

Université de Montréal

Stratégies de prévention du stress oxydatif associé au syndrome d'ischémie-reperfusion cardiaque.

**par
Julie Brunet**

**Département de Nutrition
Faculté de médecine**

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

février, 1998

© Julie Brunet, 1998



QU
145
U58
1998
V. 007

Université de Montréal

Stratégies de prévention de crises de panique au syndrôme de stress post-traumatique

par
Julie Brunet

Département de psychologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en psychologie
Université de Montréal

Janvier, 1998

Julie Brunet, 1998



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:
Stratégies de prévention du stress oxydatif associé au syndrome d'ischémie-
reperfusion cardiaque.

Présentée par:
Julie Brunet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Sylvain Chemtob	Président du jury
Dr Christine Des Rosiers	Directeur de recherche
Dr Jane Montgomery	Membre du jury
Dr John Kingma Jr.	Examineur externe
Dr Chantal Lambert	Représentante du doyen

Thèse acceptée le:.....22.06.1998.....

SOMMAIRE

Ce projet de doctorat s'intégrait dans un programme de recherche dont l'objectif à long terme était une meilleure définition des modalités et indications de la thérapie antioxydante pour la protection du coeur contre les dommages reliés à l'ischémie-reperfusion. Parmi les nombreux défis à relever dans ce domaine, il nous apparaissait pertinent de clarifier la contribution relative des espèces réactives oxygénées aux dommages observés, puisque ceci s'avère déterminant pour le choix du ou des antioxydants à préconiser. Nous avons donc entrepris d'évaluer la contribution du radical hydroxyle.

L'hypothèse d'une participation de ce radical aux dommages d'ischémie-reperfusion semblait plausible vu qu'il était reconnu comme une espèce radicalaire très toxique. Afin de mettre en évidence une relation de cause (radical hydroxyle) à effet (dommages), notre stratégie a été d'utiliser conjointement une méthode de détection, soit la formation de produits aromatiques hydroxylés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, et un antioxydant soluble ayant une bonne affinité pour ce radical, soit le N-acétylcystéine. Rétrospectivement, le choix de cette molécule antioxydante s'est avéré déterminant quant à l'orientation de ce projet de recherche. De fait, la mise en évidence d'un effet modulateur du N-acétylcystéine sur le débit coronarien dès la première série d'expérience a donné lieu à des expériences subséquentes, lesquelles visaient à préciser le ou les mécanismes en cause.

Pour réaliser cette recherche, nous avons utilisé le coeur isolé de rat perfusé selon le mode Langendorff. La séquence des événements associés à l'ischémie-reperfusion a été documentée par la mesure temporelle et continue tout au long des perfusions de divers indices: (i) production de radical hydroxyle, (ii) nécrose cellulaire (libération de la lactate déshydrogénase), (iii) stress oxydatif (libération de glutathion), et (iv) fonction métabolique (libération de lactate et de pyruvate). De plus, le dosage d'indices tissulaires (nucléotides adényliques et glutathion) après chaque expérience et la mesure de paramètres physiologiques (débit coronarien, rythme cardiaque,

pression systolique et diastolique, dp/dt) au cours des perfusions, nous ont permis d'évaluer la condition des coeurs suite à différents traitements.

Dans une première série d'expériences, les coeurs perfusés ont subi une ischémie partielle de 90 minutes (1ml/min) suivie d'une reperfusion de 30 minutes. Pour la seconde série d'expériences, nous avons d'abord préservé les coeurs isolés de rats pendant 4h dans une solution cardioplégique à 4°C avant de les reperfuser selon le mode Langendorff. Finalement, pour la troisième série d'expériences, nous avons fait subir aux coeurs une ischémie globale de 15 minutes avant de les reperfuser pendant 30 minutes.

En résumé, cette étude soulève d'une part un questionnement quant à la contribution du radical hydroxyle aux dommages observés lors de l'ischémie-reperfusion, et par conséquent sur l'efficacité d'une thérapie antioxydante ciblée sur cette espèce radicalaire. D'autre part, nos résultats mettent en évidence un effet modulateur du N-acétylcystéine sur le débit coronarien des coeurs reperfusés. Cet effet semble attribuable à la présence sur cette molécule d'un groupement thiol plutôt qu'à son activité de piègeur des radicaux hydroxyles. Le mécanisme impliqué dans cet effet modulateur du N-acétylcystéine, lequel a été observé dans trois protocoles différents d'ischémie-reperfusion, semble varier en fonction du temps d'addition du N-acétylcystéine et des conditions de perfusion. Parmi les facteurs mis en cause, tel que suggéré par nos résultats, mentionnons l'effet permissif des substrats exogènes, probablement le lactate, la formation d'oxyde nitrique et de dérivés S-nitrosothiols et l'activité des canaux K^+_{ATP} . Cet effet modulateur du N-acétylcystéine sur le débit coronarien pourrait être à l'origine des effets hypotenseurs rapportés lors de son administration chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
Identification du jury.....	i
Sommaire.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvi
<hr/>	
Chapitre I. REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	2
2. LE SYNDROME D'ISCHÉMIE-REPERFUSION CARDIAQUE.....	4
2.1. Définitions et descriptions.....	4
2.1.1. <i>L'ischémie</i>	5
2.1.2. <i>La reperfusion</i>	6
2.2. Pathophysiologie.....	7
2.2.1. <i>Hypothèse du calcium</i>	7
2.2.2. <i>Hypothèse des espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote</i>	7
2.3. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).....	8
2.3.1. <i>Définition</i>	8
2.3.2. <i>Principales sources</i>	9
2.3.2.1. Chaîne de transport d'électrons.....	11
2.3.2.2. Xanthine oxydase.....	11
2.3.2.3. NADPH-oxydase et myéloperoxydase.....	11
2.3.2.4. Cyclo-oxygénase et lipoxygénase.....	12

	Page
2.3.2.5. Catécholamines.....	12
2.3.2.6. Système des oxydases à fonctions mixtes.....	13
2.3.2.7. NADH-oxydase.....	13
2.3.2.8. Autres voies.....	13
2.3.3. <i>Cibles</i>	14
2.3.4. <i>Systèmes de protection</i>	16
2.3.4.1. Les systèmes enzymatiques.....	18
2.3.4.2. Les systèmes non-enzymatiques.....	21
2.3.5. <i>Méthodes d'évaluation ou de détection des ERO</i>	23
2.3.5.1. EPR.....	23
2.3.5.2. HPLC.....	23
2.3.5.3. Chimiluminescence.....	24
2.3.5.4. Mesure des produits de la peroxydation des lipides.....	24
2.4. Espèces réactives dérivées de l'oxyde nitrique (ERN)	24
2.4.1. <i>Historique</i>	24
2.4.2. <i>Synthèse et régulation du NO</i>	25
2.4.3. <i>Catégories</i>	27
2.4.4. <i>Fonctions</i>	27
2.4.4.1. Régulation du débit coronarien.....	28
2.5. Interactions ERO et ERN	28
2.5.1. <i>Evidences expérimentales reliant les ERO au syndrome d'I-R</i>	30
3. CARDIOPROTECTION	36
3.1. Généralités	36
3.1.1. <i>Interventions nutritionnelles</i>	36
3.1.1.1. Antioxydants.....	36
3.1.2. <i>Interventions métaboliques</i>	38

	Page
3.1.2.1. Acides aminés.....	38
3.1.2.2. Intermédiaires du cycle de Krebs	39
3.1.2.3. Intermédiaires de la glycolyse.....	40
3.1.2.4. Glucose et insuline.....	41
3.1.2.5. Dichloroacétate.....	41
3.1.2.6. Adénosine.....	42
3.1.3. <i>Interventions pharmacologiques</i>	43
3.1.3.1. Bloqueurs bêta-adrénergiques.....	43
3.1.3.2. Inhibiteurs calciques.....	43
3.1.3.3. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE).....	44
3.1.3.4. Nitrovasodilatateurs.....	45
3.1.3.5. Inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines.....	45
3.1.4. <i>Interventions mécaniques</i>	45
3.1.4.1. Préconditionnement ischémique.....	46
3.1.4.2. Modification des paramètres physico-chimiques.....	46
3.1.5. <i>Interventions géniques</i>	48
3.2. Cardioplégie	48
3.2.1. <i>Généralité</i>	48
3.2.2. <i>La préservation du greffon cardiaque</i>	49
3.2.2.1. <i>Température</i>	50
3.2.2.2. <i>Modes de préservation</i>	51
3.2.3. <i>Solutions cardioplégiques et de préservation</i>	51
3.2.3.1. Caractéristiques des solutions.....	52
3.2.3.2. Composition des solutions.....	54
3.2.3.3. Les solutions les plus utilisées.....	58
Chapitre II. <u>STRATÉGIE DE PROJET</u>	61

Chapitre III. <u>ARTICLE ET MANUSCRIT</u>	66
1. Effect of N-acetylcysteine in the rat heart reperfused after low-flow ischemia: Evidence for a direct scavenging of hydroxyl radicals and a nitric oxide-dependent increase in coronary flow	67
2. Energy substrates and reactive oxygen species modulate the flow response of rat hearts reperfused with N-acetylcysteine	79
<hr/>	
Chapitre IV. <u>DISCUSSION GÉNÉRALE</u>	119
1. INTRODUCTION	120
2. CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES	121
2.1. Les modèles d'étude	121
2.2. Les paramètres d'évaluation de la condition des coeurs	123
2.2.1. <i>Indice de production de ERO</i>	123
2.2.2. <i>Indice du stress oxydatif</i>	124
2.2.3. <i>Indice de la nécrose cellulaire</i>	125
2.2.4. <i>Indice du statut énergétique</i>	125
2.2.5. <i>Paramètres fonctionnels</i>	125
2.3. Le NAC comme antioxydant	126
2.4. La solution de préservation	127
2.5. La composition des tampons de perfusion	128

3. CONSIDÉRATIONS PHYSIOLOGIQUES.....	129
3.1. Rôles des ERO dans le syndrome d'ischémie-reperfusion.....	129
3.1.1. <i>Production de ·OH.....</i>	129
3.1.2. <i>Relation ·OH et nécrose cellulaire.....</i>	131
3.1.3. <i>Relation ·OH et fonction cardiaque et débit coronarien.....</i>	132
3.1.4. <i>Importance des piègeurs de ·OH dans la prévention du syndrome d'I-R.....</i>	133
3.2. Potentiel thérapeutique du NAC.....	133
3.2.1. <i>Effets cardioprotecteurs du NAC.....</i>	133
3.2.2. <i>Modulation par le NAC du débit coronarien.....</i>	135
3.2.2.1 <i>Rôle des thiols et des ERON.....</i>	135
3.2.2.2. <i>Rôle des substrats énergétiques.....</i>	137
3.2.2.3. <i>Rôle des canaux K⁺_{ATP}.....</i>	140
4. PROJETS FUTURS.....	145
Chapitre V. <u>CONCLUSION GÉNÉRALE</u>.....	146
Chapitre VI. <u>RÉFÉRENCES</u>.....	149

LISTE DES TABLEAUX

Cette thèse est présentée sous forme de "thèse par articles". Pour éviter toute confusion, tous les tableaux et les figures sont répertoriés par chapitres avec un numéro et une page.

Chapitre I. Revue de littérature

	page
Tableau 1: Principaux systèmes de défenses enzymatiques.....	17
Tableau 2: Principaux systèmes de défenses non-enzymatiques.....	18
Tableau 3: Principaux agents antioxydants étudiés.....	33
Tableau 4: Caractéristiques des solutions de préservation sujets à la controverse.....	53
Tableau 5: Composition de base des solutions cardioplégiques.....	55
Tableau 6: Composés ajoutés aux solutions cardioplégiques.....	57
Tableau 7: Les principales solutions de préservation utilisées pour le coeur.....	58

Chapitre II. Article et manuscrit

1. **Effects of *N*-acetylcysteine in the rat heart reperfused after low-flow ischemia: Evidence for a direct scavenging of hydroxyl radicals and a nitric oxide-dependent increase in coronary flow.**

page

Tableau 1:	Content in GSH and GSSG of hearts reperfused for 30 min after 90 min of low-flow ischemia without or with 100 μ M NAC....	75
Tableau 2:	Effect of time addition of NAC on various parameters.....	76
Tableau 3:	Effects of 100 μ M NNLA on the coronary flow rate of reperfused ischemic hearts treated with 100 μ M NAC.....	77

2. **Energy substrates and reactive oxygen species modulate the flow response of rat hearts reperfused with *N*-acetylcysteine.**

Tableau 1:	Effect of a 4H hypothermic preservation in Celsior solution on the myocardial glutathione and adenine nucleotide status.....	108
-------------------	--	-----

LISTE DES FIGURES

Chapitre I. Revue de littérature

	page
Figure 1: Décès reliés aux maladies cardiovasculaires chez les hommes canadiens entre 1951-1995.....	3
Figure 2: Sources de formation d'ERO.....	10
Figure 3: Processus de lipoperoxydation.....	15
Figure 4: Complémentarité et synergisme des molécules antioxydantes.....	19
Figure 5: Cycle du glutathion.....	20
Figure 6: Synthèse et régulation du $\cdot\text{NO}$	26
Figure 7: Régulation du débit coronarien par le $\cdot\text{NO}$	29
Figure 8: Interactions ERO et ERN.....	31

Chapitre III. Article et manuscrit

- 1. Effects of *N*-acetylcysteine in the rat heart reperfused after low-flow ischemia: Evidence for a direct scavenging of hydroxyl radicals and a nitric oxide-dependent increase in coronary flow.**

	Page
Figure 1: Effect of low-flow ischemia (LF) and reperfusion (R) on the production (A) and the concentration (B) of 34DHBZ by isolated rat hearts perfused without (white bars) or with 100 μM NAC (black bars).....	70

Figure 2:	Effects of low-flow ischemia (LF) and reperfusion (R) on the release of LDH (A) and GSH + GSSG (B) by isolated rat hearts perfused without (white bars) or with 100 μ M NAC (black bars).....	71
Figure 3:	Effects of low-flow ischemia (LF) and reperfusion (R) on the total (A) and ratio (B) of lactate and pyruvate released by isolated rat hearts perfused without (white bars) or with 100 μ M NAC (black bars).....	72
Figure 4:	Effects of low-flow ischemia (LF) and reperfusion (R) on the (A) coronary flow rate and (B) heart rate of isolated rat hearts perfused without (white bars) or with 100 μ M NAC (black bars).....	73

2. Energy substrates and reactive oxygen species modulate the flow response of rat hearts reperfused with N-acetylcysteine.

Figure 1:	Effect of sudden vs staged reperfusion of preserved hearts on the time-profile of coronary flow (A) and LDH release (B) rates.....	114
Figure 2:	Biochemical (A&B) and functional parameters (C) measured in hearts reperfused under various conditions after 4 h hypothermic preservation.....	115
Figure 3:	Effect of an antioxidant and/or energetic interventions on the coronary flow response of preserved/reperfused hearts.....	116

	Page
Figure 4: Effects of ROS addition and DCA removal on the coronary flow response of preserved hearts reperfused with a combined antioxidant and energetic therapy.....	117
Figure 5: Effects of exogenous energy substrates in the absence (A) or presence (B) of a K ⁺ _{ATP} channel inhibitor (glibenclamide) on the coronary flow rate of NAC-treated hearts subjected to 15 min global ischemia and 30 min reperfusion.....	118

Chapitre IV. Discussion

	Page
Figure 9: Rôle potentiel d'une NADH-oxydase dans la modulation du débit coronarien.....	139
Figure 10: Rôle du H ₂ O ₂ et des thiols dans la régulation du débit coronarien.....	142
Figure 11: Principaux facteurs intervenants dans la modulation du débit coronarien.....	144

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

CAT: Catalase
CK: Créatine kinase
CP: Créatine phosphate
C-R: Cardioplégie-reperfusion
DCA: Dichloroacétate
34DHBZ: 3,4-dihydroxybenzoate
EPR: Spectroscopie par résonance paramagnétique électronique
ERO: Espèces réactives dérivées de l'oxygène
ERON: Espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'oxyde nitrique
ERN: Espèces réactives dérivées de l'oxyde nitrique
ESR: Spectroscopie par résonance d'électrons non-appariés
sGC: Guanylate cyclase soluble
GCMS: Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
cGMP: Guanosine- 3', 5'-monophosphate cyclique
GSH: Glutathion réduit
GSHpx: Glutathion peroxydase
GSHrx: Glutathion réductase
GSSG: Glutathion oxydé
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HPLC: Chromatographie liquide à haute performance
I-R: Ischémie-reperfusion
LDH: Lactate déshydrogénase
MCV: Maladies cardiovasculaires
MDA: Malondialdéhyde
NAC: N-acétylcystéine
NNLA: N- ω -nitro-L-arginine
NO: Oxyde nitrique
NOS: Oxyde nitrique synthase
NO₂⁻: Nitrite

NO_3^- : Nitrate

O_2^- : Anion superoxyde

$^1\text{O}_2$: Oxygène singulet

$\cdot\text{OH}$: Radical hydroxyle

ONOO^- : Peroxynitrite

PDH: Pyruvate déshydrogénase

SOD: Superoxyde dismutase

XO: Xanthine oxydase

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement toutes les personnes qui, à divers titres, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Plus particulièrement, j'exprime une sincère gratitude au docteur Christine Des Rosiers, pour avoir accepté de diriger mes travaux, pour sa disponibilité, ses judicieux conseils, sa souplesse et son encouragement constant. Ses nombreuses connaissances et son dynamisme m'ont permis de mener à bien mon projet de doctorat malgré les multiples revirements liés aux aléas de la recherche fondamentale.

Je tiens aussi à la remercier pour m'avoir permis d'enrichir ma formation en m'offrant l'opportunité d'assister et de présenter mes résultats à plusieurs congrès internationaux.

Je remercie également le docteur Christine Des Rosiers pour son soutien financier, sans lequel il m'aurait été très difficile de compléter mes études et aussi le département de nutrition de l'Université de Montréal qui m'a fourni pendant deux ans des bourses d'études complémentaires.

Ma reconnaissance s'adresse également à Annick Laplante et Blandine Comte, avec qui j'ai partagé les joies et les frustrations de la recherche et qui sont devenues de précieuses amies.

Enfin, je remercie sincèrement mon conjoint, Sylvain pour son support, son soutien moral et ses conseils, ainsi que mes parents, pour avoir cru en mes capacités, tout au long de la réalisation de ce projet.

Chapitre I. REVUE DE LITTÉRATURE

Chapitre I. REVUE DE LITTÉRATURE

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont encore aujourd'hui la principale cause de décès et d'invalidité dans la plupart des sociétés industrialisées. En 1995, 37% des décès au Canada étaient attribuables aux MCV³⁸¹. Comparativement aux statistiques des années 50 et 60, on note cependant une amélioration constante (*Figure. 1*), due aux progrès considérables accomplis dans l'identification des facteurs de risque et dans le traitement pharmacologique et chirurgical des MCV. Malheureusement, la morbidité et la mortalité demeurent spécialement élevées chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde. En fait, la cardiopathie ischémique était responsable de 56% des décès associés aux MCV en 1995. De ce nombre, la moitié était due à un infarctus aigu du myocarde.

Au cours des quinze dernières années, un grand nombre d'études dans le domaine de recherche des MCV a porté sur la caractérisation des "lésions de reperfusion", plus récemment nommé "syndrome d'ischémie-reperfusion". Ce terme réfère à une série d'événements apparaissant à la reperfusion du coeur ischémique soit l'arythmie, la sidération myocardique et endothéliale et la nécrose cellulaire. De nombreuses évidences expérimentales incriminent les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO), comme facteurs contributifs à l'arythmie et à la sidération myocardique ou endothéliale, toutefois leur implication dans la mort cellulaire est controversée. Ceci explique en partie les résultats plutôt décevants des thérapies antioxydantes (lesquelles limitent l'effet toxique des ERO) lors de l'infarctus, un état qui inclut une composante importante de nécrose. En outre, l'application clinique des thérapies antioxydantes semble plus prometteuse lors de la transplantation et/ou de la chirurgie cardiaque et lorsque se produisent des épisodes répétés et transitoires d'ischémie-reperfusion (thrombolyse, angine). Toutefois, les modalités de ces thérapies antioxydantes n'ont pas été définies précisément.

Etant donné l'abondance de littérature traitant des antioxydants, des espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'oxyde nitrique, cette revue bibliographique ne peut être exhaustive, bien qu'elle tente de cerner les effets de ces différents facteurs dans le syndrome d'ischémie-reperfusion cardiaque. Aussi, les références citées sont souvent des revues de la littérature.

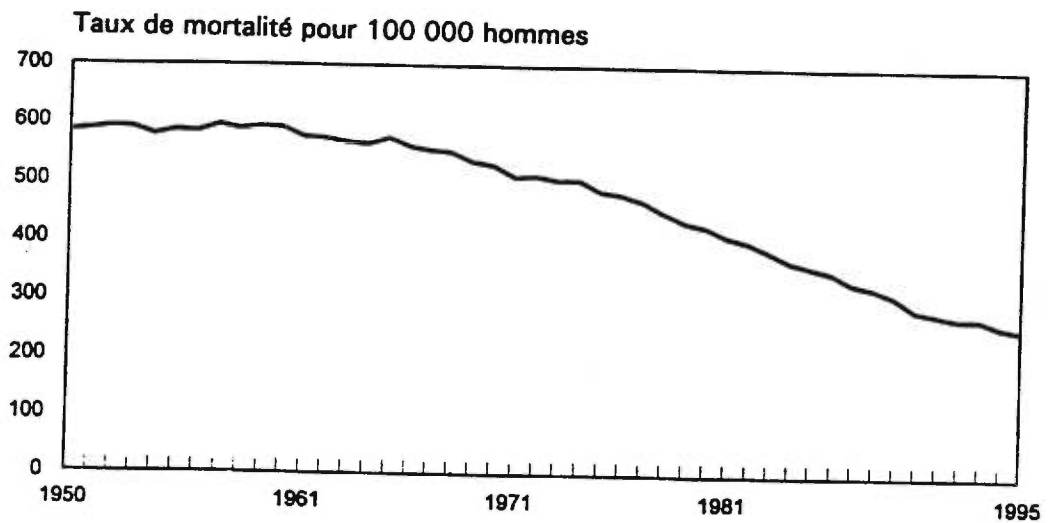


Figure 1. Décès reliés aux maladies cardiovasculaires chez les hommes canadiens entre 1951-1995.

Ajustés en fonction de l'âge d'après la population mâle canadienne de 1991³⁸¹.

2. LE SYNDROME D'ISCHÉMIE-REPERFUSION CARDIAQUE

2.1. Définitions et descriptions

L'ischémie suivie d'une reperfusion induit une série de phénomènes caractéristiques nommés syndrome d'ischémie-reperfusion (I-R). Ces phénomènes sont: la sidération myocardique, la sidération endothéliale, l'arythmie et la nécrose cellulaire.

La sidération myocardique est une dysfonction mécanique réversible, sévère et prolongée, observée suite à une ischémie, malgré une reperfusion normale et l'absence de nécrose cellulaire¹⁶⁵. La sévérité de la sidération myocardique serait proportionnelle à la durée de l'ischémie.

La sidération endothéliale ou vasculaire réfère à une altération dans la fonction des vaisseaux viables après l'ischémie et la reperfusion^{43,168}. Ce phénomène, qui peut se manifester par une reperfusion ralentie et une diminution dans la réserve de vasodilatateurs coronariens, concerne principalement l'endothélium, un tissu important dans l'homéostasie des vaisseaux sanguins.

Le troisième phénomène associé au syndrome d'I-R est l'arythmie. Les différents types d'arythmies, dont la fibrillation ventriculaire, sont des manifestations du dérangement électrophysiologique de la cellule⁸² qui se produisent surtout suite à une ischémie régionale. En fait, la fibrillation ventriculaire serait la principale cause de décès chez l'homme lors d'une ischémie myocardique aiguë.

Finalement, le quatrième phénomène associé au syndrome d'I-R est la nécrose cellulaire ou la mort d'une partie du tissu myocardique. Il y a encore un débat à savoir si ce phénomène se produit à la reperfusion seulement, s'il est causé par l'ischémie ou s'il provient de la combinaison I-R.

2.1.1. L'ischémie

L'ischémie cardiaque se caractérise par l'interruption du flux sanguin donc par une diminution de l'apport en oxygène au niveau du myocarde. L'ischémie peut être globale ou régionale, instituée volontairement comme c'est le cas lors d'une chirurgie de revascularisation ou lors de la préservation du greffon cardiaque pour une transplantation, ou être causée par une diminution du débit sanguin suite à l'athérosclérose.

Il existe deux autres conditions qui ne seront pas discutées dans cette thèse mais qui doivent être mentionnées car elles s'apparentent à l'ischémie. D'abord l'anoxie, une condition expérimentale qui se caractérise par une absence d'oxygène mais sans restriction de débit, et aussi l'hypoxie, une condition où il y a une baisse de la concentration d'oxygène sans variation de débit, ce qui est caractéristique de la vie en haute altitude.

Concernant le degré d'ischémie, si elle est globale, comme c'est le cas lors de la cardioplégie avec une solution non-oxygénée en hypothermie, aucun substrat exogène n'est disponible mais l'énergie peut être obtenue par la scission du glycogène endogène en lactate. Un contenu élevé en glycogène serait bénéfique durant des ischémies de courte durée mais non durant celles de longue durée où le glycogène serait tout de même déplété totalement et où des dommages myocardiques apparaîtraient, exacerbés par un pH faible qui mène à l'augmentation des échanges Na^+ / H^+ durant la reperfusion⁸⁰.

Lors d'une ischémie partielle ou régionale (avec un débit résiduel), le flux glycolytique joue un rôle essentiel dans la génération d'ATP. Les substrats mitochondriaux seuls ne permettent pas une récupération de la créatine phosphate (CP), et l'ATP généré seulement par la phosphorylation oxydative n'est pas suffisant pour promouvoir la récupération métabolique ou maintenir la fonction diastolique durant l'ischémie partielle modérée³⁵⁹. En fait, le flux glycolytique diminue en fonction du débit coronarien même si l'extraction de glucose augmente à faible débit, ce qui suggère

que le débit coronarien est l'élément limitant lors d'ischémie partielle. Le débit coronarien résiduel pourrait donc être le facteur crucial qui détermine si un approvisionnement de glucose sera bénéfique ou néfaste dans le développement des contractures ischémiques²⁰¹.

Par ailleurs, l'hibernation myocardique est un état chronique de dysfonction contractile régionale du ventricule gauche associé à la maladie coronarienne. La diminution de la fonction contractile réduit la demande en oxygène du coeur dans une condition où l'apport est faible car le débit sanguin est réduit⁴²⁶. L'hibernation myocardique est une situation réversible avec une reperfusion normale et est parfois décrite comme une réponse adaptative du coeur à un apport d'oxygène à peine suffisant pour maintenir les fonctions biochimiques responsables de l'intégrité des cellules.

2.1.2. La reperfusion

La reperfusion se définit par le retour d'un débit et d'une oxygénation normale au myocarde. Lorsqu'un tissu est privé d'oxygène, en particulier le myocarde, le rétablissement du débit sanguin est un pré-requis absolu pour la survie. Toutefois, paradoxalement, il peut aussi entraîner des lésions du myocarde, appelées lésions de reperfusion^{20,49,163}. C'est dans les années 70, qu'a été soulevée la possibilité que la reperfusion puisse endommager les myocytes déjà lésés par l'ischémie¹⁶⁴. Mais ce n'est qu'en 1983 que le concept de "lésions de reperfusion" a vu le jour³⁴². En effet, la reperfusion est associée avec une libération d'enzymes, une augmentation transitoire de la pression diastolique, une diminution de la contractilité, un influx de calcium, des altérations de la fonction mitochondriale, des dommages aux membranes cellulaires et même de la nécrose. Encore aujourd'hui, les preuves qui relient la mort cellulaire et les autres phénomènes à la reperfusion sont faibles. Pour comprendre les mécanismes impliqués, il faudrait concentrer les efforts sur la réalisation d'études visant uniquement une intervention au moment même de la reperfusion.

2.2. Pathophysiologie

Le syndrome d'I-R est complexe et multifactoriel. Les événements biochimiques qui ont été associés aux altérations fonctionnelles observées lors de l'I-R sont les suivants: les mouvements de certains ions (Ca^{2+} , Na^+ , H^+ , K^+) de part et d'autre de la membrane cellulaire, la dégradation des substrats énergétiques (CP, nucléotides adényliques), l'accumulation de produits toxiques du métabolisme (ions H^+ , acyl-CoA) et la production d'ERO. Toutefois, le déroulement précis de ces différents événements, ainsi que leur contribution respective à la pathophysiologie du syndrome d'I-R ne sont pas encore connus avec précision. Deux hypothèses principales se dégagent de la littérature, soient: L'accumulation massive de calcium ionisé (Ca^{2+}) dans le cytosol^{193,297} et la production d'ERO^{41,118,252,335,457}. Plus récemment, la production d'espèces réactives dérivées de l'oxyde nitrique (ERN)^{96,361,435,454} a été proposé comme hypothèse complémentaire à celle des ERO. Il convient de mentionner que les deux hypothèses retenues sont toutefois interdépendantes.

2.2.1. Hypothèse du calcium

L'homéostasie du calcium intracellulaire joue un rôle significatif dans la régulation du métabolisme cellulaire ainsi que dans de nombreux processus physiologiques dont la contraction. Lors d'une l'ischémie suivie d'une reperfusion, l'accumulation de calcium intracellulaire attribuée en partie à une augmentation des échanges séquentielles H^+/Na^+ et $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ¹⁴² et à un mauvais fonctionnement des pompes catalysant ces échanges^{47,421}, serait à l'origine de la destruction des membranes plasmiques et mitochondriales¹²⁰ menant éventuellement à la mort cellulaire¹⁹³ et à l'arythmie^{100,298}. Cette hypothèse a été formulée sur la base de nombreuses études qui montraient le bénéfice d'une réduction de la concentration extracellulaire de calcium à la reperfusion^{126,169} et/ou d'un pré-traitement avec des antagonistes calciques^{152,174} avant l'ischémie, sur la sidération myocardique et l'incidence d'arythmie.

2.2.2. Hypothèse des espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote

La seconde hypothèse implique les espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote (ERON) comme facteurs responsables des dommages cellulaires induits par

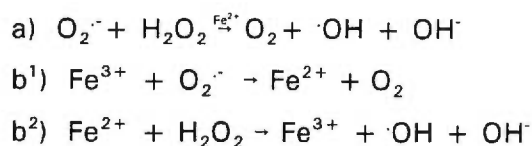
l'ischémie et la reperfusion myocardique. Plusieurs études ont montré que la libération d'ERO^{9,15,42,136,172,296,462} ou d'ERN^{361,435,454} est un phénomène étroitement lié au début de la reperfusion. Ainsi, une corrélation entre la production d'ERO et la sidération myocardique a été observée par plusieurs auteurs^{40,128,321}, surtout dans des modèles d'ischémie de courte durée²³⁶ où la nécrose est moins importante. Par ailleurs, la relation entre les ERO et la nécrose n'est pas claire. Alors que la libération d'ERO prend une forme de cloche en fonction de la durée de l'ischémie, la nécrose augmente de façon exponentielle⁴⁶⁵. D'autre part, le lien entre la sidération endothéliale et la production d'ERN n'a été exploré que récemment et met en cause l'atteinte du complexe récepteurs-protéines G et l'activation de l'enzyme nitrique oxyde synthase (NOS)³⁶². Enfin, dans un modèle d'I-R, l'arythmie serait causée, du moins en partie, par la génération d'ERO^{25,240,412}, quoique certains auteurs réfutent cette hypothèse^{73,113}.

Bien que nous reconnaissons le rôle important du calcium dans le syndrome d'I-R, l'abondance de littérature du début des années 90 et la technologie à notre disposition ont orienté nos recherches vers l'hypothèse des ERON. Les prochaines sections présenteront de façon plus détaillée la littérature pertinente à cette hypothèse puisqu'elle est directement reliée au sujet de cette thèse.

2.3. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).

2.3.1. Définition

Le terme "radical libre" réfère aux entités chimiques possédant un ou plusieurs électrons non-appariés. Le terme "espèces réactives dérivées de l'oxygène" ou ERO réfère aux entités chimiques formées suite à la réduction monovalente de la molécule d'oxygène. Ainsi, la première étape de cette réduction conduit à l'anion superoxyde (O_2^-), lequel peut être converti enzymatiquement ou chimiquement en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence de complexes de fer, le H_2O_2 se décompose en espèce à très fort potentiel d'oxydation, soit principalement le radical hydroxyle ($\cdot OH$) via les réactions de Haber-Weiss (a) et de Fenton (b):



Il est à noter que tous ces ERO, sauf le H_2O_2 et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) sont aussi des radicaux libres. Toutes ces espèces chimiques ont par ailleurs une réactivité et une toxicité très variables et la plupart ont une demi-vie très courte. Ainsi, il est très difficile de les mesurer et de les étudier même si leur production est permanente dans l'organisme en raison du caractère ubiquitaire de l' O_2 et du fer.

Le H_2O_2 , le $\text{O}_2^{\cdot-}$, le $\cdot\text{OH}$, et l' $^1\text{O}_2$ ont été impliqués dans le syndrome d'I-R. Plus précisément, la majorité des études *in vivo* et *in vitro* incrimine les radicaux hydroxyles comme facteurs contributifs à la sidération myocardique⁴¹ et le H_2O_2 comme précurseur du $\cdot\text{OH}$ ¹⁵⁴. D'autre part, l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ serait plutôt relié à la sidération endothéliale^{233,417}, alors que quelques études mentionnent son implication dans les dommages de reperfusion^{213,459}.

2.3.2. Principales sources

Plusieurs sites de formation d'ERO ont été décrits, autant intracellulaires qu'extracellulaires et varieraient selon le tissu et l'espèce étudiée. Divers types cellulaires et tissus donnent naissance à des ERO par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normal et parfois en réponse à un stimuli spécifique. Notons qu'il peut y avoir plusieurs sources différentes à l'intérieur d'un site. Nous décrirons ici les principales sources potentiellement présentes dans le coeur²¹³ et nous discuterons de leur importance relative dans le syndrome d'I-R, puisque plusieurs évidences montrent que des ERO seraient produits en grande quantité lorsque le coeur privé d'oxygène est réoxygéné^{15,42,136,462}. La *Figure 2* schématise les effets de quelques-unes de ces sources.

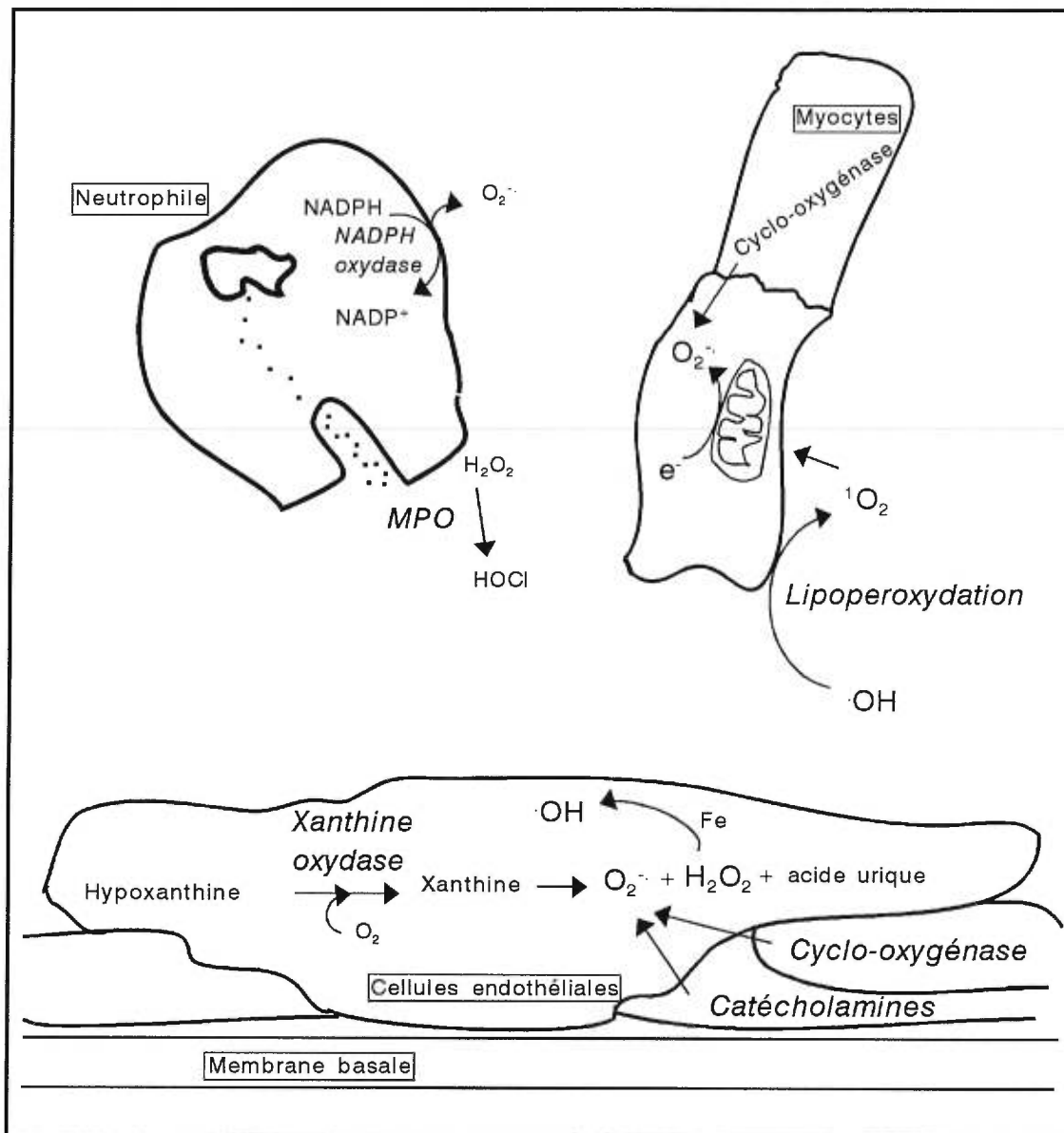


Figure 2. Sources de formation d'ERO.

Abréviations: MPO = myéloperoxydase, HOCl = acide hypochlorique, Fe²⁺ = fer ferreux.

2.3.2.1. Chaîne de transport d'électrons: En conditions physiologiques, la chaîne de transport d'électrons, située dans les mitochondries, est la source la plus importante de production d'ERO. Environ 2% de l'oxygène utilisée par les mitochondries aérobies intactes est partiellement réduite par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire, formant ainsi le $O_2^{\cdot-121}$. Cette fuite d'électrons est augmentée durant l'ischémie par l'état réduit des transporteurs de la chaîne respiratoire et davantage au début de la reperfusion lorsque l'oxygène est réintroduit dans des conditions où le NADH est élevé et où il y a absence d'ADP. Bien qu'il existe peu de preuves directes^{5,213}, il y a peu d'études²⁷³ qui réfutent le rôle de cette source dans la production d'ERO lors du syndrome d'I-R.

2.3.2.2. Xanthine oxydase: A l'état normal, les tissus contiennent peu de xanthine oxydase (XO), laquelle se retrouve principalement dans les cellules endothéliales. Au cours de l'ischémie, l'activation d'une protéine kinase causée par l'accumulation de calcium cytosolique ou par l'oxydation des groupements thiols, convertit la xanthine déshydrogénase, une enzyme qui ne produit pas de ERO, en XO. La dégradation de l'ATP cellulaire conduit à l'accumulation d'hypoxanthine¹⁴¹, qui en présence d'oxygène à la reperfusion, est transformé par la XO en xanthine, puis en acide urique. Cette production s'accompagne de la formation d' $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 ²⁵². Dans le tissu reperfusé, la XO cytoplasmique semble être une des principales sources de ERO, du moins dans le coeur isolé de rat⁴¹⁰. Il existe toutefois peu d'évidences directes^{290,450} du rôle de la XO dans le syndrome d'I-R, d'autant plus que la conversion entre la xanthine déshydrogénase et la XO serait faible et lente. De plus, la controverse demeure dans le syndrome d'I-R cardiaque chez l'humain car quelques études ont rapporté que le coeur possède peu ou pas de XO^{92,106,146} alors que d'autres ont démontré sa présence^{130,433}.

2.3.2.3. NADPH-oxydase et myéloperoxydase: Parmi les différents types de leucocytes, certains granulocytes (neutrophiles et éosinophiles) et les monocytes (macrophages) sont des cellules phagocytaires impliquées dans le processus inflammatoire. Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants au début de

la reperfusion et contiennent dans leur membrane plasmique une NADPH-oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire en O_2^- . Les neutrophiles activés sécrètent aussi l'enzyme myéloperoxydase (MPO) qui catalyse la formation de l'acide hypochlorique (HOCl)³³⁵, en plus d'induire la conversion de la xanthine déshydrogénase en XO dans les cellules endothéliales. Le rôle de la NADPH-oxydase et de la MPO dans le syndrome d'I-R cardiaque est toutefois controversé, étant donné qu'il y a tout de même présence de stress oxydatif dans des préparations sans neutrophiles et qu'il n'est toujours pas établi si les neutrophiles sont activés au début de la reperfusion ou plus tard quand les dommages de reperfusion sont déjà établis¹¹⁹. Malgré cela, plusieurs chercheurs ont proposé que les neutrophiles soient une source majeure d'ERO dans le coeur reperfusé²²⁶ principalement lors d'ischémies prolongées et/ou sévères²³².

2.3.2.4. Cyclo-oxygénase et lipoxygénase: Les perturbations du métabolisme des lipides, plus particulièrement l'activation des phospholipases par l'accumulation de calcium cytosolique, peut induire une libération d'acide arachidonique qui est métabolisé en prostaglandines et leucotriènes durant l'ischémie⁴⁰⁶. Cette voie implique un transfert d'électrons qui pourrait initier la formation de ERO, principalement l' O_2^- , par la cyclo-oxygénase et la lipoxygénase, bien que ce rôle dans le syndrome d'I-R cardiaque ne soit pas bien défini²¹³. Il est probable que cette voie soit impliquée lors d'ischémies sévères puisque l'accumulation d'acide arachidonique dans le coeur ischémique est un phénomène tardif qui apparaît après au moins 30 minutes d'ischémie et qui est aggravé par la reperfusion⁴²³.

2.3.2.5. Catécholamines: Les catécholamines produites dans les membranes cellulaires et libérées de façon importante lors de la reperfusion pourraient aussi contribuer à une formation d'ERO. Initialement, un mécanisme d'auto-oxydation avait été proposé³⁷⁰, mais plus récemment, il a été démontré que si le phénomène d'auto-oxydation se produit, il s'agit d'un processus extrêmement lent¹⁹⁵ qui a peu de chance d'être impliqué dans le syndrome d'I-R cardiaque. L'oxydation des catécholamines catalysée par une enzyme ou des métaux traces serait le mécanisme le plus probable.

2.3.2.6. Système des oxydases à fonctions mixtes: Le système des oxydases à fonctions mixtes est constitué par une chaîne de transport d'électrons similaire à celle de la chaîne respiratoire mitochondriale. Essentiellement localisé dans les microsomes, ce système comprend entre autre, des cytochrome P450 et le NADPH. Le système des oxydases à fonctions mixtes servirait à l'inactivation et l'élimination des xénobiotiques⁷⁸. L'O₂ moléculaire pourrait être activé par ce système et être transformé en substances toxiques comme l'O₂⁻⁴¹⁹. Bien que le rôle de ce système ait été démontré dans le foie⁴⁵, il ne semble pas jouer un rôle important dans le syndrome d'I-R cardiaque.

2.3.2.7. NADH-oxydase: Récemment, le rôle d'une NADH-oxydase non-mitochondriale, dépendante d'une cytochrome b558, a été mis en évidence dans des microsomes de cellules endothéliales provenant d'artères coronaires bovines^{272,274}, de muscles lisses vasculaires et de myocytes²⁷³ comme étant une source majeure de la production intracellulaire de O₂⁻. Des études antérieures^{292,422} avaient aussi mis en évidence une NADH-oxydase mitochondriale non-reliée à la chaîne de transport d'électrons dont l'activité augmentait proportionnellement à la gravité de l'ischémie dans le coeur de lapin. Selon Mohazzab-H et collaborateurs²⁷³, il s'agirait de la même enzyme et les évidences rapportées laissent croire qu'elle pourrait jouer un rôle important dans le syndrome d'I-R.

2.3.2.8. Autres voies: L'accumulation d'équivalents réducteurs pendant l'ischémie tels que le NADH, le NADPH, le lactate, les quinones et les flavoprotéines qui peuvent réagir entre eux ou avec l'oxygène, pourrait induire la formation d'ERO. La formation de méthémoglobine à partir d'oxyhémoglobine produit l'O₂⁻²⁶⁹ très lentement à pH physiologique, mais plus rapidement à pH acide comme lors d'ischémie. La lyse des hématies dans les capillaires libère des dérivés du fer qui favorisent la production d'ERO²⁵⁰. L'importance de ces deux dernières voies n'est certes pas très grande dans des modèles de coeurs isolés et perfusés sans sang où des ERO sont tout de même observés. Par contre, la formation de méthémoglobine et la lyse des hématies sont certes des voies de production de ERO non négligeables dans le syndrome d'I-R

cardiaque *in vivo*.

2.3.3. Cibles

Les métabolites dérivés de l'oxygène s'attaquent à tous les constituants cellulaires possédant un groupement nucléophile. Ainsi, les modifications structurales des bases puriques et pyrimidiques entraînent des altérations génétiques. De plus l'oxydation des groupements sulfhydryles des protéines ou des enzymes par les ERO, modifie leurs fonctions (métabolisme, transport d'ions, récepteurs, etc.). Finalement, en agissant sur les acides gras polyinsaturés par un processus de peroxydation, les ERO altèrent les propriétés des membranes cellulaires, dont la fluidité et la compartimentation. Cela modifie l'activité des récepteurs et par conséquent la fonction des seconds messagers, en plus d'entraîner la fuite des composés intracellulaires tels la lactate déshydrogénase (LDH) et la créatine kinase (CK)²¹¹. Une description de la peroxydation lipidique suivra, étant donné qu'il s'agit du processus le plus étudié^{108,112,318}.

Les différents stades de la peroxydation lipidique ont été décrits pour la première fois au début du 19^{ième} siècle. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives: i) une phase limitante d'initiation, ii) une phase explosive de propagation, et iii) une phase de terminaison (*Figure 3*).

i) *Phase d'initiation*: La phase d'initiation consiste en la formation d'un radical d'acide gras (L·) par soustraction d'un atome d'hydrogène (H·) à un groupement méthylène (CH₂) à l'aide d'une espèce radicalaire suffisamment réactive. Par réarrangement, le radical d'acide gras se stabilise en formant un diène conjugué.

ii) *Phase de propagation*: C'est une étape d'amplification, se développant en présence d'O₂, dont la concentration dans les tissus et le sang est toujours largement supérieure à celle nécessaire. L'O₂ se fixe sur le radical d'acide gras pour former un radical peroxyde (LO₂·), qui lui-même réagit avec un acide gras (LH) adjacent formant un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical lipidique (L·) qui propage la réaction.

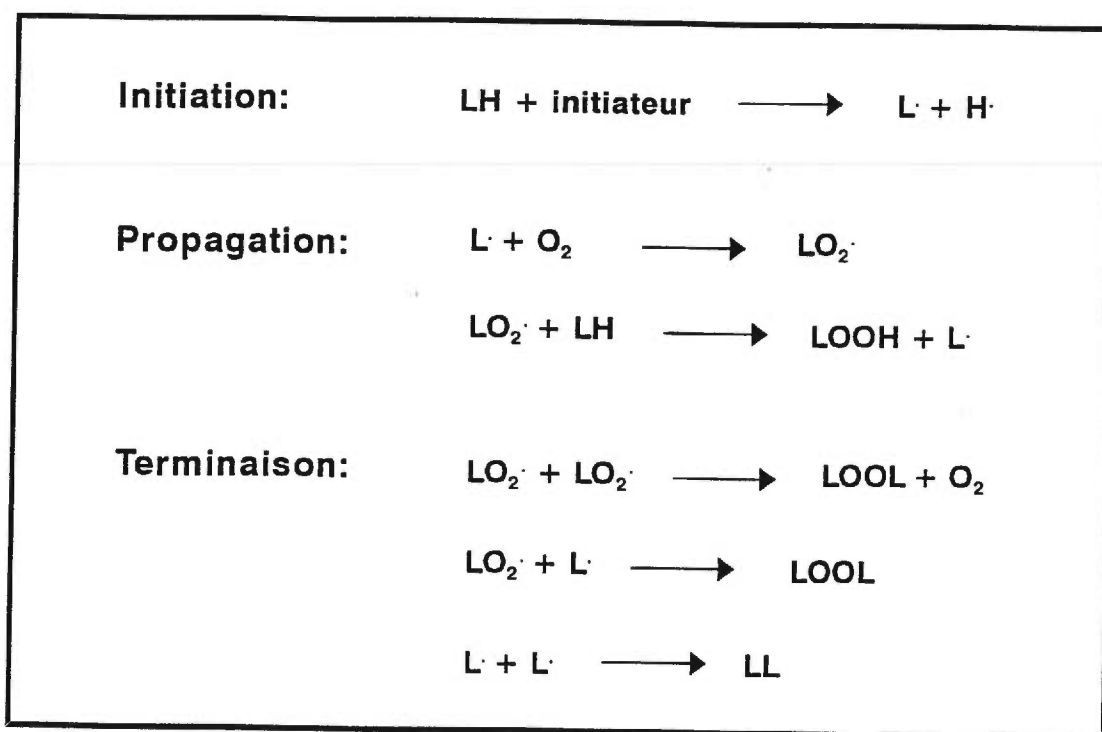


Figure 3. Processus de lipoperoxydation

Abréviations: LH = acide gras, L· = radical lipidique, LO₂· = radical peroxyde, LOOH = radical hydroperoxyde, LOOL et LL = composés stables.

Les hydroperoxydes réagissent soit avec des métaux ou soit avec l' $O_2^{\cdot-}$, pour former des aldéhydes toxiques et d'autres radicaux libres qui entretiennent la réaction par un phénomène auto-catalytique. Les aldéhydes dont l'hydroxynonéal et le malondialdéhyde (MDA) pour nommer les plus importants, peuvent ainsi réagir avec les divers constituants cellulaires et propager les dommages initialement induits par les ERO¹¹².

iii) *Phase de terminaison*: Cette dernière étape consiste en la formation de composés stables issus de l'association de deux espèces radicalaires. La probabilité de rencontre de deux radicaux libres est beaucoup plus faible que la probabilité d'une interaction ERO et acides gras polyinsaturés car ces derniers ont une concentration supérieure. Ainsi, la phase de terminaison ne peut survenir qu'après un certain temps qui, bien que bref, n'en est pas moins suffisant pour que des lésions moléculaires se soient déjà produites.

2.3.4. Systèmes de protection

Un antioxydant peut être défini comme n'importe quelle substance qui présente à faible concentration comparativement à un oxydant peut ralentir significativement ou inhiber l'oxydation d'un substrat. Les antioxydants sont donc des molécules qui peuvent prévenir la formation d'ERO, ou peuvent réagir avec ces derniers pour les neutraliser. Les termes "antioxydants" et "piégeurs de radicaux libres" sont utilisés alternativement pour décrire les différents systèmes de protection.

Dans des conditions aérobiques, le myocarde survit à la production continue de ERO grâce à l'équilibre entre la production d'oxydants par les différents systèmes cellulaires et le maintien des défenses antioxydantes. Cependant, durant l'ischémie, le myocarde est partiellement déplété de ses réserves antioxydantes et à la reperfusion, à cause de l'arrivée massive d'oxygène, la production d'ERO est augmentée, diminuant encore plus les réserves antioxydantes endogènes du coeur¹²¹. En fait, le coeur subit des dommages durant la reperfusion dont l'étendue est très dépendante de l'efficacité des défenses antioxydantes.

Le déséquilibre entre l'activité des systèmes de protection ou de défense et la production d'ERO entraîne un stress oxydatif qui peut déclencher une réaction inflammatoire et ainsi affecter la fonction et le métabolisme cardiaque⁴. C'est ce qui se produit lors du syndrome d'I-R où le stress oxydatif apparaît dans une situation où le glutathion oxydé (GSSG) s'accumule plus vite qu'il est métabolisé en glutathion réduit (GSH). En fait, la cellule peut tolérer un certain niveau de stress oxydatif, cependant dans les cas les plus sévères, elle subit des dommages importants qui peuvent mener à la mort.

Pour se défendre des attaques radicalaires, l'organisme possède deux grands systèmes de défense. Les systèmes *enzymatiques* (Tableau 1) et les systèmes *non-enzymatiques* (Tableau 2) existent et fonctionnent de façon complémentaire et synergique selon une compartimentation bien précise pour protéger les cellules contre les métabolites cytotoxiques de l'oxygène (Figure 4).

Tableau. 1. Principaux systèmes de défenses enzymatiques

Antioxydants	Fonctions
Superoxyde dismutase (SOD)	Dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène: ($O_2^{\cdot-} \rightarrow O_2 + H_2O_2$).
Catalase (CAT)	Réduire le peroxyde d'hydrogène en eau: ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$).
Glutathion peroxydase (GSHpx)	Réduire le peroxyde d'hydrogène en eau: ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + GSSG$) et les hydroperoxydes en acide hydroxyle: ($LOOH \rightarrow LOH + GSSG$).
Glutathion réductase (GSHrx)	Réduire le glutathion oxydé en glutathion réduit (GSSG \rightarrow GSH) en présence d'un co-facteur, le NADPH.

Tableau 2. Principaux systèmes de défenses non-enzymatiques

Antioxydants	Fonctions
Transferrine, céruloplasmine et albumine	Séquestrer des ions métalliques
Histidine	Piéger les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet
Taurine	Piéger l'acide hypochlorique (HOCl) et les radicaux hydroxyles
Ubiquinone	Prévenir la peroxydation lipidique
Flavonoïdes	Prévenir la peroxydation lipidique et séquestrer des ions métalliques
Vitamine E (tocophérol)	Piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulet
Vitamine C (acide ascorbique)	Recycler le radical tocophéryl en tocophérol
Beta-carotène	Piéger l'oxygène singulet
Glutathion réduit (GSH)	Co-enzyme du glutathion peroxydase, piègeurs de radicaux hydroxyles et d'oxygène singulet

2.3.4.1. Les systèmes enzymatiques: Plusieurs types de SOD sont décrits dans la littérature: une forme mitochondriale, soit une métallo-protéine contenant du manganèse à son site actif, une forme cytoplasmique contenant du cuivre et du zinc et une forme extracellulaire de SOD⁴¹⁹. Les différents types ayant tous comme rôle principal de piéger les $O_2^{\cdot-}$. Aussi, la CAT est une enzyme principalement localisée dans le cytosol qui agit en dégradant le H_2O_2 comme la GSHpx cytosolique, une métallo-enzyme contenant du sélénium. Par ailleurs, la GSHrx est très importante, car elle régénère le GSH oxydé par la GSHpx en GSSG (*Figure 5*). Il semble donc qu'aucun des systèmes enzymatiques ait spécifiquement pour cible les $\cdot OH$. De plus, bien que l'activité de la GSHpx soit relativement élevée dans le coeur, l'activité de la SOD y est environ quatre fois moins élevée que dans le foie et celle de la CAT y est très faible¹¹⁸.

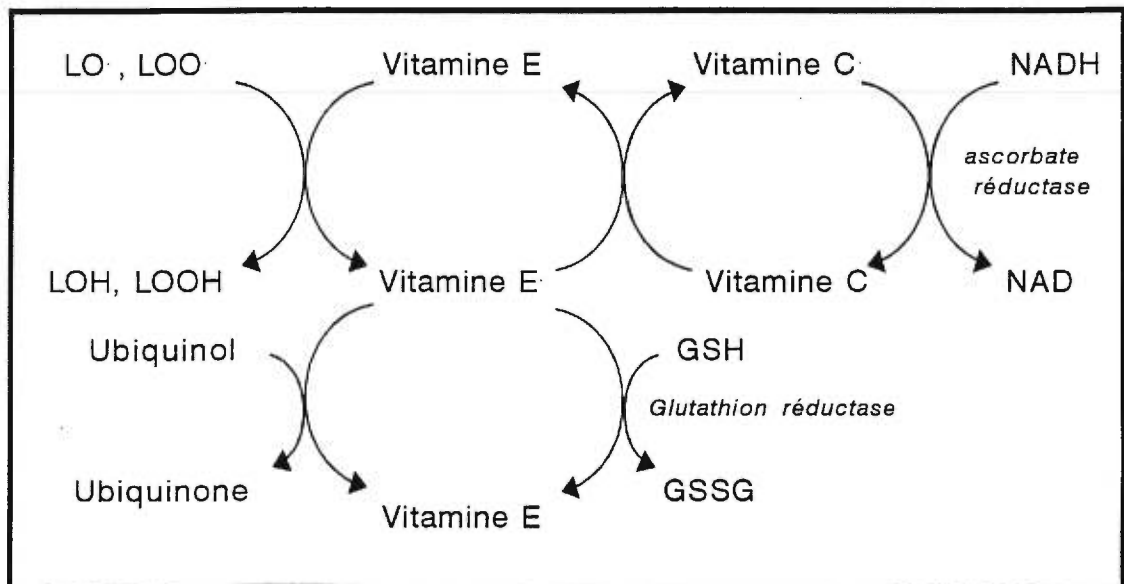


Figure 4. Complémentarité et synergisme des molécules antioxydantes

Abréviations: $LO\cdot$ = radical alkoxy, $LOO\cdot$ = radical peroxy, LOH = acide hydroxyle, $LOOH$ = hydroperoxyde

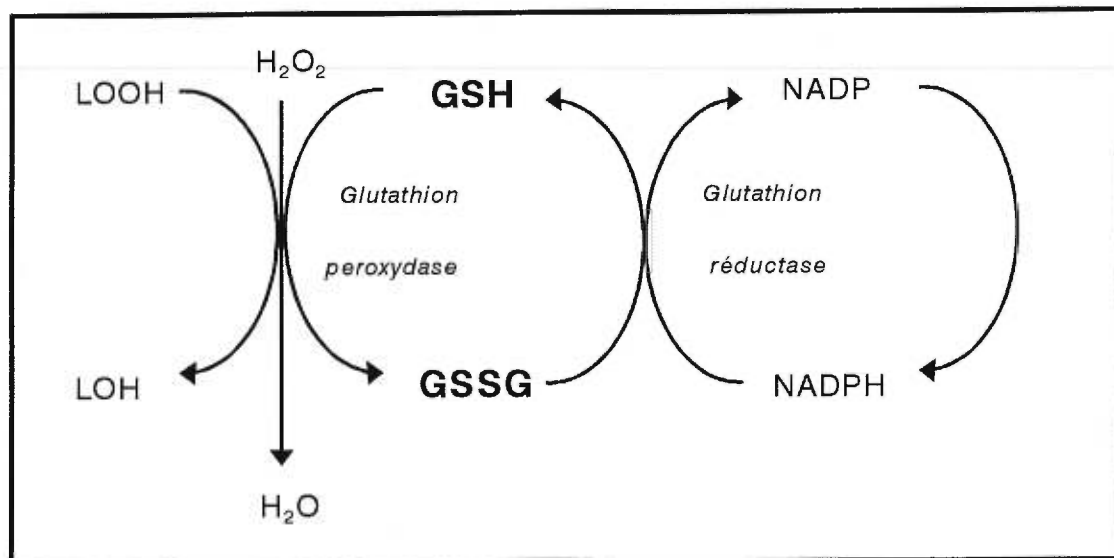


Figure 5. Cycle du glutathion

Abréviations: LOOH = hydroperoxyde, LOH = acide hydroxyle.

2.3.4.2. Les systèmes non-enzymatiques: D'une part, la transferrine, l'albumine et la céruloplasmine sont des protéines de poids moléculaire élevé présentes en grande quantité dans le sang où elles séquestrent les métaux (fer, cuivre) qui catalysent les réactions d'oxydation. D'autre part, certains acides aminés qui circulent aussi dans le sang peuvent pénétrer dans le milieu intracellulaire où, en plus de servir à la synthèse des protéines, ils peuvent exercer un effet antioxydant. Par exemple, l'histidine, un précurseur du glutamate, exerce ses propriétés antioxydantes comme piègeur d' 1O_2 et de $\cdot OH$ et protège le cœur du syndrome d'I-R via ses multiples effets dose-dépendants^{214,308}. La taurine, un produit du métabolisme de la cystéine, est présente en grande concentration au niveau intracellulaire bien que son rôle physiologique ne soit pas clairement établi. Elle influence la contractilité cardiaque en modulant les flux de Na^+ et Ca^{2+} ¹⁸¹ et protège des effets des neutrophiles en piégeant les HOCl originant de la MPO³²⁹.

Par ailleurs, l'ubiquinone, aussi appelé coenzyme Q₁₀, est un constituant naturel de la chaîne respiratoire mitochondriale qui a démontré des propriétés antioxydantes d'abord *in vitro* sur des cellules cardiaques animales isolées³⁹⁶ puis plus récemment, dans divers modèles animaux d'I-R cardiaque^{13,247,277,458}. Chez l'humain, un traitement à l'ubiquinone avant une chirurgie cardiaque a permis de diminuer la peroxydation lipidique et la nécrose durant et après la période d'ischémie⁶⁶. Bien que le mécanisme d'action de l'ubiquinone ne soit pas connu, il a été proposé que la forme réduite pourrait agir en piégeant des radicaux lipidiques ou directement des espèces radicalaires impliquées dans l'initiation de la peroxydation lipidique⁶⁶. Il s'agit, en fait, du seul antioxydant lipidique synthétisé de façon endogène.

Les flavonoïdes constituent une famille de composés provenant des plantes et ayant divers effets. L'intérêt pour la recherche sur les flavonoïdes vient en partie du paradoxe français. En effet, il a été démontré que le vin rouge, consommé en grande quantité par les Français exerçait un effet cardioprotecteur encore plus important que les autres types d'alcool. En fait, le vin rouge est riche en composés phénoliques comme le trans-resveratrol qui fait partie de la famille des flavonoïdes^{74,301}. Ce

composé, ainsi que la quercétine aussi présente dans le sang mais en moins grande quantité, ont des effets sur l'agrégation plaquettaire, la synthèse de thromboxanes et d'autres dérivés néfastes des leucotriènes. Des études *in vitro* chez l'animal ont démontré des effets cardioprotecteurs de certains flavonoïdes, possiblement via leurs propriétés antioxydantes^{288,425}.

Les vitamines qui proviennent de l'alimentation se retrouvent dans le sang, mais aussi liées aux membranes dans le compartiment intracellulaire. Alors que l'acide ascorbique est hydrosoluble, le tocophérol ainsi que le bêta-carotène sont liposolubles et se déplacent liés à différentes formes de transporteurs. Plusieurs études, autant *in vivo*, qu'*in vitro* ont démontré les effets antioxydants du tocopherol^{14,18,54,111,190,340}, et dans une moindre mesure, de l'acide ascorbique³⁴¹ et du bêta-carotène^{111,336}. Ils agiraient tous les trois en interrompant des réactions en chaîne impliquées dans la peroxydation des lipides. Présent dans le cœur, le tocophérol agit de façon synergique avec la vitamine C qui réagit avec le radical tocophéryl pour régénérer le tocophérol. L'administration d'acide ascorbique^{306,424} ou du bêta-carotène³⁸⁵ lors de la séquence I-R pourrait par contre avoir des effets néfastes dans certaines conditions.

En outre, toutes les cellules de l'organisme, incluant les cellules cardiaques contiennent des niveaux élevés (0.5-10 mM) de GSH, un tripeptide qui joue un rôle important comme antioxydant endogène et dans le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction. En fait, le GSH participe à l'élimination du H₂O₂ et des LOOH, en servant de co-substrat à l'enzyme GSHpx¹²¹. Le GSSG formé par cette première réaction est de nouveau réduit en GSH par la GSHrx, une enzyme qui utilise le NADPH comme cofacteur. Un statut élevé en GSH du myocarde est associé à une diminution de l'étendue de l'infarctus et une récupération précoce des fonctions contractiles du myocarde ischémique³⁷¹. Enfin, le GSH peut inhiber la peroxydation des lipides et s'avère efficace comme piègeur direct de certains ERO, tels les ·OH et ¹O₂^{28,153}.

Bien que le GSH soit synthétisé dans le cytosol, on en retrouve une grande quantité

dans la mitochondrie. La libération de GSH des organes isolés et perfusés origine largement du compartiment cytosolique et peu de la mitochondrie. En fait, le rôle du GSH cytosolique est bien défini puisqu'il agit dans le transport, la catalyse et la protection contre des composés toxiques endogènes et exogènes²⁵³ alors que le GSH mitochondrial, moins bien défini, semble agir presque'exclusivement contre le stress oxydatif³³¹.

2.3.5. Méthodes d'évaluation ou de détection des ERO

La spectroscopie par résonance paramagnétique électronique (EPR), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chimiluminescence sont des techniques utilisées pour la détection directe des ERO, alors que la mesure des produits de la peroxydation des lipides est une méthode d'évaluation indirecte de la production de ERO.

2.3.5.1. EPR: A l'origine, la technique de EPR qui fournit des spectres de résonance, était appliquée sur des homogénats de coeurs préalablement congelés^{249,462}. Cette méthode a été critiquée du fait que certains spectres de résonance ne seraient pas dus à des ERO, mais plutôt à la congélation et à la manipulation mécanique du tissu⁴⁶⁵. Aussi, cette méthode ne permet qu'une mesure par coeur, à un temps prédéterminé¹⁷². Depuis quelques années, la technique EPR est surtout appliquée sur l'effluent coronarien^{9,15,34,42,136,250,353,413} ou sur des cellules en culture^{461,464}, auxquels un agent qui sert à piéger les électrons non-appariés (ESR:"electron spin resonance spectroscopy") est ajouté, stabilisant les ERO et rendant la méthode plus spécifique. L'utilisation de 5,5-diméthyl-pyrroline-*N*-oxyde (DMPO) permet en effet de piéger les ·OH, mais cet agent pourrait simultanément réduire la vulnérabilité des coeurs à l'arythmie⁴¹³. Aussi, les échantillons doivent tout de même être purifiés et/ou congelés et une production artéfactuelle de ERO a été rapportée²⁸³, de même que la toxicité *in vivo* des agents piégeurs à concentrations élevées^{42,315}.

2.3.5.2. HPLC: Après une purification (extraction ou filtration) des produits de l'hydroxylation de substances aromatiques dont le salicylate, servant d'index de la

production de $\cdot\text{OH}$ (2,3-dihydroxybenzoate, 2,5-dihydroxybenzoate), sont mesurés par HPLC^{27,200,317,397,398,411}. L'acide salicylique (2-hydroxybenzoate) est ajouté au tampon de reperfusion et sert à piéger les $\cdot\text{OH}$. Cette technique serait beaucoup plus sensible que l'EPR dans la détection d' $\cdot\text{OH}$ ^{296,411}.

2.3.5.3. Chimiluminescence: La chimiluminescence est une technique sensible, non invasive qui peut servir à évaluer la génération de ERO en continue¹⁷². Pour la chimiluminescence à faible niveau, la lumière est générée par l'émission d' $^1\text{O}_2$ et via des intermédiaires de la peroxydation des lipides. Pour la chimiluminescence à niveau élevée, une substance fluorescente (le luminole ou la lucigénine) émettant de la lumière lorsqu'elle est oxydée, est ajoutée à la préparation pour amplifier le signal⁸. Cette technique n'est toutefois pas spécifique à une espèce radicalaire bien que la lucigénine soit très sensible à l' $\text{O}_2^{\cdot-}$.

2.3.5.4. Mesure des produits de la peroxydation des lipides: Les méthodes utilisées pour la mesure des produits de la peroxydation des lipides dosent soit les diènes conjugués, les hydroperoxydes lipidiques, les alcanes de l'air expiré ou les aldéhydes. La méthode la plus populaire, bien que non spécifique, demeure le test à l'acide thiobarbiturique (TBA ou TBARS) qui sert à quantifier le MDA, un des aldéhydes produit lors de la peroxydation lipidique¹⁸⁹. Cette méthode utilise soit la technique de spectrophotométrie qui est non spécifique et peu sensible ou soit la technique de HPLC qui améliore la spécificité et la sensibilité. Plus récemment, des méthodes plus spécifiques de dosages de divers aldéhydes issus de la lipoperoxydation utilisent la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS)⁹⁸.

2.4. Espèces réactives dérivées de l'oxyde nitrique (ERN)

2.4.1. Historique

Bien que l'oxyde nitreux (N_2O) ait été introduit dans la pratique clinique en anesthésie il y a plus de cent ans, ce n'est que vers la fin des années 80 et surtout au début des années 90 que l'intérêt s'est accru pour l'oxyde nitrique ($\cdot\text{NO}$). Les effets sur le coeur

de cette molécule hydrosoluble ont été rapportés pour la première fois par Furchgott et Zawadzki en 1980¹³¹, qui l'avait nommé EDRF ("endothelium derived relaxing factor"). Depuis, certains auteurs ont démontré qu'il s'agissait du $\cdot\text{NO}$ ^{115,302}, mais d'autres recherches proposent qu'il s'agit plutôt d'un S-nitrosothiol^{76,198}. Dans l'ensemble, les recherches ont progressé rapidement puisqu'il a été démontré que le $\cdot\text{NO}$ est synthétisé dans plusieurs types cellulaires et qu'il contrôle et influence de nombreux processus physiologiques critiques⁵⁰.

2.4.2. Synthèse et régulation du $\cdot\text{NO}$

Le $\cdot\text{NO}$ résulte de la conversion du L-arginine en L-citrulline une réaction catalysée par l'oxyde nitrique synthase (NOS), une enzyme du cytochrome P450 qui agit à l'aide de cofacteurs tels le NADPH, l' O_2 , le Ca^{2+} /calmoduline, le tétrahydrobioptérine (H_4B), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN)²⁴¹ (*Figure 6*). Il existe trois types d'isoenzymes de la NOS, soit la forme neuronale (nNOS; type I), la forme inductible (iNOS; type II) et la forme endothéliale (eNOS; type III). Ces trois isoenzymes diffèrent par plusieurs traits caractéristiques incluant leur expression (constitutive ou inductible), leur distribution subcellulaire et leur dépendance au calcium et à la calmoduline.

La synthèse du $\cdot\text{NO}$ apparaît dans différents types cellulaires et tissus, incluant l'endothélium vasculaire, les plaquettes, les macrophages et les cellules neuronales²³⁰. En outre, un cœur normal synthétise le $\cdot\text{NO}$ via la NOS présente dans l'endothélium coronarien et dans les myocytes. Plusieurs agents peuvent augmenter la concentration intracellulaire de calcium, laquelle induit l'activation de la NOS. De plus, l'endothéline-1 (ET-1), un peptide produit par l'endothélium, induit la libération de facteurs de relaxation comme le $\cdot\text{NO}$ et les prostacyclines à partir des cellules endothéliales. En conditions pathologiques, l'ET-1 endogène agit comme un vasoconstricteur car il semble que le mécanisme régulateur de production et de libération de $\cdot\text{NO}$ et de ET-1 puisse avoir été détruit si l'endothélium est endommagé²⁴². Il existerait un mécanisme de rétroaction réciproque de synthèse entre les vasoconstricteurs et les vasodilatateurs⁴³⁷. Selon plusieurs auteurs, la

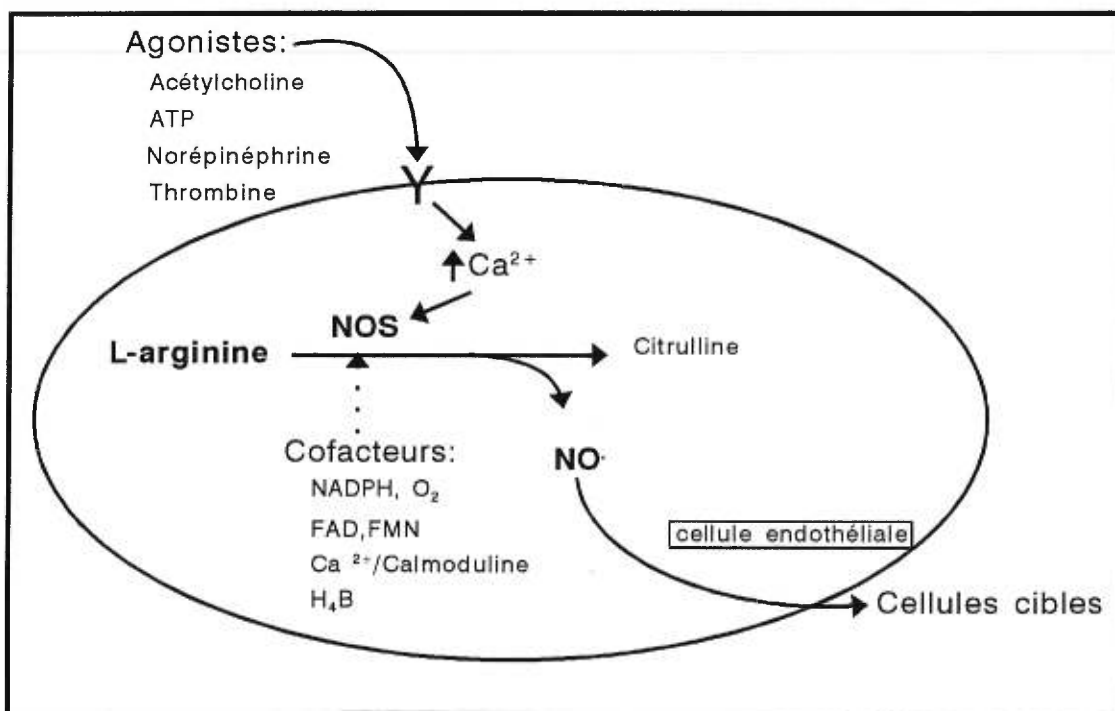


Figure 6. Synthèse et régulation du NO

Abréviations: NOS = oxyde nitrique synthase, H_4B = tétrahydrobioptérine

libération de $\cdot\text{NO}$ par l'endothélium des coronaires serait réduite dans quelques conditions pathologiques incluant l'athérosclérose et le syndrome d'I-R^{221,287}, bien que d'autres aient mesuré une augmentation de la libération de $\cdot\text{NO}$ dans les premières secondes de reperfusion^{435,466}. Il semble que lors d'ischémies de courtes durées la formation de $\cdot\text{NO}$ provienne de la NOS, alors que si l'ischémie est longue et progresse vers la nécrose, la formation de $\cdot\text{NO}$ viendrait de la décomposition du nitrite tissulaire⁴³⁵. D'autre part, l'expression de la NOS inductible non-dépendante du calcium ionique, apparaît dans les myocytes de coeurs humains défaillants et pourrait être impliquée dans certaines pathophysiologies^{162,408}. Ainsi, différents types de stress pourraient être responsables de l'expression de la iNOS qui est indétectable dans le myocarde non-défaillant.

2.4.3. Catégories

En plus du $\cdot\text{NO}$, les recherches ont mis à jours au moins trois formes réactives dérivées de l'oxyde nitrique soit le peroxynitrite (ONOO^-), le dioxyde nitrique ou nitrite (NO_2^-) et le nitrate (NO_3^-). À un pH de 7.4, le ONOO^- serait très instable et réagirait rapidement avec des résidus tyrosines sur les protéines pour former le nitrotyrosine⁴⁴⁹ ou serait protoné en acide peroxynitreux qui se réarrange en NO_3^- ou se décompose en NO_2^- et OH^- ³²⁸.

2.4.4. Fonctions

L'effet protecteur ou délétère du $\cdot\text{NO}$ n'est pas clairement établi dans le coeur. Beaucoup d'études utilisent des méthodes indirectes, avec le L-arginine^{223,282,330,442} ou des inhibiteurs de la NOS^{361,447,453,454} pour démontrer l'effet du $\cdot\text{NO}$. Selon les modèles (coeur ischémique ou normal) étudiés, certains auteurs lui confèrent un effet plutôt protecteur^{209,220,282,362,436,442,446}, alors que d'autres^{21,97,361,454} le croit nocif. Aussi, durant le phénomène d'I-R du myocarde, les cellules souffriraient, selon certains auteurs, d'une libération déficiente de $\cdot\text{NO}$ ^{287,417,442}, alors que d'autres rapportent une augmentation marquée de $\cdot\text{NO}$ à la reperfusion⁴³⁵.

Le principal mécanisme d'action du $\cdot\text{NO}$ est une réaction avec des protéines et des

enzymes contenant du fer et/ou un groupement thiol (Fe-S)³⁵¹. Par ce mécanisme, le $\cdot\text{NO}$ exerce diverses fonctions au niveau du système cardiovasculaire tels que la régulation du débit coronarien, du tonus vasculaire et de la contractilité myocardique, le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire, l'inhibition de l'agrégation et de l'adhérence des plaquettes et des neutrophiles. De plus, le $\cdot\text{NO}$ semble exercer une modulation métabolique via, par exemple, l'inhibition de l'aconitase, une enzyme importante du cycle de Krebs et avoir un effet antioxydant ou pro-oxydant selon les circonstances^{230,275}. La fonction de régulation du débit coronarien sera élaborée davantage puisqu'elle est directement impliquée dans ce projet de recherche.

2.4.4.1. Régulation du débit coronarien: Il est généralement accepté que le $\cdot\text{NO}$ régule le débit coronarien par la stimulation directe de la guanylate cyclase soluble (sGC), une protéine contenant du fer hémique, qui catalyse la formation de guanosine-3',5'-monophosphate cyclique (cGMP), un second messenger à action vasorelaxante dans plusieurs systèmes biologiques³⁶⁰ (Figure 7). Cette fonction du $\cdot\text{NO}$ a été évalué dans différents modèles, principalement *in vitro* en utilisant des donneurs de $\cdot\text{NO}$ ^{48,209} ou des inhibiteurs de $\cdot\text{NO}$ ^{48,235}. Cependant, le rôle du $\cdot\text{NO}$ dans la régulation basale du débit coronarien a été récemment remis en question par une étude dans le coeur isolé de chien perfusé avec une solution sanguine³⁵⁴. Il semble que cette disparité puisse provenir d'un effet de pression relié au type de solution et/ou de l'espèce animale utilisée. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que le $\cdot\text{NO}$ provenant de l'endothélium est un des facteurs impliqués dans le mécanisme d'hyperémie réactive myocardiale qui suit une interruption transitoire du débit sanguin coronaire^{48,235,418,466}.

2.5. Interactions ERO et ERN

Les interactions multiples et complexes entre les ERO \cdot et le $\cdot\text{NO}$ seraient déterminantes dans le syndrome d'I-R^{85,231,284,291,361} (Figure 8). Lors de la reperfusion, en présence d'O₂⁻, le $\cdot\text{NO}$ pourrait être transformé en ONOO \cdot qui se décompose

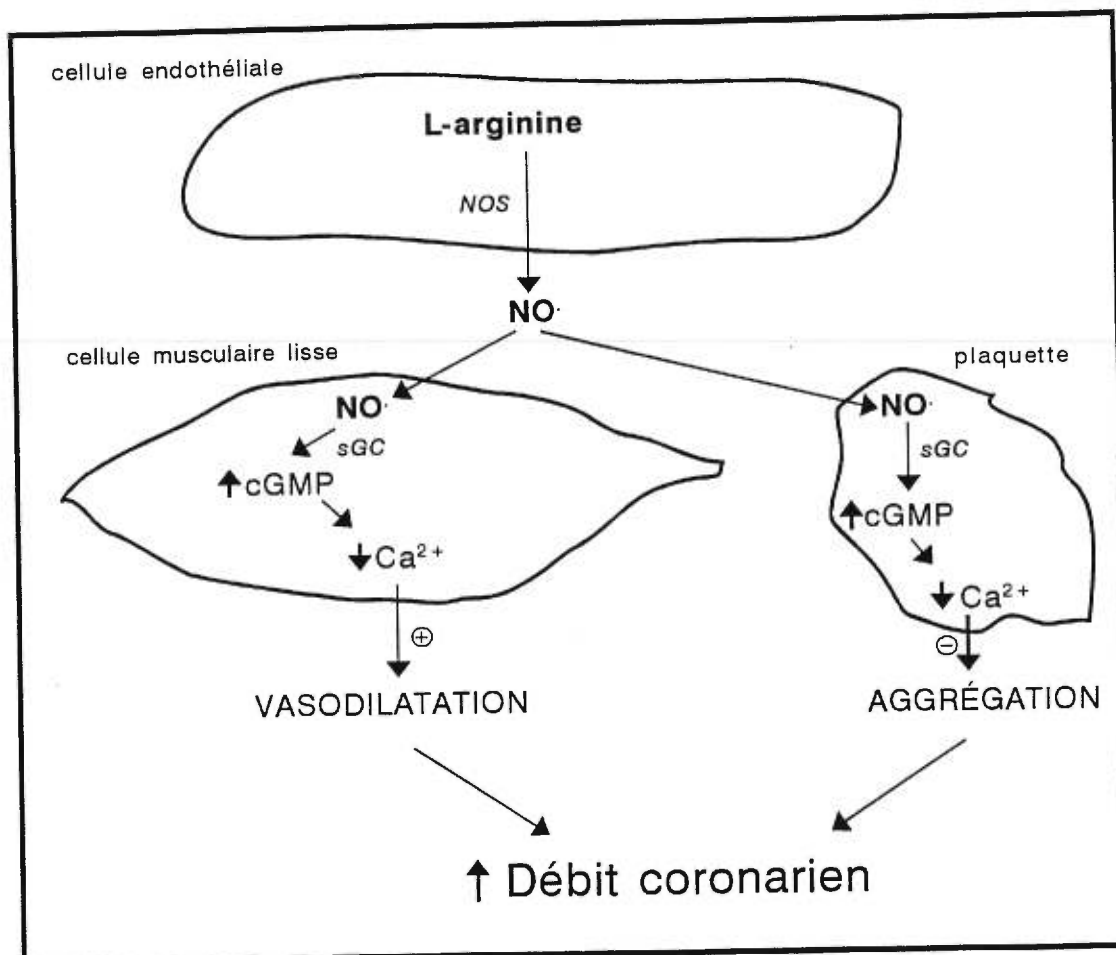


Figure 7. Régulation du débit coronarien par le NO

Abréviations: NOS = oxyde nitrique synthase, sGC = guanylate cyclase soluble, cGMP = guanosine-3',5'-monophosphate cyclique.

ultérieurement en $\cdot\text{OH}$ ²⁴¹. Les évidences expérimentales à ce sujet sont de plus en plus nombreuses bien que souvent indirectes et controversées^{21,278,320,328,429}. Récemment, dans différents modèles *in vitro* de coeurs isolés, la formation de ONOO^- a été mise en évidence^{327,435,454}, bien que celle-ci n'ait pas encore été démontrée de façon directe *in vivo*. Aussi, il a été proposé que la NOS pourrait elle-même produire $\text{O}_2^{\cdot-}$ en plus du $\cdot\text{NO}$ en condition où le L-arginine est faible⁴⁴⁹. De plus, il est connu que des cellules endommagées libèrent du fer qui est disponible lors de la période de reperfusion pour convertir les $\text{O}_2^{\cdot-}$ et les H_2O_2 en $\cdot\text{OH}$. Ce dernier peut exacerber les dommages endothéliaux¹⁵⁵ et modifier la production de $\cdot\text{NO}$. Puisque le ONOO^- oxyderait les composés sulfhydryles cent fois plus vite que le H_2O_2 , il est proposé que cette réaction soit un mécanisme important de la toxicité des ERN³²⁸, ou un mécanisme par lequel le $\cdot\text{NO}$ est mis en réserve sous forme de S-nitrosothiols et relâché sur une période prolongée⁴⁴⁸.

En outre, lorsque le $\cdot\text{NO}$ réagit avec des thiols réduits, il y a production de radicaux intermédiaires, puis de S-nitrosothiols capables comme le $\cdot\text{NO}$, de produire une vasodilatation. Cependant, il existe une controverse à savoir si la réaction entre le $\cdot\text{NO}$ et les molécules contenant des groupements sulfhydryles produit vraiment des nitrosothiols dans des conditions anaérobiques, à pH neutre^{94,177}. Il semble que la présence d'oxygène et de molécules accepteuses d'électrons soit nécessaire¹⁴⁴ pour que la réaction se produise. Par ailleurs, certaines études ont proposé que le $\cdot\text{NO}$ pourrait servir de piègeur d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ ^{116,350}. Enfin, l'effet néfaste du NO_2^- qui oxyderait le GSH tissulaire par un mécanisme temps-dépendant a été démontré par certaines études¹⁵⁶. Finalement, d'autres ont montré que la nitrosation du GSH ou d'autres composés possédant un groupement thiol par le NO_2^- causerait plutôt une relaxation par un mécanisme impliquant la production de $\cdot\text{NO}$ et la stimulation de sGC⁸⁸.

2.5.1. Evidences expérimentales reliant les ERON au syndrome d'I-R

Dans les années 70, Hearse et ses collaborateurs^{166,167} ont démontré que la réintroduction de l'oxygène à un coeur hypoxique était accompagnée d'une altération rapide et profonde du tissu, évaluée par la libération d'enzymes cytosoliques et des

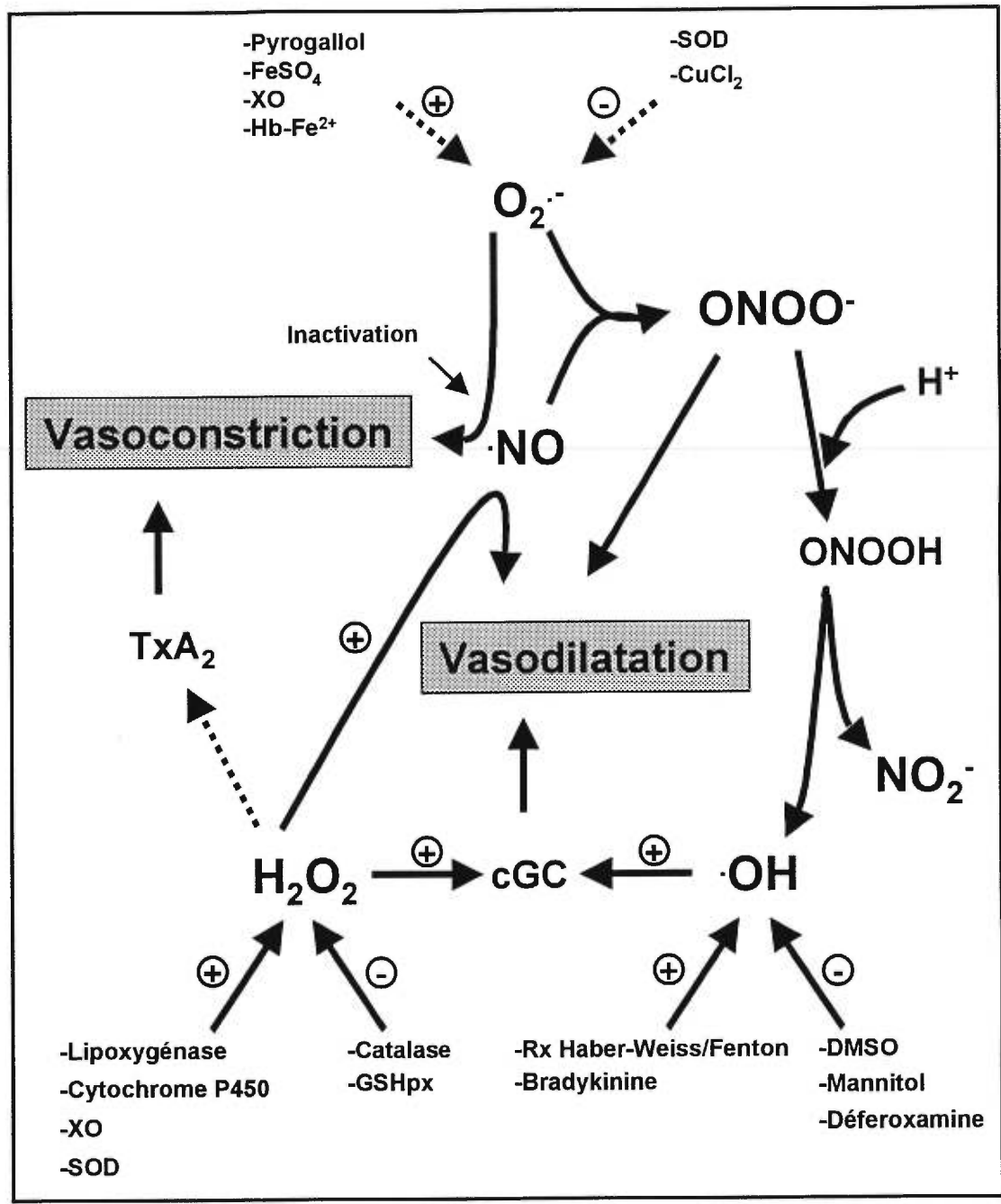


Figure 8. Interactions ERO et ERN
Voies: connues \rightarrow , proposées \dashrightarrow
Abréviation: TxA_2 = thromboxane A_2 , $ONOOH$ = acide peroxyntreux,
DMSO = diméthylsulfoxyde

changements ultrastructuraux. Au début des années 80, des chercheurs ont noté qu'il existait plusieurs voies de production des ERO dans différents tissus (voir section 2.3.2.), incluant le coeur³⁴⁷. Comme la plupart de ces sources radicalaires pouvaient être activées durant la reperfusion après une période d'ischémie, il fut proposé que les ERO puissent contribuer à la mort cellulaire observée dans le syndrome d'I-R. Cette hypothèse implique que ce n'est pas l'ischémie en soit qui entraîne la mort cellulaire, mais plutôt la réintroduction de l'oxygène à la reperfusion.

Ainsi, plusieurs évidences expérimentales supportant le rôle des ERO dans l'infarctus du myocarde sont basées sur la capacité de molécules présumément antioxydantes à réduire les dommages dans des modèles d'I-R myocardique. Plusieurs antioxydants ont été utilisés, autant durant l'ischémie que la reperfusion, pour tenter de prévenir ou corriger les dommages d'I-R. Le *Tableau 3* résume quelques-unes de ces études. L'action de certains agents antioxydants sera davantage documentée dans la section 3.1.1.1.. Malgré le grand nombre d'études *in vitro* répertoriées sur le sujet avant le début de ce projet de doctorat^{16,63,257,258,281,386,441}, le rôle de la thérapie antioxydante dans la séquence ischémie/reperfusion *in vivo* avait été peu étudié^{40,322}. Chez l'humain, avant 1992, il n'existait que des études épidémiologiques sur la consommation de vitamines antioxydantes, principalement la vitamine E et le risque de MCV¹⁹⁰.

Plusieurs raisons peuvent expliquer les résultats divergents obtenus dans ces études et le succès mitigé de la thérapie antioxydante dans la prévention du syndrome d'I-R:

- 1) Les modèles d'études (organelles cellulaires, myocytes isolées, coeurs isolés), les espèces animales (rat, chien, cochon, lapin, etc.)³⁸⁹ et les paramètres mesurés sont très variables et parfois difficilement comparables. A titre d'exemple, mentionnons la taille de l'infarctus qui est mesurée après une durée limitée de reperfusion, quoiqu'elle varie grandement dans les 24h suivant la reperfusion³³⁵;

Tableau 3. Principaux agents antioxydants étudiés

Interventions antioxydantes	Espèce étudiée	Modèle	Moment de l'intervention	Effets observés	Références
SOD (Converti $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2)	Lapin	Hypoxie/reperfusion	Reperfusion	Augmente la libération de CK	281
SOD et CAT (Convertissent les $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 et en H_2O)	Chien	Ischémie-partielle/reperfusion	Juste avant reperfusion	Ne diminue pas la taille de l'infarctus	322
Allopurinol (Inhibiteur de la XO)	Chien	Ischémie-partielle/reperfusion	18h avant l'occlusion + bolus 5 min avant l'occlusion	Diminue la taille de l'infarctus	441
	Rat	Ischémie/reperfusion	Avant et après l'ischémie	Améliore la fonction cardiaque et diminue la LDH	309
Déferoxamine (Chélateur de fer)	Lapin	Ischémie/reperfusion	Juste avant reperfusion	Maintien la CP et la fonction myocardique	6
	Rat	Perfusion/préservation/reperfusion	Préservation/reperfusion	Améliore la récupération fonctionnelle	107
	Rat	Préservation/reperfusion	Préservation/reperfusion	Améliore la récupération fonctionnelle	260
Mercaptopropionyl glycine (MPG) (Piégeur de $\cdot OH$)	Chien	Ischémie/reperfusion	Différents moments	Améliore la récupération fonctionnelle si donné avant l'occlusion ou juste avant reperfusion et pendant reperfusion. Diminue $\cdot OH$ si administré juste avant la reperfusion.	40
	Rat	Préservation/reperfusion	Pendant l'infusion de solution cardioprotectrice pour l'arrêt du coeur	N'améliore pas la fonction cardiaque	63
Probucol (Inhibiteur de réactions en chaîne)	Humain	angioplastie-reperfusion	Avant l'angioplastie et après pour plusieurs mois	↓ resténose	403

- 2) La thérapie antioxydante semble efficace seulement contre les dommages réversibles. Toutefois, l'infarctus qui est la situation clinique la plus courante a une composante irréversible importante;
- 3) Il semble crucial que l'intervention ait lieu immédiatement au moment de la reperfusion^{334,460}, puisque c'est à ce moment qu'il y a le plus d'évidences d'une production augmentée d'ERO⁴²;
- 4) S'il est relativement simple d'accroître le potentiel antioxydant extracellulaire, le renforcement des antioxydants intracellulaires pose des problèmes puisque la plupart des molécules ont un poids moléculaire trop élevé pour traverser la membrane et s'attaquer aux sites de production intracellulaires des ERO²⁰². En combinant la SOD ou la CAT avec le polyéthylène glycol ou en les encapsulant dans des liposomes, il est possible d'améliorer l'accès intracellulaire. Cependant, bien que ce genre de traitement s'effectue sur l'animal, il reste à être évalué chez l'humain;
- 5) Même avec des molécules antioxydantes qui pénètrent facilement la membrane plasmique tel que le N-acétylcystéine (NAC), l'efficacité du traitement est incertain, étant donné la réactivité extrême des ERO tel le $\cdot\text{OH}$;
- 6) Dans plusieurs études, l'effet bénéfique de substances présumément antioxydantes sur la fonction myocardique est rapporté sans que soit établie une relation de cause à effet. Il y aurait eu lieu de documenter simultanément la diminution de la production des ERO et les bénéfices pour la fonction dans une même étude. Par exemple, des effets bénéfiques de l'allopurinol ont été maintes fois rapportés, bien qu'il ne soit pas prouvé hors de tous doutes que la XO ait un rôle dans la pathophysiologie des dommages de reperfusion myocardique. Certains chercheurs remettent même en question la présence de cette enzyme dans le myocarde humain^{92,106,146};

- 7) Certaines techniques utilisées pour évaluer la production d'ERO ou leurs effets, dont le test TBA, donnent des résultats artéfactuels et sont controversés^{150,189}.

Finalement, le syndrome d'I-R est un phénomène multifactoriel dont la prévention ou le traitement nécessite vraisemblablement plus qu'une simple intervention antioxydante. Puisqu'il est difficile d'identifier quels types d'ERON sont impliqués, il est aussi très difficile de choisir le type d'antioxydant adéquat pour protéger le coeur. De plus, il est bien connu que l'ischémie diminue le statut énergétique du coeur, ainsi une thérapie combinée (antioxydant et substrats énergétiques) aurait avantage à être proposée.

3. CARDIOPROTECTION

3.1. Généralités

La thérapie antioxydante ne s'avère qu'une des nombreuses approches envisagées pour la protection du myocarde ischémié et reperfusé. Au cours des dernières années, l'amélioration des techniques chirurgicales a grandement contribué à réduire les statistiques de mortalité et de morbidité reliées aux accidents cardiaques. De plus, plusieurs autres interventions sont proposées pour protéger le coeur des dommages ischémiés et/ou améliorer la récupération fonctionnelle des coeurs ayant subi une période d'ischémie. Ces interventions peuvent être utilisées autant pour les patients devant subir une intervention chirurgicale que pour ceux souffrant de maladies cardiaques de type ischémié, telle l'angine.

Dans le cas d'ischémie précédant ou reliée à une chirurgie, ces interventions sont effectuées soit au moment où se produit la période d'ischémie (lors de la préservation du coeur dans les cas de transplantation, ou durant l'arrêt cardiaque associé à toutes chirurgies), et/ou lors de la reperfusion du myocarde.

3.1.1. *Interventions nutritionnelles*

Les interventions nutritionnelles se rapportent à l'administration de substances retrouvées normalement dans l'organisme ou leurs précurseurs. La stratégie nutritionnelle vise à maximiser les réserves antioxydantes du coeur et à améliorer le métabolisme énergétique de la cellule myocardique.

3.1.1.1. Les antioxydants: Tel que mentionné précédemment, les antioxydants sont nécessaires pour prévenir la formation et s'opposer à l'action des ERON, lesquels causent des dommages à l'ADN, aux lipides, aux protéines et à d'autres biomolécules¹⁵³. Une des stratégies nutritionnelles consiste à fournir au coeur des substances antioxydantes naturelles ou leurs précurseurs dès le début de la reperfusion et si possible, avant l'ischémie, pour augmenter les réserves en vue de piéger les ERO ou interrompre les réactions en chaîne. Parmi les antioxydants

naturels, mentionnons les vitamines E et C, les caroténoïdes, l'ubiquinone et les flavonoïdes. Puisqu'il a déjà été question de ces antioxydants (section 2.3.4.), les paragraphes suivants porteront sur le GSH et un de ses précurseurs, soit le NAC qui ont été utilisés lors du présent projet de recherche.

GSH: Tel que mentionné précédemment, le GSH joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction des cellules. Le GSH exogène ne peut facilement être capté par la cellule. Par contre, il peut être synthétisé dans la cellule à partir de la L-cystéine, de la glycine et du glutamate. Pour augmenter les réserves tissulaires de GSH, la stratégie est de fournir soit des précurseurs qui s'avèrent limitant pour sa synthèse comme la cystéine, ou des donneurs de GSH comme le GSH monoethyl ester¹⁴⁷. Toutefois, la cystéine ne peut être administrée tel quel puisqu'elle est rapidement oxydée en cystine et de fortes concentrations extracellulaires de cystéine sont toxiques chez l'animal⁷ et pour les cellules en culture¹⁷¹.

NAC: Le NAC est un composé de faible poids moléculaire précurseur de cystéine. Puisque sa désacétylation est lente, il est faiblement toxique à toutes les concentrations testées. D'ailleurs, en clinique, le NAC est utilisé depuis une quarantaine d'années pour différents traitements dont les maladies obstructives et congestives des poumons³⁵⁵ et l'intoxication au paracétamol qui produit une déplétion en GSH dans les hépatocytes¹²⁵. Son utilisation comme agent cardioprotecteur demeure assez récente. Ainsi, plusieurs études ont montré que le NAC atténue les phénomènes associés au syndrome d'I-R dans différents modèles *in vitro*^{62,121,127,263,323,376,401} et *in vivo* chez des patients subissant un pontage¹²¹ ou suite à l'infarctus^{10,377}.

En fait, il semble que le NAC puisse exercer un effet antioxydant en agissant via plusieurs mécanismes. Ainsi, il a été rapporté que l'infusion de NAC à des coeurs lapins subissant une ischémie puis une reperfusion, augmente la concentration intracellulaire de GSH⁶². D'autres études ont montré que le NAC n'augmentait pas¹²⁷ ou peu^{75,206} la synthèse de GSH, mais augmentait plutôt le rapport GSH/GSSG³⁵². Il

a aussi été rapporté que s'il est administré avant l'ischémie, le NAC stimule la production de GSH dans divers modèles animaux^{62,121}, montre des effets protecteurs au niveau de la fonction cardiaque^{62,121,127,256,323,401} et du débit coronarien^{256,401}, mais que si il est administré qu'à la reperfusion, dans la majorité des cas, il perd ses bénéfices. D'autre part, *in vitro*, le NAC agit surtout comme antioxydant directe contre le $\cdot\text{OH}^{11}$, puisqu'il s'agit d'un composé comportant un groupement sulfhydryle. Toutefois, à notre connaissance, cet effet antioxydant direct n'a pas été documenté dans des systèmes cellulaires intacts ou de perfusion d'organes.

3.1.2. Interventions métaboliques

Plusieurs substrats énergétiques dont certains acides aminés intermédiaires du cycle de Krebs et de la glycolyse, le glucose, ainsi que l'adénosine ont été étudiés pour leurs effets cardioprotecteurs. Ces substrats peuvent aussi être combinés à une hormone telle que l'insuline et/ou à d'autres agents comme le dichloroacétate (DCA), reconnus pour leurs effets métaboliques. Un résumé des connaissances actuelles sera présenté pour chaque type de substrats énergétiques ou agents ci-haut mentionnés.

3.1.2.1. Acides aminés: En conditions aérobiques, les acides aminés contribuent peu (< 5%) à la production d'énergie du coeur. Le myocarde oxyde préférentiellement les glucides (glucose), le lactate et les lipides (acides gras) pour former l'ATP nécessaire aux contractions, au maintien des diverses pompes ioniques et à la réparation des structures subcellulaires²⁸⁶. Cependant, la contribution des acides aminés (principalement le glutamate et les acides aminés à chaînes branchées) augmente lorsque l'apport en oxygène est insuffisant. En effet, plusieurs études^{32,44,56,70,71,139,310,311,343,366,367,375} montrent que les acides aminés peuvent protéger contre les dommages d'ischémie, même si quelques unes^{77,133,140,194,332} n'ont pas démontré d'effet bénéfique. La reperfusion avec un ou des acides aminés a permis dans différents modèles d'I-R d'obtenir une meilleure récupération de la fonction contractile^{32,44,56,70,139,151,267,366,367}, de la fonction endothéliale²⁸², du métabolisme énergétique^{56,109,343,367,391,440} ou une diminution de la taille de l'infarctus¹⁰⁹. *In vivo*, l'effet du glutamate a été étudié chez l'humain en condition d'I-

R et semble stimuler la sécrétion d'insuline et modifier la disponibilité et l'utilisation des substrats vers le glucose et le glutamate plutôt que vers les acides gras⁴⁰⁹. Les résultats divergents obtenus concernant la recherche sur les acides aminés s'expliquent par les différences dans les modèles d'I-R, l'espèce animale, les acides aminés utilisés, leurs concentrations, la période d'administration, le niveau de travail cardiaque et/ou la concentration de substrats exogènes employés³⁰⁸.

Les mécanismes proposés pour expliquer les effets des acides aminés sont nombreux et sujets à la controverse. Pour le glutamate, l'aspartate et les acides aminés à chaînes branchées, leur métabolisme respectif en intermédiaire du cycle de Krebs semble impliqué. Ainsi, suite à leur transamination respective en α -cétoglutarate et en oxaloacétate^{32,71}, ils contribueraient à une voie anaérobie pour la régénération des phosphates riches en énergie. De plus, le glutamate améliore la clairance du lactate et de l'excès de NH_3 en accélérant la transamination du pyruvate en alanine³⁹².

Par ailleurs, l'intérêt récent pour le L-arginine provient de son rôle de précurseur de NO. Il semble que l'ischémie suivie de la reperfusion endommage les cellules endothéliales, ce qui pourrait bloquer le recyclage de L-citrulline en L-arginine²³⁴. La supplémentation en L-arginine ne fait pas l'unanimité car certains chercheurs⁴⁰⁰ ont démontré une augmentation des dommages liés à la séquence d'I-R. Aussi, le L-arginine pourrait avoir des effets sur les cellules indépendamment de son rôle de précurseur de NO car il s'agit d'un acide aminé basique dont le transport est assuré par des transporteurs voltages-sensibles¹⁹⁷.

3.1.2.2. Intermédiaires du cycle de Krebs: Plusieurs substrats intermédiaires du cycle de Krebs, dont le fumarate, le malate, l' α -cétoglutarate et le succinate seraient cardioprotecteurs dans des modèles *in vitro* et *in situ* d'I-R³⁴⁴. Ils amélioreraient la production d'ATP lors de l'ischémie mais cet avantage serait perdu dès le début de la reperfusion³⁴⁶. Par contre, lors de la cardioplégie hypothermique, le fumarate semble améliorer la récupération fonctionnelle ainsi que le niveau de CP³⁰³. Le mécanisme d'action proposé est similaire à celui du glutamate et de l'aspartate, soit

l'amélioration de la production d'ATP lors de l'ischémie. Ainsi, l' α -cétoglutarate a été ajouté aux solutions cardioplogiques lors de chirurgie cardiaque chez l'humain²⁰⁵ et comme substrat dans une solution de perfusion pré-ischémique pour un coeur isolé³⁷⁵. Selon ces études, l' α -cétoglutarate agirait en augmentant la capacité oxydative du myocarde.

3.1.2.3. Intermédiaires de la glycolyse: Plusieurs auteurs ont rapporté un effet cardioprotecteur du pyruvate^{1,53,57,61,89-91,363}. Son utilisation mène à une augmentation des équivalents réduits pour la chaîne mitochondriales de transport d'électrons et à un potentiel de phosphorylation cytosolique supérieur au glucose³⁵⁹. *In vitro*, dans des modèles de coeurs isolés perfusés, le pyruvate diminue la perte de GSH des mitochondries³³⁷, diminue les phosphates intracellulaires⁴⁶³, améliore le pompage d'ions du réticulum sarcoplasmique dont le Ca^{2+} ⁵³, diminue la libération de LDH^{61,90}, augmente l'activité de l'enzyme GSHpx⁹¹ et augmente ou préserve les phosphates riches en énergie^{57,89}. De plus, en présence de glucose, le pyruvate prévient la perte de CP à la reperfusion, dans un modèle d'ischémie partielle³⁵⁹, alors que le pyruvate seul a le même effet s'il est administré avant l'ischémie globale⁶¹ ou régionale⁵⁷ en plus d'améliorer la performance fonctionnelle. En conditions anaérobiques, ce substrat a un effet important sur la récupération de la pression développée après l'ischémie, bien que la pression demeure substantiellement plus faible que les valeurs pré-ischémiques^{344,363}. Le pyruvate doit être administré avant la reperfusion pour avoir ces effets et même, une meilleure protection est offerte quand le coeur est perfusé avec le pyruvate avant le début de l'ischémie.

L'effet protecteur du pyruvate serait donc multifactoriel et différents modes d'action semblent intervenir³⁰. En général, deux explications ressortent; un effet métabolique et un effet antioxydant. D'abord, cet intermédiaire de la glycolyse est directement transporté dans la mitochondrie par un mécanisme de transporteur médié, éliminant plusieurs étapes limitantes de la glycolyse. Les différentes voies métaboliques impliquées sont: une carboxylation qui fournit l'oxaloacétate, une deshydrogénation qui forme l'acetyl-CoA, outrepassant la glycolyse et la formation de lactate par la LDH

qui réduit le ratio NADH/NAD⁺. De plus, en combinaison avec le glucose, le pyruvate augmente l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) durant l'anoxie ou l'ischémie et la reperfusion⁸⁹. Finalement, le pyruvate exerce un effet antioxydant en réagissant avec le H₂O₂ et conséquemment en réduisant la production de ·OH⁸⁹.

3.1.2.4. Glucose et insuline: Lors de l'ischémie, le coeur a une capacité réduite de produire de l'énergie à partir de l'oxydation des glucides. L'utilisation du glucose et de l'insuline lors de l'ischémie partielle a pour but d'éviter la perte des réserves de glycogène pour la reperfusion⁴²⁷. L'administration d'une quantité supraphysiologique de glucose accompagnée d'insuline à un coeur ischémique, permet de maintenir la glycolyse et d'éviter les contractures ischémiques⁴²⁷. L'utilisation d'un mélange glucose-insuline-potassium en clinique a permis d'améliorer la fonction ventriculaire gauche suite à une chirurgie cardiaque nécessitant une période d'ischémie³⁹⁴. Cependant, l'insuline pourrait avoir d'autres effets que la captation de glucose, tels que la diminution des acides gras libres circulants, la promotion de la synthèse myocardique de glycogène et possiblement la stimulation de l'activité de la PDH³⁹¹. Ces effets favoriseraient l'oxydation des glucides au dépend des acides gras.

3.1.2.5. Dichloroacetate: Quoique le DCA ne soit pas un substrat naturel, son mécanisme d'action est essentiellement métabolique. C'est un puissant activateur du complexe de la PDH qui augmente l'incorporation de pyruvate dans le cycle de Krebs, augmentant l'oxydation du glucose et du lactate quand les niveaux d'oxygène sont suffisants. Chez certains patients souffrants de maladies stables des artères coronaires ou d'insuffisance cardiaque sévère sans acidose, le DCA augmente la fraction d'éjection et diminue les dommages ischémiques en améliorant l'oxydation via la PDH³⁸⁰. Dans un modèle de préservation/reperfusion, l'administration de DCA à la reperfusion améliore la récupération fonctionnelle, le statut énergétique et diminue la concentration de lactate dans le perfusé⁴³². De même, le DCA améliore la performance mécanique d'un coeur ayant subi une ischémie suivie d'une reperfusion, en réduisant le lactate via l'augmentation de l'activité de la PDH³²⁶.

Ainsi, plusieurs évidences suggèrent que le DCA exerce un effet inotropique directe (contraction) sur le coeur, présumément en facilitant le métabolisme oxydatif des glucides au dépend des lipides dans des conditions où la disponibilité des phosphates riches en énergie et/ou l'oxygène peut être limitante pour la fonction cardiaque³⁸⁰. Bien que la consommation d'oxygène et le débit coronarien ne soient pas affectés par le DCA, la diminution des besoins en oxygène pour oxyder le glucose comparativement aux acides gras et l'ATP généré par l'oxydation aérobie du glucose, suggère des mécanismes par lesquels cette drogue peut améliorer l'efficacité du coeur.

3.1.2.6. Adénosine: L'adénosine est un nucléoside endogène qu'on retrouve dans toutes les cellules de l'organisme. Les nucléosides sont des substances dont l'hydrolyse libère un pentose et une base purique ou pyrimidique. Catabolite de l'adénine nucléotide, l'adénosine est un puissant vasodilatateur qui a des effets directs sur les muscles vasculaires lisses²⁴ et qui exerce aussi un effet chronotrope (rythme) négatif et dromotrope (conduction) négatif sur les noeuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire¹⁰¹. L'adénosine a aussi plusieurs autres actions cardiovasculaires dont la stimulation des flux glycolytiques, l'inhibition de la lipolyse, un effet anti-adrénergique qui réduit la libération de norépinéphrine des terminaisons nerveuses sympathiques et une habileté à inhiber l'agrégation plaquettaire et la génération de O_2^- par les neutrophiles¹³⁴. De plus l'adénosine atténuerait la sidération myocardique et microvasculaire, initierait et modulerait le préconditionnement et finalement, réduirait l'étendue de l'infarctus⁴²⁰.

Bien qu'il y ait des évidences que l'adénosine puisse protéger contre les dommages induits par l'ischémie et la reperfusion, il y a peu d'enthousiasme pour son utilisation lors de la cardioplégie³⁸ et en clinique. Les éléments mis en cause sont: sa très courte demie-vie, son rôle de précurseur d'hypoxanthine (le substrat de la XO), sa captation rapide par l'endothélium et les globules rouges et ses multiples effets secondaires rapportés¹³⁴.

3.1.3. Interventions pharmacologiques

Plusieurs classes de produits pharmacologiques ont été utilisées dans un but de cardioprotection. Parmi celles-ci mentionnons les plus étudiées:

3.1.3.1. Bloqueurs bêta-adrénergiques (bêta-bloquants): Depuis les années 50, les bêta-bloquants sont utilisés dans le traitement de l'angine de poitrine et de l'arythmie et depuis environ une décennie, dans celui de l'hypertension³¹⁹. Les bêta-bloquants seraient particulièrement efficaces pour réduire les épisodes d'ischémie lors d'angine instable. Aujourd'hui, ces médicaments sont aussi utilisés dans la prévention de l'infarctus du myocarde ou lors de la période de reperfusion suivant un infarctus. Ils agissent par compétition avec les neurotransmetteurs du système nerveux sympathiques pour occuper les sites des récepteurs bêta-adrénergiques. Dans le coeur, on retrouve les sites des récepteurs bêta₁-adrénergiques, alors que dans les vaisseaux et les muscles lisses on retrouve les bêta₂-adrénergiques¹⁷⁶. L'efficacité de ces médicaments dans le traitement de l'angine est attribuable à une diminution de la consommation d'oxygène par le myocarde au repos et à l'exercice, dû à un effet chronotrope négatif, un effet inotropique négatif et une réduction dans la pression artérielle sanguine durant l'exercice.

L'intérêt accru pour ces médicaments au cours des dernières années vient de leurs effets sur le métabolisme des lipides et les réactions médiées par les ERO et sur la cascade de l'acide arachidonique. Il a été démontré que les bêta-bloquants diminuent l'agrégation plaquettaire et la prolifération de neutrophiles³⁴⁵. De plus, certains bêta-bloquants (carvedilol, propranolol) améliorent les paramètres hémodynamiques post-ischémiques, diminuent la libération de LDH, la formation d'hydroperoxydes et la peroxydation lipidique²¹².

3.1.3.2. Inhibiteurs calciques: Utilisé dans le traitement de l'angine, du spasme coronarien puis de l'hypertension, les inhibiteurs calciques agissent en inhibant l'entrée de calcium dans les cellules des muscles lisses vasculaires et du myocarde et en entraînant la dilatation des artères coronaires. L'utilisation des inhibiteurs

calciques dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*, démontre l'importance attribuée au paradoxe du calcium, un phénomène qui se produit lorsque le coeur est perfusé quelques minutes avec une solution contenant très peu ou pas de calcium suivi d'une perfusion avec une concentration physiologique de calcium. Le dérèglement des pompes calciques résulte en une accumulation de Ca^{2+} intracellulaire, qui s'accompagne d'une perte de constituants intracellulaires et de problèmes de contractilité¹³⁵. Le paradoxe du calcium est d'autant plus dommageable lorsqu'il apparaît lors du syndrome d'I-R où le coeur est déjà affaibli.

Comme les autres antagonistes du calcium, la nifédipine démontre un effet inotropique négatif qui permet une meilleure récupération fonctionnelle dans un modèle expérimental d'I-R³⁰⁷ à condition d'être administré avant la période d'ischémie³¹⁴. Par ailleurs, le 2,3-butanedione monoxime est un agent inotropique négatif vasodilatateur, qui diminue de façon réversible la sensibilité des protéines contractiles au Ca^{2+} . En fait, il s'agit d'un inhibiteur réversible du couplage actine-myosine qui a un rôle d'inhibiteur calcique. Cette drogue influencerait plusieurs mécanismes, incluant la contraction musculaire, les courants ioniques et la transmission synaptique³⁶⁴. Elle est utilisée de façon expérimentale dans les solutions de reperfusion^{37,58,368,438} et de préservation cardiaque^{229,387,388}.

3.1.3.3. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE): Différents inhibiteurs de l'ACE ont été administrés de façon expérimentale dans des modèles d'I-R^{203,243,244,259,402} et chez des patients souffrant de MCV¹²². Ces agents pharmacologiques, dont le premier commercialisé était le captopril, ont pour effet d'inhiber la conversion de l'angiotensine I qui est relativement inactive en angiotensine II active. Les inhibiteurs de ACE agiraient en augmentant la récupération contractile à la reperfusion via la prévention de la dégradation de la bradykinine⁴⁰² qui stimule la biosynthèse des prostaglandines et la production de NO dans l'endothélium vasculaire^{203,244}. Par ailleurs, certains inhibiteurs de ACE démontreraient des effets bénéfiques en partie à cause de leur groupement thiol²⁵¹.

3.1.3.4. Nitrovasodilatateurs (donneurs de NO): La nitroglycérine est utilisée depuis fort longtemps pour la prévention et le traitement des crises d'angine de poitrine. Cette drogue sert aussi dans le traitement d'infarctus aigu du myocarde en augmentant le débit coronarien par la dilatation des artères coronaires et par l'amélioration de l'irrigation des territoires ischémiés³³⁸. Les nitrates également utilisés contre l'angine de poitrine agissent aussi en libérant le NO, lequel relaxe les muscles vasculaires lisses incluant ceux des artères et des veines. De plus, ils semblent redistribuer le débit coronarien dans le coeur quand la circulation coronaire est partiellement bloquée³³⁸. Bien que le mécanisme responsable de ces effets ne soit pas parfaitement clair, il est connu que ces produits sont efficaces à court terme mais non à long terme car une tolérance possiblement associée à une déplétion en thiols se développe avec le temps². Plus récemment, les donneurs de groupements SH comme le NAC ont été employés pour renverser cette tolérance aux nitrates^{10,68}, alors que les nitrosothiols eux-mêmes, ont été utilisés au niveau expérimental comme donneurs de NO^{210,374}.

3.1.3.5. Inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines: Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont depuis longtemps utilisés suite à l'infarctus ou chez les patients souffrant de maladies thrombotiques comme analgésiques et anti-inflammatoires. Ces drogues telles l'aspirine, l'indométhacine ou l'ibuprophène, inhibent la synthèse de prostaglandines en agissant sur la cyclo-oxygénase, diminuant ainsi l'agrégation plaquettaire²¹⁸. Récemment, des drogues plus spécifiques ont été évaluées dans des modèles animaux *in vivo* et *in vitro*, démontrant l'implication des leucotriènes et des thromboxanes dans les dommages de reperfusion³⁶⁵. Chez l'humain, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'enzyme thromboxane synthase a permis de préserver la production de la prostacycline PGI₂, qui démontre des effets protecteurs et aussi d'améliorer le débit coronarien suite à un pontage⁴⁰⁷.

3.1.4. Interventions mécaniques

Les interventions mécaniques incluent le préconditionnement, la modification des paramètres physico-chimiques du coeur et la cardioplégie. Cette dernière stratégie

sera discutée en détail à la section 3.2. étant donné qu'elle fait partie des interventions utilisées dans ce projet de recherche.

3.1.4.1 Préconditionnement ischémique: L'exposition du coeur à des ischémies transitoires semble induire des changements adaptatifs qui améliorent la capacité du coeur à subir une ischémie plus importante. Ce phénomène, appelé preconditionnement ischémique²⁷⁹, permettrait en outre d'augmenter l'efficacité des systèmes de protection endogènes^{86,383}. Parmi les mécanismes proposés pour expliquer ce phénomène, mentionnons les récepteurs alpha-adrénergiques, l'adénosine, les canaux potassiques sensibles à l'ATP et/ou la protéine kinase C. Bien que ces mécanismes soient encore débattus, ce phénomène a des implications cliniques et expérimentales intéressantes. Par exemple, il est possible que l'ischémie produite lors d'angine de poitrine puisse être suffisante pour induire un preconditionnement ischémique chez les patients.

3.1.4.2. Modification des paramètres physico-chimiques: Les paramètres physico-chimiques des solutions utilisées pour l'arrêt, la préservation ou la reperfusion du coeur dans des modèles d'organes isolés peuvent influencer la récupération fonctionnelle du coeur. Parmi ces paramètres, mentionnons la température, la pression, le pH et la composition ionique, particulièrement la concentration de calcium, de magnésium et de potassium. Dans cette section, seuls les facteurs se rapportant aux interventions de reperfusion seront discutés, les autres paramètres plus pertinents à la cardioplégie seront abordés à la section suivante.

Pression et température: La pression et la température au cours des premières minutes de reperfusion semblent affecter la restauration de la fonction cardiaque après une période d'ischémie^{3,148,393}. La pression de reperfusion jouerait un rôle majeur au niveau de la nécrose cellulaire³⁹⁹, de la demande énergétique³¹², de la fonction contractile^{358,399,452} et de l'apparition d'oedème¹²⁶. Dans les modèles animaux, une restauration progressive plutôt qu'abrupte du flot coronaire, réduirait la surcharge en calcium²⁰⁸ et le stress mécanique sur la paroi vasculaire, diminuant le

paradoxe de l'oxygène, responsable des dommages associés aux ERO dans les myocytes et la vasculature^{225,268}. Chez l'humain, la reperfusion directement à la pression normale suite à une ischémie globale, est associée avec de l'oedème prolongé, des niveaux d'ATP inférieurs et une récupération plus lente de la fonction contractile comparativement à une reperfusion avec une augmentation graduelle de la pression³⁹³. Dans certaines études, l'effet de la température de reperfusion n'est pas dissocié de l'effet de la pression^{148,225}. Cependant, il a été rapporté qu'une reperfusion hypothermique pouvait affecter la récupération de la fonction hémodynamique, en retardant la production d'ATP^{346a}.

pH et calcium: Pour les trois premières minutes de reperfusion suite à une ischémie, la récupération des coeurs est influencée par le pH²⁹⁴. Certains auteurs obtiennent une meilleure récupération avec un pH acide^{31,160,179,246,294}, bien que de plus vieilles études mentionnaient avoir de meilleurs résultats avec pH basique pour contrer l'acidose^{33,126,255}. Le mécanisme expliquant l'effet protecteur d'un pH initial de reperfusion acide n'est pas simple et le mécanisme de base par lequel le pH affecte la contractilité du muscle cardiaque et le métabolisme myocardique n'est pas complètement compris. Un pH acide retarderait la récupération du pH physiologique, préviendrait la libération d'H⁺, la surcharge de calcium et la liaison du calcium avec la troponine. Aussi, en réduisant la contractilité, un pH acide diminue la demande énergétique et réduit l'utilisation d'ATP. Mais le pH a un effet biphasique et si la reperfusion acide se prolonge plus de trois minutes, cela devient néfaste²⁹⁴. Par ailleurs, il semble que la température de la solution de reperfusion influence l'effet du pH.

D'autre part, dans la cellule myocardique intacte le système d'échange Na⁺/Ca²⁺ est sensible au pH. Le taux initial de captation de Ca²⁺ via l'échange Na⁺/Ca²⁺ à pH 6.7 est réduit de 50% par rapport à sa valeur à pH 7.4³⁰⁴. Donc si les dommages induits par la reperfusion sont provoqués par l'entrée de Ca²⁺, l'acidification de la solution de reperfusion initiale protège la cellule. De plus, une acidose intracellulaire transitoire pourrait prévenir la sidération myocardique^{179,246}, probablement par une réduction des

influx de Ca^{2+} dans la cellule et/ou par la compétition des ions H^+ pour les sites de liaison du calcium intracellulaire au début de la reperfusion^{204,246}. La charge de Na^+ associée à la réduction de l'acidose intracellulaire via l'échange Na^+/H^+ ou par l'inhibition de la pompe au Na^+ peut aussi contribuer à la surcharge en Ca^{2+} en inhibant les efflux de calcium par les échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ¹⁴². La réduction de Ca^{2+} dans la solution de reperfusion et l'ajout d'un agent anti-calcique font partie des stratégies de cardioprotection^{67,126}.

3.1.5. Interventions géniques

La thérapie génique est une nouvelle intervention de cardioprotection, développée *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux. Elle consiste à introduire du nouveau matériel génétique à l'intérieur des cellules somatiques pour permettre de synthétiser des protéines déficientes ou manquantes³⁴⁸. Il existe trois principales approches de transfert de gènes, soit les rétrovirus recombinants, les adénovirus recombinants et la livraison directe d'ADN³⁷³. La thérapie génique dans le traitement des MCV pourra éventuellement permettre de diminuer les facteurs de risque d'athérosclérose, de prévenir les maladies thrombolytiques vasculaires, de fournir un système d'administration des médicaments et de prévenir l'infarctus du myocarde³⁴⁸. La recherche progresse très rapidement au niveau du phénomène de resténose qui se produit suite à une angioplastie^{110,117,129,157,276}. Le but ultime étant d'interférer avec la prolifération de cellules musculaires lisses et/ou avec la sécrétion de diverses composantes de la matrice extracellulaire qui accompagne la lésion de resténose dans la lumière des artères²¹⁷. À ce jour, l'injection directe d'ADN donne une expression génique très faible, alors que l'utilisation de vecteurs adénoviraux donne une expression génique beaucoup plus efficace¹²⁹.

3.2. Cardioplégie

3.2.1. Généralité

Lors de la chirurgie cardiaque ou de la préservation en vue d'une transplantation, le coeur doit inévitablement subir une période d'ischémie²³. Dans ces conditions, les

dommages sont minimisés par la cardioplégie. La cardioplégie réfère à un arrêt cardiaque contrôlé, visant à ralentir l'apparition de lésions ischémiques irréversibles. Les solutions cardioplégiques induisent un arrêt rapide et complet du coeur en diastole, minimisant ainsi ses besoins énergétiques.

Depuis son introduction au début des années 70, la cardioplégie cristalloïde froide est devenue la méthode de protection myocardique de choix de plusieurs équipes chirurgicales. Associée aux progrès de l'anesthésie et des techniques chirurgicales, elle a permis de réduire de façon sensible la morbidité et la mortalité suite aux chirurgies cardiaques. Initialement, les solutions cardioplégiques visaient principalement l'arrêt rapide et complet du coeur en diastole afin de minimiser les besoins énergétiques. De nos jours, les solutions cardioplégiques de types intracellulaire (riche en potassium) ou extracellulaire (riche en sodium), cristalloïdes ou sanguines, enrichies de diverses substances pour leurs effets anti-ischémiques, sont utilisées de routine pour arrêter et protéger le myocarde durant les chirurgies à coeur ouvert.

3.2.2. Préservation du greffon cardiaque

Que ce soit pour une transplantation ou pour toutes autres chirurgies nécessitant un arrêt relativement prolongé de la circulation sanguine, la préservation du greffon cardiaque est inévitable et entraîne une période d'ischémie transitoire qui doit être contrôlée.

Plus particulièrement lors de transplantation, la protection cardiaque pose des problèmes spécifiques, puisque les conditions de prélèvement et de transport du greffon cardiaque imposent une privation d'oxygène de plusieurs heures²³. En fait, le coeur subit cinq phases, soit: l'arrêt ou cardioplégie, le prélèvement, la préservation, la réimplantation et la reperfusion. En dépit de recherches actives, lors de transplantations, les coeurs des donneurs sont souvent préservés par des techniques simples d'entreposage au froid qui permettent une préservation sécuritaire de 4 à 5 h^{266,443}. Pourtant, des efforts considérables ont été déployés pour améliorer

la qualité et augmenter la durée de la préservation, afin de surmonter la pénurie de coeurs à greffer. Malheureusement, il existe encore trop de controverses concernant la préservation de longue durée pour que son usage devienne répandu.

La préservation myocardique est un processus dynamique affecté par la durée et la sévérité de l'ischémie. Contrairement au foie et au rein, le coeur est un organe contractile qui contient de grandes quantités d'actine et de myosine. Il est donc susceptible à des dommages de contraction reliés à une privation d'énergie, d'autant plus que le rétablissement rapide de sa fonction est vital³⁷⁹. Plusieurs types de préservation ont été testés autant sur des modèles expérimentaux animaux que chez l'humain. Différentes températures et modes de préservation ont été utilisés.

3.2.2.1. Température: Que la température de préservation soit physiologique (37°C) ou froide (<20°C), chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients et la température myocardique idéale reste à déterminer. La préservation hypothermique ralentit l'activité des enzymes intracellulaires ainsi que la mort cellulaire sans toutefois arrêter totalement le métabolisme²². Selon certains, la cardioplégie tiède (37°C), continue, ne serait pas supérieure à la cardioplégie froide et aucune n'offrirait une protection complète^{248,324}. D'autres auteurs, ont observé une meilleure protection avec la cardioplégie tiède²⁶⁵, laquelle permettrait d'éviter le stress oxydatif, alors que la froide l'augmenterait. En outre, l'utilisation de cardioplégie sanguine froide préserverait l'endothélium mieux que la solution cristalloïde¹⁶¹.

Les contractures seraient la principale cause de dommages myocardiques lors de la préservation hypothermique, un phénomène accéléré par la présence de calcium ionisé³⁸⁷. Pourtant, des températures entre 0°C et 10°C permettraient la récupération complète de la fonction ventriculaire, alors qu'entre 12 et 20°C la récupération serait plus lente^{239,245,445}. L'oedème tissulaire, une complication majeure de la préservation d'organe à basse température, apparaît à cause de l'hypothermie et de l'absence d'oxygène combinés, qui inhibent les pompes sodium-potassium du sarcolemme. En conséquence, les ions Na⁺ et Cl⁻ entrent dans la cellule contre un

gradient de concentration, avec un déplacement d'eau concomitant.

3.2.2.2. Modes de préservation: Il n'y a pas de consensus à savoir si le coeur devrait être préservé d'une façon statique ou s'il devrait être perfusé. On reproche toutefois à la perfusion d'accélérer le processus d'oxydation donc d'exposer le coeur aux ERO et d'inhiber les systèmes de protection enzymatiques²⁶⁶. Par contre, en hypothermie, les coeurs ont un meilleur débit aortique et libèrent moins de CK lorsqu'infusé à 10 ou 20 cmH₂O⁶⁴. Des pressions plus ou moins élevées seraient néfastes. Il semble que la récupération de la fonction contractile lors de préservation à long terme soit reliée au débit d'infusion durant la préservation²³⁷. La microperfusion permettrait donc d'améliorer la fonction cardiaque pour des préservations de longue durée (12-24h) malgré un fort oedème. Pour des préservations de 6h ou moins la microperfusion n'aurait pas d'avantage sur préservation hypothermique statique sauf pour les niveaux d'ATP, d'ADP et d'AMP¹²⁴.

Les chercheurs sont aussi très partagés quant au mode de perfusion le plus adéquat car il semble dépendre de la température. Ainsi, il ne semble pas plus avantageux d'utiliser la perfusion continue avec le sang en normothermie que la solution cristalloïde froide administrée de façon intermittente³²⁴. Par ailleurs, il existe un lien complexe entre la pression d'infusion, la durée d'infusion et la concentration d'ions potassiques dans la solution⁶⁰. Ainsi, la microperfusion avec une solution froide sans oxygène serait plus efficace qu'une solution oxygénée perfusée à pression plus élevée. La présence d'une substance colloïdale dans ce cas est cependant nécessaire pour obtenir de bons résultats à long terme⁴⁴⁴.

3.2.3. Solutions cardioplégique et de préservation

En pratique, plusieurs équipes utilisent une solution d'arrêt (cardioplégique) mais préservent encore le coeur dans un salin physiologique froid⁴⁴³. Heureusement, la tendance va vers l'utilisation de solutions de préservation plus sophistiquées qui servent parfois du même coup de solution d'arrêt. Les nombreuses recherches des dernières années en vue de déterminer la composition de la solution idéale ont permis

de mieux comprendre les complications liées à la préservation du coeur et d'identifier les facteurs responsables. Malheureusement, la variété de solutions utilisée donne lieu à beaucoup de controverse dans ce domaine.

3.2.3.1. Caractéristiques des solutions: Plusieurs caractéristiques des solutions de préservation influencent le devenir du coeur. Le *Tableau 4* résume ces caractéristiques, tout en soulevant les controverses.

pH: Il est bien établi que pour maintenir les réactions enzymatiques, l'équilibre acido-basique doit être respecté. Cependant, une autre théorie veut qu'en utilisant une solution légèrement alcaline (pH 7.4-7.6) cela puisse compenser pour l'acidose métabolique qui accompagne l'ischémie myocardique¹⁰². Pour une préservation de longue durée, de meilleurs résultats sont obtenus à pH physiologique³⁸⁸.

Oxygénation: Le besoin d'oxygénation semble étroitement relié à la température de préservation. La dépendance à l'oxygène des coeurs de rats arrêtés à 20°C est démontrée par la quantité substantielle d'O₂ consommée sur une période de 5h⁹⁹. L'oxygénation diminuerait les pertes d'ATP, de CP⁶⁹ et aurait aussi un effet sur le pH⁴³⁰.

Osmolarité: Tant les solutions hypo-osmolaires (260-270 mOsm), que hyper-osmolaires (310-350 mOsm), si elles sont hypothermiques, causent des problèmes à la fonction cardiaque¹⁹. L'osmolarité optimale se situerait entre 280 et 290 mOsm. La prévention de l'oedème avec une solution hyper-osmolaire n'est pas efficace puisqu'à la reperfusion, ces coeurs deviennent oedémiques. Par ailleurs, l'augmentation de l'osmolarité stimulait le taux de consommation myocardiale d'oxygène de façon dose-dépendante¹⁵⁹.

Type de solution: Comparativement à la cardioplégie cristalloïde, la cardioplégie au sang permettait une meilleure récupération de la fonction cardiaque^{52,285} et une meilleure préservation des phosphates riches en énergie²⁹³, bien que certains auteurs

Tableau 4. Caractéristiques des solutions de préservation sujets à la controverse

Caractéristiques	Avantages et inconvénients	Références
pH:	<p><u>Acidose vs Alcalose</u></p> <ul style="list-style-type: none"> . Acidose durant préservation: ↓ surcharge en Ca^{2+}, ↓ libération de lactate; . Légère alcalose pendant la préservation: compense pour acidose métabolique; . Acidose ou alcalose: ↓ fonction ventriculaire et ↓ libération de CK; . Légère alcalose pendant préservation: ↑ récupération fonctionnelle. 	102,138,388
Oxygénation:	<p><u>Oxygénée vs Non-oxygénée</u></p> <ul style="list-style-type: none"> . Oxygénation: ↓ perte d'ATP et de CP, ↓ libération de lactate; . Oxygénation: ↑ production d'ERO; . Oxygénation: ↓ ou ↑ récupération des paramètres hémodynamiques. 	69,99,313,430
Osmolarité:	<p><u>Iso-osmolaire (280-320mOsm) vs Hyperosmolaire (>320mOsm)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> . Hyperosmolaire: prévient l'oedème durant préservation mais pas lors de la reperfusion; . Isoosmolaire: ↑ récupération de la fonction contractile. 	19,159,388
Type de solutions:	<p><u>Sanguine vs Cristalloïde</u></p> <ul style="list-style-type: none"> . Sanguine: ↑ récupération de la fonction cardiaque; . Sanguine: ↑ préservation des phosphates riches en énergie; . Cristalloïde: ↓ viscosité à basse température; . Cristalloïde: absence de leucocytes qui produisent des ERO. <p><u>Extracellulaire vs Intracellulaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> . Intracellulaire (hyperkaliémique): endommage endothélium coronarien lors de l'arrêt; . Intracellulaire: permet de maintenir la fonction cardiaque à la reperfusion; . Extra- et Intracellulaire: niveau d'oedème et réserves de substrats riches en énergie similaires. 	17,132, 254, 324 83, 105, 192, 207, 414, 415, 456

n'aient pas observé de bénéfices à la solution sanguine¹² ou aient noté des avantages avec les deux types de solution¹⁷. L'inconvénient majeur de la solution cristalloïde est sa faible capacité de transport de l'oxygène alors que la solution sanguine à basse température a une viscosité élevée, ce qui peut causer l'éclatement des globules rouges avec une obstruction des capillaires. Les conclusions sont cependant difficiles à tirer des études comparant les solutions sanguines et cristalloïdes parce que la température varie et le sang est souvent dilué dans un ratio 4:1 dans une solution cristalloïde.

En ce qui concerne les types de solutions intra et extracellulaires, il n'y a pas de consensus à savoir si l'un est préférable à l'autre. Les solutions de type intracellulaire imitent la composition du liquide intracellulaire avec une concentration élevée en potassium, alors que les solutions dites extracellulaires ont un contenu élevé en sodium.

Finalement, aucune technique (froid, chaud, intermittent, continue, etc.) de cardioplégie n'a encore permis de prévenir totalement les conséquences de l'ischémie myocardique chez des patients subissant un pontage⁴⁵⁵. En fait, il existe un lien complexe entre les caractéristiques qui forment l'équilibre d'une solution et c'est pourquoi il n'existe pas de consensus pour ce qui est des caractéristiques idéales que devraient posséder une solution de préservation. Il semble que plusieurs combinaisons soient acceptables.

3.2.3.2. Composition des solutions cardioplégiques: Outre les caractéristiques des solutions cardioplégiques mentionnées à la section précédente, la composition de ces solutions a aussi fait l'objet de nombreuses études. Depuis les vingt dernières années, plusieurs agents ont été ajoutés aux solutions cardioplégiques afin d'en améliorer l'efficacité. Nous décrivons dans un premier temps la composition de base des solutions cardioplégiques (*Tableau 5*), puis nous discuterons brièvement des principaux composés ajoutés à ces solutions (*Tableau 6*).

Tableau 5. Composition de base des solutions cardioplégiques

Additifs	Principales fonctions	Concentrations utilisées
Potassium	Arrêt du coeur en diastole	4-145 mM
Calcium	Maintien de l'intégrité des membranes cellulaires mitochondriales	0.05-2.5 mM
Sodium	Equilibre ionique	10-184 mM
Magnésium	Diminution des influx de calcium et efflux de potassium durant ischémie	0.4-34 mM
Chlore	Equilibre ionique	20-276 mM
Bicarbonate de sodium	Pouvoir tampon	4.5-30 mM

Du *Tableau 5*, nous devons souligner les points suivant:

- 1) Malgré que la nature des ions ajoutés aux solutions varie peu, leur concentration est très variable.
- 2) Des concentrations élevées de potassium durant l'arrêt et la préservation pourraient être responsables, du moins en partie, de la dégénérescence de l'endothélium observée à la reperfusion^{60,238}.
- 3) La présence de calcium dans la solution cardioplégique ne semble pas essentielle, d'autant plus que son absence cause l'arrêt cardiaque⁶⁷. Cependant, les problèmes apparaissent lors de la reperfusion d'un coeur préservé sans calcium, avec une solution contenant du calcium, causant le paradoxe du calcium.
- 4) Le magnésium a plusieurs utilités; entre autres il prévient la perte cellulaire de

potassium, préserve le magnésium endogène pour son rôle de cofacteur enzymatique, joue un rôle anti-calciqque et diminue l'incidence des troubles du rythme à la reperfusion¹⁶⁶.

- 5) Les concentrations optimales de sodium et de chlore n'ont pas été déterminées car très peu d'études se sont attardées à l'effet direct de ces ions⁴³¹. Il en est de même pour le bicarbonate de sodium, qui a de plus un pouvoir tampon discutable si la solution n'est pas oxygénée.

Le *Tableau 6* résume les principales classes d'agents retrouvés dans les solutions cardioplégiques. Les effets anti-ischémiques cardioprotecteurs des substrats énergétiques et des inhibiteurs calciqques ont déjà été discutés respectivement aux sections 3.1.2. et 3.1.3.2.. Bien que le rôle des antioxydants a également fait l'objet de cette revue précédemment (sections 2.3.4. et 3.1.1.1.), ajoutons tout de même que l'utilisation d'antioxydants dès la période de préservation est justifiée par des évidences de la production de ERO durant l'ischémie⁴⁶². Aussi, des effets bénéfiques de l'addition de GSH ont été rapportés sur le coeur reperfusé, bien que son utilisation puisse causer un problème pratique relié à son instabilité chimique. La substitution par le NAC dans ces conditions n'a pas donné d'aussi bons résultats²⁶² et récemment le S-adénosyl-L-méthionine a été proposé comme alternative¹¹⁴.

En outre, concernant les autres classes d'agents, elles seront brièvement introduites:

Agents osmotiques et oncotiques: Au même titre que les ERO, l'oedème intracellulaire du myocarde pourrait contribuer à la mauvaise performance du coeur après l'ischémie¹⁴³. Les agents osmotiques aident donc à conserver l'intégrité morphologique des cellules alors que les agents oncotiques visent plus spécifiquement à limiter l'oedème interstitiel.

Agents vasodilatateurs et anesthésiques: L'utilisation d'agents vasodilatateurs est

Tableau 6. Composés ajoutés aux solutions cardioplégiques

Classes d'agents	Exemples	Références
Substrats énergétiques (Acides aminés, intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs)	Glutamate	26,56,71,139,151, 216, 262, 264, 311,332,343,405,440
	Aspartate	26, 56, 70,133,311,332, 343,375,405
	Glucose	299,300
	Pyruvate	61,90,208,337,363
	Fumarate	303
Antioxydants	GSH	63,258,262-264,305
	NAC	75,256,300
	Mannitol	123,143,262,264,305
	Allopurinol	83,309
	Déféroxamine	107,257,260
	SOD	16,216,258,386
	CAT	16,216
Agents osmotiques	Lactobionate	65,261,264
	Mannitol	123,143,262,264
Agents oncotiques	Dextran	262300
Inhibiteurs calciques	Verapamil	152,300,321,451
	Diltiazem	389404
	2,3-Butanedione monoxime	229,387,388
Agents vasodilatateurs	Nitroglycérine	175,300
Agents Anesthésiques	Procaïne	170,428

moins répandue mais semble améliorer la fonction cardiaque. L'efficacité de la nitroglycérine serait dose-dépendante. Par ailleurs, les anesthésiques sont utilisés en cardioplégie pour induire l'arrêt cardiaque, diminuer la demande d'oxygène durant

l'ischémie et réduire l'arythmie à la reperfusion¹⁰².

3.2.3.3. Les solutions les plus utilisées: Dans la littérature, plusieurs solutions utilisées pour l'arrêt et/ou la préservation cardiaque sont dénombrées. Par contre, seulement deux solutions ont été conçues spécifiquement pour le coeur. Les autres ont été développées pour la préservation d'organes abdominaux dont la sensibilité à la préservation diffère grandement du coeur en raison de son contenu en actine et myosine qui le rend susceptible à des dommages de contraction reliés à une privation d'énergie. Le *Tableau 7* identifie les principales solutions utilisées dans la préservation cardiaque, ainsi que leurs caractéristiques dominantes.

Tableau 7. Les principales solutions de préservation utilisées pour le coeur

SOLUTIONS	CARACTÉRISTIQUES	RÉFÉRENCES
University of Wisconsin (UW)	Allopurinol, adénosine, GSH	104,191
St-Thomas Hospital No.2 ou Plegisol (STH No.2)	Ions principaux et bicarbonate de sodium	219,395
Celsior	GSH, glutamate, histidine, mannitol	264
Stanford University	Osmolarité élevée	384
Bretschneider HTK	Histidine élevée	178,333
Collins	Glucose élevé	207,414,415
Columbia University (CU)	cAMP, nitroglycérine	300

Dans les prochains paragraphes, suivra une brève description de chacune des solutions énumérées dans le *Tableau 7*:

La solution UW est certes la plus connue. Elle a été mise au point pour la transplantation de pancréas, avant d'être utilisée pour le rein, le foie puis le coeur. Comme solution cardioplégique elle connaît du succès dans différents modèles pour des durées et conditions de préservation très variées. Par contre, puisqu'elle ne

contient pas de calcium, la solution UW peut causer un dysfonctionnement cellulaire si la reperfusion a lieu avec une solution contenant du calcium, via un influx massif de ce dernier. Aussi, sa viscosité élevée peut augmenter le stress et la résistance vasculaire si elle est perfusée contribuant ainsi aux dommages endothéliaux⁵⁹ déjà présents à cause de la concentration élevée de potassium. Enfin, il semble que la solution Wisconsin cause des dysfonctions endothéliales proportionnelles à l'augmentation de température^{239,445} et qu'elle serait plus efficace à 4°C.

D'autre part, la solution STH No.2 a été conçue en 1981 à partir de la solution St-Thomas No.1²¹⁹. Les modifications apportées (légère diminution du sodium et du potassium et diminution de 50% du contenu en calcium, retrait de la procaine, ajout de bicarbonate et ajustement du pH à 7.8) ont amélioré les performances de cette solution dont l'efficacité est rapportée entre 1 et 10°C avec une solution oxygénée⁶⁹.

Conçue en 1994, la solution Celsior a été mise au point spécifiquement pour le cœur²⁶⁴. La formulation de cette solution visait trois grands principes, soit la prévention de l'oedème intracellulaire, la prévention des dommages causés par les ERO et la prévention des contractures par l'amélioration de la production d'énergie et la limitation de la surcharge en calcium. Cette solution contient des composés antioxydants, un substrat énergétique, des agents osmotiques, des agents tampons et les électrolytes de base.

Par ailleurs, il existe peu de littérature concernant les solutions Stanford, Bretschneider HTK, Collins et Columbia. A long terme, les patients dont le cœur a été traité avec la solution Stanford lors de transplantation, ont démontré moins de vasculopathie que ceux traités avec la solution UW¹⁰⁵. La solution Stanford University est quelques fois utilisée simplement pour la période d'arrêt.

Développée en 1961, la solution Bretschneider serait la plus utilisée en Europe. Au cours des années, elle a été modifiée et la version HTK conçue pour la préservation de cœurs, est maintenant la plus utilisée, offrant de bons résultats en hypothermie,

sans être oxygénée³¹³.

De son côté, la solution Collins avait été conçue au départ pour la préservation de reins. Elle endommage le coeur à l'arrêt à cause de sa grande concentration de potassium et sa faible concentration de sodium, mais serait efficace pour la préservation⁴¹⁴, surtout à basse température.

Finalement, la solution CU, élaborée dans le but de reconstituer le cGMP, le NO et l'AMP inter et intra-cellulaire, contient une grande diversité de produits et serait efficace pour les préservations de longue durée³⁰⁰.

Enfin, il existe une confusion majeure dans la littérature concernant les solutions cardioplégiques. Certains chercheurs utilisent les formulations initiales, d'autres les modifient. De plus, le mode, la durée et la température de préservation, de même que l'espèce étudiée varient constamment rendant les comparaisons sur l'efficacité des solutions très hasardeuses.

Chapitre II. STRATÉGIE DE PROJET

Chapitre II. STRATÉGIE DE PROJET

Ce projet de doctorat s'intégrait dans un programme de recherche dont le l'objectif à long terme était une meilleure définition des modalités et indications de la thérapie antioxydante pour la protection du coeur contre les dommages reliés à l'ischémie-reperfusion.

Dans le contexte du début des années 90, plusieurs études portant sur le sujet avaient été publiées, bien que la controverse régnait quant au rôle de la thérapie antioxydante due en partie, au manque de rigueur de plusieurs études. A cet égard, l'objectif général de ce projet était d'éclaircir la contribution de chacune des espèces radicalaires aux dommages observés, puisque ceci s'avère déterminant pour le choix du ou des antioxydants à préconiser. L'hypothèse principale était que l'investigation systématique de la séquence des événements pendant l'ischémie et la reperfusion avec les outils méthodologiques appropriés, nous permettrait de clarifier la relation de cause à effet entre les espèces réactives oxygénées et les dommages associés à l'ischémie-reperfusion.

Nous avons donc choisi d'étudier le rôle des $\cdot\text{OH}$ puisque d'une part, il semble qu'ils soient les plus toxiques et d'autre part, nous disposions d'une méthode spécifique de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour évaluer leur formation. Aussi, nous voulions travailler avec un seul antioxydant dont l'efficacité avait été démontré *in vitro* contre le $\cdot\text{OH}$. C'est ainsi que le NAC a été sélectionné, d'autant plus qu'il s'agissait d'une molécule non-toxique possédant plusieurs propriétés intéressantes dont certaines furent démontrées *in vivo* chez des sujets souffrant de maladies cardiaques.

Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser un modèle d'ischémie-reperfusion sur des coeurs isolés de rats perfusés selon le mode Langendorff. Ce modèle permet un bon contrôle des conditions expérimentales et la caractérisation de la séquence des

événements par différentes mesures faites sur le perfusat effluent. Puisque la première série d'expériences avait un aspect exploratoire, nous avons documenté différents paramètres dans des coeurs isolés de rats perfusés en conditions aérobiques, soumis à une ischémie partielle de 90 minutes (1 ml/min) puis à une reperfusion de 30 minutes soient: la production de $\cdot\text{OH}$ ainsi que divers paramètres reflétant soit le stress oxydatif (GSH), la nécrose cellulaire (LDH), l'état rédox cytosolique (lactate/pyruvate) et la fonction cardiaque (débit coronarien et rythme cardiaque). De plus, le NAC a été infusé à différents moments durant l'expérience afin de déterminer si: 1) cette molécule avait un effet antioxydant direct sur les $\cdot\text{OH}$ dans un organe isolé et dans l'affirmative, 2) si cet effet était associé à des effets bénéfiques sur les paramètres biochimiques et physiologiques du coeur. Des résultats de cette première partie de l'étude, nous avons tiré les conclusions suivantes: 1) le NAC a un effet antioxydant direct contre les $\cdot\text{OH}$ quoique cette action ne soit pas associée à aucun effet bénéfique sur les paramètres biochimiques et physiologiques du coeur et 2) le NAC induit une hyperémie soutenue dans les coeurs reperfusés après une ischémie partielle. Il semble que plus d'un mécanisme soit impliqué dont la production de $\cdot\text{NO}$, et que ce mécanisme dépende du temps d'addition du NAC.

Suite à cette première série d'expériences, nous avons examiné, suivant le même protocole, les effets de deux dérivés du NAC, des molécules non commercialisées très prometteuses, soit le thiopyruvate éthyl ester et le N-acétylcystéine-fumarate diéthyl ester. L'hypothèse était que ces molécules devaient permettre d'observer des bénéfices supplémentaires à la réduction des $\cdot\text{OH}$ étant donné les propriétés des conjugués. Les résultats préliminaires décevants nous ont fait changer de voie.

Par ailleurs, quelques articles parus dans la littérature soulevaient la possibilité d'un plus grand bénéfice d'une thérapie antioxydante dans un modèle où la nécrose serait moins importante, comme dans les cas de chirurgie pour un pontage ou lors d'une préservation en vue d'une transplantation. C'est alors que nous avons décidé d'appliquer la thérapie antioxydante à la mise au point d'une solution de préservation et d'une solution de reperfusion. La solution cardioplégique devait permettre

d'augmenter la durée sécuritaire de la période de préservation alors que la solution de reperfusion devait limiter les dommages associés à l'ischémie-reperfusion. Après plusieurs essais et après avoir réalisé l'ampleur de la littérature, la complexité de ce domaine de recherche et les controverses qui y règnent, nous nous sommes fixés des objectifs plus précis. Nous avons décidé d'utiliser une solution de préservation conçue spécifiquement pour le coeur afin de pouvoir concentrer nos efforts sur diverses interventions lors de la période de reperfusion.

Nous avons donc utilisé un deuxième protocole basé sur un modèle de cardioplégie-reperfusion (C-R). L'hypothèse de travail était que dans un modèle de C-R où il y a peu de nécrose, nous devrions observer d'une façon plus marquée les effets bénéfiques d'un traitement antioxydant. Puisque dans la littérature il était suggéré qu'une reperfusion graduelle pourrait permettre de diminuer les dommages de reperfusion associés au stress oxydatif, nous avons comme premier objectif de documenter l'effet de la technique de reperfusion. En tenant compte du résultat, le deuxième objectif était d'évaluer l'effet d'une thérapie antioxydante couplée ou non avec une thérapie énergétique. Dans les deux cas, les coeurs de rats étaient préservés 4h à 4° C dans la solution Celsior, puis reperfusés 60 minutes sur un montage Langendorff. En plus des techniques utilisées lors de la première série d'expérience, nous avons mis au point le dosage d'ATP, d'ADP et d'AMP tissulaire par spectrophotométrie, nous avons placé de petites électrodes sur le coeur à la reperfusion afin d'évaluer l'incidence d'arythmie et nous avons inséré un ballonnet dans le ventricule gauche du coeur pendant la reperfusion afin d'obtenir des paramètres de la fonction contractile. Des résultats de ce deuxième protocole, nous avons tiré les conclusions suivantes: 1) le NAC combiné aux substrats énergétiques augmentent le débit coronarien à la reperfusion et 2) l'augmentation du débit coronarien n'est associée à aucun effet bénéfique sur les paramètres biochimiques et physiologiques du coeur isolé.

Pour tenter d'expliquer les facteurs impliqués dans la modulation du débit coronarien, nous avons utilisé un troisième protocole d'ischémie-reperfusion, soit l'ischémie

globale de 15 minutes suivie d'une reperfusion de 30 minutes. Ce protocole permettait le traitement des coeurs avec des inhibiteurs variés avant la période d'ischémie. L'hypothèse de travail étant qu'en bloquant alternativement différentes voies connues dans la littérature pour être impliquées dans la modulation du débit coronarien, nous pourrions identifier la ou les voies responsables de l'élévation du débit coronarien observée pour les coeurs reperfusés avec le NAC et les substrats énergétiques.

Les résultats obtenus au cours de ce projet font l'objet d'un article publié (*Free Radicals Biology & Medicine*) et d'un manuscrit soumis (*American Journal of Physiology*). Dans l'ensemble, ces résultats soulèvent un questionnement quant à la contribution des $\cdot\text{OH}$ et par conséquent, quant à la pertinence d'une thérapie antioxydante ciblée sur ces espèces réactives oxygénées dans le syndrome d'ischémie-reperfusion sur un coeur isolé. En outre, les résultats mettent aussi en évidence un effet modulateur du NAC sur le débit coronarien. Cet effet est indépendant de son activité de piègeur de $\cdot\text{OH}$ et pourrait bien expliquer les effets hypotenseurs rapportés précédemment dans la littérature lors de son administration chez des patients cardiaques.

Chapitre III. ARTICLE ET MANUSCRIT



 **Original Contribution**

EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE IN THE RAT HEART REPERFUSED AFTER LOW-FLOW ISCHEMIA: EVIDENCE FOR A DIRECT SCAVENGING OF HYDROXYL RADICALS AND A NITRIC OXIDE-DEPENDENT INCREASE IN CORONARY FLOW

JULIE BRUNET, MARIE-JOSÉE BOILY, SYLVIE CORDEAU, and CHRISTINE DES ROSIERS

Department of Nutrition, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada

(Received 12 January 1995; Revised and accepted 26 April 1995)

Abstract—The capacity of *N*-acetylcysteine to directly scavenge hydroxyl radical produced by rat hearts reperfused after 90 min of low-flow ischemia was assessed by the hydroxylation of 4-hydroxybenzoate into 3,4-dihydroxybenzoate using a gas chromatography–mass spectrometric assay. Reperfused hearts showed a massive release of 3,4-dihydroxybenzoate, lactate dehydrogenase, and total glutathione, contained less reduced and oxidized glutathione, but maintained spontaneous beating and coronary flow rates close to preischemic values. Compared to untreated hearts: reperfused hearts treated with *N*-acetylcysteine from the start of ischemia (i) released four times less 3,4-dihydroxybenzoate, but similar amounts of lactate dehydrogenase or glutathione, (ii) showed a nitric oxide-dependent increase in coronary flow rate, and (iii) contained less oxidized glutathione, but similar amounts of reduced glutathione. Reperfused hearts receiving *N*-acetylcysteine since the last 5 min of ischemia had also a four-times lower 3,4-dihydroxybenzoate release, but their coronary flow rate response was similar to that of untreated hearts. These results indicate that *N*-acetylcysteine can directly scavenge hydroxyl radicals produced by reperfused ischemic hearts, although this effect is not associated with any protective effects as indicated by the lactate dehydrogenase and glutathione release and cannot explain the nitric oxide-dependent reperfusion hyperemia.

Keywords—*N*-Acetylcysteine, Low-flow ischemia, Reperfusion, Coronary flow, Heart, Hydroxyl radical, Free radicals

INTRODUCTION

Reperfusion of blood flow to the ischemic myocardium is an absolute prerequisite for survival. However, paradoxically, it may also promote further myocardial injury by what has been called “reperfusion injury.” Reperfusion injury is a complex multifaceted phenomenon that includes arrhythmias, reversible myocardial and endothelial dysfunction (myocardial and microvascular stunning), and the conversion of reversibly to irreversibly injured myocytes (myocyte death; see for review Opie,¹ Yellon and Jennings,² and Hearse et al.³). Increasing evidence indicates that arrhythmias and stunning are free radical-mediated phenomena,⁴⁻⁷ but controversy persists regarding whether oxygen radicals contribute to extending cell death.⁸⁻¹¹

N-Acetylcysteine (NAC) is one among many agents

administered in an attempt to neutralize the deleterious effects of free-radicals and thus to improve heart recovery upon reperfusion. NAC is a low molecular weight compound that raises the intracellular concentration of cysteine, and hence of reduced glutathione (GSH),¹² an important endogenous antioxidant. It also has direct scavenging properties in vitro against the hydroxyl radical ([•]OH), and hypochlorous acid.¹³⁻¹⁴ NAC was shown by many authors,^{12,15-16} but not all,¹⁷⁻¹⁸ to be effective in improving heart mechanical function without reducing myocyte death.^{15,19} These beneficial effects are observed when NAC treatment is started before¹⁶ or during ischemia,¹⁵ but not at reperfusion,^{16,18} and are associated in some studies,^{12,16} but not all,¹⁵ with an increase in the GSH content of the heart. The failure of NAC to be beneficial when added at reperfusion is taken as evidence against its direct scavenging action.¹⁶ However, the latter cannot be excluded, because the improved cardiac function is not always associated with an increased heart GSH content.¹⁵

The purpose of this study was to determine whether NAC can directly scavenge [•]OH radical in an in vitro

Address correspondence to: Julie Brunet, Laboratory of Intermediary Metabolism, Louis-Charles Simard Research Center, Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke St. East, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1.

model of cardiac ischemia and reperfusion. $\cdot\text{OH}$ production has been assessed by aromatic hydroxylation,²¹ measuring the formation of 3,4-dihydroxybenzoate (34DHBZ) from 4-hydroxybenzoate (4HBZ) using a gas chromatography mass spectrometry (GCMS) assay.²¹ Part of this work was presented in abstract form.²²

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

N-acetyl-L-cysteine, (\pm)-norepinephrine hydrochloride, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), 2-vinylpyridine, [2,2,3,3- $^2\text{H}_4$]succinic acid and [1,1- $^2\text{H}_2$]phenylacetic acid were obtained from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). 4-Hydroxybenzoate, 3,4-dihydroxybenzoate, 2,5-dihydroxybenzoate, sodium octanoate, *N*- ω -nitro-L-arginine (NNLA), L(+)-lactic acid, reduced glutathione (GSH), and glutathione reductase were bought from Sigma (St. Louis, MO), oxidized glutathione (GSSG), NAD, NADPH, and TRIS from Boehringer Mannheim Canada (Laval, Québec), triethanolamine from Fisher Scientific (Montréal, Québec), and sulfosalicylic acid from Anachemia (Montréal, Québec). Cardiotrol (lactate dehydrogenase (LDH) from human serum) was obtained from Hoffmann-La Roche Ltd (Brampton, Ontario). *N*-Methyl-*N*-(*t*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide was supplied by Regis Chemical Co. (Morton Grove, IL). Sodium borodeuteride (NaB^2H_4) was bought from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). The internal standard, [3,4,4,4- $^2\text{H}_4$]lactate was synthesized as previously described.²³ All other reagents were analytical grade. All aqueous solutions were made with water purified by a "Milli-Q" system (Millipore, St-Laurent, Québec).

Rat heart perfusions

Male Sprague-Dawley rats weighing between 250 and 350 g were sacrificed by cervical dislocation. The hearts were rapidly excised and perfused according to the Langendorff technique at a constant pressure of 80 mm Hg with a nonrecirculating modified Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 119 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 mM NaHCO_3 , 11 mM glucose, 0.2 mM octanoate, and 1 mM 4HBZ. The perfusate was equilibrated at 37°C with 5% CO_2 and 95% O_2 (pH 7.4). The heart was enclosed in a temperature-controlled, water-jacketed, chamber. Coronary flow rate was measured with an electromagnetic flow probe (Model FM501, Carolina Medical Electronics Inc., King, NC) installed above the aortic cannula. Heart rate was measured using a pressure transducer connected to the perfusion line via a T junction above the

aortic cannula (Blood Pressure Analyzer, Micro-Med Inc., Louisville, KN), and the heart temperature using a thermocouple (Yellow Springs Instrument Co., Inc, OH) attached on the surface of the heart. All three instruments were linked to a microcomputer (Hewlett Packard Vectra ES) for continuous recording of data. The hearts were allowed to beat spontaneously throughout the experiments. Hearts that didn't fulfill the following criteria were discarded: spontaneous heart rate above 200 beats/min and increase of coronary flow on release of a 20–25 second period of inflow occlusion (reactive hyperemia).

Perfusion protocols

After an equilibration period at normal flow (normally about 20–30 min), hearts were perfused aerobically at reduced flow (1 ml/min) for 90 min low-flow ischemia, and then reperfused for 30 min. Hearts were freeze-clamped (with Wollenberger tongs) and stored in liquid nitrogen.

For all perfusions, norepinephrine (NE) was infused at a final concentration of 1 μM from the beginning of the low-flow ischemic period until the end of the perfusion to simulate the excessive systemic and/or local adrenergic discharge, which are known complications of myocardial ischemia.²⁴ When indicated, NAC was infused at a final concentration of 100 μM ¹² either from (i) the beginning of the low-flow ischemic period, or (ii) 5 min prior to the reperfusion period, until the end of the perfusion. To determine the effect of a nitric oxide (NO) synthetase inhibitor, *N*- ω -nitro-L-arginine (NNLA) was added to the perfusion buffer at a final concentration of 100 μM .²⁵ Perfusate NE and NAC concentrations were kept constant despite variations in coronary flow using a computer program²⁶ developed for feedback control of a syringe pump (Harvard Instruments, Southnatick, MA). Stock solutions of NE (100 μM) and NAC (10 mM) were prepared fresh with deionized nitrogen-equilibrated water just prior to the experiment, and were protected from light. The 5 mM NNLA stock solution was made in 0.9% NaCl solution.

Sampling protocols

Samples of effluent perfusate were collected on ice at the indicated times and processed immediately as follows: (i) 34DHBZ: 2 ml perfusate without any treatment, (ii) GSH + GSSG: 500 μL perfusate was treated with 10 μl of saturated sulfosalicylic acid (SSA) for protein precipitation, followed by 16 μl of triethanolamine for neutralization; (iii) LDH: 500 μl perfusate was diluted with 500 μl 245 mM TRIS buffer pH 7.0, and (iv) lactate, pyruvate and succinate: 500 μl

perfusate was treated for 30 min with 200 μ l 1 M NaB^2H_4 to stabilize pyruvate by reduction into [^2H]-lactate.²¹ Glutathion was assayed within 2 to 4 h²⁷ after sample collection, and LDH within 20 min as preliminary experiments indicated a rapid decrease in LDH activity with time. Samples for the assay of 34DHBZ, lactate, pyruvate, and succinate were frozen.

Analytical procedures

Enzymatic assays: LDH, GSH, and GSSG were assayed on a Roche COBAS FARA. For LDH, the procedure of the instrument operator's manual, which is that of Gay et al.,²⁸ was followed. A standard solution of LDH (Cadiotrol) was always assayed in parallel with the samples. The procedure to assay GSH and GSSG was that of Anderson.²⁹ For tissue content of GSH and GSSG, hearts were pulverized in a mortar cooled at the temperature of liquid nitrogen, and the frozen powdered tissue (80 mg) was homogenized using an ultrasonic disintegrator (Vibra Cell, Sonics & Materials Inc., Danbury, CN) in 1 ml of an ice-cold nitrogen-equilibrated 5% SSA solution. The homogenates were then centrifuged at 3000 g for 20 min. For the assay of GSH, 100 μ l supernatant was diluted in 0.4 ml nitrogen-equilibrated 5% SSA solution and neutralized with 16 μ l triethanolamine. For the assay of GSSG, 400 μ l supernatant is treated with 8 μ l of 2-vinylpyridine to prevent interference by GSH, and neutralized with 6 μ l triethanolamine. Standard curves of GSH and GSSG were always performed in parallel. Analyses were performed in triplicate, and each sample was assayed three times.

Gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) assay. (i) 34DHBZ: Perfusate samples (2 ml) were spiked with 1 nmol of each of the following external standards, [$^2\text{H}_2$]phenylacetic acid ([$^2\text{H}_2$]PAC) and 2,5-dihydroxybenzoate (25DHBZ).²¹ (ii) Lactate, pyruvate (reduced to [^2H]lactate),²³ and succinate: Perfusate samples (0.5 ml) were spiked with 250 nmol [$^2\text{H}_4$]lactate and 5 nmol [$^2\text{H}_4$]succinate. All samples were acidified, saturated with NaCl, and extracted with diethyl ether. The combined ether phases were dried with anhydrous sodium sulphate and gently evaporated under a nitrogen stream. The dry residues were converted to *t*-butyldimethylsilyl (TBDMS) derivatives by the addition of 50 or 75 μ l of *N*-Methyl-*N*-(*t*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide.

All samples were analyzed on a Hewlett Packard 5988A GCMS operated in the electron impact mode (70 eV) using selective ion monitoring analysis (SIM). GC conditions were: 25 m \times 0.2 mm HP-5 capillary column; helium flow, 0.6–0.8 ml/min; split ratio 1:10;

column head pressure, 20 kPa; injection port and transfer line, 280°C. The GC temperature programs used were the following: (i) 34DHBZ: 110° for 2 min and 6°/min to 280°. Elution times for the TBDMS derivatives of [$^2\text{H}_2$]PAC, 25DHBZ, and 34DHBZ were 12.2, 28.0, and 29.3 min, respectively. Ions monitored at these times were at *m/z* 195, 439, and 439, respectively. Those ions are formed through the loss of the *t*-butyl group [*M*-57]⁺ from the TBDMS radical. (ii) Lactate, [^2H]lactate (pyruvate reduced with NaB^2H_4), succinate: 140° for 5 min and 5°/min to 205° and 50°/min to 250° for 2 min. The TBDMS derivatives of lactate and succinate elute at 9.3 and 12.7 min, respectively. Ions monitored are at *m/z* 261, 262, and 265 for lactate, [^2H]lactate and [$^2\text{H}_4$]lactate, respectively, and at *m/z* 289 and 293 for succinate and [$^2\text{H}_4$]-succinate, respectively.

Peak areas, determined by computer integration, were corrected for naturally occurring heavy isotopes and for light isotopic impurities.^{30–31} Concentrations of lactate, pyruvate, and succinate in samples (Q_A) were calculated using the corrected area (CA) of the ion corresponding to the compound of interest (CA_A) and to the internal standard (CA_{IS}), and the quantity of the internal standard (Q_{IS}) added to each sample analyzed.

$$Q_A = Q_{IS} \times (CA_A/CA_{IS})$$

For 34DHBZ, quantitation was achieved using a response factor in the numerator of the above equation.³² This factor is determined experimentally for each external standard with a standard curve performed in parallel with the samples to be analyzed. The limit of detection of our assay is in the pmole range. 34DHBZ data are expressed in three different formats: (i) concentration (nmol 34DHBZ per ml of effluent perfusate), (ii) rate of production or formation in nmol per min (nmol 34DHBZ per ml of effluent perfusate \times flow rate in ml/min), and (iii) accumulated amount of 34DHBZ formed during the first 10 min of reperfusion (nmol 34DHBZ/10 min), which was calculated as follows:

$$\Sigma \{[\text{Rate of formation of 34DHBZ (nmol/min) at } t_1] \times [(t_1 - t_2) (\text{min})]\}.$$

where $t_1 - t_2$ is the time interval between two sample collections.

In view of possible artefacts associated with measurements of $\cdot\text{OH}$ radicals production by aromatic hydroxylation in various systems,^{20,33–34} our 34DHBZ data were corrected for background noise. The latter

was determined for each perfusion experiment by GCMS analysis of the influent perfusate, collected at the beginning and the end of the experiment. It averaged 6.2 ± 1.6 nmol/l, representing 71%, 22%, and 16% of basal, ischemic, and postischemic 34DHBZ concentration, respectively. Similarly, in two separate experiments where we simulated a perfusion without hanging a heart, the artefactual concentration of 34DHBZ in the perfusate amounted to 2.8 ± 1.0 nmole/l.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SE of n heart perfusions. A one-way nonparametric analysis of variance (Kruskal–Wallis test) were used to assess separately in control or NAC-treated hearts the effect of intervention (low-flow ischemia, or reperfusion, versus basal or preischemic conditions) on the various measured parameters. Comparisons between control and NAC-treated hearts (effect of treatment) were performed using either an analysis of covariance for repeated measures (perfusate), a one-way analysis of variance followed by a

Dunnnett multiple comparison test (perfusate), or an unpaired t -test (tissue). Linear trend between two parameters was tested with the Pearson correlation coefficient. A probability of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The formation of $\cdot\text{OH}$ radicals by the isolated perfused rat heart was assessed by the hydroxylation of 4HBZ into 34DHBZ using GCMS. This approach is similar to that measuring the formation of 2,3-dihydroxybenzoate from the chemical reaction of salicylic acid with $\cdot\text{OH}$. Similarly, the chemical reaction of 4HBZ with $\cdot\text{OH}$ yields 34DHBZ.²¹ Quantitation of 34DHBZ in the heart influent and effluent perfusate was achieved using two different external standards, [²H₂]phenylacetic acid, and 2,5-dihydroxybenzoate. Because similar results were obtained with the two external standards (not shown), only those calculated with [²H₂]phenylacetic acid are reported in this article.

In preliminary experiments (not shown), the addition of 1 mM 4HBZ to the perfusate of hearts subjected

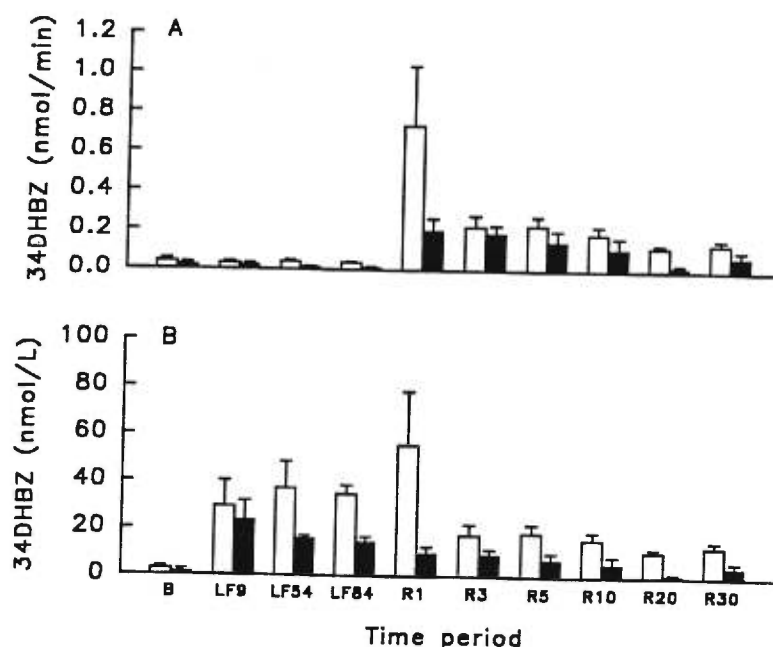


Fig. 1. Effect of low-flow ischemia (LF) and reperfusion (R) on the production (A) and the concentration (B) of 34DHBZ by isolated rat hearts perfused without (white bars) or with 100 μM NAC (black bars). Two groups of hearts, perfused with a nonrecirculating Krebs–Ringer buffer containing 11 mM glucose, 0.2 mM octanoate, and 1 mM 4HBZ were subjected to 90 min of LF and 30 min of reperfusion. Starting at the beginning of the LF period, one group of hearts received an infusion of 1 μM NE alone ($n = 6$, control), whereas the other group received an infusion of 1 μM NE + 100 μM NAC ($n = 5$, NAC). Samples from the effluent perfusate were collected during 1–2 min starting at the time indicated, and analyzed by GCMS to determine the quantity of 34DHBZ formed from 4HBZ, an index of $\cdot\text{OH}$ radical production. Values are means \pm SE of the five or six heart perfusions. Analysis of covariance (effect of treatment): $p < 0.05$ for both 34DHBZ production and concentration at LF and R. Analysis of variance (effect of intervention): (a) 34DHBZ production, LF: NS (control, NAC), R: $p < 0.05$ (control, NAC); (b) 34DHBZ concentration, LF $p < 0.05$ (control, NAC), R: $p < 0.05$ (control) and NS (NAC). B: basal or preischemic conditions.

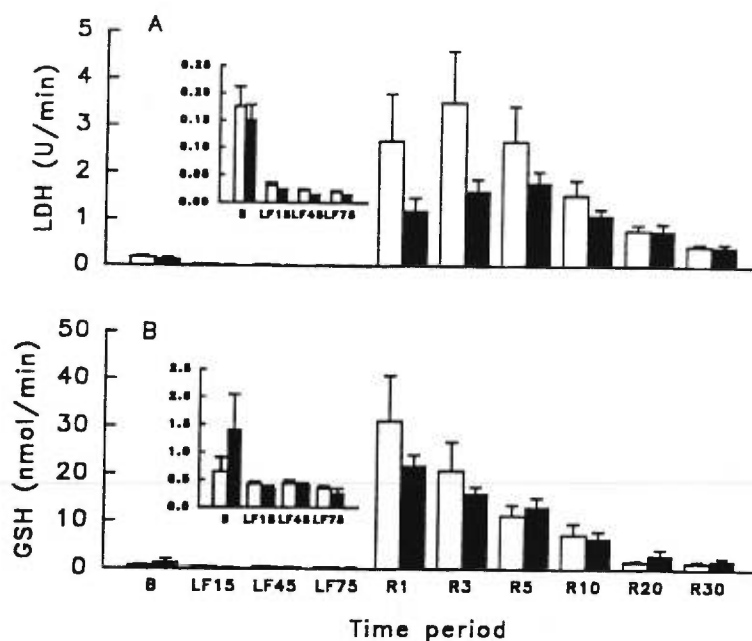
Effects of *N*-acetylcysteine

Fig. 2. Effect of low-flow ischemia (LF) and reperfusion (R) on the release of LDH (A) and GSH + GSSG (B) by isolated rat hearts perfused without (white bars) or with 100 μ M NAC (black bars). Other data from the heart perfusion experiments described in Figure 1. Samples from the effluent perfusate were collected during 1–2 min at the time indicated and assayed immediately. Values are means \pm SE of five or six heart perfusions. Analysis of covariance (effect of treatment): NS in all cases. Analysis of variance (effect of intervention): (a) LDH, LF and R: $p < 0.05$ (control, NAC); (b) GSH, LF: NS (control, NAC), R: $p < 0.05$ (control, NAC). B: basal or preischemic conditions.

to 60 min of low-flow ischemia and 15 min of reperfusion did not significantly influence the coronary flow rate or heart rate, nor the magnitude of LDH and GSH release, under basal or ischemic conditions or upon reperfusion. Also, the formation of 34DHBZ by hearts perfused during 75 min under aerobic conditions was found to be close to the limit of detection of our assay.

Low-flow ischemia and reperfusion

Hearts perfused under normal aerobic conditions released small amounts of 34DHBZ, LDH, GSH, and lactate + pyruvate in a ratio within the physiological range (Figs. 1–3, open bars). Under these conditions, the concentration of 34DHBZ in the effluent perfusate was close to the limit of detection of our assay. Reducing the coronary flow to 1 ml/min for 90 min resulted in (i) similar formation, but increased perfusate concentration, of 34DHBZ (Fig. 1), (ii) lower release of LDH (Fig. 2A), and (iii) a greater and time-dependent release of lactate + pyruvate (Fig. 3) and succinate (not shown). Because the ischemic heart released proportionally more lactate, but less pyruvate, than the aerobic heart (not shown), the lactate/pyruvate ratios after 75 min of low-flow ischemia were as much as 600-fold greater than the preischemic value (Fig. 3B). Shortly after reperfusion, the ischemic hearts released

(Figs. 1–3 and Table 2) 34DHBZ, LDH, and GSH in massive amounts, but lactate + pyruvate, and succinate (not shown) at a rate similar to that observed after 75 min of low-flow ischemia. One minute after reperfusion, the lactate/pyruvate ratio was already 20-fold lower than that observed at the end of low-flow ischemic period. As reperfusion continued, all these metabolic parameters returned progressively to preischemic values. After reperfusion, hearts had coronary flow rates (Fig. 4A) and maintained spontaneous beating (Fig. 4B) close to preischemic values.

NAC treatment

When compared to untreated hearts, hearts receiving 100 μ M NAC from the beginning of the low-flow ischemic period showed a significantly lower production and perfusate concentration of 34DHBZ during the low-flow ischemic period and at reperfusion (Fig. 1, dark bars). The release of all other measured parameters, LDH, GSH, lactate + pyruvate and lactate/pyruvate ratio (Figs. 2 and 3, black bars) was not significantly affected by the treatment, although values tended to be lower (LDH, $p = 0.07$ using the analysis of covariance) and to show less variability (as indicated by the smaller standard errors). With respect to the physiological parameters, treatment with NAC resulted

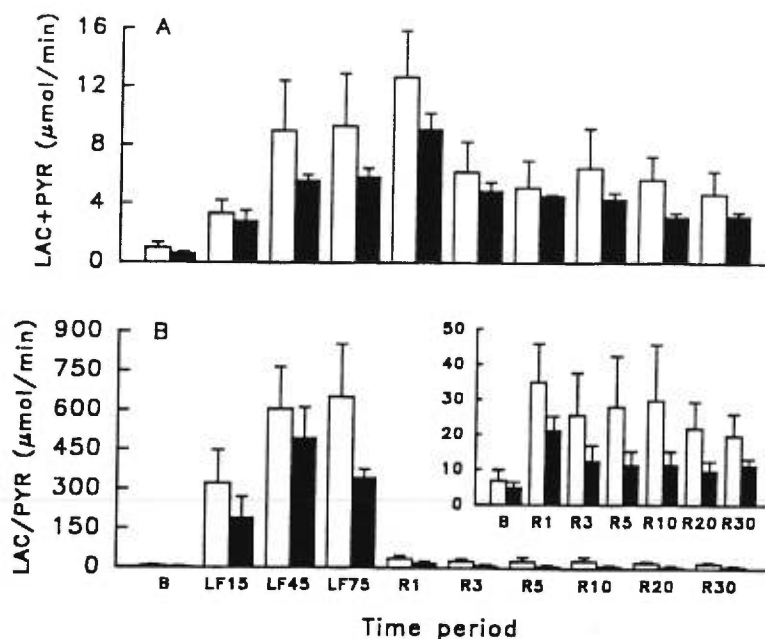


Fig. 3. Effect of low-flow ischemia (LF) and reperfusion (R) on the total (A) and the ratio (B) of lactate and pyruvate released by isolated rat hearts perfused without (white bars) or with 100 μ M NAC (black bars). Other data from the heart perfusion experiments described in Figure 1. Samples of effluent perfusate were collected during 1–2 min starting at the time indicated, and analyzed by GCMS for lactate (LAC) and pyruvate (PYR) concentration with an internal standard of [3 H $_4$]lactate. Results are shown as (A) total lactate + pyruvate release and as (B) the ratio lactate/pyruvate, which is an index of the cytosolic redox state (NADH/NAD). Values are means \pm SE of four or five heart perfusions. Analysis of covariance (effect of treatment): NS in all cases. Analysis of variance (effect of intervention): (a) LAC + PYR, LF: $p < 0.05$ (control, NAC), R: $p < 0.05$ (control, NAC); (b) LAC/PYR, LF: $p < 0.05$ (control, NAC), R: NS (control, NAC). B: basal or preischemic conditions.

in coronary flow rates at reperfusion about 65% greater than preischemic values (Fig. 4A and Table 2, $p < 0.05$), although it did not influence the heart rate response (Fig. 4B). Finally, reperfused ischemic hearts treated with NAC contained less GSSG, but similar GSH, than untreated hearts (Table 1). Consequently, the GSH/GSSG ratio also tended to be higher.

The addition of NAC 5 min prior to reperfusion (Table 2) resulted in a release of 34DHBZ at reperfusion comparable to that observed for hearts treated with NAC from the beginning of the low-flow ischemic period. The release of all other metabolic and physiological parameters, including the coronary flow rate, measured at reperfusion was similar to untreated hearts.

Relation between the release of 34DHBZ, LDH, and GSH

The relation between 34DHBZ, LDH, and GSH was evaluated by (i) testing for a linear trend between the magnitude of their release during the first 10 min of reperfusion with the the Pearson correlation coefficient and by (ii) comparing the average time of their peak release. Taking into account all perfusion experiments

($n = 15$), without and with NAC, a significant correlation was found between the total release of LDH and GSH ($r = 0.89$; $p < 0.0001$), but not between that of 34DHBZ and either LDH ($r = 0.3$; $p = 0.3$), or GSH ($r = 0.1$; $p = 0.7$). However, 34DHBZ and GSH release peaked at a similar time, 1.14 ± 0.14 and 1.29 ± 0.19 minute, respectively (NS), which was earlier than LDH, 2.69 ± 0.43 min ($p < 0.05$). Note that the given times are the average of all perfusion experiments, because they did not differ for hearts perfused without or with NAC.

Because results obtained in the two first series of perfusions (without and with NAC added at ischemia) already indicated similar times for the peak release of 34DHBZ and GSH, the sampling protocol of our last series of perfusions (hearts treated with NAC 5 min prior to reperfusion) was slightly modified in hoping to clarify a possible cause to effect relationship. Thus, the perfusate coming out of the heart immediately at the time of reestablishment of flow was also collected and analyzed for 34DHBZ, LDH, and GSH. Out of five hearts, four showed a greater release for 34DHBZ (0.74 ± 0.26 nmol/min; $n = 5$) at this earlier time compared to that observed between 1 and 3 min of reperfusion (R1 = 0.35 ± 0.07 nmol/min; $n = 5$), compared to only one for GSH and none for LDH.

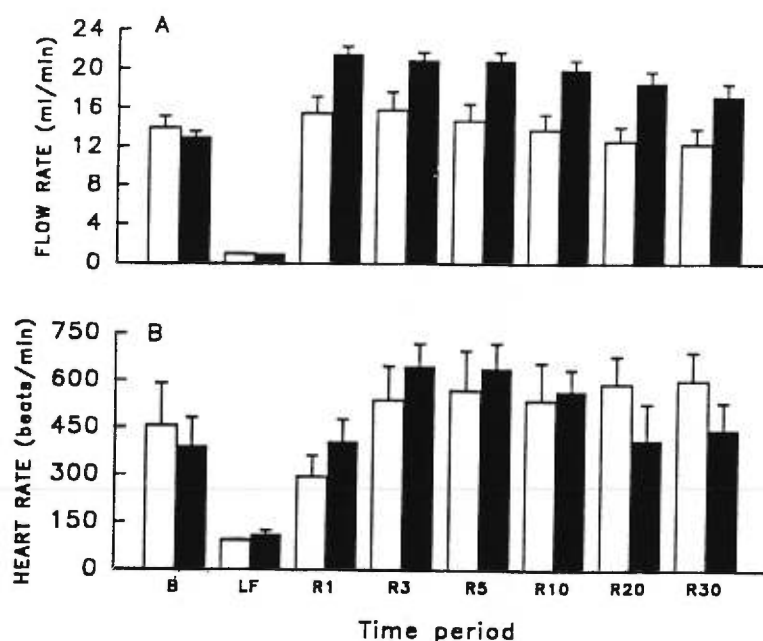
Effects of *N*-acetylcysteine

Fig. 4. Effect of low-flow ischemia (LF) and reperfusion (R) on the (A) coronary flow rate and (B) heart rate of isolated rat hearts perfused without (white bars) or with 100 μ M NAC (black bars). Other data from the heart perfusion experiments described in Figure 1. Coronary flow rate (CFR) and heart rate (HR) were continuously monitored throughout the perfusion experiments and averaged for the following time period: (i) the last 10 min preceding LF, (ii) the entire LF and (iii) for the time interval between that indicated during reperfusion. Values are means \pm SE of six or seven heart perfusions. Analysis of covariance (effect of treatment): (a) CFR at R, $p < 0.05$. Analysis of variance (effect of intervention): (a) CFR, R: NS (control) and $p < 0.05$ (NAC); (b) HR, LF: $p < 0.05$ (control) and NS (NAC), R: NS (control, NAC). B: basal or preischemic conditions.

These results do not, however, change any of the above conclusions.

Effect of NNLA on the coronary flow rate at reperfusion

Perfusion of aerobic hearts for 20 min with 0.1 mM NNLA, a NO synthase inhibitor, resulted in more than a two-fold decrease in the coronary flow rate ($42\% \pm 5\%$ of basal value, $n = 9$, not shown). This decrease was observed in the absence or presence of 100 μ M NAC \pm 1 μ M NE. NAC alone, with or without NE, had no effect on the coronary flow rate (not shown). The effect of NNLA on the coronary flow rate of reperfused ischemic hearts treated with NAC varied depending upon the time of addition of NAC (Table 3). NNLA was without any effect when NAC was added prior to NNLA and to the low-flow ischemic period, that is, there was still a 75% increase in the coronary flow rate at reperfusion. However, this rise was abolished by the addition of NNLA prior to ischemia and of NAC at the beginning of the low-flow ischemic period.

DISCUSSION

This article demonstrates that NAC treatment decreases the production of \cdot OH radicals by the isolated

rat heart reperfused after 90 min of low-flow ischemia. It also documents a NO-dependent increase in coronary flow at reperfusion of hearts treated with NAC since the beginning of the low-flow ischemic period.

Production of \cdot OH radicals during ischemia and reperfusion

Increased production of oxygen-derived free radicals (ODFR) early upon reflow of ischemic or hypoxic

Table 1. Content in GSH and GSSG of Hearts Reperfused for 30 min After 90 min of Low-Flow Ischemia Without or With 100 μ M NAC

Parameters	Perfusion Conditions	
	Control	+ 100 μ M NAC
GSH	555 \pm 62	531 \pm 32
GSSG	13.0 \pm 1.3	9.3 \pm 0.5*
GSH/GSSG	45 \pm 4	58 \pm 6'

Other data from the heart perfusion experiments described in Figure 1. At the end of the perfusion, all hearts were freeze-clamped at the temperature of liquid N_2 . Heart tissue was pulverized and homogenized before determination of GSH and GSSG concentration. Values are expressed in nmol/g wet weight and are mean \pm SE of five heart perfusions. For comparison, values for three nonperfused hearts were: GSH = 1017 \pm 93 nmol/g; GSSG = 24 \pm 2 nmol/g; GSH/GSSG = 45 \pm 7 nmol/g; * $p < 0.05$ and ' $p < 0.1$, NAC versus control using an unpaired *t*-test.

Table 2. Effect of Time of Addition of NAC on Various Parameters

Parameters Measured Upon Reperfusion	Time of NAC Addition		
	None	Low-Flow Ischemia (LF)	Reperfusion (R)
34DHBZ (nmol/10 min)	3.7 ± 0.7	1.3 ± 0.4 [†]	1.6 ± 0.2 [*]
LDH (units/10 min)	26 ± 8	15 ± 2	31 ± 8
GSH (nmol/10 min)	159 ± 41	141 ± 13	180 ± 38
CFR (% PI value)	107 ± 10	162 ± 9 [†]	91 ± 8 [‡]

Other data from the heart perfusion experiments described in Figure 1 in which 100 μ M NAC was added at the beginning of the low-flow ischemic (LF) period, and from similar heart perfusion experiments where NAC was added 5 min prior to the reperfusion period (R, $n = 5$). For 34DHBZ, LDH, and GSH, values shown are the total quantity recovered in the effluent perfusate during the first 10 min of reperfusion. For the coronary flow rate (CFR), values were averaged for the first 10 min of reperfusion and expressed as % of the preischemic value (% PI value). Values are means \pm SE of four or seven heart perfusions. [†] $p < 0.01$, ^{*} $p < 0.05$, addition of NAC at LF or R versus no addition, and [‡] $p < 0.001$, addition of NAC at R versus addition of NAC at LF, using analysis of variance followed by Dunnett multiple comparison test.

hearts has been repeatedly and consistently documented with various techniques,³⁵⁻⁴⁴ including aromatic hydroxylation.^{33,45-47} The latter technique, which was used in this study, provides a specific quantitative analysis of \cdot OH production.²⁰ ODFR may also be formed during ischemia,^{35,39-40,43-44,48} but the nature, magnitude, and time course of this production, compared to that observed under basal conditions or after reperfusion, has not been so well characterized, and it is a subject of controversy.

In this study, rat hearts perfused under low-flow ischemia produced 34DHBZ, an index of \cdot OH radical production, at a low rate, comparable to that observed under aerobic conditions (preischemic period). The concentration of 34DHBZ in the effluent perfusate of ischemic hearts was, however, several-fold greater than that observed in the preischemic period, being closer to that observed early after reflow. The importance of discriminating between the ODFR vascular concentration and their rate of formation was recently stressed by Blasig *et al.*⁴⁹ Only the former was found to be significantly correlated with indices of microvascular (decreased coronary flow rate) and myocardial mechanical damage (arrhythmias, depressed contractile function) in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion. Thus, from our data, it may be suggested that (i) those cells being perfused under low-flow ischemia produce ODFR in quantities greater than under aerobic conditions, and (ii) possibly the higher ODFR concentration contributes to the ischemia-induced myocardial and microvascular injury.

Very early upon reperfusion (0-120 s) of ischemic hearts, we observed, like many others,^{35-38,40,44-46} an increased production of ODFR, more specifically \cdot OH radicals. The peak 34DHBZ formation at reperfusion

occurred in all our experiments. In their study, Tosaki *et al.*⁴⁵ detected 23DHBZ or 25DHBZ formation from salicylate in fibrillating hearts only. Thus, the incidence of ventricular fibrillation in our reperfused hearts was probably high,⁵⁰ although this was not assessed. The magnitude and time-course of the production and perfusate concentration of \cdot OH radical we observed are similar to those reported by Takemura *et al.*⁴⁶ These authors used also aromatic hydroxylation to assess \cdot OH production. Because the duration of ischemia has been shown to be a powerful determinant of the magnitude of the postischemic production of ODFR, including the \cdot OH radical,^{42,46} it may be suggested that 90 min low-flow ischemia (this study) and 15-20 min global ischemia (study of Takemura *et al.*⁴⁶) produce comparable damage in rat hearts. Takemura *et al.*⁴⁶ presented evidence for limited mechanical damage, that is, recovery of heart contractility (dP/dt), heart rate, and coronary flow rate. In our study, a rapid metabolic and functional recovery of our reperfused hearts was indicated by the (i) maintenance of spontaneous beating and coronary flow rate close to preischemic values, and (ii) normalization of the cytosolic redox state, as indicated by the lactate/pyruvate ratio, and of the intracellular reduced thiol status, as indicated by the tissue GSH/GSSG ratio.

Antioxidant effect of NAC

The beneficial effects of NAC observed in several ischemia-reperfusion models was mostly attributed to its ability to serve as a precursor of GSH.^{12,16} However, NAC can improve cardiac function without increasing tissue GSH level,¹⁵ suggesting alternate mechanism(s) of action. Our data indicate that direct scavenging of

Table 3. Effect of 100 μ M NNLA on the Coronary Flow Rate of Reperfused Ischemic Hearts Treated With 100 μ M NAC

Time of NAC Addition	Coronary Flow Rate (% PI value)
Preischemic period	175 \pm 5
Beginning of the LF period	82 \pm 18*
Beginning of reperfusion period	63 \pm 4*

Other data from the heart perfusion experiments described in Figure 1. For all heart perfusions, 100 μ M NNLA was infused 20 min prior to the beginning of low-flow ischemia (LF). NAC infusion (final concentration 100 μ M) was started either (i) during the preischemic period, at the same time or 10 min prior to NNLA infusion ($n = 3$), (ii) at the beginning of LF period ($n = 3$), and (iii) at the beginning of the reperfusion period ($n = 2$). Values are means \pm SE. * $p < 0.05$ NAC addition at the LF or reperfusion period vs NAC addition during the pre-ischemic period, using a one-way analysis of variance followed by Dunnett multiple comparison test.

\cdot OH radicals by the ischemic-reperfused hearts should be considered. In fact, NAC decreased the production of 34DHBZ (i) by the ischemic hearts and (ii) by the reperfused ischemic hearts even when added only 5 min prior to reperfusion (Table 2). Also, the GSH content of reperfused-ischemic hearts treated with NAC from the beginning of low-flow ischemia was similar to that of untreated hearts. More likely, NAC can significantly increase total tissue GSH only when added prior to the ischemic period.^{12,16,51} However, our data do not exclude the possibility that NAC could increase the GSH pool locally,¹⁵ possibly in endothelial cells, when added at the beginning of the low-flow ischemia.

A direct scavenging of \cdot OH radicals by NAC is in agreement with *in vitro* studies.¹³⁻¹⁴ NAC is also a powerful scavenger of hypochlorous acid, but not of hydrogen peroxide or superoxide anion. The production of all these oxidant species is increased in the reperfused ischemic hearts *in vivo*,^{2,12} but *in vitro*, there is no known source of hypochlorous acid. Also, NAC has effects similar to other \cdot OH scavengers^{46,52-53} in that it improved cardiac function,¹⁵⁻¹⁶ but failed to reduce tissue necrosis when added during ischemia and/or reperfusion.^{15,19} and this study In this study, there was no correlation between 34DHBZ production (index of \cdot OH radical) and LDH leakage by the ischemic-reperfused rat hearts, although the observed sequence of events (an earlier peak release of 34DHBZ than LDH or GSH) suggested a priori a cause-effect relationship. The reason for this discrepancy is not known. In our system, the production of 34DHBZ appears to reflect \cdot OH radical formation rather than the activity of the heart cytochrome P450 system.⁵⁴ In fact, the magnitude of the transient peak of 34DHBZ formation observed at reperfusion was (i) similar if 4HBZ was added only

5 min prior to reperfusion (not shown), and is (ii) diminished by the addition of a \cdot OH radical scavenger (NAC; Table 2). However, the chemical reaction of 4HBZ with the \cdot OH radical probably occurs mostly in the coronary vasculature, such that the assay of 34DHBZ formation may underestimate the myocardial \cdot OH production. The latter would be expected to be more closely related to the LDH release.

Effect of NAC treatment on coronary flow rate

We report a possible preservative effect of NAC treatment during ischemia and reperfusion on the coronary microvasculature, as evidenced by a NO-dependent hyperemic response upon reperfusion of ischemic rat hearts. This effect was lost when NAC was given only before the onset of reflow, as was also reported for other beneficial effects of NAC such as improved cardiac function^{12,15-16,18-19} or decreased incidence of arrhythmias.¹⁹ The involvement of NO was indicated by the blunted coronary response in the presence of NNLA, a NO synthase inhibitor, in reperfused hearts receiving NAC since the beginning of ischemia. Other authors used LNNA (0.005 mM–1 mM) to show the involvement of a NO-dependent process in the basal regulation⁵⁵ of coronary blood flow, as well as hypoxic vasodilation,⁵⁶⁻⁵⁷ NO generation⁵⁸⁻⁶⁰ and myocardial hyperemia.⁶¹ NNLA, however, failed to prevent an increase in coronary flow rate above preischemic values when NAC infusion started before that of the inhibitor, during the preischemic period. This suggests more than one possible mechanism by which NAC can exert its effect on coronary flow regulation.

To our knowledge, such an effect of NAC on coronary flow rate has not been reported before, although Ferrari et al.¹² did report hypotension in humans with cardiovascular disease receiving NAC. Also, in one⁵¹ of many studies where NAC was given to heart subjected to ischemia-reperfusion,^{12,15-16,18-19} a significantly better hemodynamic recovery of reperfused hearts receiving NAC was observed, although coronary flow rates upon reflow were significantly lower than preischemic values. We do not have an explanation for these differences. However, the type and extent of the ischemic insult is known to influence the coronary flow response of ischemic hearts upon reflow (see Hearse et al.³ for review), and, in this study, unlike others,^{12,15-16,18-19,51} NE was infused during low-flow ischemia and reperfusion to simulate the excessive systemic and/or local adrenergic discharge, which are known complications of myocardial ischemia and circulatory shock *in vivo*.²⁴

It is now accepted that microvascular injury occurs, independently of myocardial injury, during ischemia

and reperfusion (see Hearse *et al.*¹ and Treasure⁶² *et al.* for review). Even mild, reversible, ischemia causes a loss of vasodilator reserve and progressive vasoconstriction. Also, responses to drugs are impaired, especially those which are endothelium-dependent. Among the mechanisms that have been proposed to contribute to the genesis of microvascular injury during ischemia and reperfusion are ODFR, principally the superoxide anion,^{3,63-64} which may impair the production and action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF),^{62,65} which is proposed to be NO.⁶⁶⁻⁶⁷

We can only speculate on the possible mechanisms responsible for the observed increase in coronary flow rates following NAC addition during ischemia and reperfusion. First, the effect of NAC is more likely to be permissive or indirect, rather than a direct action on vascular smooth muscle cells. *In vitro*, NAC induces an endothelium-independent relaxation of rat vessels or of resistance arteries precontracted with NE.²⁵ However, in this study, NAC was without effect on the coronary flow rate of (i) aerobically perfused rat hearts (not shown) and of (ii) reperfused ischemic hearts if added 5 min prior to reflow (Table 3). Second, NAC is unlikely to act by reducing NO degradation through either direct scavenging of superoxide anions produced at reperfusion or increased SOD activity. In fact, (i) NAC addition at reperfusion failed to induce an increased coronary flow response (Table 2), (ii) NAC reacts poorly, if at all, with superoxide anions *in vitro*,¹³ and (iii) NAC treatment did not modify heart SOD activity in an ischemia-reperfusion setting.¹⁵ The benefit of NAC's [•]OH scavenging property in this context is hard to evaluate because the role of [•]OH, if any, in microvascular injury is not clear.

We, therefore, consider the following three explanations as being more likely, as well as not being mutually exclusive: (1) NAC treatment during ischemia and reperfusion preserves the intracellular thiol (including GSH) pool of endothelial cells during low-flow ischemia. This explanation is supported by the demonstration that, upon reperfusion, GSH-depleted hearts show increased coronary resistance,⁶⁸ whereas GSH-treated hearts show increased posthypoxic coronary flow.⁶⁹ (2) NAC serves as precursor for the formation of *S*-nitrosothiols, either *S*-nitrosocysteine or *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine, which are (i) more stable and more potent vasodilatory compounds than NO⁷⁰⁻⁷¹ and (ii) proposed as endogenous precursors of NO.⁷⁰⁻⁷² Although there is no clear evidence that *S*-nitrosothiols are an intracellular storage form of NO,⁷³ this could explain why NAC addition before NNLA and during the pre-ischemic period elicited an increased coronary flow response upon reflow that was not blunted by NNLA (Table 3). (3) NAC inhibits the angiotensin converting

enzyme (ACE), an enzyme localized at the membrane of the endothelium.⁷⁴ This decreases the production of angiotensin II, a vasoconstrictor, and prevents the degradation of bradykinin, a vasodilator that induces the synthesis of NO.⁷⁵

In summary, this study provides evidence for a direct scavenging of [•]OH radicals by NAC in reperfused ischemic rat hearts whether added at the beginning or at the end of a 90 min low-flow ischemic period. We also report an additional, possibly beneficial, effect of NAC on the coronary flow rate regulation of the reperfused ischemic heart. The elucidation of the exact mechanism underlying the increased hyperemic response of reperfused hearts receiving NAC since the beginning of ischemia may help to better define the conditions of NAC administration to humans, so as to prevent or better control the associated hypotension.¹²

Acknowledgements — The authors thank Dr. Jane Montgomery and Ms. Line Ste-Marie for their help with the GCMS assay of 4HBZ and 34DHBZ, and Dr. Luc Vachon and M. Yves Lalonde for their advice on statistical analyses. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10816 and MT-10920 to C. Des Rosiers).

REFERENCES

- Opie, L. H., ed. *The heart: Physiology and metabolism*. New York: Raven Press; 1991.
- Yellon, D. M.; Jennings, R. B., eds. *Myocardial protection: The pathophysiology of reperfusion injury*. New York: Raven Press; 1992.
- Hearse, D. J.; Maxwell, L.; Saldanha, C.; Gavin, J. B. The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: A target for injury and protection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25:759-800; 1993.
- Jeroudi, M. O.; Hartley, C. J.; Bolli, R. Myocardial reperfusion injury: Role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants. *Am. J. Cardiol.* 73:2B-7B; 1994.
- Curtis, M. J.; Pugsley, M. K.; Walker, M. J. A. Endogenous chemical mediators of ventricular arrhythmias in ischemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* 27:703-719; 1993.
- Tosaki, A.; Das, D. K. Reperfusion induced arrhythmias are caused by generation of free radicals. *Cardiovasc. Res.* 28:422; 1994.
- Goldhaber, J. I.; Weiss, J. N. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities. *Hypertension* 20:118-127; 1992.
- Przyklenk, K.; Kloner, R. A. "Reperfusion injury" by oxygen-derived free radicals? Effect of superoxide dismutase plus catalase, given at the time of reperfusion, on myocardial infarct size, contractile function, coronary microvasculature and regional myocardial blood flow. *Circulation Res.* 64:86-96; 1989.
- Ambrosio, G.; Becker, L. C.; Hutchins, G. M.; Weisman, H. F.; Weisfeldt, M. L. Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: Insights into the pathophysiology of reperfusion injury. *Circulation* 74:1424-1433; 1986.
- Chambers, D. E.; Parks, D. A.; Patterson, G.; Roy, R.; McCord, J. M.; Yoshida, S.; Parmley, L. F.; Downey, J. M. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17:145-152; 1985.
- Lesnefsky, E. J. Reduction of infarct size by cell-permeable oxygen metabolite scavengers. *Free Radic. Biol. Med.* 12:429-446; 1992.

Effects of *N*-acetylcysteine

12. Ferrari, R.; Ceconi, C.; Curello, S.; Cargnoni, A.; Allieri, O.; Pardini, A.; Marzollo, P.; Visioli, O. Oxygen free radicals and myocardial damage: Protective role of thiol-containing agents. *Am. J. Med.* **91**:95s-105s; 1991.
13. Aruoma, O. I.; Halliwell, B.; Hoey, B. M.; Butler, J. The antioxidant action of *N*-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* **6**:593-597; 1989.
14. Gressier, B.; Cabanis, A.; Lebegue, S.; Brunet, C.; Dine, T.; Luyckx, M.; Cazin, M.; Cazin, J-C. Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: Comparison *in vitro* of some thiol-containing drugs. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **16**:9-13; 1994.
15. Forman, M. B.; Puett, D. W.; Cates, C. U.; McCroskey, D. E.; Beckman, J. K.; Greene, H. L.; Virmani, R. Glutathione redox pathway and reperfusion injury. Effect of *N*-acetylcysteine on infarct size and ventricular function. *Circulation* **78**:202-213; 1988.
16. Ceconi, C.; Curello, S.; Cargnoni, A.; Ferrari, R.; Albertini, A.; Visioli, O. The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: Effects of *N*-acetyl cysteine. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **20**:5-13; 1988.
17. Tani, M. Effects of anti-free radical agents on Na⁺, Ca²⁺, and function in reperfused rat hearts. *Am. J. Physiol.* **259**:H137-H143; 1990.
18. Collis, C. S.; Davies, M. J.; Rice-Evans, C. Comparison of *N*-methyl hexanoylhydroxamic acid, a novel antioxidant, with desferrioxamine and *N*-acetyl cysteine against reperfusion-induced dysfunctions in isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22**:336-342; 1993.
19. Qiu, Y.; Bernier, M.; Hearse, D. J. The influence of *N*-acetylcysteine on cardiac function and rhythm disorders during ischemia and reperfusion. *Cardioscience* **1**:65-74; 1990.
20. Halliwell, B.; Kaur, H.; Ingelman-Sundberg, M. Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: A cautionary note. *Free Radic. Biol. Med.* **10**:439-441; 1991.
21. Montgomery, J. A.; Ste-Marie, L.; Brunet, J. *Quantitation of hydroxybenzoates in biological fluids as indices of hydroxyl radical production*. Proceeding, 41st American Society of Mass Spectrometry Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 322ab abstr.; 1993.
22. Brunet, J.; Boily, M-J.; Jetté, M.; Montgomery, J. A.; Des Rosiers, C. Indices of the oxidative and metabolic state during low-flow ischemia and reperfusion in the isolated rat heart. Effect of glutamate and *N*-acetylcysteine. *FASEB J.* **8**(5):4959 abstr.; 1994.
23. Des Rosiers, C.; Montgomery, J. A.; Garneau, M.; David, F.; Mamer, O. A.; Daloz, P.; Toffolo, G.; Cobelli, C.; Landau, B. R.; Brunengraber, H. Pseudoketogenesis in hepatectomized dogs. *Am. J. Physiol.* **258**:E519-E528; 1990.
24. Bünger, R.; Mallet, R. T.; Hartman, D. A. Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and post-ischemic isolated working heart. Near-complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur. J. Biochem.* **180**:221-223; 1989.
25. Sunman, W.; Hughes, A. D.; Sever, P. S. Free-radical scavengers, thiol-containing reagents and endothelium-dependent relaxation in isolated rat and human resistance arteries. *Clin. Sci.* **84**:287-295; 1993.
26. Montgomery, J. A.; Jetté, M.; Huot, S.; Des Rosiers, C. Acyloln production from aldehydes in the perfused rat heart: The potential role of pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* **294**:727-733; 1993.
27. Roberts, J. C.; Francetic, D. J. The importance of sample preparation and storage in glutathione analysis. *Anal. Biochem.* **211**:183-187; 1993.
28. Gay, R. J.; McComb, R. B.; Bowers, Jr., G. N. Optimum reaction conditions for human lactate dehydrogenase isoenzymes as they affect total lactate dehydrogenase activity. *Clin. Chem.* **14**:740-753; 1968.
29. Anderson, M. E. Tissue glutathione. In: Greenwald, R. A., eds. *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. Florida: CRC Press, Inc.; 1985:317-323.
30. Des Rosiers, C.; Montgomery, J. A.; Desrochers, S.; Garneau, M.; David, F.; Mamer, O. A.; Brunengraber, H. Interference of 3-hydroxyisobutyrate with measurements of ketone body concentration and isotopic enrichment by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **173**:96-105; 1988.
31. Laplante, A.; Comte, B.; Des Rosiers, C. Assay of blood and tissue oxaloacetate and α -ketoglutarate by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **224**:580-587; 1995.
32. Des Rosiers, C.; Rivest, M-J.; Boily, M-J.; Jetté, M.; Carrobé-Cohen, A.; Kumar, A. Gas chromatographic-mass spectrometric assay of tissue malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, and other aldehydes after their reduction to stable alcohols. *Anal. Biochem.* **208**:161-170; 1993.
33. Powell, S. R.; Hall, D. Use of salicylate as a probe for [•]OH formation in isolated ischemic rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* **9**:133-141; 1990.
34. Montgomery, J. A.; Ste-Marie, L.; Boismenu, D.; Vachon, L. Hydroxylation of aromatic compounds as indices of hydroxyl radical production: A cautionary note revisited. *Free Radic. Biol. Med.* In press.
35. Zweier, J. L.; Flaherty, J. T.; Weisfeldt, M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:1404-1407; 1987.
36. Baker, J. E.; Felix, C. C.; Olinger, G. N.; Kalyanaraman, B. Myocardial ischemia and reperfusion: Direct evidence for free radical generation by electron spin resonance spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2786-2789; 1988.
37. Maupoil, V.; Rochette, L. Evaluation of free radical and lipid peroxide formation during global ischemia and reperfusion in isolated rat heart. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2**:615-621; 1988.
38. Ruuge, E. K.; Ledenev, A. N.; Lakomkin, V. L.; Konstantinov, A. A.; Ksenzenko, M. Y. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.* **261**:81-86; 1991.
39. Garlick, P. B.; Davies, M. J.; Hearse, D. J.; Slater, T. F. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circulation Res.* **61**:757-760; 1987.
40. Bolli, R.; Patel, B. S.; Jeroudi, M. O.; Lai, E. K.; McCay, P. B. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of spin trap α -phenyl *N*-tert-butyl nitron. *J. Clin. Invest.* **82**:476-485; 1988.
41. Damerau, W.; Ibel, J.; Thürich, T.; Assadnazzari, H.; Zimmer, G. Generation of free radicals in Langendorff and working hearts during normoxia, hypoxia, and reoxygenation. *Basic Res. Cardiol.* **88**:141-149; 1993.
42. Henry, T. D.; Archer, S. L.; Nelson, D.; Weir, E. K.; From, A. H. L. Postischemic oxygen radical production varies with duration of ischemia. *Am. J. Physiol.* **264**:H1478-H1484; 1993.
43. Henry, T. D.; Archer, S. L.; Nelson, D.; Weir, E. K.; From, A. H. L. Enhanced chemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation during ischemia and reperfusion. *Circulation Res.* **67**:1453-1461; 1990.
44. Arroyo, C. M.; Kramer, J. H.; Dickens, B. F.; Weglicki, W. B. Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS Lett.* **221**:101-104; 1987.
45. Tosaki, A.; Bagchi, D.; Pali, T.; Cordis, G. A.; Das, D. K. Comparisons of ESR and HPLC methods for the detection of OH[•] radicals in ischemic/reperfused hearts. *Biochem. Pharmacol.* **45**:961-969; 1993.
46. Takemura, G.; Onodera, T.; Ashraf, M. Quantification of hydroxyl radical and its lack of relevance to myocardial injury during early reperfusion after graded ischemia in rat hearts. *Circulation Res.* **71**:96-105; 1992.
47. Onodera, T.; Ashraf, M. Detection of hydroxyl radicals in the postischemic reperfused heart using salicylate as a trapping agent. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **23**:365-370; 1991.

48. Maupoil, V.; Rochette, L.; Tabard, A.; Clauser, P.; Harpey, C. Evolution of free radical formation during low-flow ischemia and reperfusion in isolated rat heart. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 4:791-795; 1990.
49. Blasig, I. E.; Shuter, S.; Garlick, P.; Slater, T. Relative time-profiles for free radical trapping, coronary flow, enzyme leakage, arrhythmias, and function during myocardial reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* 16:35-41; 1994.
50. Tosaki, A.; Braquet, P. DMPO and reperfusion injury: Arrhythmia, heart function, electron spin resonance, an nuclear magnetic resonance studies in isolated working guinea pig hearts. *Am. Heart J.* 120:819-830; 1990.
51. Menasché, P.; Grousset, C.; Gauduel, Y.; Mouas, C.; Piwnica, A. Maintenance of the myocardial thiol pool by *N*-acetylcysteine. An effective means of improving cardioplegic protection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 103:936-944; 1992.
52. Khalid, M. A.; Ashraf, M. Direct detection of endogenous hydroxyl radical production in cultured adult cardiomyocytes during anoxia and reoxygenation. Is the hydroxyl radical really the most damaging radical species? *Circ. Res.* 72:725-736; 1993.
53. Bolli, R.; Jeroudi, M. O.; Patel, B. S.; Aruoma, O. I.; Halliwell, B.; Lai, E. K.; McCay, P. B. 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.* 65:607-622; 1989.
54. Ingelman-Sundberg, M.; Kaur, H.; Terelius, Y.; Persson, J.-O.; Halliwell, B. Hydroxylation of salicylate by microsomal fractions and cytochrome P-450. Lack of production of 2,3-dihydroxybenzoate unless hydroxyl radical formation is permitted. *Biochem. J.* 276:753-757; 1991.
55. Bouma, P.; Ferdinandy, P.; Sipkema, P.; Allaart, C. P.; Westerhof, N. Nitric oxide is an important determinant of coronary flow in the isolated blood perfused rat heart. *Basic Res. Cardiol.* 87:570-584; 1992.
56. Brown, I. P.; Thompson, C. I.; Belloni, F. L. Role of nitric oxide in hypoxic coronary vasodilatation in isolated perfused guinea pig heart. *Am. J. Physiol.* 264:H821-H829; 1993.
57. Park, K. H.; Rubin, L. E.; Gross, S. S.; Levi, R. Nitric oxide is a mediator of hypoxic coronary vasodilatation. Relation to adenosine and cyclooxygenase-derived metabolites. *Circulation Res.* 71:992-1001; 1992.
58. Woditsch, I.; Schrör, K. Prostacyclin rather than endogenous nitric oxide is a tissue protective factor in myocardial ischemia. *Am. J. Physiol.* 263:H1390-H1396; 1992.
59. Leipert, B.; Becker, B. F.; Gerlach, E. Different endothelial mechanisms involved in coronary responses to known vasodilators. *Am. J. Physiol.* 262:H1676-H1683; 1992.
60. Pinsky, D. J.; Oz, M. C.; Koga, S.; Taha, Z.; Broekman, M. J.; Marcus, A. J.; Liao, H.; Naka, Y.; Brett, J.; Cannon, P. J.; Nowygrod, R.; Malinski, T.; Stern, D. M. Cardiac preservation is enhanced in a heterotopic rat transplant model by supplementing the nitric oxide pathway. *J. Clin. Invest.* 93:2291-2297; 1994.
61. Maekawa, K.; Saito, D.; Obayashi, N.; Uchida, S.; Haraoka, S. Role of endothelium-derived nitric oxide and adenosine in functional myocardial hyperemia. *Am. J. Physiol.* 267:H166-H173; 1994.
62. Treasure, C. B.; Alexander, R. W. The dysfunctional endothelium in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 22:129A-134A; 1993.
63. Kitakaze, M.; Hori, M.; Takashima, S.; Iwai, K.; Sato, H.; Inoue, M.; Kitabatake, A.; Kamada, T. Superoxide dismutase enhances ischemia-induced reactive hyperemic flow and adenosine release in dogs. A role of 5'-Nucleotidase activity. *Circ. Res.* 71:558-566; 1992.
64. Tsao, P. S.; Aoki, N.; Lefer, D. J.; Johnson III, G.; Lefer, A. M. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* 82:1402-1412; 1990.
65. Lefer, A. M.; Tsao, P. S.; Lefer, D. J.; Ma, X.-L. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J.* 5:2029-2034; 1991.
66. Furchgott, R. F.; Khan, M. T.; Jothianandan, D. Comparison of endothelium-dependent relaxation and nitric oxide-induced relaxation in rabbit aorta. *Fed. Proc.* 385:396 abstr.; 1987.
67. Palmer, R. M. J.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526; 1987.
68. Blaustein, A.; Deneke, S. M.; Stolz, R. I.; Baxter, D.; Healey, N.; Fanburg, B. L. Myocardial glutathione depletion impairs recovery after short periods of ischemia. *Circulation* 80:1449-1457; 1989.
69. Gauduel, Y.; Menasché, P.; Duvelleroy, M. Enzyme release and mitochondrial activity in reoxygenated cardiac muscle: Relationship with oxygen-induced lipid peroxidation. *Gen. Physiol. Biophys.* 8:327-340; 1989.
70. Myers, P. R.; Minor, Jr., R. L.; Guerra Jr., R.; Bates, J. N.; Harrison, D. G. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345:161-163; 1990.
71. Ignarro, L. J. Endothelium-derived nitric oxide: Pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters. *Pharmac. Res.* 6:651-659; 1989.
72. Stamler, J. S.; Simon, D. I.; Osborne, J. A.; Mullins, M. E.; Jaraki, O.; Michel, T.; Singel, D. J.; Loscalzo, J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:444-448; 1992.
73. Kowaluk, E. A.; Fung, H.-L. Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for *in vitro* vascular relaxation by S-nitrosothiols. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255:1256-1264; 1990.
74. Boesgaard, S.; Aldershvile, J.; Poulsen, H. E.; Christensen, S.; Digepetersen, H.; Giese, J. *N*-acetylcysteine inhibits angiotensin converting enzyme *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265:1239-1244; 1993.
75. Massoudy, P.; Becker, B. F.; Gerlach, E. Bradykinin accounts for improved postischemic function and decreased glutathione release of guinea pig heart treated with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23:632-639; 1994.

ABBREVIATIONS

34DHBZ—3,4-dihydroxybenzoate
 GSH—reduced glutathione
 GSSG—oxidized glutathione
 LDH—lactate dehydrogenase
 NAC—*N*-acetylcysteine
 NE—norepinephrine
 NNLA—*N*- ω -nitro-L-arginine
 NO—nitric oxide
 ODFR—oxygen-derived free radical

**ENERGY SUBSTRATES AND REACTIVE OXYGEN SPECIES MODULATE THE FLOW
RESPONSE OF RAT HEARTS REPERFUSED WITH N-ACETYLCYSTEINE .**

Brunet, Julie[#], Laplante, Annick⁺, Bouchard, Bertrand, Vincent, Geneviève⁺
and Des Rosiers, Christine^{#++}

Departments of Nutrition[#] and Biochemistry⁺, University of Montréal,
Montréal, Québec, Canada.

Running title: Coronary flow rate modulation.

* To whom correspondence should be addressed: Laboratoire du métabolisme intermédiaire, Centre de Recherches du CHUM, Campus Notre-Dame (Y-3616), 1560 rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1; Telephone; (514) 281-6000 #7477, Facsimile; (514) 896-4762, E-mail; desrosiers@sympatico.ca.

ABSTRACT

We previously reported a N-acetylcysteine-induced sustained hyperemic response in isolated rat hearts reperfused after 90 min low-flow ischemia. This flow effect was inhibited by a nitric oxide synthase inhibitor, but not if N-acetylcysteine was added prior to the inhibitor, suggesting that more than one mechanism is involved. We here report data in two different models of ischemia/reperfusion, showing that N-acetylcysteine flow effect is modulated by the energy substrate composition of the perfusion buffer. Further, in agreement with our previous study, this flow effect was not correlated with improvement in cardiac function or tissue necrosis, nor was it correlated with hydroxyl radical production. However, it was found to be antagonized by hydrogen peroxide and to a lesser extent by superoxide anions. Of many drugs, only glibenclamide, a K^+_{ATP} channel antagonist, decreased significantly the coronary flow response of hearts perfused with N-acetylcysteine and energy substrates both before and after ischemia. In conclusion, the coronary flow response of reperfused hearts treated with N-acetylcysteine is acutely modulated by the presence of exogenous energy substrates and reactive oxygen species, via a mechanism which involve, at least in part, K^+_{ATP} channels. Such interactions may explain why N-acetylcysteine administration *in vivo* induced hypotension in some patients recovering from cardiac surgery.

Keywords: thiol, heart preservation, Celsior solution, K^+_{ATP} channels.

INTRODUCTION

N-acetylcysteine (NAC) is one of many agents administered in an attempt to neutralize the deleterious effects of reactive oxygen species (ROS) and thus to improve the recovery of heart function at reperfusion. It has shown promising effects in cardiac patients (8,33). In a previous study (4), we documented a sustained hyperemic response following NAC treatment in rat hearts reperfused after 90 min low-flow ischemia. This flow effect was not related to NAC scavenging properties against hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), nor was it associated with other beneficial effects on cellular necrosis or cardiac function¹. It was abolished by the nitric oxide synthase inhibitor N- ω -nitro-L-arginine, but only when the latter drug was added before NAC, suggesting the involvement of more than one mechanism by which NAC modulates coronary flow rates. Only two of many studies on NAC treatment in cardiac ischemia-reperfusion injury including one in humans, reported some flow effects (8,35). Most studies (22,30), but not all (9), documented an improvement of contractile function, with no effect on tissue necrosis. The reason for these discrepancies is not clear, but it could be due to differences in experimental models or conditions. Indeed, the type and extent of the ischemic insult is known to influence the coronary flow response of ischemic/reperfused hearts as well as the outcome of an antioxidant treatment (34). More promising indications for the use of antioxidant therapy are clinical conditions where the ischemic insult is associated with little cellular necrosis such as heart transplantation and surgery (20).

In transplantation, the recently developed Celsior solution (24), unlike other solutions

(such as Wisconsin and St-Thomas #2) was specifically designed for heart preservation. This extracellular type solution combines several advantages: (i) prevention of cell swelling by cellular impermeants (lactobionate and mannitol) and high osmolarity; (ii) enhancement of endogenous thiol pools and antioxidant defenses by addition of scavengers targeting different ROS; namely reduced glutathione (hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), peroxynitrite ($ONOO^-$)), histidine (singlet oxygen (1O_2)) and lactobionate ($\cdot OH$); (iii) limitation of calcium overload by a low calcium content, addition of a calcium chelator (lactobionate) and antagonist (high Mg^{++}); (iv) enhancement of anaerobic energy production (glutamate), and (v) high buffering capacity (lactobionate and histidine). Evidence for the superiority of this preservation solution in the rat heart model led to its clinical investigation in Europe (24). In spite of advantages offered by the Celsior solution for heart preservation, to our knowledge, the effect of reperfusion conditions in this setting has not been investigated aside from one study by Pietri et al. (29).

In view of the above considerations, we re-examined the effect of NAC in rat hearts reperfused after cardioplegic arrest and preservation in Celsior solution. Data from these perfusion experiments indicated an increased and sustained hyperemic response in hearts treated with NAC only when the perfusion buffer contained energy substrates mixture. This result led us to investigate the mechanism responsible for this increased coronary flow response using another ischemia-reperfusion protocol.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals.

Chemicals, enzymes and organic solvents were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI), Sigma (St. Louis, MO), Boehringer Mannheim Canada (Laval, Québec), Fisher Scientific (Montréal, Québec), Anachemia (Montréal, Québec). Cardiotorol (Lactate dehydrogenase (LDH) from human serum) was obtained from Hoffmann-La Roche Ltd (Brampton, Ontario). N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide was supplied by Regis Chemical Co. (Morton Grove, IL). Glibenclamide (Glib), diphenyleneiodonium chloride (DPI), indomethacin, dimethyl sulfoxide and 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODO) were bought from Sigma (St. Louis, MO). All aqueous solutions were made with water purified by an "Elga" system. The Celsior cardioplegic solution, prepared essentially as described by Menasché et al. (24), contained the following compounds (in mM): 15 potassium, 112 sodium, 13 magnesium, 0.25 calcium, 41.5 chloride, 80 lactobionate, 60 mannitol, 30 histidine, 20 glutamate, 3 reduced glutathione (GSH). Final osmolarity of the solution was 360 mOsm/L and pH at 4 °C was 7.4.

Heart isolation, preservation and perfusion.

All animal experiments were approved by the local institutional animal care committee which follows guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats weighing between 220-320 g were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (70 mg/kg) and received heparin (150 IU) by intrajugular injection. After opening of the chest, hearts were rapidly excised, and either promptly (i) installed on the Langendorff set-up as previously described (4) or

(ii) arrested by perfusing through an aortic cannula 30 mL (10 mL/min) of cold Celsior solution kept at 4 °C. Hearts were stored at 4 °C in 100 mL of Celsior solution. After 4 h, they were flushed with 20 mL (10 mL/min) of Celsior solution and then perfused aerobically for 60 minutes according to the Langendorff technique with a non-recirculating modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer containing (in mM): 119 NaCl, 4.8 KCl, 1.3 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 24 NaHCO₃, 11 glucose, 0.2 octanoate (a medium chain fatty acid) and 1 4-hydroxybenzoate (4HBZ). Note that heart perfusion experiments with buffer containing 11 mM glucose and 0.2 mM octanoate as sole ES are referred to as *control conditions*. 4-hydroxybenzoate was added as a trapping agent for ·OH, as previously described (4). Other additions were as indicated. The perfusate concentration of the various agents infused was kept constant despite variations in coronary flow using a computer program developed for feedback control of the syringe pump (Harvard Instruments, South Natick, MA) (4). Perfusion buffer, which had been filtered through a 5 μm membrane, was equilibrated with 5% CO₂ and 95% O₂ at the indicated temperature. At all times, the heart was enclosed in a temperature-controlled, water-jacketed, chamber.

Experimental design

This study is divided in two parts. First, we examined the effect of NAC in hearts preserved for 4 h in cold Celsior solution. Then, perfusion experiments were designed to identify the factor(s) or mechanism(s) responsible for the coronary flow effect observed in the first set of experiments. This was done using either in preserved/reperfused hearts (A) or using a second perfusion protocol (15 min global ischemia and 30 min reperfusion) to allow treatment with various drugs before the

ischemic episode (B).

Part I: Perfusion experiments in preserved/reperfused hearts. Various indices of the oxidative, metabolic and/or functional status of the hearts were documented in a total of eight conditions. This includes initial sets of perfusion experiments: (i) to document the effect of preservation and (ii) to define conditions of pressure and temperature under which hearts preserved for 4h in cold Celsior solution ought to be reperfused to study the effect of NAC. Two different protocols of pressure and temperature were tested: (i) Reperfusion for 60 min at a constant pressure of 70 mm Hg with a buffer equilibrated at pH 7.4 and 37 °C with 5% CO₂ and 95% O₂ (*sudden reperfusion*; n=7) or (ii) reperfusion at a pressure of 30 mm Hg with a buffer equilibrated at 23 °C with 5% CO₂ and 95% O₂ (pH 7.2) for the first 10 min and then at 70 mm Hg with a buffer equilibrated at 37 °C with 5% CO₂ and 95% O₂ (pH 7.4) for the remaining 50 min (*gradual reperfusion*; n = 7).

Then, the effect of NAC was examined using the sudden reperfusion protocol. ***Effect of NAC:*** Hearts were reperfused at 70 mm Hg with buffer containing 11 mM glucose and 0.2 mM octanoate alone (*control conditions*) or in combination with other energy substrates (ES; in mM): 0.5 lactate, 0.1 pyruvate, 0.2 fumarate, 0.2 glutamate, 0.2 valine. When indicated, NAC and/or dichloroacetate (DCA: *a pyruvate dehydrogenase activator*), were infused for the first 20 minutes of the perfusion at a final concentration of 0.1 and 1 mM, respectively. The stock solution of NAC (10 mM) was prepared fresh before use with deionized nitrogen-equilibrated water. That of DCA (100 mM) was kept frozen until the experiment. These solutions, whose pH

was adjusted to 7.4, were protected from light.

Part II. Effect of various interventions on the coronary flow response of hearts perfused with NAC: (A) First, we examined whether the following interventions would modify the coronary flow response of preserved hearts reperfused with NAC, ES and DCA as described above. (i) Removal of DCA, or (ii) increased ROS concentrations, either $O_2^{\cdot-}$ or H_2O_2 . NAC (0.1 mM) was infused during the first 20 min of reperfusion, either (i) alone, (ii) with DCA (1 mM) and pyrogallol (an intracellular $O_2^{\cdot-}$ generator, 10 μ M), or (iii) with DCA (1 mM) and H_2O_2 (50 μ M). (B) Then, we documented the effect of various drugs was documented on the coronary flow rate of hearts subjected to 15 min global ischemia and 30 min reperfusion in the presence of 0.1 mM NAC and 11 mM glucose, either alone, or with ES (in mM: 1 lactate, 0.2 pyruvate, 0.2 octanoate and 0.2 fumarate). NAC was infused at 0.1 mM throughout the perfusion, starting 30 min before the ischemic episode. Stock solutions of the various drugs, prepared in either 95% ethanol (indomethacin 100 mM) or dimethyl sulfoxide (DPI 20 mM; ODQ 20 mM and Glib 20 or 100 mM), were diluted either in saline and infused or added directly to the perfusion buffer. The final perfusate concentration of the vehicle, less than 0.01%(ethanol) or 0.05% (dimethyl sulfoxide), did not affect coronary flow rate (not shown).

Parameters measured: **Functional parameters:** Parameters were monitored during the perfusion experiments through instruments linked to microcomputers (Hewlett Packard Vectra ES and IBM compatible Logic AT 486) as described previously (4). These included (i) the coronary flow rate using an electromagnetic flow probe (Model

FM501, Carolina Medical Electronics Inc., King, NC) installed above the aortic cannula, and (ii) the heart temperature, using a thermocouple (Yellow Springs Instrument Co., Inc, OH) attached to the surface of the heart. Finally, the contractile function was evaluated during the last 20-min of reperfusion by inserting into the left ventricular cavity, a saline-filled latex balloon inflated to yield a diastolic pressure between 5 to 10 mm Hg and connected to a pressure transducer (Digi-Med Heart Performance Analyser, Micro-Med, Louisville, KY). We favoured balloon insertion at a later time in reperfusion to limit mechanical stress (27) although this precluded measurements of an increase in diastolic pressure.

Biochemical parameters: *Effluent perfusates:* Procedures for the assay of effluent perfusate concentrations and release rates of the following parameters were previously described (4): (i) 3,4-dihydroxybenzoate (34DHBZ from the hydroxylation of 4-hydroxybenzoate, an index of $\cdot\text{OH}$ formation; 4 mL untreated perfusate), (ii) LDH (an index of cellular necrosis; perfusate diluted with 245 mM TRIS buffer pH 7.0 to yield 10 U LDH/L) and (iii) lactate (an index of ischemic challenge and anaerobic glycolysis, 0.5 mL untreated perfusate). LDH was assayed within 20 minutes of sample collection and lactate on previously frozen samples, using a spectrophotometer (Roche COBAS FARA). 34DHBZ was assayed by selected ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry (SIM-GCMS, Hewlett Packard; GC 5890 coupled to an MSD 5972) on previously frozen samples spiked with 1 nmol of the external standard 2,5-dihydroxybenzoate. All samples were acidified, saturated with NaCl, and extracted with diethyl ether. The combined ether phases were dried with anhydrous sodium sulphate and gently evaporated under a nitrogen stream. The

dry residues were converted to *t*-butyldimethylsilyl derivatives by the addition of 75 μ L of *N*-methyl-*N*-(*t*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide. 34DHBZ data were corrected for background noise as previously described (4).

Tissue homogenates: For tissue content of GSH, oxidized glutathione (GSSG) and adenine nucleotides (ATP, ADP, AMP), freeze-clamped hearts, which had been stored at -196 °C, were pulverized in a mortar cooled with liquid nitrogen. The powdered frozen tissue was homogenized using an ultrasonic disintegrator (Vibra Cell, Sonics & Materials Inc., Danbury, CN). Conditions for GSH and GSSG assay (80 mg tissue homogenized in 1 mL of 5% sulfosalicylic acid) were previously described (4). Concentrations of adenine nucleotides (375 mg tissue homogenized at 4° C in 1.5 mL 6% perchloric acid) were determined enzymatically using a kit (ATP, Sigma #366) and standard methods (ADP and AMP) (1).

Statistical analysis. Data are expressed as means \pm SE. Effects of interventions on the various parameters were analyzed using the indicated test. A probability of $p < 0.05$ was considered statistically significant. The average factor for conversion of measured g wet weight to g dry weight was determined to be 8.85 ± 0.16 ($n = 29$).

RESULTS

Effect of heart preservation in Celsior solution: Table 1 reports the content in GSSG, GSH, and adenine nucleotides of hearts before and after 4 h cold preservation in Celsior solution. Preserved hearts contained significantly more GSH and GSSG, but maintained a similar [GSH]/[GSSG] ratio, than non-preserved hearts. They also showed a higher tissue level of adenine nucleotides and a lower value for the ratio [ATP]/[ADP]. The increased total glutathione of hearts preserved in Celsior solution results from the composition of this cardioplegic solution. Indeed, for comparison, hearts preserved for 4 h in St-Thomas #2 solution showed a total glutathione and adenine nucleotides (1.07 ± 0.02 and 2.92 ± 0.08 $\mu\text{mol/g}$ wet weight, $n=5$) content similar to non-preserved hearts, but a similar ratio [ATP]/[ADP] (1.68 ± 0.14) to hearts preserved in Celsior solution.

Recovery of preserved/reperfused rat hearts under control conditions: Figs 1 and 2 (open bars) show the functional and biochemical parameters measured in preserved hearts reperfused at a constant pressure of 70 mm Hg with buffer containing 11 mM glucose and 0.2 mM octanoate as sole energy substrates (*control conditions*). Compared to non-preserved rat hearts (data not shown), preserved/reperfused rat hearts maintained a similar coronary flow rate, but showed a lower contractile activity (25-40% lower dP/dt), released several-fold more LDH (threefold), GSH + GSSG (400-fold) and 34DHBZ (20-fold) and contained less adenine nucleotides (40%) despite similar ratio [ATP]/[ADP]. Compared to hearts reperfused for 30 min after 90 min low-flow ischemia, a model which we previously characterized (4),

preserved/reperfused hearts showed 72% less LDH release, indicating that the preservation model is associated with less tissue necrosis.

Note that none of the parameters measured were significantly modified by staged reperfusion of preserved hearts (Fig. 2, hatched bars), although the time-profile of the coronary flow and LDH release rates showed a biphasic response, with maximal values observed at 10-15 min, concomitant with the rise in pressure and temperature (Fig. 1, hatched bars). This finding points out the importance of measuring LDH release, as well as other indices, at several time points during reperfusion to assess total release.

Effects of NAC in preserved/reperfused hearts:

Effects of NAC alone or in combination with a mixture of ES and DCA was documented in preserved hearts reperfused at a constant pressure of 70 mm Hg. Note that under control conditions, the ES present in our perfusion buffer (glucose and the medium chain fatty acid octanoate) supply acetyl-CoA from β -oxidation of octanoate in non limiting amounts to the citric acid cycle whose activity is crucial for the energy metabolism of the heart (5). Other substrates were added to our buffer (lactate, pyruvate, glutamate, fumarate and valine) to feed all pathways of oxidative and anaerobic energy production. Lactate and pyruvate, added at physiological concentrations, maximizes anaplerotic oxaloacetate supply for citrate formation (5). Glutamate, fumarate and valine, which were shown to be cardioprotective by others, favor formation of succinate by pathways linked to ATP formation by substrate level

phosphorylation (17,18,32). Finally, DCA, a pyruvate dehydrogenase activator, enhances the post-ischemic myocardial functional recovery by favoring glucose over fatty acid oxidation (19,38).

As shown in Fig. 2, none of the measured indices of contractile function (dP/dt_{max}), necrosis (LDH), energy status (tissue adenine nucleotide), oxidative stress (tissue glutathione) or $\cdot OH$ production (34DHBZ), were significantly modified by supplementation of the perfusion buffer with NAC either alone, or with the ES mixture and DCA. However, as shown in Fig. 3, hearts reperfused with the combination NAC, ES and DCA maintained a higher coronary flow rate. The three-way ANOVA testing the effect of NAC, ES plus DCA or time revealed an effect of ES plus DCA ($p < 0.001$) and an interaction between NAC and ES plus DCA ($p < 0.001$), which was independent of time.

Effects of various interventions on the coronary flow response of hearts perfused with NAC. We attempted to identify factors underlying and/or modulating the coronary flow response in preserved hearts reperfused with NAC and ES plus DCA. As shown in Fig. 4, we found that the flow response was antagonized by H_2O_2 ($p < 0.05$), and to some extent by pyrogallol, an intracellular $O_2^{\cdot -}$ generator ($p = 0.07$). However, it was not affected by the removal of DCA, nor did this intervention modify the recovery of contractile function (not shown).

Then, perfusion experiments were performed using another protocol, namely 15 min

global ischemia and 30 min reperfusion, an insult considered to be mild (12). This protocol allowed treatment with drugs before the ischemic period. The choice of drug tested was based on their known inhibitory effect on one of the many processes proposed to participate in coronary flow regulation (see discussion for details).

Similar to hearts reperfused after preservation, hearts subjected to 15 min of ischemia and 30 min reperfusion in the presence of NAC and ES (in mM: 11 glucose, 0.2 octanoate, 1 lactate, 0.2 pyruvate, 0.2 fumarate) maintained higher coronary flow rates than those perfused with NAC and glucose alone (Fig. 5A). This flow difference was significant both before and after the ischemic episode, except for peak hyperemic flow rate values observed within the first few minutes of reperfusion. Of the various drugs tested, neither DPI (10 μ M; inhibitor of cytochrome b_{558} -NADH-oxidase (26), indomethacin (10 μ M; inhibitor of the cyclo-oxygenase pathway) nor ODQ (10 μ M or 30 μ M; specific inhibitor of soluble guanylate cyclase (sGC)(31)) affected significantly coronary flow rates of hearts perfused with NAC and ES despite the fact that these drugs were tested using various protocols². However, preliminary experiments showed a reversible, dose-dependent coronary flow rate inhibition by a K^+_{ATP} channel blocker (Glib; 10 and 50 μ M) in pre- and post-ischemic hearts perfused with NAC and ES mixture³. On this basis, and considering that the presence of Glib during the ischemic insult could modify the post-ischemic recovery of heart function (10,36), we chose the following infusion protocol. The infusion of Glib (10 μ M), which lasted 10 min during the pre-ischemic period, was interrupted for 10 min prior to ischemia and then resumed for 20 min at the third min of reperfusion.

As shown in Fig. 5B, Glib infusion significantly decreased the coronary flow rate of pre- and post-ischemic hearts treated with NAC irrespectively of the energy substrate composition of the perfusion buffer, although the recovery of flow at reperfusion was significantly greater in hearts supplied with NAC plus the ES mixture. Note that Glib infusion did not affect the peak hyperemic response shortly after reperfusion, suggesting that it did not modify the magnitude of the ischemic insult.

DISCUSSION

The major findings of the present study can be summarized as follows. Data demonstrate that the coronary flow rate of rat hearts perfused with NAC depends on the nature of the energy substrates feeding the heart. This effect of exogenous substrates was documented under various perfusion conditions, namely normoxia, reperfusion after 4h preservation in cold Celsior solution or after 15 min global ischemia. Although other investigations are needed to identify the exact mechanism underlying this effect, our data suggest that ROS and K^+_{ATP} channels ought to be considered in the overall mechanistic scheme. Indeed, data obtained in preserved/reperfused hearts indicated that the sustained hyperemic response observed in the presence of NAC and ES was antagonized by H_2O_2 , and to some extent by $O_2^{\cdot-}$. However, it was not related to NAC's direct scavenging of $\cdot OH$ as indicated by the 34DHBZ data, suggesting that effect of NAC is probably related to its thiol function. Further, data obtained in ischemic/reperfused hearts demonstrated that the flow response of hearts perfused with NAC and ES was inhibited by Glib, a K^+_{ATP} channel blocker.

To our knowledge, an interaction between NAC, ES and ROS (H_2O_2 and to some extent $O_2^{\cdot-}$ but not $\cdot OH$) in the flow rate modulation of reperfused hearts has not been documented before. Effects of exogenous metabolic substrates such as lactate, pyruvate or glutamate, or of exogenous and endogenous thiols, on the recovery of coronary flow rates of ischemic/reperfused hearts have been reported separately

(4,7,16,18,35). A modulating effect of exogenous substrates may explain why, in our previous study, NAC treatment elicited a sustained hyperemic response in rat hearts reperfused after 90 min low-flow ischemia (4). The exact nature of the energy substrate(s) responsible for the flow effects reported in this and previous (4) studies cannot be determined. Lactate (≥ 0.2 mM) and/or octanoate (0.2 mM) appear likely candidates, since they are the only two common substrates present in all perfusions experiments where an increased flow rate in hearts treated with NAC was observed.

The involvement of K^+_{ATP} channels in coronary flow regulation under our perfusion conditions is suggested by the effect of Glib³ and would be supported by the reported modulation of K^+_{ATP} channels activity by lactate concentration in the mM range (11,15) as well as the thiol redox status (6,14,37). However, the implication of other mechanisms is by no means excluded. Coronary flow regulation is complex and involves interactions between several vasodilating and vasoconstricting agents. Other proposed factors are NO, adenosine and prostaglandins which would act by modulating the activity of sGC, adenylate cyclase, and/or K^+_{Ca} channels (3,28). Among these processes, sGC activity was shown to be increased by lactate via a mechanism involving the participation of microsomal NADH-dependent cytochrome b_{558} oxidase and the formation of H_2O_2 (26). However, from perfusion experiments with various drugs (DPI, an inhibitor of cytochrome oxidase b_{558} ; ODO, an inhibitor of sGC; indomethacin, an inhibitor of cyclo-oxygenase), we obtained no evidence indicating that those pathway could explain the increased flow of hearts perfused with NAC and ES. However, an involvement of K^+_{Ca} channels cannot be excluded.

Indeed, Bolotina et al. (3) reported that $\cdot\text{NO}$ directly activates K^+_{Ca} channels in vascular smooth muscle, without requiring cGMP formation. This latter observation suggests that $\cdot\text{NO}$ could be involved in the modulation of coronary flow in our model even in the presence of ODQ, a specific sGC inhibitor. This view would be strengthened by data from our previous study indicating that NAC's effect on flow involve the formation of $\cdot\text{NO}$ either via the NO synthase pathway and/or possibly formation of S-nitrosothiol. An involvement of $\cdot\text{NO}$ could also explain the slight inhibition of flow observed in the presence of the superoxide generator (pyrogallol). Indeed, $\text{O}_2^{\cdot-}$ are known to react rapidly with $\cdot\text{NO}$ to form ONOO^- , thus decreasing $\cdot\text{NO}$ concentration (21). However, another explanation must be sought to explain the greater inhibitory effect of H_2O_2 compared to pyrogallol addition. One possibility is that H_2O_2 lowers the open probability of K^+_{ATP} channels through changes in the thiol redox status (6,14,37). These changes could occur following oxidation of the cellular thiol redox status, since the reduction of H_2O_2 to H_2O is linked to the conversion of GSH to GSSG. This explanation is, however, speculative and remains to be investigated.

Other data presented in this paper should also be discussed, such as the effect of NAC alone, or combined with an energy substrate therapy, in hearts subjected to a mild ischemic insult, i.e. inducing little necrosis. It turned out that the choice of our preservation solution was probably a determining factor in demonstrating a sustained coronary flow response in the presence of NAC and ES, although this effect was not associated with an improved recovery of contractile function or decreased cellular

necrosis. Note, however, that we did not evaluate the early recovery of function or the contractile reserve ("stunning" component e.g., following adrenergic stimulation (2)). This could have revealed differences in the functional recovery of preserved hearts reperfused under the various conditions. We favored measurements of contractile function at a later time in the reperfusion period to delineate effects of reperfusion on measured indices from those due to mechanical stress of balloon insertion into the ventricular cavity. This view was strengthened by our observation of a transient increase in LDH and GSH release rates upon balloon insertion (from 1.5 ± 0.2 to 3.8 ± 0.6 U/5 min and from 22 ± 5 to 61 ± 10 nmol/5 min, respectively; $p < 0.005$).

Nevertheless, our data contrasts with those of many other studies with preserved hearts where a beneficial effect of a single intervention (either addition of an antioxidant, an energy substrate, or gradual rise of pressure) was reported (23,25,32). However, none of these studies used the Celsior solution, a solution which contains elements to minimize oxidative damage, oedema, calcium overload and maximize anaerobic energy metabolism. Under these conditions, the effect of any reperfusion intervention on the biochemical and functional parameters measured might have been mitigated. This raises the possibility that when hearts are adequately protected during the preservation period, the reperfusion technique is not crucial.

In conclusion, our data demonstrate that the coronary flow rate of post-ischemic hearts is acutely modulated by interactions between exogenous ES, NAC, ROS (H_2O_2

or O_2^- , but not $\cdot OH$). These interactions are likely to be mediated, at least in part, by changes in K^+_{ATP} channel activity. However, other investigations are needed to (i) evaluate a possible effect of $\cdot NO$ on K^+_{Ca} channel activity, and to identify (ii) the nature of the energy substrate(s), although the presence of lactate with or without octanoate appears to be crucial and (iii) the mechanism by which NAC exerts its effect, either directly, after its conversion to GSH or via nitrosothiol formation. Clarification of these aspects would appear to be relevant to a more effective use of NAC *in vivo* in cardiac patients. Indeed, although increased K^+_{ATP} channel activity could benefit hypertensive patients, it could also elicit hypotension in others as reported by Ferrari et al. (8) and Horowitz et al. (13). Finally, altogether our data underline the importance of considering the nature of energy substrates feeding the heart (defined by the composition of the perfusion buffer *in vitro*, or of the blood *in vivo*), as well as the myocardial redox thiol status, on the regulation of coronary flow.

Footnotes

- ¹ The functional recovery of hearts subjected to 90 min low-flow ischemia and 30 min reperfusion in the absence or presence of NAC evaluated by the rate pressure product [(RPP in beats/min X mm Hg) X 10³ = (heart rate X (systolic-diastolic pressure))] was 14 ± 6 (NAC; n = 2) and 13 ± 1 (control; n = 3), respectively (unpublished data).
- ² Indomethacin (10 μM; n = 2) or DPI (10 μM; n = 2) or ODQ (10 μM; n = 4) was infused for 20 min prior to ischemia, starting 10 min after NAC, and during reperfusion. In addition, ODQ (10 μM; n = 4) was also infused for 30 min prior to ischemia, starting 10 min prior to NAC, and during reperfusion. When the concentration of ODQ was raised to 30 μM, the coronary flow rate was not decreased as would be expected from sGC inhibition.
- ³ An implication of K⁺_{ATP} channels in the preservation/reperfusion protocol, though not systematically examined, was supported by the results of two experiments: the coronary flow rate of preserved hearts reperfused for 30 min with NAC and ES was rapidly decreased by 15 ± 3% (n = 2) upon the infusion of Glib (50 μM).

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10816 and MT-10920 to C. Des Rosiers) and by a Studentship from the Department of Nutrition of the University of Montreal (to J. Brunet).

Abbreviations:

DCA: dichloroacetate

DPI: diphenyliodonium chloride

ES: energy substrates

34DHBZ: 3,4-dihydroxybenzoate

Glib: glibenclamide

GSH: reduced glutathione

GSSG: oxidized glutathione

LDH: lactate dehydrogenase

NAC: N-acetylcysteine

ODQ: 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one

ROS: reactive oxygen species

sGC: soluble guanylate cyclase

References

1. Bergmeyer, U.H. *Methods of Enzymatic Analysis* (Second English Edition). New York, Academic Press, Inc., 1974, p2127-2131.
2. Bolli, R., W-X. Zhu, M.L. Myers, C.J. Hartley, R. Roberts. Beta-adrenergic stimulation reverses post-ischemic myocardial dysfunction without producing subsequent functional deterioration. *Am. J. Cardiol.* 56:964-968, 1988.
3. Bolotina, V.M., S. Najibi, J.J. Palacino, P.J. Pagano, R.A. Cohen. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368:850-853, 1994.
4. Brunet, J., M-J. Boily, S. Cordeau, C. Des Rosiers. Effects of *N*-acetylcysteine in the rat heart reperfused after low-flow ischemia: Evidence for a direct scavenging of hydroxyl radicals and a nitric oxide-dependent increase in coronary flow. *Free Radic. Biol. Med.* 19:627-638, 1995.
5. Comte, B., G. Vincent, B. Bouchard, M. Jetté, S. Cordeau, C. Des Rosiers. A ¹³C mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat hearts. *J. Biol. Chem.* 42:26125-26131, 1997.
6. Coetzee, W.A., T.Y. Nakamura, J-F. Faivre. Effects of thiol-modifying agents on K_{ATP} channels in guinea pig ventricular cells. *Am. J. Physiol.* 269:H1625-H1633, 1995.

7. de Groot, M.J.M., G.J. van der Vusse. The effects of exogenous lactate and pyruvate on the recovery of coronary flow in the rat heart after ischaemia. *Cardiovasc. Res.* 27:1088-1093, 1993.
8. Ferrari, R., C. Ceconi, S. Curello, A. Cargnoni, O. Alfieri, A. Pardini, P. Marzollo, O. Visiolo. Oxygen free radicals and myocardial damage: Protective role of thiol-containing agents. *Am. J. Med.* 91:(suppl.3C):95s-105s, 1991.
9. Forman, M.B., D.W. Puett, C.U. Cates, D.E. McCroskey, J.K. Beckman, H.L. Greene, R. Virmani. Glutathione redox pathway and reperfusion injury. Effect of *N*-acetylcysteine on infarct size and ventricular function. *Circulation* 78:202-213,1988.
10. Grover, G.J. Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) openers in models of myocardial ischemia and reperfusion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:309-315, 1997.
11. Han, J., I. So., E-Y. Kim, Y.E. Earm. ATP-sensitive potassium channels are modulated by intracellular lactate in rabbit ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 425:546-548, 1993.
12. Henry, T.D., S.L. Archer, D. Nelson, E.K. Weir, A.H.L. From. Postischemic oxygen radical production varies with duration of ischemia. *Am. J. Physiol.*

264:H1478-H1484, 1993.

13. Horowitz, J.D., C.A. Henry, M.L. Syrjanen, W.J. Louis, D. Fish, T.W. Smith, E.M. Antman. Combined use of nitroglycerin and *N*-acetylcysteine in the management of unstable angina pectoris. *Circulation* 77:787-794, 1988.
14. Islam, S., P-O. Berggren, O. Larsson. Sulfhydryl oxidation induces rapid and reversible closure of the ATP-regulated K⁺ channel in the pancreatic β -cell. *FEBS Lett.* 319:128-132, 1993.
15. Keung, E.C., Q. Li. Lactate activates ATP-sensitive potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. *J. Clin. Invest.* 88:1772-1777, 1991.
16. King, L.M., F. Boucher, L.H. Opie. Coronary flow and glucose delivery as determinants of contracture in the ischemic myocardium. *J Mol. Cell. Cardiol.* 27:701-720, 1995.
17. Laplante, A., G. Vincent, M. Poirier, C. Des Rosiers. Effects and metabolism of fumarate in the perfused rat heart. A ¹³C mass isotopomer study. *Am. J. Physiol.* 272:E74-E82, 1997.
18. Lazar, H.L., X. Yang, S. Rivers, D. Stockwell, R.J. Shemin. Superiority of substrate enhancement over oxygen free-radical scavengers during extended periods of cold storage for cardiac transplantation. *Surgery* 108:423-430,

1990.

19. Lopaschuck, G.D., M. Saddik. The relative contribution of glucose and fatty acids to ATP production in hearts reperfused following ischemia. *Molec. Cell. Biochem.* 116:111-116, 1992.
20. Manché, A., S.J. Edmondson, D.J. Hearse. Dynamics of early postischemic myocardial functional recovery. Evidence of reperfusion-induced injury? *Circulation* 92:526-534, 1995.
21. Marin, J. M.A. Rodriguez-Martinez. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J. Auton. Pharmacol.* 15:279-307, 1995,
22. Menasché, P., C. Grousset, Y. Gauduel, C. Mouas, A. Piwnica. Maintenance of the myocardial thiol pool by *N*-acetylcysteine: An effective means of improving cardioplegic protection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 103:936-944, 1992.
23. Menasché, P., C. Grousset, C. Mouas, A. Piwnica. A promising approach for improving the recovery of heart transplants. Prevention of free radical injury through iron chelation by deferoxamine. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 100:13-21, 1990.
24. Menasché, P., J.L. Termognon, F. Pradier, C. Grousset, C. Mouas, G. Alberici,

- M. Weiss, A. Piwnica, G. Bloch. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur. J. Cardio-thorac. Surg.* 8:207-213, 1994.
25. Minor, T., J. Sturz, H. Klauke, W. Isselhard. Reduction of oxidative tissue injury and endothelial dysfunction by graduated reperfusion after cardioplegic arrest in isolated rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* 18:621-626, 1995.
26. Mohazzab-H, K.M., P.M. Kaminski, R.P. Fayngersh, M.S. Wolin. Oxygen-elicited responses in calf coronary arteries: Role of H₂O₂ production via NADH-derived superoxide. *Am. J. Physiol.* 270:H1044-H1053, 1996.
27. Nishimura, M., H. Takami, M. Kaneko, S. Nakano, H. Matsuda, K. Kurosawa, T. Inoue, K. Tagawa. Mechanism of mitochondrial enzyme leakage during reoxygenation of the rat heart. *Cardiovasc. Res.* 27:1116-1122, 1993.
28. Park, K.H., L.E. Rubin, S.S. Gross, R. Levi. Nitric oxide is a mediator of hypoxic coronary vasodilatation. Relation to adenosine and cyclooxygenase-derived metabolites. *Circ. Res.* 71:992-1001, 1992.
29. Pietri, S., M. Culcasi, B. Albat, G. Albrici, P. Menasché. Direct assessment of the antioxidant effects of a new heart preservation solution, Celsior. A hemodynamic and electron spin resonance study. *Transplantation* 58:739-742, 1994.

30. Qiu, Y., D.J. Hearse. The influence of *N*-acetylcysteine on cardiac function and rhythm disorders during ischemia and reperfusion. *Cardioscience* 1:65-74, 1990.
31. Schrammel, A., S. Behrends, K. Schmid, D. Koesling, B. Mayer. Characterization of 1*H*-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Molec. Pharmacol.* 50:1-5, 1996.

32. Shug, A.L., D. Madsen, R. Dobbie, D.J. Paulson. Protection of mitochondrial and heart function by amino acids after ischemia and cardioplegia. *Life Sci.* 54:567-577, 1994.
33. Sochman, J., J.H. Peregrin. Total recovery of left ventricular function after acute myocardial infarction: Comprehensive therapy with streptokinase, *N*-acetylcysteine and percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Int. J. Cardiol.* 35:116-118, 1992
34. Takemura, G., T. Onodera, M. Ashraf. Quantification of hydroxyl radical and its lack of relevance to myocardial injury during early reperfusion after graded ischemia in rat heart. *Circ. Res.* 71:96-105, 1992.
35. Tang, L.D., J-Z. Sun, K. Wu, C-P. Sun, Z-M. Tang. Beneficial effects of *N*-acetylcysteine and cysteine in stunned myocardium in perfused rat heart. *Br.*

J. Pharmacol. 102:601-606, 1991.

36. Tosaki, A., F.A. Hellegouarch. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channel blocking agent ameliorates, but the opening agent aggravates, ischemia/reperfusion-induced injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* 23:487-496, 1994.
37. Tricarico, D., D. Conte Camerino. ATP-sensitive K⁺ channels of skeletal muscle fibers from young adult and aged rats: Possible involvement of thiol-dependent redox mechanisms in the age-related modifications of their biophysical and pharmacological properties. *Molec. Pharmacol.* 46:754-761, 1994.
38. Wahr, J.A., D. Olszanski, K.F. Childs, S. Bolling. Dichloroacetate enhanced myocardial functional recovery post-ischemia: ATP and NADH recovery. *J. Surg. Res.* 63:220-224, 1996.

TABLE 1. Effect of 4 h hypothermic preservation in Celsior solution on the myocardial glutathione and adenine nucleotide status.

	<u>HEART TREATMENT</u>	
	<u>NON-PRESERVED</u>	<u>PRESERVED</u>
GSH + GSSG ($\mu\text{mol/gww}$)	0.95 \pm 0.02 (9)	2.27 \pm 0.02 (5)*
GSH/GSSG	81 \pm 9 (9)	98 \pm 6 (5)
ATP + ADP + AMP ($\mu\text{mol/gww}$)	2.9 \pm 0.2 (4)	3.5 \pm 0.1 (5)*
ATP/ADP	3.7 \pm 0.7 (4)	1.6 \pm 0.2 (5)*

Hearts were freeze-clamped either before or after preservation for 4 hours in cold Celsior solution. They were pulverized and homogenized for the determination of concentrations of reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG) and adenine nucleotides (ATP, ADP, AMP). Values are means \pm SE (n=4 to 9). *p<0.05, using an unpaired two-sided t-test. gww = g wet weight.

LEGEND TO THE FIGURES

FIGURE 1. Effect of sudden vs staged reperfusion of preserved hearts on the time-profile of coronary flow (A) and LDH release (B) rates.

Preserved hearts were reperfused with standard buffer either (i) at a constant pressure of 70 mm Hg and at 37 °C for 60 min (*sudden reperfusion*), or (ii) at a pressure of 30 mm Hg and at 23 °C for 10 min and then at 70 mm Hg and at 37 °C for 50 min (*staged reperfusion*). Samples of effluent perfusate for the assay of LDH were collected for 5 min ending at the indicated time. The coronary flow rate was continuously monitored and averaged for 5-min period ending at the indicated time. Values are means \pm SE (n = 7). * p < 0.05 using an unpaired two-sided t-test.

FIGURE 2. Biochemical (A & B) and functional parameters (C) measured in hearts reperfused under various conditions after 4 h hypothermic preservation.

Hearts were preserved for 4 hours in cold Celsior solution. They were then reperfused for 60 min at a constant pressure of 70 mm Hg (*sudden reperfusion*), with standard buffer alone (control; CTRL) or enriched in ES (in mM: 0.5 lactate, 0.1 pyruvate, 0.2 fumarate, 0.2 glutamate, 0.2 valine). When indicated, NAC (0.1 mM) and/or DCA (1 mM), were infused for the first 20 min. In addition, one group of hearts was also reperfused with standard buffer at a pressure of 30 mm Hg and at 23 °C for 10 min, and then at 70 mm Hg and at 37 °C for 50 min (*staged reperfusion*). Values shown are means \pm SE (n=3-7). For LDH and 34DHBZ (n=6-7), values reflect cumulative release during the first 30 min or 15 min of reperfusion, respectively. Functional parameters (LVDP: left ventricular developed pressure; dP/dt; n=3-6) are reported for the indicated number of non-fibrillating hearts (see fractional number above the dP/dt bars). The tissue glutathione and adenine nucleotide status was determined in homogenates of pulverized freeze-clamped hearts (n=3-6). One way analysis of variance: NS in all cases. gww = g wet weight.

FIGURE 3. Effect of an antioxidant and/or energetic interventions on the coronary flow response of preserved/reperfused hearts.

Other data from experiments described in Fig. 2 with preserved hearts reperfused in the presence of NAC and /or ES (in mM: 0.5 lactate, 0.1 pyruvate, 0.2 fumarate, 0.2 glutamate, 0.2 valine) and DCA. The coronary flow rate was continuously monitored and averaged for a 5 min period ending at the indicated time. Values are means \pm SE (n = 6-7). A three-way analysis of variance: Time independent effect of treatment: NAC: NS; ES + DCA: $p < 0.001$; time independent interaction between treatments: NAC x ES + DCA: $p < 0.001$.

FIGURE 4. Effects of ROS addition and of DCA removal on the coronary flow response of preserved hearts reperfused with NAC and the energetic therapy.

Hearts, preserved for 4 hours in cold Celsior solution, were reperfused at 70 mm Hg and 37 °C with standard buffer enriched in ES (in mM: 0.5 lactate, 0.1 pyruvate, 0.2 fumarate, 0.2 glutamate, 0.2 valine). NAC (0.1 mM) was infused during the first 20 min of reperfusion, either (i) alone (-DCA) or (ii) with DCA (1 mM) and pyrogallol (PYRO; an intracellular O_2^- generator, 10 μ M), or (iii) with DCA (1 mM) and H_2O_2 (50 μ M). The coronary flow was continuously monitored and was averaged for the first 30 min of reperfusion. Flow values are means \pm SE (n=3-8). One way analysis of variance: *p<0.05 and #p<0.07, all conditions vs NAC+ES+DCA (NONE).

FIGURE 5. Effects of exogenous energy substrates in the absence (A) or presence (B) of a K^+_{ATP} channel inhibitor (glibenclamide) on the coronary flow rate of NAC-treated hearts subjected to 15 min global ischemia and 30 min reperfusion.

Hearts perfused with buffer containing 11 mM glucose, either alone (\square), or with other ES (in mM: 0.2 mM octanoate, 1 lactate, 0.2 pyruvate and 0.2 fumarate; \blacksquare), were subjected to 15 min global ischemia and 30 min reperfusion. Further, NAC was infused at 0.1 mM throughout the perfusion experiment, starting 20 min before the ischemic episode. The infusion of Glib 10 μ M (B, as indicated) which lasted 10 min during the pre-ischemic period, was interrupted 10 min prior to ischemia, and then resumed for 20 min at the third min of reperfusion. The coronary flow rate was continuously monitored. Flow values shown are averages of 3 min period starting at the indicated time, and they are means \pm SE (n=4-8). For perfusion experiments in the presence of glibenclamide (B), values are expressed in percentage of those obtained in the absence of glibenclamide (A) at the corresponding time-period. $p < 0.05$ using an unpaired two-sided *t*-test: Effect of ES(*), or of glibenclamide (#).

Fig. 1.

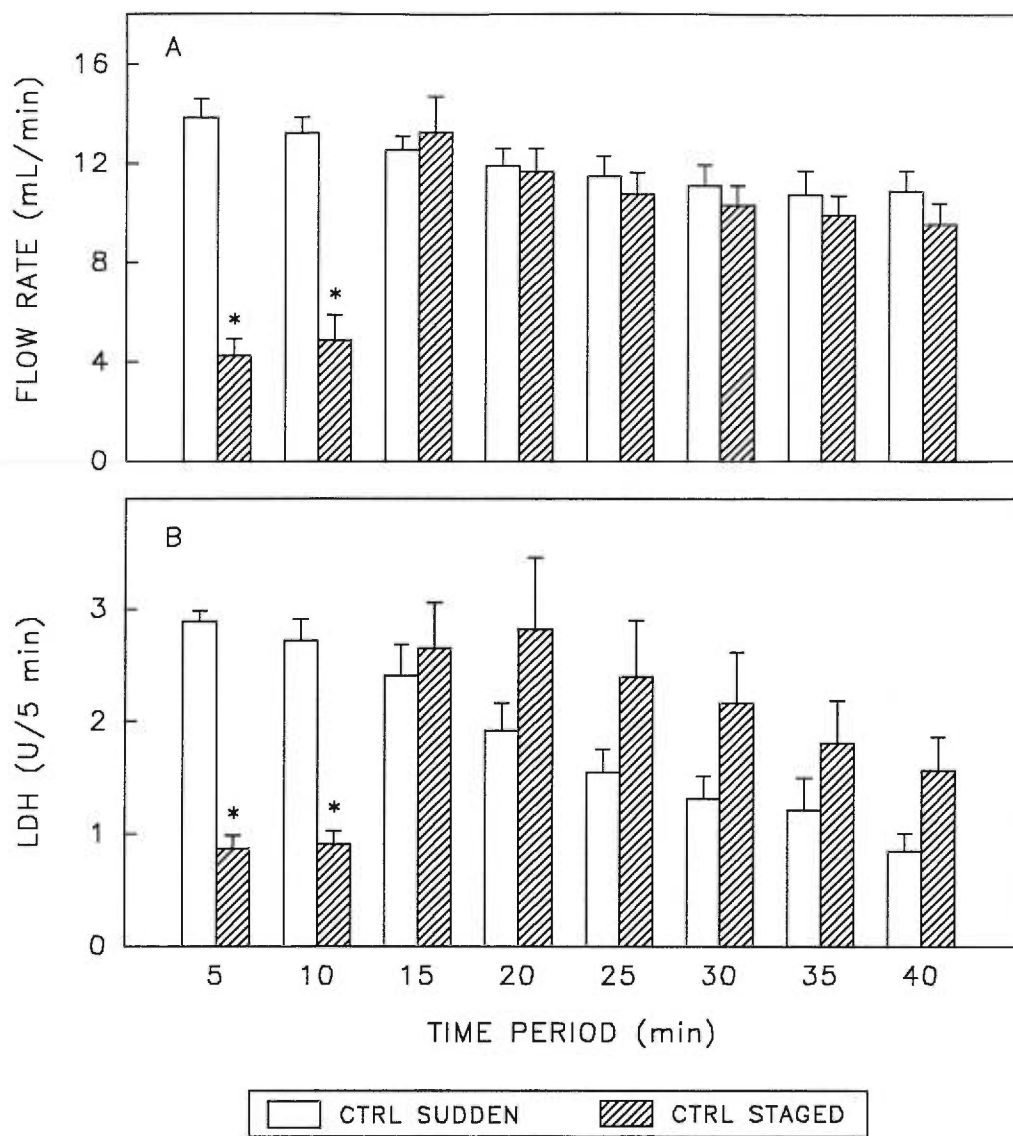


Fig. 2.

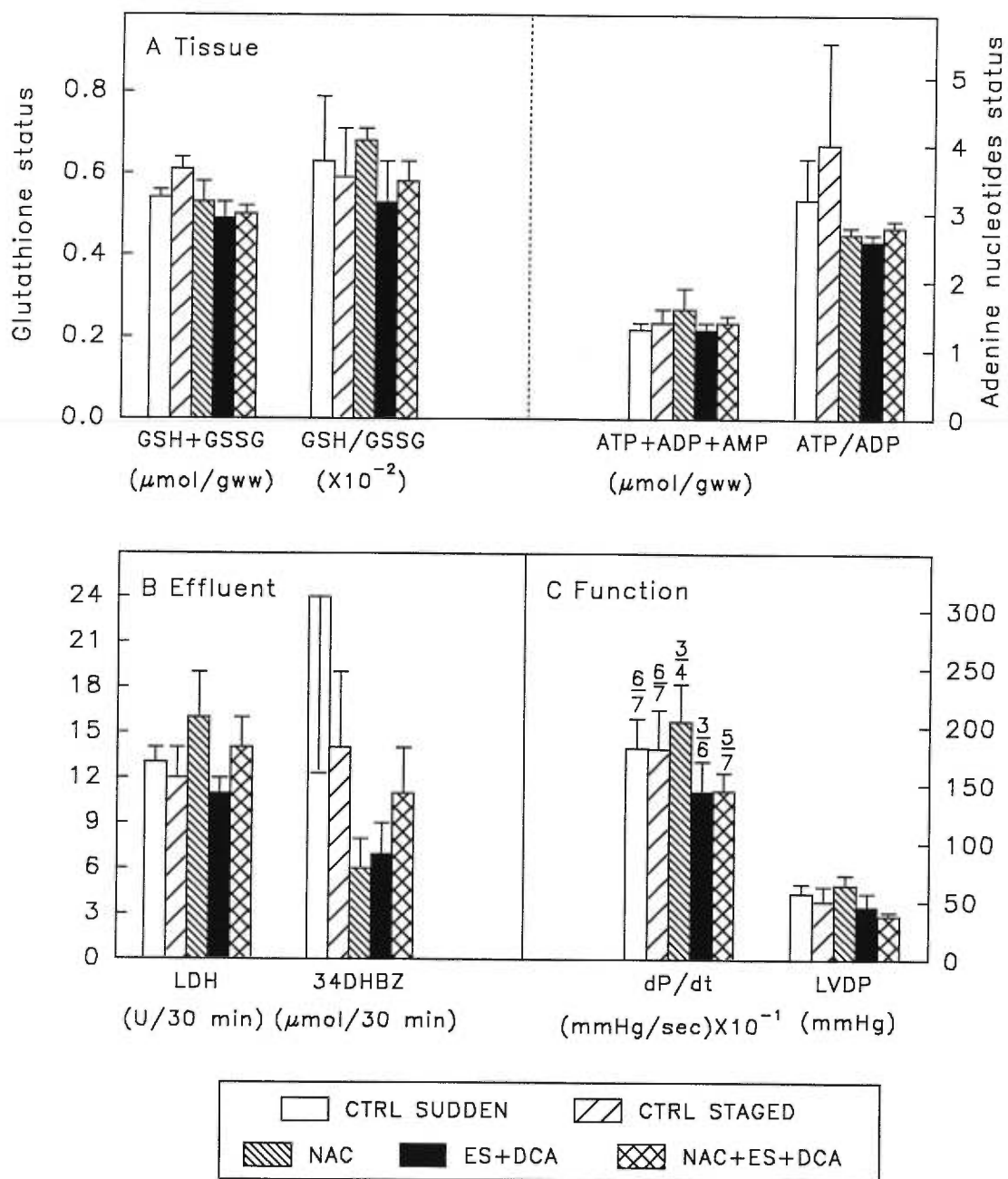


Fig.3.

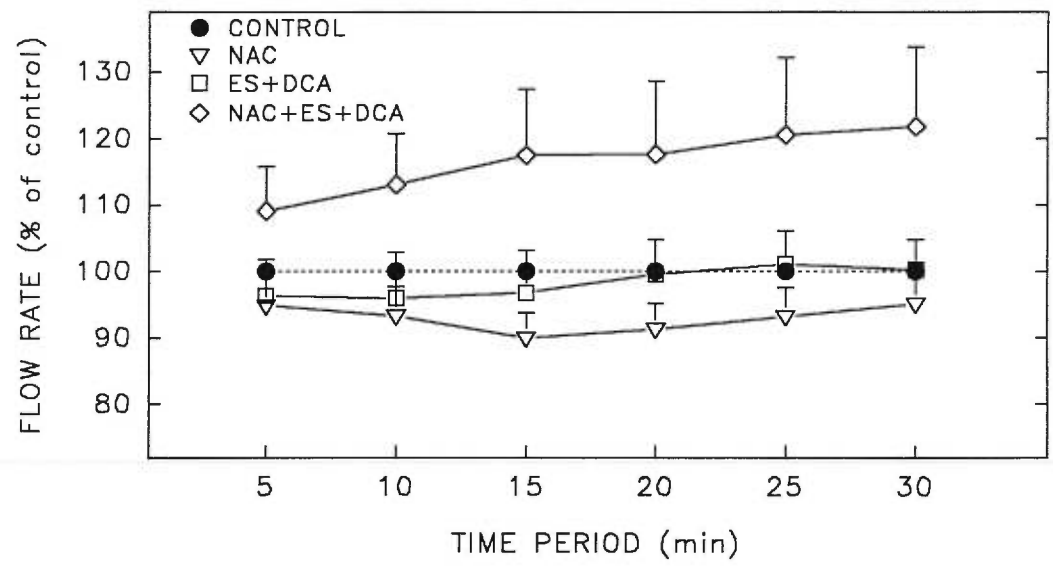


Fig.4.

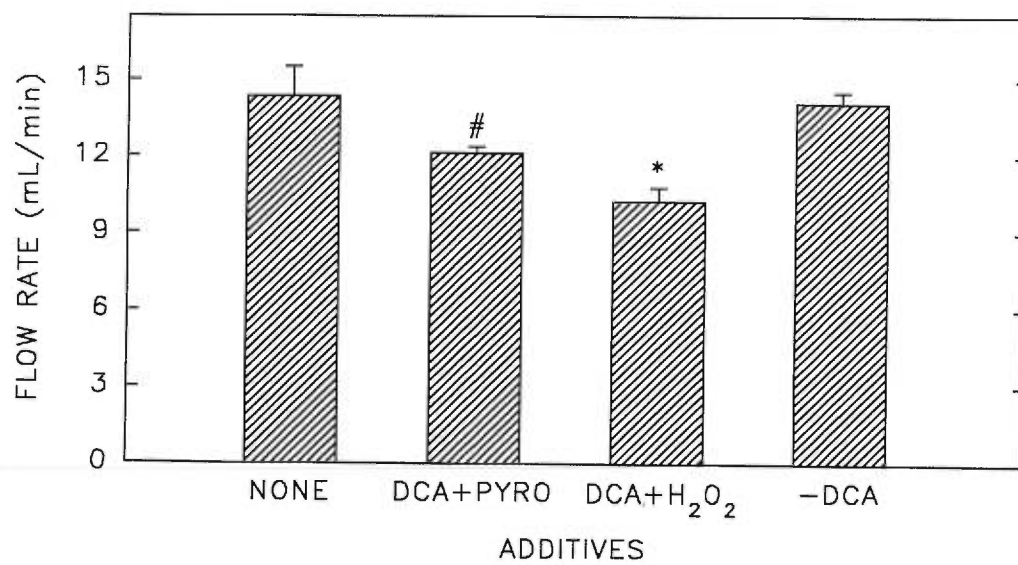
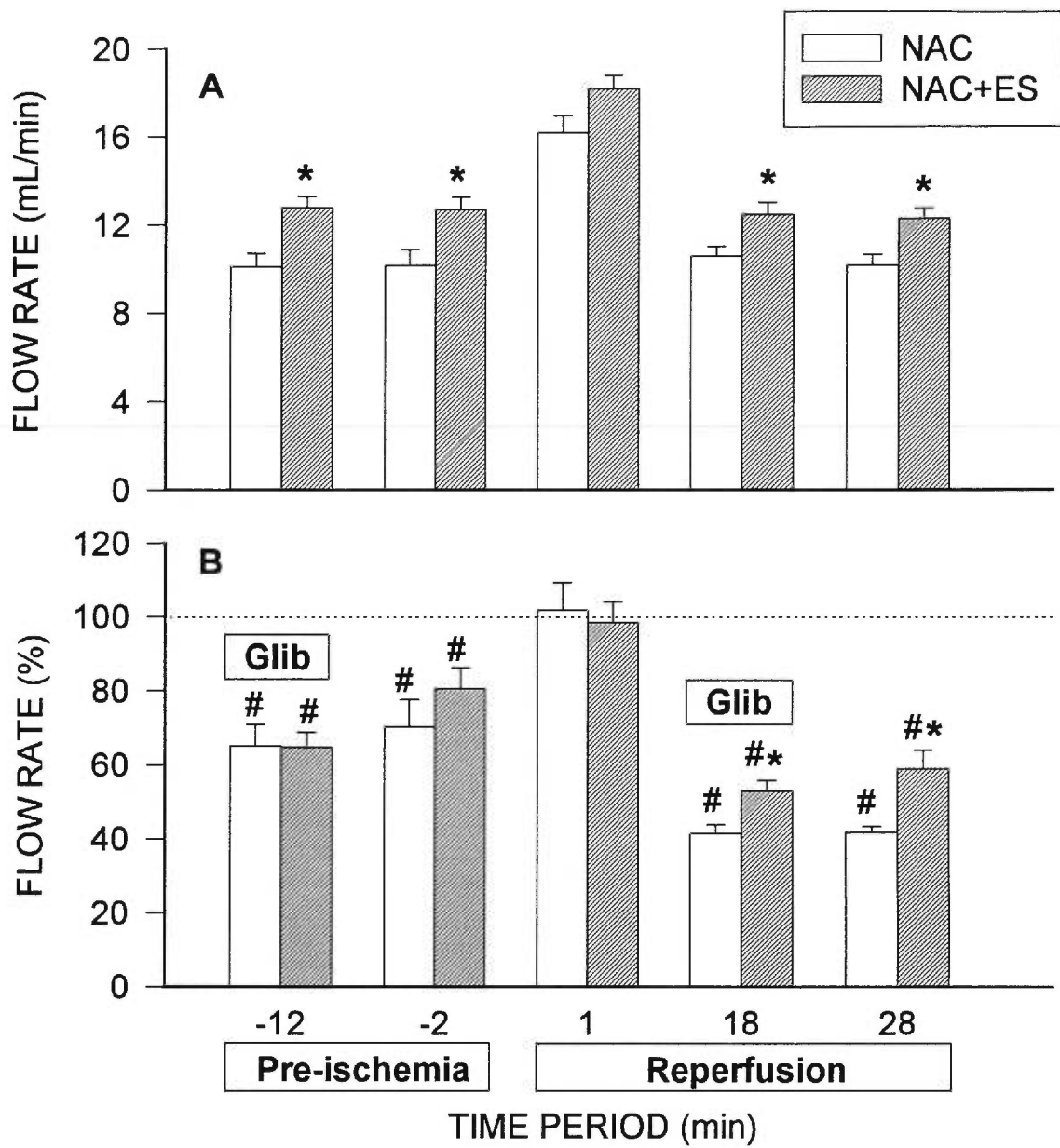


Fig. 5.



Chapitre IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

Chapitre IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

1. INTRODUCTION

Ce projet de doctorat s'intégrait dans un programme de recherche dont le but à long terme était une meilleure définition des modalités et indications de la thérapie antioxydante pour la protection du coeur contre les dommages associés à l'ischémie-reperfusion. Au début du projet, plusieurs études sur les antioxydants avaient été publiées. Toutefois, la controverse régnait en partie à cause d'un manque de rigueur de plusieurs de ces études, lesquelles ne permettaient pas d'établir clairement une relation de cause à effet. Entre autre, il semblait pertinent de clarifier la contribution de chacune des espèces radicalaires aux dommages observés, puisque ceci s'avère déterminant pour le choix de ou des antioxydants à préconiser.

Nous avons donc entrepris d'évaluer le rôle du radical hydroxyle, lequel était reconnu comme une espèce radicalaire très réactive, en utilisant conjointement: (i) une méthode de détection et (ii) un antioxydant soluble ayant une bonne affinité pour ce radical. La production de radicaux hydroxyles, l'effet du NAC, ainsi que l'ampleur des dommages associés à l'ischémie-reperfusion (nécrose, fonction cardiaque et débit coronarien) ont donc été documentés dans des coeurs isolés de rats perfusés selon deux protocoles différents de privation d'oxygène et de reperfusion. Les résultats de ces expériences ont mis en évidence un effet modulateur du NAC sur le débit coronarien, indépendant de son activité de piègeur de radical hydroxyle, pouvant expliquer les effets hypotenseurs du NAC observés lorsqu'administré chez des patients souffrant de maladies cardiaques. À notre connaissance, une seule étude a rapporté un tel effet du NAC sans toutefois proposer de mécanisme d'action⁴⁰¹. Aussi, les mécanismes impliqués dans cet effet du NAC ont été investigués.

2. CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES

2.1. Les modèles d'étude

Pour étudier les phénomènes liés au syndrome d'ischémie-reperfusion, nous avons choisi de travailler avec le coeur isolé de rat, sur un montage Langendorff avec un tampon non-recirculant. Le choix de l'espèce animale a été orienté par la grosseur du coeur, le nombre d'études antérieures et le coût par animal. Le modèle classique de Langendorff¹⁰³ qui est utilisé pour une majorité d'études de perfusions a été choisi pour sa simplicité et parce qu'il était déjà au point dans notre laboratoire. Il est évident que le modèle de coeur au travail qui est plus complexe, est aussi plus physiologique que le modèle Langendorff. Avec ce dernier, la perfusion est rétrograde ce qui signifie que seules les coronaires sont irriguées et que les ventricules contractent contre la pression de l'air. Par conséquent, les coeurs perfusés par la méthode Langendorff ont une consommation d'oxygène plus basse que les coeurs perfusés au travail⁸⁴. En outre, d'autres différences ont été rapportées entre ces deux modèles de coeurs dont une production de ERO plus faible dans les coeurs perfusés sur un montage Langendorff⁸⁴. Puisqu'il s'agissait d'études comparatives où l'influence de la pression de travail n'était pas une composante de première importance, le modèle Langendorff semblait satisfaisant dans nos conditions.

Différents protocoles d'I-R ont été utilisés dans cette étude. Le choix de ces protocoles était basé sur des études préliminaires et sur la littérature^{173,397} en tenant compte de la sévérité de l'ischémie quant au degré de nécrose cellulaire et dans certains cas, de la présence de débit résiduel pendant l'ischémie permettant le prélèvement de perfusat effluent pour la quantification de divers indices ($\cdot\text{OH}$, GSH, LDH, lactate, pyruvate). Ces paramètres se sont avérés des critères importants à diverses étapes du projet.

Pour la première partie de l'étude, le protocole utilisé est l'ischémie partielle de 90 minutes suivie d'une reperfusion de 30 minutes. Une comparaison des divers indices mesurés dans ce modèle et ceux rapportés dans la littérature indique que cette insulte

ischémique équivaut à une ischémie globale de 20 minutes. Quoique le protocole d'ischémie partielle soit moins utilisé que l'ischémie globale dans la littérature, ce choix s'est avéré avantageux pour la comparaison de la formation de $\cdot\text{OH}$ pendant l'ischémie et la reperfusion. Ainsi, tel qu'il sera discuté à la section 3 de ce chapitre, cette première série d'expériences a permis de clarifier des résultats controversés de la littérature à ce sujet.

Pour la deuxième partie de l'étude, nous avons utilisé l'arrêt cardioplégique et la préservation de 4 heures à 4 °C, suivies d'une reperfusion de 60 minutes sur un montage Langendorff. Dans ce protocole, la composante de nécrose cellulaire est nettement inférieure à celle du protocole d'ischémie partielle-reperfusion de la première série d'expériences. Aussi, dans la littérature, une durée de préservation de 4 heures est jugée sécuritaire, peu importe la solution cardioplégique utilisée. Par ailleurs, la cardioplégie hypothermique a été abondamment étudiée^{245,445} et est utilisée en clinique par plusieurs groupes^{95,339} bien qu'elle comporte des inconvénients. La principale différence avec la plupart des études en cardioplégie est que nous n'avons pas perfusé les coeurs avant la cardioplégie afin de mesurer des paramètres pré-ischémiques de la fonction contractile. Cependant, nous avons préalablement effectué une étude de la fonction contractile en normoxie sur une autre série de coeurs. Finalement, les résultats obtenus avec le protocole de C-R ayant soulevé plusieurs questions relatives à la modulation du débit coronarien du coeur reperfusé, il nous est apparu judicieux d'utiliser un troisième protocole, soit 15 minutes d'ischémie globale suivies d'une reperfusion de 30 minutes pour évaluer l'effet de différentes drogues. Cette dernière série d'expériences consiste en une ischémie de courte durée où la sévérité de l'ischémie est considérée comme modérée sur la base du degré de nécrose cellulaire³⁹⁷.

Dans l'ensemble, l'utilisation de trois protocoles d'ischémie-reperfusion s'est avérée un avantage du fait qu'il a permis de mettre en évidence l'effet modulateur du NAC sur le débit coronarien des coeurs reperfusés après une période d'ischémie, indépendamment du protocole choisi.

2.2. Les paramètres d'évaluation de la condition des coeurs

2.2.1. *Indice de production de ERO*

Comme indice de production d'espèces réactives oxygénées, nous avons utilisé le 34DHBZ, lequel provient de l'hydroxylation du 4-hydroxybenzoate (4HBZ) par les radicaux ·OH. Le 34DHBZ est dosé par GCMS selon une technique mise au point dans notre institution³⁸². Cette méthode s'apparente à celle décrite pour le salicylate où le 2,3 et le 2,5DHBZ sont mesurés par HPLC^{27,200,317,398,411}. L'hydroxylation de produits aromatiques n'est évidemment qu'une des nombreuses approches employées pour évaluer la formation des ERO. Parmi les autres méthodes les plus utilisées, mentionnons les techniques de EPR et de ESR, la chimiluminescence et la mesure du MDA. Ces méthodes, décrites au chapitre I (section 2.3.5), ont toutefois leurs limitations.

La technique de EPR a été critiquée du fait que certains spectres de résonance ne seraient pas dus à des ERO, mais plutôt à la congélation et à la manipulation mécanique du tissu⁴⁶⁵. De plus, cette technique n'est pas spécifique pour un radical en particulier et permet une quantification subjective de la production de ERO. L'ajout d'agents servant à piéger les électrons non-appariés (ESR) rendrait la méthode plus spécifique mais des effets secondaires⁴¹³ et la toxicité de certains de ces produits a été rapportée à concentration élevée³¹⁵. Par ailleurs, la chimiluminescence est une technique sensible, non invasive qui peut servir à évaluer la génération de ERO en continue^{172,173}. Le problème de cette technique est qu'elle n'est pas spécifique à un type radicalaire. Enfin, le MDA est un produit de la peroxydation des lipides qui est souvent dosé par spectrophotométrie après une réaction avec l'acide thiobarbiturique, d'où le nom du test TBA²⁶⁸. Ce dosage est toutefois non-spécifique pour le MDA et ne peut donner qu'une idée globale du processus de peroxydation lipidique dans une situation donnée¹⁸⁹. Plus récemment, le dosage du MDA par HPLC a permis d'augmenter la spécificité et la sensibilité, cependant la principale critique vient du fait que seulement certains produits de la peroxydation lipidique génèrent le MDA¹⁸⁹.

Le principal avantage de la méthode d'hydroxylation des produits aromatiques, surtout

avec le 4HBZ, est que cette méthode soit spécifique pour le radical hydroxyle et que les artéfacts reliés à l'utilisation de l'acide salicylique²²⁷ semblent évités. En effet, l'inhibition de la cyclo-oxygénase par le salicylate pourrait influencer non seulement la production de radicaux hydroxyles mais aussi le débit coronarien suite à une diminution de la synthèse des prostaglandines. Malgré que la structure du 4HBZ soit semblable à celle du salicylate, nous n'avons pas obtenu d'évidences indiquant que le 4HBZ avait de tels effets. De plus, puisqu'il est présent en tout temps dans le tampon de perfusion, le 4HBZ ne peut expliquer les effets observés sur le débit coronarien dans nos modèles. En outre, puisque notre méthode avec le 4HBZ ne fournit qu'un seul produit d'hydroxylation (34DHBZ) et non deux comme le salicylate (2,3DHBZ et 2,5DHBZ), elle s'avère plus spécifique, d'autant plus que l'analyse par GCMS est plus sensible que celle par HPLC.

Malgré plusieurs avantages, la méthode utilisée n'est pas exempte de tous problèmes. Certains auteurs proposent que la concentration de 34DHBZ retrouvée dans le perfusat effluent reflète l'activité du cytochrome P450 plutôt qu'une formation de $\cdot\text{OH}$ ¹⁸⁵, bien que nous n'ayons noté aucune évidence de ce phénomène. Aussi, le site de formation de 34DHBZ n'est pas connu, mais il y a peu de chance que la quantité mesurée soit représentative de la production totale de $\cdot\text{OH}$ des coeurs pouvant provenir de différents mécanismes enzymatiques. Finalement, il est important de corriger la production pour la formation non-spécifique de 34DHBZ attribuée à la présence de faible quantité (trace) de métaux (fer et cuivre) dans le tampon de perfusion³¹⁶ car cela peut augmenter la variabilité dans la mesure.

2.2.2. Indice du stress oxydatif

Dans les protocoles d'ischémie partielle-reperfusion et C-R, nous avons dosé le glutathion dans le perfusat et dans le tissu (GSH+GSSG et ratio GSH/GSSG). Plusieurs études suggèrent que ces mesures reflètent le niveau de stress oxydatif du coeur^{62,81,121}. La libération de GSH+GSSG par des coeurs perfusés sujets à de brèves périodes d'ischémies serait un meilleur indice de stress oxydatif que le contenu tissulaire de ces métabolites selon Massoudy et collaborateurs²⁴³. Cependant, puisque

le GSH semble avoir plusieurs fonctions au niveau du myocarde et que sa libération pourrait être modulée par différentes voies, le GSH libéré dans le perfusat doit être utilisé avec discernement comme indice de stress oxydatif, d'autant plus que de nombreuses évidences récentes montrent l'importance du GSH dans la conversion des nitrates en ·NO et nitrosothiols³⁹.

2.2.3. Indice de la nécrose cellulaire

L'activité d'enzymes cytosoliques, telles la LDH et la CK, libérées dans le perfusat effluent des coeurs perfusés, sert souvent d'indice de la nécrose cellulaire. Cette perte d'enzyme intracellulaire est attribuée soit à un "washout" des zones sous perfusées qui deviennent endommagées irréversiblement durant l'ischémie, et/ou à l'effet néfaste de la reperfusion elle-même, qui par la pression, produit un stress mécanique²⁷¹. Dans notre étude, la mesure de la LDH semble avantageuse du fait que l'activité de la CK est sensible à la présence de ERO³⁹⁰. Mais l'indice LDH a récemment été critiqué¹⁸⁸ et l'examen histologique^{127,202,376} aurait pu être utile bien que cela nécessite l'utilisation du tissu et empêche donc le dosage des métabolites tissulaires.

2.2.4. Indice du statut énergétique

Le dosage spectrophotométrique d'ATP, d'ADP, d'AMP, dans le tissu sert d'indice du statut énergétique du coeur. La créatine phosphate (CP) est un indice plus précis qui est influencée par les variations récentes du statut énergétique. D'autres indices auraient pu être dosés, soit la mesure des produits de dégradation de l'ATP (adénosine, inosine et hypoxanthine) dans le perfusat effluent des coeurs perfusés. Il est proposé que ces indices reflètent mieux les variations rapides du statut énergétique du coeur lorsqu'ils sont dosés par HPLC.

2.2.5. Paramètres fonctionnels

Dans notre étude, le débit coronarien est mesuré constamment et précisément grâce à un débitmètre installé en amont du coeur. Cela contraste avec plusieurs études où le débit est mesuré qu'occasionnellement à l'aide d'un cylindre gradué et expliquerait

peut-être, en partie, pourquoi un tel effet sur le débit a pu être documenté dans notre recherche. Par ailleurs, le rythme cardiaque, le LVDP (pression développée par le ventricule gauche), le RPP (rythme cardiaque X pression développée) et le dP/dt (dérivé de pression) sont mesurés à l'aide d'un ballonnet installé dans le ventricule gauche du coeur. Il s'agit d'une méthode couramment utilisée qui produit toutefois un stress mécanique²⁸⁹ démontré par une élévation des indices biochimiques de nécrose et du débit coronarien lors de l'insertion du ballonnet. Dans le protocole de C-R, la possibilité d'un stress mécanique additionnel nous a incité à insérer le ballonnet seulement pour les 20 dernières minutes de reperfusion. Ceci nous a empêché d'évaluer les changements fonctionnels immédiatement après la reperfusion, une période où la relation ERO/fonction aurait pu être plus évidente²⁶⁰.

Par ailleurs, l'installation d'électrodes sur le coeur permet de mesurer l'incidence d'arythmie. Cette technique a été difficile à maîtriser et l'interprétation des résultats obtenus, qui semblaient influencés par les conditions environnantes (champs magnétiques), a été ardue. L'évaluation subjective par inspection visuelle, une pratique préconisée par Walker et ses collaborateurs⁴³⁴, s'est avérée un bon outil de validation.

2.3. Le NAC comme antioxydant

Pour être efficace, un antioxydant doit atteindre le site de formation du ERO en assez grande concentration et au bon moment¹⁵⁵. Nous avons choisi le NAC car il s'agit d'une molécule de faible poids moléculaire qui pénètre facilement la cellule et qui est précurseur de cystéine et conséquemment de GSH^{62,121}. De plus, les premières études chez des patients souffrant de MCV semblaient prometteuses^{121,377} et l'effet antioxydant direct du NAC sur les $\cdot OH$ avait déjà été documenté *in vitro*^{11,145}, mais non dans des organes intacts. Finalement, le choix d'une concentration d'infusion de 100 μM de NAC repose sur des études dose-réponse effectuées *in vitro*¹²¹.

Par ailleurs, l'utilisation du NAC plutôt qu'un autre piègeur de $\cdot OH$, tel le

mercaptopropionyl glycine, a été déterminante pour la présente étude. De fait, les principaux effets du NAC documentés sont attribuables à la présence sur cette molécule d'un groupement SH plutôt qu'à son effet antioxydant envers les $\cdot\text{OH}$.

2.4. La solution de préservation

Le fondement théorique, biochimique, pour l'incorporation de divers substrats dans les solutions de cardioplégie ou de préservation est bien compris. Cependant, à quel moment et dans quelles conditions la provision de substrats exogènes résulte en transport, utilisation et amélioration du devenir des coeurs préservés, ceci est moins évident³⁶³. Pour des questions de commodité et de flexibilité, nous avons décidé d'utiliser une solution cristalloïde, moins visqueuse que la solution sanguine, étant donnée qu'elle ne contient pas de protéines.

Parmi les solutions de préservation existantes, la solution Celsior est une des rares qui, tout en combinant les principes généraux de la préservation d'organe en hypothermie, a été mise au point spécifiquement pour le coeur. Quoiqu'elle ait été relativement peu étudiée, elle est sous investigation clinique en France²⁶⁴. Cette solution offre la possibilité d'être utilisée non seulement pour la préservation mais aussi pour l'arrêt du coeur du donneur, durant la réimplantation et à la reperfusion. Le GSH, le mannitol et l'histidine contenus dans cette solution ont des effets antioxydants²⁶⁴, alors que le glutamate a démontré des effets cardioprotecteurs grâce à son rôle de substrat énergétique³⁰⁸. Le lactobionate de sodium présent dans la solution Celsior réduit drastiquement la production de 2,3 et 2,5DHBZ, des index de production du $\cdot\text{OH}$ ⁶⁵ et s'avère un bon chélateur de calcium²⁶¹. Des coeurs préservés pendant 4h en présence de lactobionate montrent une récupération améliorée de la contractilité (LVDP et dP/dt élevés) à la reperfusion²⁶¹.

Pour toutes ces raisons, le choix de la solution Celsior nous est apparu adéquat pour le deuxième protocole de ce projet. Il est probable que la préservation dans une solution moins appropriée pour le coeur, avec un niveau plus faible d'antioxydants,

aurait par contre permis d'observer plus d'effets bénéfiques lors des thérapies antioxydantes et/ou énergétiques à la reperfusion. Toutefois, l'utilisation de cette solution riche en GSH a probablement permis de mettre en évidence le rôle permissif du NAC sur la régulation du débit coronarien.

2.5. La composition des tampons de perfusion

La perfusion des coeurs dans notre étude s'effectue à l'aide d'un tampon Krebs Henseleit modifié, où la concentration de calcium est diminué de moitié (1.3 mM) et la concentration de glucose doublée (11 mM) par rapport à la recette originale. De plus, contrairement à une majorité d'études dans ce domaine, divers substrats énergétiques ont été ajoutés dans les trois protocoles. L'octanoate, un acide gras à chaîne moyenne (0.2 mM) est présent presque en tout temps. Son oxydation produit une quantité non-limitante d'acétyl-CoA pour le cycle de Krebs dont l'activité est cruciale pour le métabolisme énergétique du coeur. Dans les deux derniers protocoles, le lactate et le pyruvate sont ajoutés à des concentrations et dans un rapport retrouvé normalement dans la circulation sanguine, soit respectivement 0.5-1 et 0.1-0.2 mM. D'autres substrats tels le glutamate, la valine et le fumarate, ont aussi été ajoutés dans les deux derniers protocoles pour leurs effets cardioprotecteurs^{303,308,392}. L'ajout de ces substrats a permis de mettre en évidence leur rôle modulateur de l'effet du NAC sur le débit coronarien des coeurs reperfusés.

3. CONSIDÉRATIONS PHYSIOLOGIQUES

Tout en tenant compte des considérations méthodologiques mentionnées à la section 2 de ce chapitre, les résultats obtenus au cours de ce projet apportent quelques précisions quant au rôle du $\cdot\text{OH}$ dans la pathologie radicalaire sous-jacente au syndrome d'ischémie-reperfusion. De plus, les résultats de la présente étude mettent en évidence un effet modulateur du NAC sur le débit coronarien, lequel dépend de la nature des substrats exogènes présents et serait attribuable à la présence d'un groupement SH ou thiol sur la molécule de NAC, plutôt qu'à son activité de piègeur de $\cdot\text{OH}$.

3.1. Rôles des ERO dans le syndrome d'ischémie-reperfusion

Malgré le nombre élevé d'études sur le rôle des ERO dans la pathophysiologie cardiaque reliée au syndrome d'I-R, la contribution de chacune des espèces radicalaires aux dommages observés, reste à être clarifiée. Chacune de ces espèces peut réagir avec les composantes cellulaires pour induire diverses altérations. Généralement, le rôle des ERO est mis en évidence de façon indirecte par l'étude des effets de diverses substances interférant avec leur production ou pouvant les éliminer et par l'utilisation de systèmes générateurs de ERO. Seulement un autre groupe de chercheurs a spécifiquement évalué l'effet du $\cdot\text{OH}$ ^{200,397}. Dans notre étude, l'utilisation simultanée d'une méthode de détection (34DHBZ par GCMS) et d'un piègeur (NAC) de $\cdot\text{OH}$ et aussi de deux protocoles d'I-R avec des degrés d'insulte différents, a permis de préciser le rôle du $\cdot\text{OH}$ dans la nécrose, la fonction cardiaque et le débit coronarien.

3.1.1. Production de $\cdot\text{OH}$

Avec les protocoles d'ischémie partielle-reperfusion et de C-R dans cette étude, nous avons montré une augmentation de la production des $\cdot\text{OH}$ dans les premières minutes de la période de reperfusion, tel que rapporté dans quelques études utilisant

l'hydroxylation aromatique par HPLC^{200,296,397,411} ou la technique de ESR^{411,464}.

En raison de sa très grande réactivité, le $\cdot\text{OH}$ a été particulièrement mis en cause dans le développement des altérations cellulaires induites par l'ischémie et la reperfusion myocardique. Il y a quelques années, certaines études ont rapporté que les $\cdot\text{OH}$ produits de façon exogène causaient des dommages aux cellules endothéliales et myocardiques^{36,55,187,347}. C'est pourquoi nous avons choisi d'agir sur ces radicaux et d'en mesurer la production et la concentration, autant durant l'ischémie qu'à la reperfusion des coeurs.

La production d' $\cdot\text{OH}$ dans le protocole C-R n'est pas influencée par le mode de reperfusion. En effet, la reperfusion graduelle n'a pas permis de réduire ou de retarder la production de $\cdot\text{OH}$. Ces résultats vont à l'encontre des conclusions de Minor et collaborateurs²⁶⁸, lesquelles reposaient sur une diminution du MDA mesuré avec le test TBA, une technique donnant des résultats discutables. De plus, ces auteurs mesuraient la peroxydation lipidique alors que nous avons mesuré la production de $\cdot\text{OH}$ à intervalles réguliers au cours de la reperfusion.

Les $\cdot\text{OH}$ sont aussi formés durant la période d'ischémie tel que démontré à l'aide du protocole d'ischémie partielle-reperfusion. Bien que certains auteurs^{9,42,84,172,249} aient observé une production de ERO durant l'ischémie, à notre connaissance, personne n'avait rapporté de production spécifique du $\cdot\text{OH}$ durant cette période. Aussi, la nature, l'importance et la séquence de cette production à l'ischémie étaient sujets à la controverse. Notre étude a permis de clarifier certains éléments car avec notre méthode, nous pouvions facilement exprimer les $\cdot\text{OH}$ mesurés en terme de production et de concentration. Peu d'auteurs³⁴ ont fait cette distinction qui permet de voir que durant l'ischémie la production de $\cdot\text{OH}$ diminue mais la concentration intravasculaire augmente. Nos travaux suggèrent donc la possibilité d'une exposition locale des cellules endothéliales à des concentrations élevées de $\cdot\text{OH}$.

Par ailleurs, cette recherche ne nous permet pas de préciser le site ou la source

(section 2.3.2., chapitre I) de formation du $\cdot\text{OH}$ durant l'ischémie et la reperfusion. En présence de Fe^{++} libre, le $\text{O}_2^{\cdot-}$ et le H_2O_2 sont convertis en $\cdot\text{OH}$ par la réaction de Fenton, laquelle pourrait être favorisée par la plus grande quantité de fer libérée lors de la reperfusion d'un coeur ischémique¹⁵⁵. Il est aussi proposé que le $\cdot\text{OH}$ puisse être formé à partir du ONOO^- lequel provient de la réaction entre le $\text{O}_2^{\cdot-}$ et le $\cdot\text{NO}$ ^{21,320}. Les résultats d'expériences préliminaires où la production de $\cdot\text{OH}$ a été mesurée dans des coeurs soumis à l'ischémie partielle-reperfusion en présence d'un inhibiteur de la NO synthase, le N- ω -nitro-L-arginine (NNLA), suggèrent que ce radical soit formé par la réaction de Fenton plutôt qu'à partir du ONOO^- . Aussi, étant donné le type de mesure utilisé (34DHBZ) et le fait que les coeurs soient perfusés avec une solution cristalloïde dans notre étude, il semble probable qu'une partie de la formation des $\cdot\text{OH}$ soit intravasculaire, endothéliale ou du muscle lisse.

3.1.2. Relation $\cdot\text{OH}$ et nécrose cellulaire

Dans les deux premières séries d'expériences, nous avons démontré que la production de $\cdot\text{OH}$ à la reperfusion précède la libération de LDH. La dissociation entre ces deux phénomènes est encore plus marquée lorsqu'on utilise une reperfusion graduelle. En effet, l'intervention mécanique avec le protocole de C-R met en évidence que le profil de libération de la LDH est influencé par la pression et/ou la température de reperfusion mais, sur une période de 60 minutes, la libération totale de LDH demeure inchangée. Au contraire, le 34DHBZ produit n'est pas affecté par la pression et la température de reperfusion. Aussi, nous n'avons observé aucune corrélation au niveau de l'ampleur de ces phénomènes puisqu'avec le protocole d'ischémie partielle-reperfusion la nécrose cellulaire était élevée et la production de $\cdot\text{OH}$ faible, alors qu'avec le protocole de C-R, la nécrose cellulaire était plus faible et la production de ERO plus élevée. De plus, avec le premier protocole, le NAC réduisait la production de $\cdot\text{OH}$ sans influencer significativement la libération de LDH. Tous ces résultats suggèrent que la production de $\cdot\text{OH}$ à la reperfusion ne soit pas un facteur déterminant de la nécrose cellulaire, corroborant ainsi les résultats de Takemura et collaborateurs³⁹⁷ et de Khalid et collaborateurs²⁰⁰.

3.1.3. Relation $\cdot\text{OH}$, fonction cardiaque et débit coronarien

Une majorité d'études supporte le rôle prépondérant des ERO dans la sidération endothéliale et myocardique plutôt que dans le développement de nécrose cellulaire. Les résultats de notre étude tendent à démontrer qu'il n'y a pas de relation entre la production de $\cdot\text{OH}$ à la reperfusion et la fonction cardiaque ou la production de $\cdot\text{OH}$ et le débit coronarien mesurés à la reperfusion. En effet, on remarque une production plus élevée d' $\cdot\text{OH}$ dans le protocole de C-R par rapport au protocole d'ischémie partielle-reperfusion (21.6 ± 11.5 vs 3.7 ± 0.7 nmol 34DHBZ/10 min), bien que la fonction cardiaque soit équivalente (RPP: 15 ± 2 vs 13 ± 1 (batt/minXmm Hg) $\times 10^3$). De plus, l'ajout du NAC à la reperfusion dans le protocole d'ischémie partielle-reperfusion diminue la production de $\cdot\text{OH}$ sans influencer la fonction cardiaque ni le débit coronarien. Finalement, l'ajout de H_2O_2 ou de $\text{O}_2^{\cdot-}$, deux ERO potentiellement précurseurs de $\cdot\text{OH}$, dans le protocole de C-R, diminue le débit coronarien à la reperfusion mais n'influence pas significativement la fonction cardiaque. Les résultats obtenus appuient ceux de Takemura et collaborateurs³⁹⁷.

Par ailleurs, il convient de mentionner les limites sous-jacentes à la comparaison de la fonction contractile des coeurs reperfusés dans les différents protocoles utilisés, même si ces considérations n'influencent pas les conclusions de l'étude. La fonction cardiaque des coeurs reperfusés dépend, d'une part, de l'ampleur de la nécrose et d'autre part, de la sidération. Cette dernière composante est éventuellement réversible si le temps de reperfusion alloué est assez long (plusieurs heures, voir même jours) ou si les coeurs sont stimulés avec une catécholamine¹⁴⁹. Ainsi, il est probable que la fonction cardiaque mesurée dans des coeurs reperfusés pendant 30 minutes en présence de norépinéphrine après 90 minutes d'ischémie partielle (premier protocole), soit une valeur maximale. Au contraire, la fonction cardiaque des coeurs reperfusés pendant 60 minutes après une cardioplégie hypothermique de 4 heures (deuxième protocole) est une valeur minimale. Puisque ce dernier modèle est associé à peu de nécrose, il est donc probable qu'il comporte une composante importante de dysfonctionnement cardiaque dû à la sidération. Lors de la reperfusion avec le protocole de C-R, une infusion d'isoprotérénol ($1 \mu\text{M}$) aurait permis de déterminer la

fonction contractile maximale de ces coeurs.

3.1.4. Importance des piègeurs de $\cdot\text{OH}$ dans la prévention du syndrome d'I-R

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans cette étude suggèrent qu'une thérapie antioxydante de reperfusion ciblée pour les $\cdot\text{OH}$, du moins avec le NAC, ne permet pas d'atténuer de façon importante les dommages associés au syndrome d'I-R, autant sur la nécrose que la fonction cardiaque ou le débit coronarien. Plusieurs raisons peuvent être invoquées. En effet, il est possible que l'efficacité d'une thérapie antioxydante ciblée pour le $\cdot\text{OH}$ soit limitée par la grande réactivité de ce radical. Par ailleurs, il n'est pas exclu que l' $^1\text{O}_2$ soit aussi une espèce dommageable^{214,459} dans ces conditions et qu'elle devrait être ciblée. De plus, l'utilisation d'un antioxydant liposoluble devrait aussi être envisagé²⁰⁰. Finalement, le temps alloué pour le traitement avec l'antioxydant dans les protocoles utilisés dans cette étude n'est peut-être pas suffisant pour que les effets escomptés soient observés. En fait, dans des études où les animaux étaient traités avec une intervention antioxydante pour plusieurs heures ou jours avant d'induire une ischémie, le traitement antioxydant a diminué la durée de la sidération myocardique¹³, a amélioré la récupération de la fonction contractile²²² et a diminué les dommages mitochondriaux^{228,424} observés à la reperfusion. Ceci suggère que les bénéfices d'une intervention antioxydante à moyen et long terme, pourraient impliquer une régulation de l'expression génique²⁹.

3.2. Potentiel thérapeutique du NAC

3.2.1. Effets cardioprotecteurs du NAC

Dans notre étude, l'effet antioxydant directe du NAC sur les $\cdot\text{OH}$, documenté pour la première fois dans un organe intact, a été observé durant l'ischémie et aussi à la reperfusion. Toutefois, contrairement à certaines études^{10,62,121}, le NAC n'a pas augmenté le contenu en GSH du myocarde dans les protocoles d'ischémie partielle-reperfusion et de C-R. Dans le premier protocole, ceci s'explique en partie par le temps d'addition du NAC au moment de l'ischémie partielle. En outre, ceci n'exclut

pas une augmentation locale de GSH dans les cellules bordant les vaisseaux. Aussi, contrairement à plusieurs autres études^{10,62,121,256,323,376-378,401}, nous n'avons pas rapporté d'effets bénéfiques du NAC sur la fonction contractile ou la nécrose des coeurs reperfusés après une période de privation d'oxygène. Nos résultats sont cependant en accord avec ceux de certains auteurs^{127,202} utilisant différents protocoles d'I-R où l'administration du NAC débute soit 10 minutes avant ou pendant l'ischémie partielle. Par ailleurs, la controverse demeure quant au rôle des ERO dans l'arythmie, étant donné l'inefficacité des antioxydants pour contrer ce phénomène^{113,323}. Dans notre étude, l'ajout de NAC 100 μ M au moment de la reperfusion dans le modèle C-R, semble diminuer l'arythmie, bien que le nombre de perfusions soit insuffisant pour atteindre une signification statistique.

Parmi les raisons à invoquer pour expliquer les différences entre les effets du NAC rapportés dans notre étude et ceux rapportés par d'autres, mentionnons: (i) le choix unique des conditions de perfusion, telle la présence de substrats (lactate) dans le tampon, (ii) le temps d'addition du NAC et (iii) les différents protocoles d'I-R; l'ischémie partielle combinée à une infusion de norépinéphrine (première partie) et la cardioplégie hypothermique avec la solution Celsior (deuxième partie) riche en antioxydants (GSH).

Rétrospectivement, les observations suivantes, lesquelles sont centrées sur l'activité des canaux K^+_{ATP} myocardiques (voir section 3.2.2.3 de ce chapitre), suggèrent que la présence des divers substrats dans le tampon de perfusion contribue, du moins en partie, à cette disparité. Ainsi, les travaux de Sargent et collaborateurs³⁵⁷ démontrent un lien entre les effets cardioprotecteurs de certains thiols dont le NAC et les canaux K^+_{ATP} . En effet, les effets cardioprotecteurs du NAC, démontrés dans des coeurs perfusés en présence de glucose et soumis à une I-R, sont renversés par un inhibiteur des canaux K^+_{ATP} , le glibenclamide. Aussi, des travaux réalisés récemment dans notre laboratoire²¹⁵ suggèrent que la probabilité d'ouverture des canaux K^+_{ATP} dans les coeurs perfusés avec un mélange de substrats soit plus grande que dans les coeurs perfusés avec le glucose seul. Donc sur la base de ces deux études, nous

pourrions prédire que le NAC peut être plus bénéfique pour des coeurs perfusés en présence de glucose seul, comme c'est le cas dans la plupart des études mentionnées plus tôt, qu'en présence d'octanoate, lactate, pyruvate, fumarate, ajoutés aux perfusats dans notre étude.

3.2.2. Modulation par le NAC du débit coronarien

Dans la présente étude, l'utilisation du NAC comme antioxydant dans trois protocoles d'I-R a permis de mettre en évidence son effet modulateur sur le débit coronarien des coeurs reperfusés. Cet effet semble attribuable à la présence sur cette molécule d'un groupement thiol plutôt qu'à son activité de piègeur de $\cdot\text{OH}$. De fait, aucune corrélation n'a été observée entre les effets rapportés sur le débit coronarien et la production de $\cdot\text{OH}$. La modulation du débit coronarien par le NAC semble impliquer plusieurs mécanismes, lesquels varieraient en fonction du temps d'addition du NAC et des conditions de perfusions. La présence de substrats exogènes, possiblement le lactate, la formation de $\cdot\text{NO}$, de S-nitrosothiols et l'action des canaux K^+_{ATP} semblent des facteurs importants. Les protocoles de C-R et d'ischémie globale-reperfusion ont confirmé les effets modulateurs du NAC sur le débit coronarien observés avec le premier protocole, tout en précisant davantage les facteurs intervenants dans ces effets, soit le rôle permissif de certains substrats exogènes présents dans le tampon de perfusion et l'implication des canaux K^+_{ATP} . Un tel effet du NAC sur le débit dans un modèle d'I-R cardiaque n'avait été rapporté que dans une étude⁴⁰¹, alors qu'une autre³⁷² observait une amélioration du débit des coeurs perfusés en normoxie et que des cas d'hypotension avaient été notés lors de l'administration de NAC chez des patients coronariens^{121,180}.

3.2.2.1. Rôle des thiols et des ERON: Notre première série d'expériences, où des coeurs ont été soumis à l'ischémie partielle suivie d'une reperfusion, suggérait l'importance du groupement thiol du NAC (ou du GSH formé à partir du NAC) et le rôle des ERON dans la modulation par le NAC du débit coronarien. Dans ce protocole, une protection de la microvasculature coronaire par le traitement au NAC est suggérée par la réponse hyperémique soutenue observée lors de la reperfusion. Il semble que

plus d'un mécanisme soit impliqué et que ceux-ci dépendent du temps d'addition du NAC. De fait, le NAC devait être présent pendant ou avant l'ischémie partielle pour observer l'effet sur le débit coronarien. L'implication du $\cdot\text{NO}$ est mis en évidence par l'ajout de NNLA, un inhibiteur de NO synthase, lequel doit toutefois être présent avant l'ajout de NAC pour inhiber le débit. Ceci suggère l'implication d'un autre mécanisme qui n'a pas été identifié.

Malgré que le traitement au NAC durant l'ischémie et la reperfusion n'ait pas augmenté significativement le "pool" intracardiaque global de glutathion des coeurs reperfusés, il n'est pas exclu que celui-ci ait été mieux préservé localement dans les cellules endothéliales et de la musculature lisse. Ces cellules bordent les vaisseaux et sont les premières à bénéficier de l'apport en NAC. Par ailleurs, il a été montré que le NAC, autant que le GSH, peut réagir avec le peroxy-nitrite formant des S-nitrosothiols, des vasodilatateurs plus puissants et stables que le $\cdot\text{NO}$ ^{183,280}. De même, la formation de S-nitrothiol provenant de la réaction entre le NO_2^- et un thiol pourrait avoir des effets similaires de vasorelaxation⁸⁸ qui impliqueraient aussi la stimulation de la sGC par le $\cdot\text{NO}$. La formation d'un composé S-nitrosothiol ou S-nitrothiol, soit dérivé du NAC lui-même ou du GSH, pourrait expliquer le fait que le NNLA doit être ajouté avant le NAC pour inhiber l'effet sur le débit. L'importance du statut en thiol (GSH) semble déterminant pour la régulation du débit coronarien puisqu'il a été rapporté que des coeurs déplétés en GSH démontrent une résistance coronarienne accrue³⁵, alors que ceux traités au GSH montrent une augmentation post-hypoxique du débit coronarien¹³⁷.

Dans la deuxième partie de l'étude avec le protocole de C-R, l'implication du $\cdot\text{NO}$ nous semblait toujours probable car il peut être libéré seul dans l'endothélium ou couplé à une molécule contenant un groupement SH comme le N-acétylcystéine ou le glutathion. Les complexes S-nitroso ainsi formés permettent une diffusion graduelle et étendue de NO. Cependant, dans la troisième partie de l'étude, avec le protocole d'ischémie globale-reperfusion, l'utilisation d'un inhibiteur de la sGC, le 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ), n'a pas réussi à réduire le débit

coronarien à la reperfusion, suggérant que le $\cdot\text{NO}$ via l'activation la sGC, n'est pas directement impliqué dans la modulation du débit coronarien. Par contre, selon Bolotina et collaborateurs^{44a}, il n'est pas exclu que le $\cdot\text{NO}$ puisse avoir un effet sur la modulation du débit coronarien par son rôle dans l'activation des canaux K^+_{Ca} , laquelle pourrait entraîner une relaxation des muscles vasculaires indépendamment du cGMP.

Mise à part le rôle de $\text{O}_2^{\cdot-}$, lequel réagit avec le $\cdot\text{NO}$ pour former le ONOO^- , celui des autres ERON dans la régulation du débit coronarien n'est pas plus clair. Le H_2O_2 , qui peut être soit vasodilatateur ou vasoconstricteur³⁴⁹, serait très réactif en concentration non-physiologique²¹³, mais peu actif en concentration physiologique. Cependant, dans un milieu où il y a des ions métalliques, le H_2O_2 réagit avec ces derniers pour former le $\cdot\text{OH}$ qui agit comme vasodilatateur³⁴⁹. Par ailleurs, l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) a été moins étudié et ses effets sur le débit coronarien non-documenté. En effet, certains auteurs ont observé une corrélation entre la production de $^1\text{O}_2$ et les dysfonctions cardiaques⁴⁵⁹. Le mécanisme de contribution de $^1\text{O}_2$ aux dommages de reperfusion post-ischémie demeure toujours incompris. Les interactions entre les diverses espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'oxyde nitrique sont complexes et restent à être élucidées. Les résultats obtenus pour les coeurs ayant été préservés puis reperfusés avec un tampon additionné de H_2O_2 suggèrent que dans ces conditions du moins, le H_2O_2 serait vasoconstricteur.

3.2.2.2. Rôle des substrats énergétiques: La deuxième série d'expériences, réalisée avec des coeurs reperfusés après une préservation hypothermique de 4 heures dans la solution Celsior, a permis de mettre en évidence l'importance des substrats exogènes, tel le lactate, dans l'effet modulateur du NAC sur le débit coronarien. Dans la première partie de l'étude, le lactate n'était pas ajouté, mais sa concentration dans le perfusat effluent, surtout pendant l'ischémie partielle et dans une moindre mesure, durant la reperfusion, était augmentée par rapport aux valeurs basales. Des effets modulateurs du lactate sur le débit coronarien⁹⁰ et le tonus artériel²⁹⁵ ont d'ailleurs été rapportés dans la littérature. Le lactate pourrait agir sur le débit coronarien via son effet sur le pH et/ou sur le rapport NADH/NAD ⁷⁹. À la lumière des observations

décrites dans la littérature, des résultats de la première partie de l'étude et des effets démontrés par le H_2O_2 et le pyrogallol avec le protocole C-R, il nous apparaissait essentiel que le mécanisme proposé inclut des interactions entre un des substrats utilisés dans le tampon de perfusion, plus particulièrement le lactate, le H_2O_2 , l' O_2^- , le $\cdot\text{NO}$, les thiols et/ou les S-nitrosothiols. Pour ces raisons, nous avons d'abord considéré et adapté un mécanisme décrit dans une série d'articles par Mohazzab-H et ses collaborateurs²⁷²⁻²⁷⁴.

Tel que présenté dans la *Figure 9*, ce mécanisme met en évidence le rôle d'une oxydase-cytochrome b558 NADH-dépendante. L'activité de cette enzyme serait reliée au métabolisme du lactate par la LDH via le couple d'oxydo-réduction NAD^+/NADH . En effet, l'oxydation du NADH par l'enzyme est couplée avec la réduction de l'oxygène en O_2^- , lequel est transformé par la SOD en H_2O_2 . Ce dernier est métabolisé par la CAT, laquelle interagit avec la sGC pour former le cGMP qui produit une vasodilatation par un mécanisme impliquant probablement une protéine kinase. Ce schéma montre aussi l'interaction possible de l' O_2^- avec le $\cdot\text{NO}$ pour former le ONOO^- et le rôle des thiols qui réagissent avec le ONOO^- et/ou le NO_2^- pour former des S-nitrosothiols et/ou des S-nitrothiols, lesquels régénèrent le $\cdot\text{NO}$ qui induit une vasodilatation via le cGMP. L'implication d'un tel mécanisme nous apparaissait possible d'autant plus qu'il pouvait expliquer les effets du H_2O_2 observés dans le protocole de C-R. De fait, lors d'une production excessive d' O_2^- et par conséquent de H_2O_2 , ce dernier peut agir via les prostaglandines et les thromboxanes pour produire une vasoconstriction. Finalement, en favorisant indirectement la conversion du lactate en pyruvate, le DCA, ajouté au tampon de perfusion dans la deuxième partie de l'étude, jouerait un rôle d'amplificateur pour la production d' O_2^- .

Pour vérifier l'implication de ce mécanisme, il a fallu faire appel à un troisième protocole d'I-R, lequel était associé à peu de nécrose et nous permettait de pré-traiter les coeurs avec diverses drogues inhibitrices avant de les soumettre à l'ischémie puis à la reperfusion. Dans ce protocole, les coeurs perfusés avec le NAC et des substrats

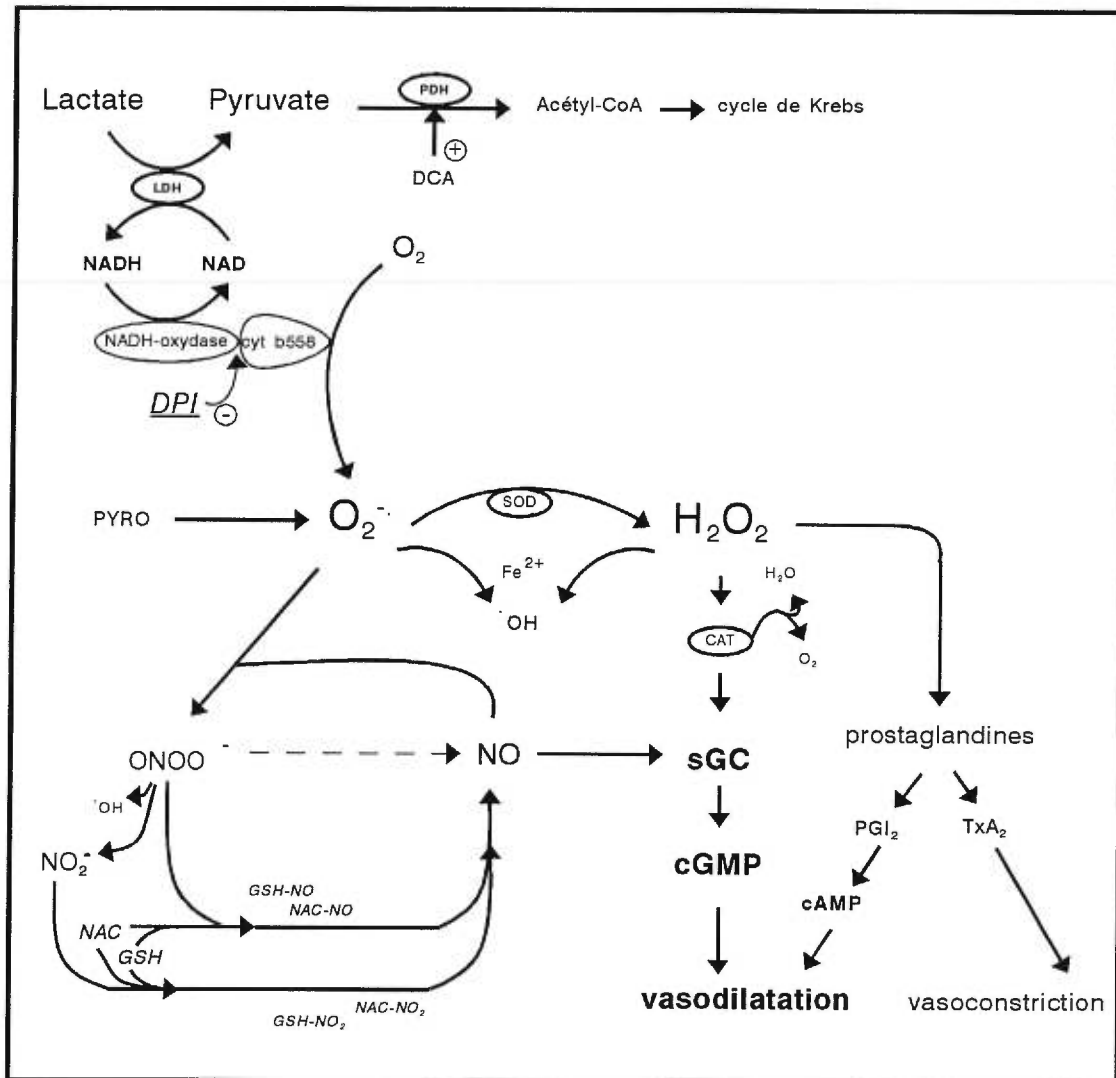


Figure 9. Rôle potentiel d'une NADH-oxydase dans la modulation du débit coronarien.

Abréviations: PDH = pyruvate déshydrogénase, DPI = chlorure de diphenyleneiodonium, PYRO = pyrogallol

avaient un débit plus élevé que ceux perfusés avec le NAC seul avant et après l'ischémie. L'absence d'effet sur le débit d'un inhibiteur de la NADH-oxydase-cytochrome b558, le chlorure de diphényleneiodonium (DPI 10 μM) et d'un inhibiteur de la sGC, l'ODQ (10 μM), ne supportait pas une contribution du mécanisme proposé à la *Figure 9*. Même qu'en augmentant la concentration de l'ODQ à 30 μM , nous avons observé une plus grande vasodilatation plutôt qu'une vasoconstriction. En outre, l'absence d'effet d'un inhibiteur de la cyclo-oxygénase, l'indométhacine, suggère que la voie des prostaglandines n'intervient pas n'ont plus dans le mécanisme de régulation du débit coronarien dans cette étude.

Ces résultats négatifs nous ont incité à considérer la possibilité de l'implication d'un autre mécanisme dans la modulation du débit coronarien. Suite à une recherche dans la littérature, notre choix s'est arrêté à l'implication des canaux K^+_{ATP} .

3.2.2.3. Rôle des canaux K^+_{ATP} : Dans la cellule musculaire lisse, il existe différents types de canaux potassiques dont les canaux K^+_{ATP} . Ces canaux sont régulés par plusieurs facteurs^{46,270,325} dont le statut métabolique et leur ouverture est associée à une diminution du calcium intracellulaire qui produit une relaxation puis conséquemment, une vasodilatation. De fait, la probabilité d'ouverture des canaux est augmentée par une diminution du rapport ATP/ADP, une diminution du pH, par l'augmentation de la concentration de lactate et d'acyl-CoA et par une faible activité de la glycolyse. Tous ces changements, qui augmentent la probabilité d'ouverture des canaux, sont observés lors du syndrome d'I-R. De plus, l'état de phosphorylation²²⁴, qui est régulé par diverses kinases dont la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) et peut être aussi la protéine kinase G (PKG)³²⁵, est aussi un facteur influençant l'ouverture des canaux K^+_{ATP} . Par ailleurs, quelques études rapportent que la présence de thiols réduits, tel le GSH, semble ouvrir ces canaux, alors que celle des thiols oxydés, tel le GSSG, les ferme^{72,416}. Le mécanisme moléculaire impliqué n'est pas connu et seules quelques évidences indirectes montrent la présence d'un groupement thiol sur les canaux K^+_{ATP} ¹⁸⁶. Ce type de régulation a été peu documenté au niveau cardiaque, mais Weik et collaborateurs⁴³⁹ ont suggéré que le groupement

SH soit situé près du site de liaison de l'ATP sur les canaux K^+_{ATP} du muscle squelettique.

Dans la troisième série d'expériences, l'utilisation de glibenclamide, un inhibiteur des canaux K^+_{ATP} , a permis de diminuer significativement et d'une façon dose-dépendante le débit coronarien des coeurs ischémiques et reperfusés. Ces résultats démontrent l'importance de ces canaux dans la régulation du débit coronarien dans notre modèle et corroborent les résultats de quelques auteurs^{51,87,184,196,356}. Les facteurs modulant l'activité de ces canaux, ainsi que les mécanismes moléculaires par lesquels ces facteurs agissent, restent à être précisés. Cependant, quelque soit ces éléments ou mécanismes, ceux-ci doivent tenir compte de l'interaction entre le NAC et un ou des substrats exogènes, probablement le lactate, documentée dans notre étude. À cet effet, il est connu qu'autant le lactate^{158,199} que la présence de thiols réduits^{72,416}, augmentent la probabilité d'ouverture des canaux K^+_{ATP} , ce qui est associé à une vasodilatation. Les mécanismes moléculaires potentiels pour les effets du lactate impliquent, entre autres, les ion H^+ et le rapport $NADH/NAD$ ³²⁵. De plus, les mécanismes moléculaires pouvant être envisagés pour expliquer l'effet du NAC doivent faire intervenir une modulation de l'activité des canaux K^+_{ATP} par l'état d'oxydation des groupements thiols associés au complexe protéines-canaux.

Même si nos résultats ne nous permettent pas d'exclure une action directe du NAC ou d'un dérivé S-nitroso-NAC, il nous semble plus probable que le mécanisme impliqué fasse intervenir la conversion du NAC en GSH. Ainsi, le rapport GSH/GSSG serait déterminant pour l'état d'oxydation des groupements SH des protéines-canaux. L'ouverture et la fermeture des canaux pourraient s'effectuer par un mécanisme impliquant la formation de disulfhydes mixtes protéines-SH et protéines -S-SG via une thiol transférase¹²¹. Un tel mécanisme pourrait expliquer l'effet du H_2O_2 qui diminue le débit coronarien dans le modèle de C-R. La *Figure 10* propose un mécanisme expliquant une partie de nos résultats, lesquels appuient ceux de Tricarico et collaborateurs⁴¹⁶. Ce mécanisme et l'effet du H_2O_2 documenté dans notre étude contredisent toutefois l'étude de Ichinari et collaborateurs¹⁸², laquelle a démontré que

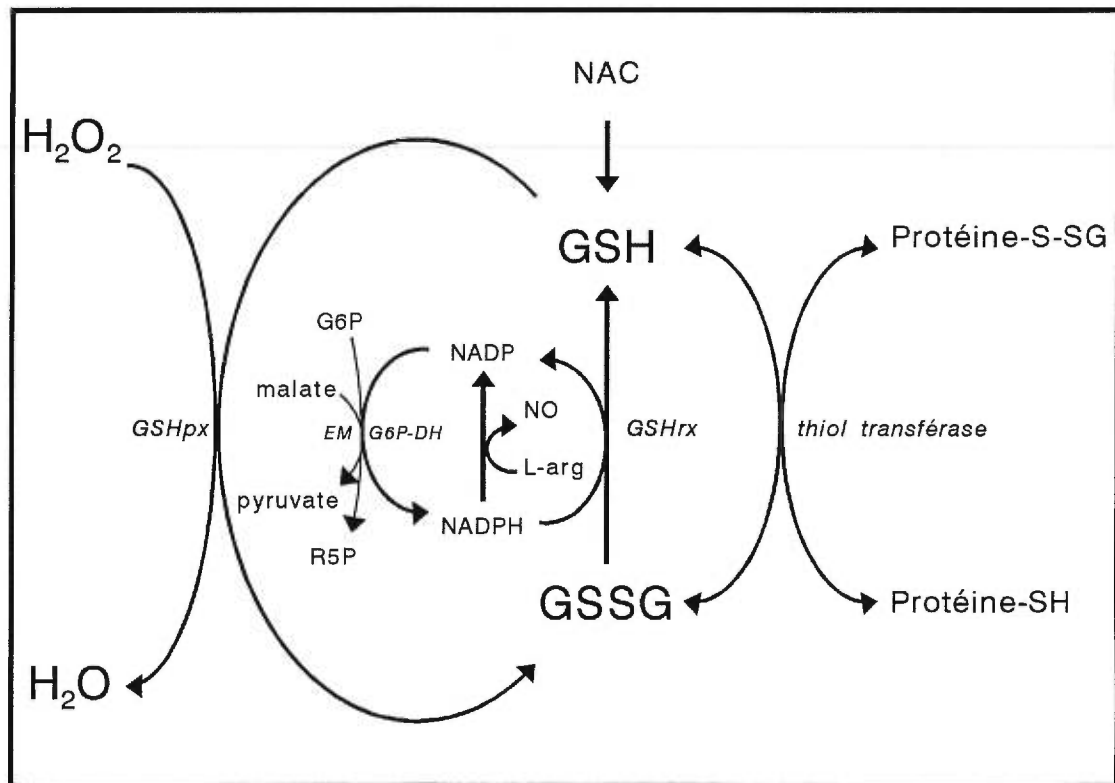


Figure 10. Rôle du H₂O₂ et des thiols dans la régulation du débit coronarien. Plutôt que d'agir via les prostaglandines pour produire une vasoconstriction, le H₂O₂ pourrait oxyder le GSH en GSSG, ce qui entraînerait une accumulation de thiols oxydés et éventuellement la fermeture des canaux K⁺_{ATP}. Abréviations: G6P = glucose-6-phosphate, R5P = ribose-5-phosphate, G6P-DH = glucose-6-phosphate-déshydrogénase, EM = enzyme malique, L-arg = L-arginine.

les ERO, plus spécifiquement le H_2O_2 , augmentait la probabilité d'ouverture des canaux.

Finalement, la *Figure 11* illustre les divers facteurs pouvant intervenir pour moduler la régulation du débit coronarien observée dans des coeurs perfusés en présence de NAC et d'un mélange de substrats énergétiques. Bien que ce schéma ne soit pas complet, nous pouvons en déduire que le principal mécanisme d'action n'origine pas de la voie de la sGC, de la voie des prostaglandines ou de la NADH-oxydase. Les résultats obtenus avec la panoplie d'inhibiteurs testés, suggèrent que le mécanisme implique les canaux K^+_{ATP} dans la modulation du débit coronarien. La probabilité d'ouverture de ces canaux serait modulée par les substrats exogènes, probablement le lactate et l'état d'oxydation des thiols. Les mécanismes moléculaires restent à être précisé. De même, l'effet observé des canaux K^+_{ATP} n'exclut pas la participation simultanée de d'autres types de canaux, principalement les canaux K^+_{Ca} ^{93,44a}.

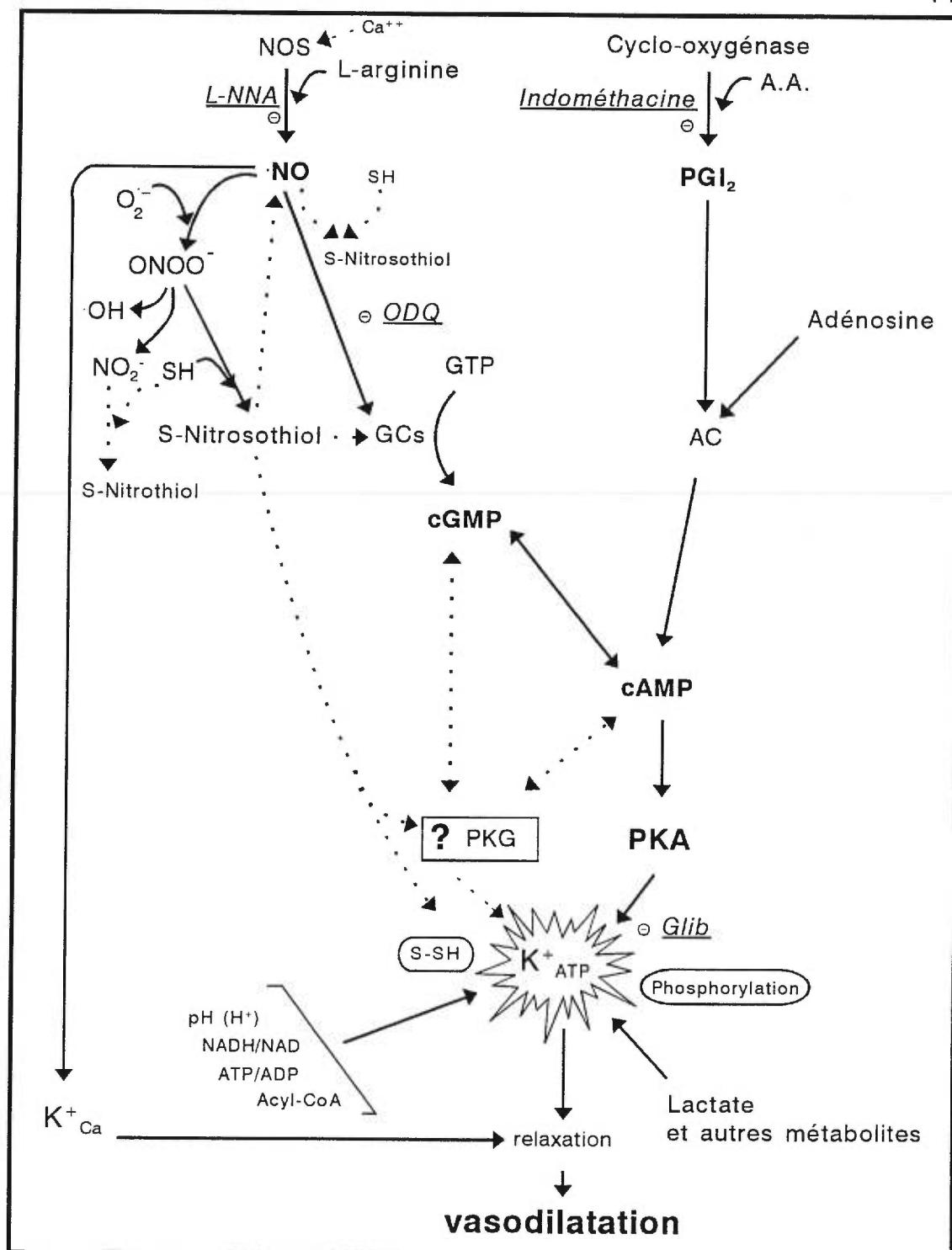


Figure 11. Principaux facteurs intervenant dans la modulation du débit coronarien.
voies: connues \longrightarrow , proposées $\cdots \blacktriangleright$

Abréviations: A.A. = acide arachidonique, AC = adénylate cyclase,
SH = thiol, Glib = glibenclamide

4. PROJETS FUTURS

Pour des raisons de limites de détection, les dosages directs de cGMP et le $\cdot\text{NO}$ (NO_2^- et NO_3^-) sur le perfusat effluent n'ont pas réussi à clarifier les mécanismes d'action impliqués dans la modulation du débit coronarien dans le modèle de cardioplégie-reperfusion. L'analyse de ces facteurs, au niveau tissulaire, de même que le dosage du GSH tissulaire dans le troisième modèle d'étude, permettraient d'augmenter notre compréhension de la séquence d'événements lors du syndrome d'I-R. La mesure des molécules S-nitroso ou S-nitrothiol au niveau tissulaire permettrait également de documenter les conditions de formation de ces molécules. De plus, l'utilisation d'une solution de préservation sans GSH permettrait peut-être d'observer une protection reliée à l'effet antioxydant du NAC. Finalement, une analyse plus systématique de l'effet de chacun des substrats ajoutés à la solution de reperfusion permettrait d'isoler, hors de tous doutes, le ou les métabolites responsables des effets observés sur le débit coronarien.

Chapitre V. CONCLUSION GÉNÉRALE

Chapitre V. CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail nous a permis d'atteindre l'objectif fixé qui était de préciser le rôle de la thérapie antioxydante pour la protection du coeur contre les dommages reliés à l'ischémie-reperfusion. De plus, parallèlement, nos résultats mettent en évidence un effet modulateur du NAC sur le débit coronarien des coeurs reperfusés tout en identifiant des facteurs impliqués dans cet effet.

Concernant la thérapie antioxydante, nos résultats soulèvent un questionnement quant à la contribution du $\cdot\text{OH}$ aux dommages observés lors de l'I-R dans le coeur isolé. L'utilisation simultanée d'une méthode de détection par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et d'un piègeur spécifique des $\cdot\text{OH}$, ainsi que la mesure temporelle de divers indices, ont permis de préciser la séquence des événements lors de l'ischémie et de la reperfusion des coeurs isolés. Malgré l'évidence d'une production accrue de $\cdot\text{OH}$ par les coeurs ischémiques et reperfusés, aucune corrélation n'a pu être observée entre la production d'ERO et un des éléments suivants: la nécrose cellulaire, la fonction cardiaque ou le débit coronarien.

Ainsi, dans l'ensemble, nos résultats suggèrent qu'une thérapie antioxydante ciblée pour les $\cdot\text{OH}$, du moins avec le NAC, n'apporte pas de bénéfice tangible pour le coeur. Une contribution du $\cdot\text{OH}$ aux dommages associés à l'ischémie-reperfusion ne peut être exclue pour autant puisque l'efficacité de la thérapie antioxydante pourrait être limitée par la trop grande réactivité de ce radical. De plus, les effets dommageables de cette espèce réactive oxygénée pourraient se manifester à plus long terme. Ainsi, il aurait été intéressant de poursuivre ce projet en évaluant l'effet de l'administration prolongée d'une thérapie antioxydante ciblée sur les $\cdot\text{OH}$ et de vérifier l'hypothèse d'un rôle sur le système immunitaire ou l'expression génique. Toutefois, pour cibler spécifiquement le $\cdot\text{OH}$, il serait préférable d'utiliser un autre antioxydant que le NAC puisque cet agent pourrait exercer ses effets majoritairement par un autre mécanisme que son activité de piègeur pour ce radical.

En effet, ce travail met aussi en évidence un effet modulateur du NAC sur le débit coronarien des coeurs reperfusés. Cet effet semble attribuable à la présence sur cette molécule d'un groupement thiol plutôt qu'à son activité de piègeur des $\cdot\text{OH}$. De fait, aucune corrélation n'a été observée entre les effet rapportés sur le débit coronarien et la production de $\cdot\text{OH}$. À notre connaissance, une seule étude avait rapporté un tel effet du NAC sans toutefois proposé de mécanisme. Pourtant, suite à l'administration de NAC, un effet hypotenseur avait été rapporté chez certains patients souffrant de maladies cardiaques. La mise en évidence de cet effet du NAC dans notre étude, et ce dans trois protocoles différents d'I-R, pourrait être attribuable au choix de nos conditions uniques de perfusion, soit l'ajout de substrats énergétiques exogènes autres que le glucose dans le tampon de perfusion des coeurs.

En ce qui a trait au mécanisme impliqué dans cet effet modulateur du NAC, il semble que celui-ci varie en fonction du temps d'addition du NAC et des conditions de perfusion. Parmi les facteurs mis en cause à l'aide de substances inhibitrices, mentionnons l'effet permissif de substrats exogènes, probablement le lactate, la formation de $\cdot\text{NO}$ et de dérivés S-nitrosothiols et l'activité des canaux K^+_{ATP} . Toutefois, d'autres expériences ou mesures auraient été nécessaires afin de préciser avec exactitude le rôle de chacun de ces facteurs. En ce qui a trait aux canaux K^+_{ATP} vasculaires, les résultats de notre étude suggèrent que les mécanismes moléculaires impliqués doivent faire intervenir une modulation de l'activité des canaux par l'état d'oxydation des groupements thiols associés au complexe protéines-canaux. De fait, il semble que la probabilité d'ouverture de ces canaux soit augmentée par un effet combiné (i) d'un ou des substrats exogènes, entre autre le lactate, et (ii) de l'état réduit des thiols résultant de l'ajout de NAC.

Finalement, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans cet effet modulateur du NAC sur le débit coronarien s'avère pertinente à son utilisation en clinique, autant pour le traitement des MCV que pour les autres indications telles que les maladies pulmonaires chroniques. De fait, ceci pourrait prévenir ou traiter adéquatement les problèmes éventuels d'hypotension.

Chapitre VI. RÉFÉRENCES

Chapitre VI. RÉFÉRENCES

1. Aasum, E., Larsen, T. Pyruvate reverses fatty-acid-induced depression of ventricular function and calcium overload after hypothermia in guinea pig hearts. *Cardiovasc. Res.* **33**:370-377; 1997.
2. Abrams, J. Interactions between organic nitrates and thiol groups. *Am. J. Med.* **91**:(suppl.3C)106s-112s; 1991.
3. Allen, B.S., Okamoto, F., Buckberg, G.D., Bugyi, H., Young, H., Leaf, J., Beyersdorf, F., Sjostrand, F., Maloney, J.V. Immediate functional recovery after six hours of regional ischemia by careful control of conditions of reperfusion and composition of reperfusate. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **92**:621-635; 1986.
4. Ambrosio, G., Santoro, G., Tritto, I., Elia, P.P., Duilio, C., Basso, A., Scognamiglio, A., Chiariello, M. Effects of ischemia and reperfusion on cardiac tolerance to oxidative stress. *Am. J. Physiol.* **262**:H23-H30; 1992.
5. Ambrosio, G., Zweier, J.L., Duilio, C., Kuppusamy, P., Santoro, G., Elia, P.P., Tritto, I., Cirillo, P., Condorelli, M., Chiariello, M. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J. Biol. Chem.* **268**:18532-18541; 1993.
6. Ambrosio, G., Zweier, J.L., Jacobus, W.E., Weisfeldt, M., Flaherty, J.T. Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: The role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation* **76**:906-915; 1987.
7. Anderson, M.E., Meister, A. Intracellular delivery of cysteine. *Methods in Enzymology* **143**:313-325; 1987.
8. Archer, S.L., Nelson, D.P., Weir, K. Detection of activated O₂ species in vitro and in rat lungs by chemiluminescence. *J. Appl. Physiol.* **67**:1912-1921; 1989.
9. Arroyo, C.M., Kramer, J.H., Dickens, B.F., Weglicki, W.B. Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS Letters* **221**:101-104; 1987.
10. Arstall, M.A., Yang, J., Stafford, I., Betts, H., Horowitz, J.D. N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects.

Circulation **92**:2855-2862; 1995.

11. Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **6**:593-597; 1989.
12. Asai, T., Grossi, E.A., LeBoutillier III, M., Parish, M.A., Baumann, F.G., Spencer, F.C., Colvin, S.B., Galloway, A.C. Resuscitative retrograde blood cardioplegia. Are amino acids or continuous warm techniques necessary? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **109**:242-248; 1995.
13. Atar, D., Mortensen, S.A., Flachs, H., Herzog, W.R. Coenzyme Q10 protects ischemic myocardium in an open-chest swine model. *Clin. Investig.* **71**:S103-S111; 1993.
14. Axford-Gatley, R.A., Wilson G.J. Reduction of experimental myocardial infarct size by oral administration of alpha-tocopherol. *Cardiovasc. Res.* **25**:89-92, 1991.
15. Baker, J.E., Felix, C.C., Olinger, G.N., Kalyanaraman, B. Myocardial ischemia and reperfusion: Direct evidence for free radical generation by electron spin resonance spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:2786-2789; 1988.
16. Bando, K., Teramoto, S., Tago, M., Seno, S., Murakami, T., Nawa, S., Senoo, Y. Oxygenated perfluorocarbon, recombinant human superoxide dismutase, and catalase ameliorate free radical induced myocardial injury during heart preservation and transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **96**:930-938; 1988.
17. Barner, H.B. Blood cardioplegia: A review and comparison with crystalloid cardioplegia. *Ann. Thorac. Surg.* **52**:1354-1367; 1991.
18. Barsacchi, R., Coassin, M., Maiorino, M., Pelosi, G., Simonelli, C., Ursini, F. Increased ultra weak chemiluminescence emission from rat heart at postischemic reoxygenation: Protective role of vitamin E. *Free Radic. Biol. Med.* **6**:573-579; 1989.
19. Batty, P.R., Hicks, G.L., DeWeese, J.A., Wang, T. Optimal osmolarity for cold storage of the cardiac explant. *J. Surg. Res.* **48**:601-605; 1990.
20. Becker, L.C., Ambrosio, G. Myocardial consequences of reperfusion. *Prog. Cardiovasc. Disease* **30**:23-44; 1987.
21. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for

- endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1620-1624; 1990.
22. Belzer, F.O., Southard, J.H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* **45**:673-676; 1988.
 23. Benvenuti, C., Cachera, J-P. La préservation du greffon cardiaque. *Pour la science* **162**:46-52; 1991.
 24. Berne, R.M. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ. Res.* **47**:807-813;1980.
 25. Bernier, M., Manning, A.S., Hearse, D.J. Reperfusion arrhythmias: Dose-related protection by anti-free radical interventions. *Am. J. Physiol.* **256**:H1344-H1352; 1989.
 26. Beyersdorf, F., Kirsh, M., Buckberg, G.D., Allen, B.S. Warm glutamate/aspartate-enriched blood cardioplegic solution for perioperative sudden death. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **104**:1141-1147; 1992.
 27. Bharadwaj, L.A., Prasad, K. Mechanism of hydroxyl radical-induced modulation of vascular tone. *Free Radic. Biol. Med.* **22**:381-390; 1997.
 28. Biaglow, J.E. Role of glutathione and other thiols in cellular response to radiation and drugs. *Drug Metab. Rev.* **20**:1-12; 1989.
 29. Biesalski, H.K., Böhles, H., Esterbauer, H., Fürst, P., Gey, F., Hundsdörfer, G., Kasper, H., Sies, H., Weisburger, J. Antioxidant vitamins in prevention. *Clin. Nutrition* **16**:151-155; 1997.
 30. Bindoli, A., Barzon, E., Rigobello, M.P. Inhibitory effect of pyruvate on release of glutathione and swelling of rat heart mitochondria. *Cardiovasc. Res.* **30**:821-824; 1995.
 31. Bing, O.H.L. Heart muscle viability following hypoxia: Protective effect of acidosis. *Science* **180**:1297-1298; 1973.
 32. Bittl, J.A., Shine, K. Protection of ischemic rabbit myocardium by glutamic acid. *Am. J. Physiol.* **245**:H406-H412; 1983.
 33. Bixler, T.J., Gardner, T.J., Flaherty, J.T., Goldman, R.A., Gott, V.L. Beneficial effects of alkalotic reperfusion following ischemic cardiac arrest. *J. Surg. Res.* **24**:488-494; 1978.
 34. Blasig, I.E., Shuter, S., Garlick, P., Slater, T. Relative time-profiles for free

radical trapping, coronary flow, enzyme leakage, arrhythmias, and function during myocardial reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* **16**:35-41; 1994.

35. Blaustein, A., Deneke, S.M., Stolz, R.I., Baxter, O., Healey, N., Fanburg, B.L. Myocardial glutathione depletion impairs recovery after short periods of ischemia. *Circulation* **80**:1449-1457; 1989.
36. Blaustein, A.S., Schine, L., Brooks, W.W., Fanburg, B.L., Bing, O.H.L. Influence of exogenously generated oxidant species on myocardial function. *Am. J. Physiol.* **250**:595-599; 1986.
37. Boban, M., Stowe, D.F., Kampine, J.P., Goldberg, A.H., Bosnjak, Z.J. Effects of 2,3-butanedione monoxime in isolated hearts: Protection during reperfusion after global ischemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **105**:532-540; 1993.
38. Boehm, D.H., Human, P.A., von Oppell, U., Owen, P., Reichensperner, H., Opie, L.H., Rose, A.G., Reichart, B. Adenosine cardioplegia: Reducing reperfusion injury of the ischaemic myocardium? *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* **5**:542-545; 1991.
39. Boesgaard, S. Thiol compounds and organic nitrates. *Danish Medical Bulletin* **42**:473-484; 1995.
40. Bolli, R., Jeroudi, M.O., Patel, B.S., Aruoma, O.I., Halliwell, B., Lai, E.K., McCay, P.B. 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.* **65**:607-622; 1989.
41. Bolli, R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* **82**:723-738; 1990.
42. Bolli, R., Patel, B.S., Jeroudi, M.O., Lai, E.K., McCay, P.B. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of spin trap *alpha*-phenyl *N*-tert-butyl nitron. *J. Clin. Invest.* **82**:476-485, 1988.
43. Bolli, R.; Triana, F.; Jeroudi, M.O. Prolonged impairment of coronary vasodilatation after reversible ischemia. Evidence for microvascular "stunning". *Circ. Res.* **67**:332-343; 1990.
44. Bolling, S.F., Childs, K.F., Ning, X-H. Amino acid substrate preloading and postischemic myocardial recovery. *J. Surg. Res.* **53**:342-348; 1992.
- 44a. Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., Cohen, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular

smooth muscle. *Nature* **368**:850-853; 1994.

45. Bondy, S.C., Naderi, S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.* **48**:155-159; 1994.
46. Bouchard, J-F., Dumont, E., Lamontagne, D. Evidence that prostaglandins I₂, E₂, and D₂ may activate ATP-sensitive potassium channels in the isolated rat heart. *Cardiovasc. Res.* **28**:901-905; 1994.
47. Boudrillon, P.D.V., Poole-Wilson, P.A. Effects of ischemia and reperfusion on calcium exchange and mechanical function in isolated rabbit myocardium. *Cardiovasc. Res.* **15**:121-130; 1981.
48. Bouma, P., Ferdinandy, P., Sipkema, P., Allaart, C.P., Westerhof, N. Nitric oxide is an important determinant of coronary flow in the isolated blood perfused rat heart. *Basic Res. Cardiol.* **87**:570-584; 1992.
49. Braunwald, E., Kloner, R.A. Myocardial reperfusion: A double-edged sword? *J. Clin. Invest.* **76**:1713-1719; 1985.
50. Bredt, D.S., Snyder, S.H. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.* **63**:175-195; 1994.
51. Bril, A., Laville, M-P., Gout, B. Effects of glibenclamide on ventricular arrhythmias and cardiac function in ischemia and reperfusion in isolated rat heart. *Cardiovasc. Res.* **26**:1069-1076; 1992.
52. Buckberg, G.D., Beyersdorf, F., Allen, B.S., Robertson, J.M. Integrated myocardial management: Background and initial application. *J. Card. Surg.* **10**:68-98; 1995.
53. Bünger, R., Mallet, R.T., Hartman, D.A. Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart. *Eur. J. Biochem.* **180**:221-233; 1989.
54. Burton, G.W. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **570**:7-22; 1989.
55. Burton, K.P., McCord, J.M., Ghai, G. Myocardial alterations due to free-radical generation. *Am. J. Physiol.* **246**:H776-H783; 1984.
56. Bush, L.R., Warren, S., Mesh, C.L., Lucchesi, B.R. Comparative effects of aspartate and glutamate during myocardial ischemia. *Pharmacology* **23**:297-304; 1981.

57. Camacho, S.A., Parmley, W.W., James, T.L., Abe, H., Wu, S.T., Botvinick, E.H., Watters, T.A., Schiller, N., Sievers, R., Wikman-Coffelt, J. Substrate regulation of the nucleotide pool during regional ischaemia and reperfusion in an isolated rat heart preparation: A phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy analysis. *Cardiovasc. Res.* **22**:193-203; 1988.
58. Cartier, R., Carrier, M., Buluran, J., Millette, D., Dagenais, F. 2,3-butanedione monoxime preserves coronary artery endothelium-dependent relaxation during myocardial ischemia in the isolated rat heart. *Can. J. Cardiol.* **11**:505-510; 1995.
59. Cartier, R., Hollmann, C., Dagenais, F., Buluran, J., Pellerin, M., Leclerc, Y. Effects of University of Wisconsin solution on endothelium-dependent coronary artery relaxation in the rat. *Ann. Thorac. Surg.* **57**:255-257; 1994.
60. Cartier, R., Pellerin, M., Hollmann, C., Pelletier, L.C. Effects of pressure and duration of hyperkalemic infusions on endothelial function. *Ann. Thorac. Surg.* **55**:700-705; 1993.
61. Cavallini, L., Valente, M., Pia Rigobello, M. The protective action of pyruvate on recovery of ischemic rat heart: Comparison with other oxidizable substrates. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **22**:143-154, 1990.
62. Ceconi, C., Curello, S., Cargnoni, A., Ferrari, R., Albertini, A., Visioli, O. The role of glutathione status in the protection against ischemic and reperfusion damage: Effect of N-acetylcysteine. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **20**:5-13; 1988.
63. Chambers, D.J., Astras, G., Takahashi, A., Manning, A.S., Braimbridge, M.V., Hearse, D.J. Free radicals and cardioplegia: Organic anti-oxidants as additives to the St-Thomas' Hospital cardioplegic solution. *Cardiovasc. Res.* **23**:351-358; 1989.
64. Chambers, D.J., Takahashi, A., Hearse, D.J. Long-term preservation of the heart: The effect of infusion pressure during continuous hypothermic cardioplegia. *J. Heart Lung Transplant.* **11**:665-675; 1992.
65. Charloux, C., Paul, M., Loisanche, D., Astier, A. Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol. *Free Radic. Biol. Med.* **19**:699-704; 1995.
66. Chello, M., Mastroberto, P., Romano, R., Castaldo, P., Bevacqua, E., Marchese, A.R. Protection by coenzyme Q₁₀ of tissue reperfusion injury during abdominal aortic cross-clamping. *J. Cardiovasc. Surg.* **37**:229-235; 1996.

67. Chen, R.H. The scientific basis for hypocalcemic cardioplegia and reperfusion in cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.* **62**:910-914; 1996.
68. Chirkov, Y.Y., Horowitz, J.D. N-acetylcysteine potentiates nitroglycerin-induced reversal of platelet aggregation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **28**:375-380; 1996.
69. Choong, Y.S., Cottier, D.S., Edgar, S.G. Protective effects of oxygenated St. Thomas' Hospital cardioplegic solution during ischaemic cardiac arrest: Improved function, metabolism and ultrastructure. *J. Cardiovasc. Surg.* **34**:423-433; 1993.
70. Choong, Y.S., Gavin, J.B. L-aspartate improves the functional recovery of explanted hearts stored in St. Thomas' Hospital cardioplegic solution at 4° C. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **99**:510-517; 1990.
71. Choong, Y.S., Gavin, J.B., Armiger, L.C. Effects of glutamic acid on cardiac function and energy metabolism of rat heart during ischaemia and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **20**:1043-1051; 1988.
72. Coetzee, W.A., Nakamura, T.Y., Faivre, J-F. Effects of thiol-modifying agents on K_{ATP} channels in guinea pig ventricular cells. *Am. J. Physiol.* **269**:H1625-H1633; 1995.
73. Coetzee, W.A., Owen, P., Dennis, S.C., Saman, S., Opie, L.H. Reperfusion damage: Free radicals mediate delayed membrane changes rather than early ventricular arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* **24**:156-164; 1990.
74. Constant, J. Alcohol, Ischemic heart disease, and the French paradox. *Clin. Cardiol.* **20**:420-424; 1997.
75. Cotgreave, I., Moldéus, P., Schuppe, I. The metabolism of N-acetylcysteine by human endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **42**:13-16; 1991.
76. Creager, M.A., Roddy, M-A., Boles, K., Stamler, J.S. N-acetylcysteine does not influence the activity of endothelium-derived relaxing factor in vivo. *Hypertension* **29**:668-672; 1997.
77. Crooke, G.A., Harris, L.J., Grossi, E.A., Baumann, F.G., Esposito, R., Spencer, F.C., Colvin, S.B., Galloway, A.C. Role of amino acids and enhancement cardioplegia in routine myocardial protection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **106**:497-501; 1993.
78. Cross, A.R., Jones, O.T.G. Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Biochim. Biophys. Acta* **1057**:281-298; 1991.

79. Cross, H.R., Clarke, K., Opie, L.H., Radda, G.K. Is lactate-induced myocardial ischaemic injury mediated by decreased pH or increased intracellular lactate? *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**:1369-1381; 1995.
80. Cross, H.R., Opie, L.H., Radda, G.K., Clarke, K. Is a high glycogen content beneficial or detrimental to the ischemic rat heart? *Circ. Res.* **78**:482-491; 1996.
81. Curello, S., Ceconi, C., Cargnoni, A., Medici, D., Ferrari, R. Oxidative stress during myocardial ischaemia and reperfusion: Experimental and clinical evidences. *J. Appl. Cardiol.* **1**:311-327; 1986.
82. Curtis, M.J., Pugsley, M.K., Walker, M.J.A. Endogenous chemical mediators of ventricular arrhythmias in ischemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* **27**:703-719; 1993.
83. Dagenais, F., Cartier, R., Hollmann, C., Buluran, J., Carrier, M., Pelletier, L.C. L'influence de différentes solutions de préservation sur la fonction endothéliale des artères coronaires du rat. *Ann. Chir.* **47**:848-854; 1993.
84. Damerou, W., Ibel, J., Thürich, T., Assadnazari, H., Zimmer, G. Generation of free radicals in Langendorff and working hearts during normoxia, hypoxia, and reoxygenation. *Basic Res. Cardiol.* **88**:141-149; 1993.
85. Darley-Usmar, V., Halliwell, B. Reactive nitrogen species, oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmaceutical Res.* **13**:649-662; 1996.
86. Das, D.K., Engelman, R.M., Kimura, Y. Molecular adaptation of cellular defences following preconditioning of the heart by repeated ischaemia. *Cardiovasc. Res.* **27**:578-584; 1993.
87. Daut, J., Klieber, H-G., Cyrus, S., Noack, T. K_{ATP} channels and basal coronary vascular tone. *Cardiovasc. Res.* **28**:811-817; 1994.
88. Davidson, C.A., Kaminski, P.M., Wu, M., Wolin, M.S. Nitrogen dioxide causes pulmonary arterial relaxation via thiol nitrosation and NO formation. *Am. J. Physiol.* **270**:H1038-H1043; 1996.
89. Deboer, L.W.V., Bekx, P.A., Han, L., Steinke, L. Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation. *Am. J. Physiol.* **265**:H1571-H1576; 1993.
90. de Groot, M.J.M., van der Vusse, G.J. The effects of exogenous lactate and

- pyruvate on the recovery of coronary flow in the rat heart after ischaemia. *Cardiovasc. Res.* **27**:1088-1093; 1993.
91. de Groot, M.J.M., van Helden, M.A.B., de Jong, Y.F., Coumans, W.A., van der Vusse, G.J. The influence of lactate, pyruvate and glucose as exogenous substrates on free radical defence mechanisms in isolated rat hearts during ischaemia and reperfusion. *Molec. Cell. Biochem.* **146**:147-155; 1995.
 92. de Jong, J.W., van der Meer, P., Nieukoop, A.S., Huizer, T., Stoeve, R.J., Bos, E. Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans. *Circ. Res.* **67**:770-773; 1990.
 93. Dellsperger, K.C. Potassium channels and the coronary circulation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23**:1096-1101; 1996.
 94. DeMaster, E.G., Quast, B.J., Redfern, B., Nagasawa, H.T. Reaction of nitric oxide with the free sulphhydryl group of human serum albumin yields a sulphenic acid and nitrous oxide. *Biochemistry* **34**:11494-11499; 1995.
 95. Demmy, T.L., Haggerty, S.P., Boley, T.M., Curtis, J.J. Lack of cardioplegia uniformity in clinical myocardial preservation. *Ann. Thorac. Surg.* **57**:648-651; 1994.
 96. Depré, C., Fiérain, L., Hue, L. Activation of nitric oxide synthase by ischemia in the perfused heart. *Cardiovasc. Res.* **33**:82-87; 1997.
 97. Depré, C., Vanoverschelde, J-L., Goudemant, J-F., Mottet, I., Hue, L. Protection against ischemic injury by nonvasoactive concentrations of nitric oxide synthase inhibitors in the perfused rabbit heart. *Circulation* **92**:1911-1918; 1995.
 98. Des Rosiers, C., Rivest, M-J., Boily, M-J., Jetté, M., Carrobé-Cohen, A., Kumar, A. Gas chromatographic-mass spectrometric assay of tissue malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, and other aldehydes after their reduction to stable alcohols. *Anal. Biochem.* **208**:161-170; 1993.
 99. de Wit, L., Coetzee, A., Kotze, J., Lochner, A. Oxygen requirements of the isolated rat heart during hypothermic cardioplegia. Effect of oxygenation on metabolic and functional recovery after five hours of arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **95**:310-320; 1988.
 100. Dimassi, N., Bril, A., Autissier, N., Bralet, J., Rochette, L. Relations between reperfusion arrhythmias and myocardial norepinephrine and accumulation of calcium in the rat. *Cardioscience* **3**:7-12; 1992.

101. Donnelly, A.J. Adenosine is a useful alternative to verapamil when negative inotropic effects must be avoided. *AORN J.* **54**:129-130; 1991.
102. Donnelly, A.J., Djuric, M. Cardioplegia solutions. *Am. J. Hosp. Pharm.* **48**:2444-2460; 1991.
103. Döring, H.J., Dehnert, H. The isolated perfused heart. According to Langendorff. 1ère édition anglaise: Biomesstechnik-Verlag March GmbH, D-7806 March, 1987.
104. Drinkwater, D.C., Stein, D.G., Permut, L.C., Laks, H. Clinical trial of University of Wisconsin solution for cardiac transplantation: Preliminary results. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **102**:798-808; 1991.
105. Drinkwater, D.C., Ziv, E.T., Laks, H., Lee, J.R., Bhuta, S., Rudis, E., Chang, P. Extracellular and standard university of Wisconsin solutions provide equivalent preservation of myocardial function. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **110**:738-745; 1995.
106. Eddy, L.J., Stewart, J.R., Jones, H.P., Engerson, T.D., McCord, J.M., Downey, J.M. Free radical-producing enzyme, xanthine oxidase, is undetectable in human hearts. *Am. J. Physiol.* **253**:H709-H711; 1987.
107. Eicher, J.C., Gabrielle, F., Abadie, C., Maupoil, V., Wolf, J.E., David, M., Rochette, L. Experimental preservation of the heart transplant: Effects of deferoxamine on functional recovery and lipid peroxidation of the isolated-perfused rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Transplantation Proceedings* **27**:1654; 1995.
108. Emerit, J., Klein, J.M., Coutellier, A., Congy, F. Radicaux libres et peroxydation lipidique en biologie cellulaire: Perspectives physiopathologiques. *Path. Biol.* **39**:316-327; 1991.
109. Engelman, R.M., Rousou, J.A., Flack III, J.E., Iyengar, J., Kimura, Y., Das, D.K. Reduction of infarct size by systemic amino acid supplementation during reperfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **101**:855-859; 1991.
110. Epstein, S.E., Speir, E., Unger, E.F., Guzman, R.J., Finkel, T. The basis of molecular strategies for treating coronary restenosis after angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* **23**:1278-1288; 1994.
111. Esterbauer, H. The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **570**:254-267, 1989.
112. Esterbauer, H., Zollner, H., Schaur, R.J. Aldehydes formed by lipid

- peroxidation: Mechanisms of formation, occurrence, and determination. In *Membrane lipid oxidation*, Vigo-Pelfrey, C. Ed., CRC Press, 239-268; 1992.
113. Euler, D.E. Reperfusion induced arrhythmias are not caused by generation of free radicals. *Cardiovasc. Res.* **28**:423; 1994.
 114. Evans, P.J., Whiteman, M., Tredger, J.M., Halliwell, B. Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: A proposed addition to organ storage fluids. *Free Radic. Biol. Med.* **23**:1002-1008; 1997.
 115. Feelisch, M., te Poel, M., Zamora, R., Deussen, A., Moncada, S. Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature* **368**:62-65; 1994.
 116. Feigl, E.O. EDRF-a protective factor? *Nature* **331**:490-491; 1988.
 117. Feldman, L.J., Tahlil, O., Steg, G. Perspectives of arterial gene therapy for the prevention of restenosis. *Cardiovasc. Res.* **32**:194-207; 1996.
 118. Ferrari, R. Oxygen-free radicals at the myocardial level: Effects of ischaemia and reperfusion. *Adv. Exp. Biol. Med.* **366**:99-111; 1994.
 119. Ferrari, R. The role of free radicals in ischaemic myocardium. *British J. Clin. Practice* **44**:301-305; 1990.
 120. Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Cargnoni, A., Agnoletti, G., Boffa, G.M., Visioli, O. Intracellular effects of myocardial ischaemia and reperfusion: Role of calcium and oxygen. *Eur. Heart J.* **7**(Suppl A):3-12; 1986.
 121. Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Cargnoni, A., Alfieri, O., Pardini, A., Marzollo, P., Visioli, O. Oxygen free radicals and myocardial damage: Protective role of thiol-containing agents. *Am. J. Med.* **91**:(suppl.3C):95s-105s; 1991.
 122. Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Pepi, P., Mazzeletti, A., Visioli, O. Cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc. Drugs. Therapy* **10**:639-647; 1996.
 123. Ferreira, R., Burgos, M., Llesuy, S., Molteni, L., Milei, J., Gonzalez Flecha, B., Boveris, A. Reduction of reperfusion injury with mannitol cardioplegia. *Ann. Thorac. Surg.* **48**:77-84; 1989.
 124. Ferrera, R. J., Marcsek, P., Larese, A., Girard, C., Guidollet, J., Dittmar, A., Dureau, G. J. Comparison of continuous microperfusion and cold storage for pig heart preservation. *Heart Lung Transplant.* **12**:463-469; 1993.

125. Flanagan, R.J., Meredith, T.J. Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *Am. J. Med.* **91**:(suppl.3C):131s-139s; 1991.
126. Folette, D.M., Fey, K., Buckberg, G.D, Helly, J.J., Steed, D.L. Foglia, R.P., Maloney, J.V. Reducing postischemic damage by temporary modification of reperfusate calcium, potassium, pH, and osmolarity. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **82**:221-238; 1981.
127. Forman, M.B., Puett, D.W., Cates, C.U., McCroskey, D.E., Beckman, J.K., Greene, H.L., Virmani, R. Glutathione redox pathway and reperfusion injury. Effect of N-acetylcysteine on infarct size and ventricular function. *Circulation* **78**:202-213; 1988.
128. Fraber, N.E., Vercellotti, G.M., Jacob, H.S., Pieper, G.M., Gross, G. Evidence for a role of iron-catalyzed oxidants in functional and metabolic stunning in the canine heart. *Circ. Res.* **63**:351-360; 1988.
129. French, B.A., Mazur, W., Ali, N.M., Geske, R.S., Finnigan, J.P., Rodgers, G.P., Roberts, R., Raizner, A.E. Percutaneous transluminal in vivo gene transfer by recombinant adenovirus in normal porcine coronary arteries, atherosclerotic arteries, and two models of coronary restenosis. *Circulation* **90**:2402-2413; 1994.
130. Friedl, H.P., Smith, D.J., Till, G.O., Thomson, P.D., Louis, D.S., Ward, P.A. Ischemia-reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am. J. Pathol.* **136**:491-495; 1990.
131. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376; 1980.
132. Galinanes, M., Bernocchi, P., Argano, V., Cargnoni, A., Ferrari, R., Hearse, D.J. Dichotomy in the post-ischemic metabolic and functional recovery profiles of isolated blood-versus buffer-perfused heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**:531-539; 1996.
133. Galinanes, M., Chambers, D.J., Hearse, D.J. Effect of sodium aspartate on the recovery of rat heart from long-term hypothermic storage. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **103**:521-531; 1992.
134. Galinanes, M., Chambers, D.J., Hearse, D.J. Should adenosine continue to be ignored as a cardioprotective agent in cardiac operations? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **105**:180-183; 1993.
135. Ganote, C.E., Nayler, W.G. Contracture and the calcium paradox. *J. Mol.*

- Cell. Cardiol. **17**:733-745; 1985.
136. Garlick, P.B., Davies, M.J., Hearse, D.J., Slater, T.F. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ. Res.* **61**:757-760; 1987.
 137. Gauduel, Y., Menasché, P., Duvelloy, M. Enzyme release and mitochondrial activity in reoxygenated cardiac muscle: Relationship with oxygen-induced lipid peroxidation. *Gen. Physiol. Biophys.* **8**:327-340; 1989.
 138. Geffin, G.A., Reynolds, T.R., Titus, J.S., O'Keefe, D.D., Daggett, W.M. Relation of myocardial protection to cardioplegic solution pH: Modulation by calcium and magnesium. *Ann. Thorac. Surg.* **52**:955-964; 1991.
 139. Gharagozloo, F., Melendez, F.J., Hein, R.A., Laurence, R.G., Shemin, R.J., DiSesa, V.J., Cohn, L.H. The effect of amino acid L-glutamate on the extended preservation ex vivo of the heart for transplantation. *Circulation* **76**(suppl V):65-70; 1987.
 140. Ghomeshi, H.R., Tian, G., Ye, J., Sun, J., Hoffenberg, E.F., Salerno, T.A., Deslauriers, R. Cardiopulmonary bypass, myocardial management, and support techniques. Aspartate/glutamate-enriched blood does not improve myocardial energy metabolism during ischemia-reperfusion: A ³¹P magnetic resonance spectroscopic study in isolated pig hearts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **113**:1068-1080; 1997.
 141. Goldhaber, J.I., Weiss, J.N. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities. *Hypertension* **20**:118-127; 1992.
 142. Goldhaber, J.I. Free radicals enhance Na⁺/Ca²⁺ exchange in ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **271**:H823-H833; 1996.
 143. Goto, R., Tearle, H., Steward, D.J., Ashmore, P.G. Myocardial oedema and ventricular function after cardioplegia with added mannitol. *Can. J. Anaesthesia* **38**:7-14; 1991.
 144. Gow, A.J., Buerk, D.G., Ischiropoulos, H. A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**:2841-2845; 1997.
 145. Gressier, B., Cabanis, A., Lebegue, S., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J-C. Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: Comparison in vitro of some thiol-containing drugs. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **16**:9-13; 1994.
 146. Grum, C.M., Gallagher, K.P., Kirsh, M.M., Schlafer, M. Absence of detectable

- xanthine oxidase in human myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**:263-267; 1989.
147. Guarnieri, C., Turinetto, B., Coli, G., Muscari, I., Cattabridge, I., Vaona, I., Finelli, C., Pignini, F., Calderera, C.M. Effect of glutathione monoethyl ester on glutathione level and cardiac energetics in reperfused pig heart. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* **81**:33-44; 1993.
 148. Gunnes, S. Ytrehus, K.; Sorlie, D. Effects of initial reperfusion temperature and pressure after prolonged cardioplegic ischemic arrest. *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **24**:135-139; 1990.
 149. Guth, B.D., Schulz, R., Heusch, G. Time course and mechanisms of contractile dysfunction during acute myocardial ischemia. *Circulation* **87**:IV35-IV42; 1993.
 150. Gutteridge, J.M.C., Quinlan, G.J. Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test: The role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. *J. Appl. Biochem.* **5**:293-299; 1983.
 151. Haan C.K., Lazar, H.L., Rivers, S., Coady, C., Shemin, R.J. Improved myocardial preservation during cold storage using substrate enhancement. *Ann. Thorac. Surg.* **50**:80-85; 1990.
 152. Hahimoto, K., Mashburn, J.P., Cartier, R., Schaff, H.V. Control of Ca²⁺ influx by manipulation of Ca²⁺ and/or Ca²⁺ antagonist in cardioplegic arrest. *Jpn. Circ. J.* **57**:237-244; 1993.
 153. Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* **16**:33-50; 1996.
 154. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**:1-14; 1984.
 155. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology* **186**:1-85; 1990.
 156. Halliwell, B., Hu, M-L., Louie, S., Duvall, T.R., Tarkington, B.K., Motchnick, P., Cross, C.E. Interaction of nitrogen dioxide with human plasma. Antioxidant depletion and oxidative damage. *FEBS Letters* **313**:62-66; 1992.
 157. Hamon, M., Bauters, C., McFadden, E.P., Wernert, N., Lablanche, J.M., Dupuis, B., Bertrand, M.E. Restenosis after coronary angioplasty. *Eur. Heart J.* **16**:133-148; 1995.

158. Han, J., So, I., Kim, E-Y., Earm, Y.E. ATP-sensitive potassium channels are modulated by intracellular lactate in rabbit ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* **425**:546-548; 1993.
159. Hanley, P.J., Cooper, P.J., Loiselle, D.S. Effect of hyperosmotic perfusion on rate of oxygen consumption of isolated guinea pig and rat hearts during cardioplegia. *Cardiovasc. Res.* **28**:485-493; 1994.
160. Harding, R.J., Duncan, C.J. Protection against cellular damage in the perfused rat heart by lowered pH. *Eur. J. Pharmacol.* **330**:47-53; 1997.
161. Harjula, A., Mattila, S., Mattila, I., Härkönen, M., Myllärniemi, H., Nickels, J., Merikallio, E. Coronary endothelial damage after cristalloid cardioplegia. *J. Cardiovasc. Surg.* **25**:147-152; 1984.

162. Haywood, G.A., Tsao, P.S., von der Leyen, H.E., Mann, M.J., Keeling, P.J., Trindade, P.T., Lewis, N.P., Byrne, C.D., Rickenbacher, P.R., Bishopric, N.H., Cooke, J.P., McKenna, W.J., Fowler, M.B. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* **93**:1087-1094; 1996.
163. Hearse, D.J. Ischemia, reperfusion and the determinants of tissue injury. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **4**:767-776; 1990.
164. Hearse D.J. Reperfusion of the ischemic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **9**:605-616; 1977.
165. Hearse, D.J. Stunning: A radical re-view. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **5**:853-876; 1991.
166. Hearse, D.J., Humphrey, S.M., Bullock, G.R. The oxygen paradox and the calcium paradox: Two facets of the same problem? *J. Mol. Cell. Cardiol.* **10**:641-668; 1978.
167. Hearse, D.J., Humphrey, S.M., Chain, E.B. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested perfused rat heart: A study of myocardial enzymes release. *J. Mol. Cell. Cardiol* **5**:395-407; 1973.
168. Hearse, D.J., Maxwell, L., Saldanha, C., Gavin, J.B. The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: A target for injury and protection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**:759-800; 1993.
169. Hearse, D.J., Tosaki, A. Free radical and calcium: Simultaneous interaction triggers as determinants of vulnerability to reperfusion-induced arrhythmias in the rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **20**:213-223; 1988.

170. Heinemeyer, D., Belles, G., Stapenhorst, K. Intracellular pH measurement during cardiac arrest in ventricular myocardium by Bretschneider's cardioplegic solution HTK and St. Thomas Hospital solution with and without procaine. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **35**:48-52; 1987.
171. Held, K.D., Sylvester, F.C., Hopcia, K.L., Biaglow, J.E. Role of Fenton chemistry in thiol-induced toxicity and apoptosis. *Radiation Res.* **145**:542-553; 1996.
172. Henry, T.D., Archer, S.L., Nelson, D., Weir, E.K., From, H.L. Enhanced chemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation during ischemia and reperfusion. *Circ. Res.* **67**:1453-1461; 1990.
173. Henry, T.D., Archer, S.L., Nelson, D., Weir, E.K., From, A.H.L. Postischemic oxygen radical production varies with duration of ischemia. *Am. J. Physiol.* **264**:H1478-H1484; 1993.
174. Heusch, G. Ischemia-selectivity: A new concept of cardioprotection by calcium antagonists. *Basic Res. Cardiol.* **89**:2-5; 1994.
175. Hisatomi, K., Maruyama, H., Isomura, T., Aoyagi, S., Kosuga, K., Ohishi, K. Beneficial effect of the addition of nitroglycerin to the cardioplegic solution on the cold-stored reperfused isolated rat heart. *Jpn. Circ. J.* **57**:558-562; 1993.
176. Hoffman B.B., Lefkowitz, R.J. Chapitre 10: Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists, p199-248. *The pharmacological basis of therapeutics*, Ninth ed. Goodman & Gilman 1996, McGraw-Hill (Maison d'édition), Montréal.
177. Hogg, N., Singh, R.J., Kalyanaraman, B. The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Letters* **382**:223-228; 1996.
178. Hölscher, M., Groenewoud, A.F. Current status of HTK solution of Bretschneider in organ preservation. *Transplantation Proc.* **23**:2334-2337; 1991.
179. Hori, M., Kitakaze, M., Sato, H., Takashima, S., Iwakura, K., Inoue, M., Kitabatake, A., Kamada, T. Staged reperfusion attenuates myocardial stunning in dogs. Role of transient acidosis during early reperfusion. *Circulation* **84**:2135-2145; 1991.
180. Horowitz, J.D., Henry, C.A., Syrjanen, M.L., Louis, W.J., Fish, D., Smith, T.W., Antman, E.M. Combined use of nitroglycerin and N-acetylcysteine in the management of unstable angina pectoris. *Circulation* **77**:787-794; 1988.

181. Huxtable, B.J. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* **72**:101-163; 1992.
182. Ichinari, K., Kakei, M., Matsuoka, T., Nakashima, H., Tanaka, H. Direct activation of the ATP-sensitive potassium channel by oxygen free radicals in guinea-pig ventricular cells: Its potentiation by MgADP. *J. Molec. Cell. Cardiol.* **28**: 1867-1877; 1996.
183. Ignarro, L.J. Endothelium-derived nitric oxide: Pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters. *Pharmac. Res.* **6**:651-659; 1989.
184. Imamura, Y., Tomoike, H., Narishige, T., Takahashi, T., Kasuya, H., Takeshita, A. Glibenclamide decreases basal coronary blood flow in anesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* **263**:H399-H404; 1992.
185. Ingelman-Sundberg, M., Kaur, H., Terelius, Y., Persson, J-O., Halliwell, B. Hydroxylation of salicylate by microsomal fractions and cytochrome P-450. Lack of production of 2,3-dihydroxybenzoate unless hydroxyl radical formation is permitted. *Biochem. J.* **276**:753-757; 1991.
186. Islam, S., Berggren, P-O., Larsson, O. Sulfhydryl oxidation induces rapid and reversible closure of the ATP-regulated K⁺ channel in the pancreatic B-cell. *FEBS Letters* **319**:128-132; 1993.
187. Jackson, C.V., Mickelson, J.K., Pope, T.K., Rao, P.S., Lucchesi, B.R. O₂ free radical mediated myocardial and vascular dysfunction. *Am. J. Physiol.* **251**:H1225-H1231; 1986.
188. Jaffe, A.S., Landt, Y., Parvin, C.A., Abendschein, D.R., Geltman, E.M., Ladenson, J.H. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clin. Chemistry* **42**:1770-1776; 1996.
189. Janero, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* **9**:515-540; 1990.
190. Janero, D.R. Therapeutic potential of vitamin E against myocardial ischemic-reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.* **10**:315-324; 1991.
191. Jeevanandam, V., Auteri, J.S., Sanchez, J.A., Barr, M.L., Ott, G.Y., Hsu, D., Marboe, C., Smith, C.R., Rose, E.A. Improved heart preservation with University of Wisconsin solution: Experimental and preliminary human experience. *Circulation* **84**:III324-III328; 1991.

192. Jeevanandam, V., Auteri, J.S., Sanchez, J.A., Hsu, D., Marboe, C., Smith, C.R., Rose, E.A. Cardiac transplantation after prolonged graft preservation with the University of Wisconsin solution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **104**:224-228; 1992.
193. Jennings, R.B., Reimer, K.A. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: Effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation* **68**:125-136; 1983.
194. Jessen, M.E., Kovarik, T.E., Jeffrey, F.M., Sherry, A.D., Storey, C.J., Chao, R.Y., Ring, W.S., Malloy, C.R. Effects of amino acids on substrate selection, anaplerosis, and left ventricular function in the ischemic reperfused rat heart. *J. Clin. Invest.* **92**:831-839;1993.
195. Jewett, S.L., Eddy, L.J., Hochstein, P. Is the autoxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion injury? *Free Radic. Biol. Med.* **6**:185-188; 1989.
196. Kanatsuka, H., Sekiguchi, N., Sato, K., Akai, K., Wang, Y., Komaru, T., Ashikawa, K., Takishima, T. Microvascular sites and mechanisms responsible for reactive hyperemia in the coronary circulation of the beating canine heart. *Circ. Res.* **71**:912-922; 1992.
197. Kavanaugh, M.P. Voltage dependence of facilitated arginine flux mediated by the system γ^+ basic amino acid transporter. *Biochemistry* **32**:5781-5785; 1993.
198. Keaney, J.F., Simon, D.I., Stamler, J.S., Jaraki, O., Scharfstein, J., Vita, J.A., Loscalzo, J. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J. Clin. Invest.* **91**:1582-1589; 1993.
199. Keung, E.C., Li, Q. Lactate activates ATP-sensitive potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. *J. Clin. Invest.* **88**:1772-1777; 1991.
200. Khalid, M.A., Ashraf, M. Direct detection of endogenous hydroxyl radical production in cultured adult cardiomyocytes during anoxia and reoxygenation. Is the hydroxyl radical really the most damaging radical species? *Circ. Res.* **72**:725-736; 1993.
201. King, L.M., Boucher, F., Opie, L.H. Coronary flow and glucose delivery as determinants of contracture in the ischemic myocardium. *J Mol. Cell. Cardiol.* **27**:701-720; 1995.
202. Kingma, J.G. jr., Rouleau, J.R. Effects of N-acetylcysteine on tissue necrosis during acute myocardial infarction in rabbits. *Can. J. Cardiol.* **5**:321-326;

1989.

203. Kitakaze, M., Minamino, T., Node, K., Komamura, K., Shinozaki, Y., Mori, H., Kosaka, H., Inoue, M., Hori, M., Kamada, T. Beneficial effects of inhibition of angiotensin-converting enzyme on ischemic myocardium during coronary hypoperfusion in dogs. *Circulation* **92**:950-961; 1995.
204. Kitakaze, M., Weisfeldt, M.L., Marban, E. Acidosis during early reperfusion prevents myocardial stunning in perfused ferret hearts. *J. Clin. Invest.* **82**:920-927; 1988.
205. Kjellman, U., Björk, K., Ekroth, R., Karlsson, H., Jagenburg, R., Nilsson, F., Svensson, G., Wernerman, J. α -Ketoglutarate for myocardial protection in heart surgery. *The Lancet* **345**:552-553; 1995.
206. Kleinveld, H.A., Demacker, P.N.M., Stalenhoef. Failure of N-acetylcysteine to reduce low-density lipoprotein oxidizability in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **43**:639-642; 1992.
207. Kohno, H., Shiki, K., Ueno, Y., Tokunaga, K. Cold storage of the rat heart for transplantation. Two types of solution required for optimal preservation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **93**:86-94; 1987.
208. Kojima, S., Wu, S.T., Watters, T.A., Parmley, W.W., Wikman-Coffelt, J. Effects of perfusion pressure on intracellular calcium, energetics, and function in the perfused rat hearts. *Am. J. Physiol.* **264**:H183-H189; 1993.
209. Konorev, E.A., Tarpey, M.M., Joseph, J., Baker, J.E., Kalyanaraman, B. S-nitrosoglutathione improves functional recovery in the isolated rat heart after cardioplegic ischemic arrest. Evidence for a cardioprotective effect of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **274**:200-206; 1995.
210. Konorev, E.A., Joseph, J., Tarpey, M.M., Kalyanaraman, B. The mechanism of cardioprotection by S-nitrosoglutathione monoethyl ester in rat isolated heart during cardioplegic ischaemic arrest. *Brit. J. Pharmacol.* **119**:511-518; 1996.
211. Korthuis, R.J., Granger, D.N. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin. Cardiol.* **16**:119-126; 1993.
212. Kramer, J.H., Weglicki, W.B. A hydroxylated analog of the beta-adrenoceptor antagonist, carvedilol, affords exceptional antioxidant protection to postischemic rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* **21**:813-825; 1996.

213. Kukreja, R.C., Hess, M.L. The oxygen free radical system: From equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc. Res.* **26**:641-655; 1992.
214. Kukreja, R.C., Loesser, K.E., Kearns, A.A., Naseem, S.A., Hess, M.L. Protective effects of histidine during ischemia-reperfusion in isolated perfused rat hearts. *Am. J. Physiol.* **264**:H1370-H1381; 1993.
215. Laplante, A., Brunet, J., Bouchard, B., Boucher, C., Becker, B.F., Comtois, A.S., Des Rosiers, C. The role of K^+_{ATP} channels in metabolic cardioprotection by fumarate. *Manuscrit soumis à Am. J. Physiol.*
216. Lazar, H.L., Yang, X., Rivers, S., Stockwell, D., Shemin, R.J. Superiority of substrate enhancement over oxygen free-radical scavengers during extended periods of cold storage for cardiac transplantation. *Surgery* **108**:423-430; 1990.
217. Leclerc, G. Le transfert génique intra-vasculaire. *Union Médicale du Canada* **122**:204; 1993.
218. Lecompte, T., Mamas, S. Prostanoides et hémostasie. *Thérapie* **46**:227-230; 1991.
219. Ledingham, S.J.M., Baimbridge, M.V., Hearse, D.J. The St. Thomas' Hospital cardioplegic solution. A comparison of the efficacy of two formulations. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **93**:240-246; 1987.
220. Lefer, A.M. Attenuation of myocardial ischemia-reperfusion injury with nitric oxide replacement therapy. *Ann. Thorac. Surg.* **60**:847-851; 1995.
221. Lefer, A.M.; Tsao, P.S.; Lefer, D.J.; Ma, X.L. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J.* **5**:2029-2034; 1991.
222. Lehman, J.D., Dyke, C., Abd-Elfattah, A., Yeh, T., Ding, M., Ezrin, A., Wechsler, A.S. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase attenuates reperfusion injury when administered twenty-four hours before ischemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **104**:1597-1601; 1992.
223. Li, X-S., Uriuda, Y., Wang, Q.-D., Nordlander, R., Sjöquist, P.-O., Pernow, J. Role of L-arginine in preventing myocardial and endothelial injury following ischaemia/reperfusion in the rat isolated heart. *Acta Physiol. Scand.* **156**:37-44; 1996.
224. Light, P. Regulation of ATP-sensitive potassium channels by phosphorylation.

Biochim. Biophys. Acta **1286**:65-73; 1996.

225. Lindal, S., Gunnes, S., Lund, I., Straume, B.K., Jorgensen, L., Sorlie, D. Ultrastructural changes in rat hearts following cold cardioplegic ischemia of differing duration and differing modes of reperfusion. *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **24**:213-222; 1990.
226. Litt, M.R., Jeremy, R.W., Weisman, H.F., Winkelstein, J.A., Becker, L.C. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* **80**:1816-1827; 1989.
227. Liu, X.K., Tosaki, A., Engleman, R.M., Das, D.K. Salicylate reduces ventricular dysfunction and arrhythmias during reperfusion in isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **19**:209-215; 1992.
228. Llesuy, S., Milei, J., Picone, V., Gonzalez Flecha, B., Beigelman, R., Boveris, A. Effect of vitamins A and E on ischemia-reperfusion damage in rabbit heart. *Molec. Cell. Biochem.* **145**:45-51; 1995.
229. Lopukhin, S.Y., Southard, J.H., Belzer, F.O. University of Wisconsin solution containing 2,3-butanedione-monoxime extends myocardium preservation time. *Transplantation Proc.* **25**:3017-3018; 1993.
230. Loscalzo, J. Welch, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Progress Cardiovasc. Diseases* **38**:87-104; 1995.
231. Loskove, J.A., Frishman, W.H. Nitric oxide donors in the treatment of cardiovascular and pulmonary diseases. *Am. Heart J.* **129**:604-613; 1995.
232. Lucchesi, B.R. Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Ann. Rev. Physiol.* **52**:561-576; 1990.
233. Ma, X.L., Tsao, P.S., Viehman, G.E., Lefer, A.M. Neutrophil-mediated vasoconstriction and endothelial dysfunction in low-flow perfusion-reperfused cat coronary artery. *Circ. Res.* **69**:95-106; 1991.
234. Ma, X-L., Weyrich, A.S., Lefer, D.J., Lefer, A.M. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ. Res.* **72**:403-412; 1993.
235. Maekawa, K., Saito, D., Obayashi, N., Uchida, S., Haraoka, S. Role of endothelium-derived nitric oxide and adenosine in functional myocardial hyperemia. *Am. J. Physiol.* **267**:H166-H173; 1994.

236. Manché, A., Edmondson, S.J., Hearse, D.J. Dynamics of early postischemic myocardial functional recovery. Evidence of reperfusion-induced injury? *Circulation* **92**:526-534; 1995.
237. Manciet, L.H., Larson, D.F., Copeland, J.G. Low-pressure perfusion results in effective microvascular perfusion of isolated rabbit hearts during hypothermic preservation for twenty-four hours. *J. Heart Lung Transpl.* **10**:710-716; 1991.
238. Mankad, P.S., Chester, A.H., Yacoub, M.H. Role of potassium concentration in cardioplegic solutions in mediating endothelial damage. *Ann. Thorac. Surg.* **51**:89-93; 1991.
239. Mankad, P., Slavik, Z., Yacoub, M. Endothelial dysfunction caused by University of Wisconsin preservation solution in the rat heart. The importance of temperature. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **104**:1618-1624; 1992.
240. Manning, A.S. Reperfusion-induced arrhythmias: Do free radicals play a critical role? *Free Radic. Biol. Med.* **4**:305-316; 1988.
241. Marin, J., Rodriguez-Martinez, M.A. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J. Auton. Pharmacol.* **15**:279-307; 1995.
242. Masaki, T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**:235-255; 1995.
243. Massoudy, P., Becker, B.F., Gerlach, E. Bradykinin accounts for improved postischemic function and decreased glutathione release of guinea pig heart treated with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **23**:632-639; 1994.
244. Massoudy, P., Becker, B.F., Gerlach, E. Nitric oxide accounts for postischemic cardioprotection resulting from angiotensin-converting enzyme inhibition: Indirect evidence for a radical scavenger effect in the isolated guinea pig heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **25**:440-447; 1995.
245. Masters, T.N., Robicsek, F., Schaper, J., Jenkins, S., Rice, H. Effects of canine donor heart preservation temperature on posttransplant left ventricular function and myocardial metabolism. *Transplantation* **57**:807-811; 1994.
246. Matsuda, N., Kuroda, H., Mori, T. Beneficial actions of acidotic initial reperfusate in stunned myocardium of rat hearts. *Basic Res. Cardiol.* **86**:317-326; 1991.
247. Matsushima, T., Sueda, T., Matsuura, Y., Kawasaki, T. Protection by coenzyme Q₁₀ of canine myocardial reperfusion injury after reperfusion. *J.*

- Thorac. Cardiovasc. Surg. **103**:945-951; 1992.
248. Matsuura, H., Lazar, H.L., Yang, X., Rivers, S., Treanor, P., Bernard, S., Shemin, R.J. Warm versus cold blood cardioplegia. Is there a difference? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **105**:45-51; 1993.
249. Maupoil, V., Rochette, L. Evaluation of free radical and lipid peroxide formation during global ischemia and reperfusion in isolated perfused rat heart. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2**:615-622; 1988.
250. Maupoil, V., Chaillot, B., Brunotte, F., Rochette, L. Identification et évaluation des radicaux libres dans la séquence ischémie-reperfusion cardiaque. *Arch. Mal. Coeur* **86**:63-68; 1993.
251. Maxwell, S.R., Lip, G.Y. Reperfusion injury: A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int. J. Cardiol.* **58**:95-117; 1997.
252. McCord, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl. J. Med.* **312**: 159-163; 1985.
253. Meister, A., Anderson, M.E. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**:711-760; 1983.
254. Menasché, P. Blood cardioplegia: Do we still need to dilute? *Ann. Thorac. Surg.* **62**:957-960; 1996.
255. Menasché, P., Grousset, C., de Boccard, G., Piwnica, A. Protective effect of a asanguineous reperfusion solution on myocardial performance following cardioplegic arrest. *Ann. Thorac. Surg.* **37**:222-228; 1984.
256. Menasché, P., Grousset, C., Gauduel, Y., Mouas, C., Piwnica, A. Maintenance of the myocardial thiol pool by N-acetylcysteine an effective means of improving cardioplegic protection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **103**:936-944; 1992.
257. Menasché, P., Grousset, C., Gauduel, Y., Mouas, C., Piwnica, A. Prevention of hydroxyl radical formation: A critical concept for improving cardioplegia. *Circulation* **76**:V180-V185; 1987.
258. Menasché, P., Grousset, C., Gauduel, Y., Piwnica, A. A comparative study of free radical scavengers in cardioplegic solutions. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **92**:264-271; 1986.
259. Menasché, P., Grousset, C., Peynet, J., Mouas, C., Bloch, G., Piwnica, A.

Pretreatment with captopril improves myocardial recovery after cardioplegic arrest. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **19**:402-407; 1992.

260. Menasché, P., Grousset, C., Mouas, C., Piwnica, A. A promising approach for improving the recovery of heart transplants. Prevention of free radical injury through iron chelation by deferoxamine. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **100**:13-21; 1990.
261. Menasché, P., Hricak, B., Pradier, F., Cheav, S.L., Grousset, C., Mouas, C., Albérici, G., Bloch, G., Piwnica, A. Efficacy of lactobionate-enriched cardioplegic solution in preserving compliance of cold stored heart transplants. *J. Heart Lung Transplant.* **12**:1053-1061; 1993.
262. Menasché, P., Pradier, F., Grousset, C., Peynet, J., Mouas, C., Bloch, G., Piwnica, A. Improved recovery of heart transplants with a specific kit of preservation solutions. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **105**:353-363; 1993.
263. Menasché, P., Pradier, F., Peynet, J., Grousset, C., Mouas, C., Bloch, G., Piwnica, A. Limitation of free radical injury by reduced glutathione: An effective means of improving the recovery of heart transplants. *Transpl. Proceed.* **23**:2240-2242; 1991.
264. Menasché, P., Termognon, J.L., Pradier, F., Grousset, C., Mouas, C., Alberici, G., Weiss, M., Piwnica, A., Bloch, G. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur. J. Cardio. Thorac. Surg.* **8**:207-213; 1994.
265. Mezzetti, A., Calafiore, A., Lapenna, D., Deslauriers, R., Tian, G., Salerno, T.A., Verna, A.M., Bosco, G., Pierdomenico, S.D., Caccurullo, F. Intermittent antegrade warm cardioplegia reduces oxidative stress and improves metabolism of the ischemic-reperfused human myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **109**:787-795; 1995.
266. Miller, L.W., Jellinek, M., Codd, J.E., Kolata, R.J. Improved myocardial preservation by control of the oxidation-reduction potential. *Heart Transplant.* **IV**:319-324; 1985.
267. Milliken, J.C., Billingsley, A.M., Laks, H. Modified reperfusate after long-term preservation of the heart. *Ann. Thorac. Surg.* **47**:725-728; 1989.
268. Minor, T., Sturz, J., Klauke, H., Isselhard, W. Reduction of oxidative tissue injury and endothelial dysfunction by graduated reperfusion after cardioplegic arrest in isolated rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* **18**:621-626; 1995.
269. Misra, H.P., Fridovich, I. The generation of superoxide radical during the

- autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **247**:6960-6962; 1972.
270. Miyoshi, H., Nakaya, Y., Moritoki, H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K⁺ channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* **345**:47-49; 1994.
271. Mohanlal R.W., Mauve, I., Zoet, A.C.M., van der Laarse, A. Reperfusion induced enzyme release: Washout effect or manifestation of reperfusion damage? *Cardiovasc. Res.* **22**:603-610; 1988.
272. Mohazzab-H, K.M., Kaminski, P.M., Fayngersh, R.P., Wolin, M.S. Oxygen-elicited responses in calf coronary arteries: Role of H₂O₂ production via NADH-derived superoxide. *Am. J. Physiol.* **270**:H1044-H1053; 1996.
273. Mohazzab-H, K.M., Kaminski, P.M., Wolin, M.S. Lactate and PO₂ modulate superoxide anion production in bovine cardiac myocytes. Potential role of NADH-oxidase. *Circulation* **96**:614-620; 1997.
274. Mohazzab-H, K.M., Kaminski, P.M., Wolin, M.S. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am. J. Physiol.* **266**:H2568-H2572; 1994.
275. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**:109-142; 1991.
276. Morishita, R., Gibbons, G.H., Kaneda, Y., Ogihara, T., Dzau, V.J. Pharmacokinetics of antisense oligodeoxyribonucleotides (cyclin B1 and CDC 2 kinase) in the vessel wall in vivo: Enhanced therapeutic utility for restenosis by HVJ-liposome delivery. *Gene* **149**:13-19; 1994.
277. Morita, K., Ihnken, K., Buckberg, G.D., Young, H.H. Studies of hypoxemic/reoxygenation injury: Without aortic clamping. VII. Counteraction of oxidant damage by exogenous antioxidants: Coenzyme Q₁₀. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **110**:1221-1227; 1995.
278. Moro, M.A., Darley-Usmar, V.M., Goodwin, D.A., Read, N.G., Zamora-Pino, R., Feelisch, M., Radomski, M.W., Moncada, S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:6702-6706; 1994.
279. Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**:1124-1136; 1986.
280. Myers, P.R., Minor, R.L., Guerra, R., Bates, J.N., Harrison, D.G. Vasorelaxant

properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* **345**:161-163; 1990.

281. Myers, C.L., Weiss, S.J., Kirsh, M.M., Schlafer, M. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the "oxygen paradox": Reduction of creatine kinase release by catalase, allopurinol or deferoxamine, but not superoxide dismutase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **17**:675-684; 1985.
282. Nakanishi, K., Vinten-Johansen, J., Lefer, D.J., Zhao, Z., Fowler III, W.C., McGee, D.S., Johnston, W.E. Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am. J. Physiol.* **263**:H1650-H1658; 1992.
283. Nakazawa, H., Ichimoro, K., Shinozaki, Y., Okino, H., Hori, S. Is superoxide demonstration by electron-spin resonance spectroscopy really superoxide? *Am. J. Physiol.* **255**:H213-H215; 1988.
284. Naseem, S.A., Kontos, M.C., Rap, P.S., Jesse, R.L., Hess, M.L., Kukreja, R.C. Sustained inhibition of nitric oxide by N^G-nitro-L-arginine improves myocardial function following ischemia/reperfusion in isolated perfused rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**:419-426; 1995.
285. Nataf, P., Pavie, A., Bracamontes, L., Bors, V., Cabrol, C., Gandjbakhch, I. Myocardial protection by blood cardioplegia and warm reperfusion in heart transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* **53**:525-526; 1992.
286. Neely, J.R., Rovetto, M.J., Oram, J.F. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Progr. Cardiovasc. Diseases* **15**:289-329; 1972.
287. Nichols, W.W., Mehta, J.L., Donnelly, W.H., Lawson, D., Thompson, L., ter Riet, M. Reduction in coronary vasodilator reserve following coronary occlusion and reperfusion in anesthetized dog: Role of endothelium-derived relaxing factor, myocardial neutrophil infiltration and prostaglandins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **20**:943-954; 1988.
288. Ning, X-H., Ding, X., Childs, K.F., Bolling, S.F., Gallager, K.P. Flavone improves functional recovery after ischemia in isolated reperfused rabbit hearts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **105**:541-549; 1993.
289. Nishimura, M., Takami, H., Kaneko, M., Nakano, S., Matsuda, H., Kurosawa, K., Inoue, T., Tagawa, K. Mechanism of mitochondrial enzyme leakage during reoxygenation of the rat heart. *Cardiovasc. Res.* **27**:1116-1122; 1993.
290. Nishino, T. The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J. Biochem.* **116**:1-6; 1994.

291. 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. Com.* **211**:370-374; 1995.
292. Nohl, H. A novel superoxide radical generator in heart mitochondria. *FEBS letters* **214**:269-273; 1987.
293. Obadia, J.F., Baouali, A.B., Maupoil, V., Rochette, L. Crystalloid versus cold blood cardioplegia in patients operated for myocardial revascularisation. *J. Cardiovasc. Surg.* **37**:45-51; 1996.
294. Ohashi, T., Yamamoto, F., Yamamoto, H., Ichikawa, H., Shibata, T., Kawashima, Y. Transient reperfusion with acidic solution affects postischemic functional recovery: Studies in the isolated working rat heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **111**:613-620; 1996.
295. Omar, H.A., Mohazzab-H., K.M., Mortelliti, M.P., Wolin, M.S. O₂-dependent modulation of calf pulmonary artery tone by lactate: Potential role of H₂O₂ and cGMP. *Am. J. Physiol.* **264**:L141-L145; 1993.
296. Onodera, T., Ashraf, M. Detection of hydroxyl radicals in the post-ischemic reperfused heart using salicylate as a trapping agent. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **23**:365-370; 1991.
297. Opie, L.H. Proposed role of calcium in reperfusion injury. *Int. J. Cardiol.* **23**:159-164; 1989.
298. Opie, L.H., Coetzee, W.A. Role of calcium ions in reperfusion arrhythmias: Relevance to pharmacologic intervention. *Cardiovasc. Drugs Therapy* **2**:623-636; 1988.
299. Owen, P., du Toit, E.F., Opie, L.H. The optimal glucose concentration for intermittent cardioplegia in isolated rat heart when added to St. Thomas' Hospital cardioplegic solution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **105**:995-1006; 1993.
300. Oz, M.C., Pinsky, D.J., Koga, S., Liao, H., Marboe, C.C., Han, D., Kline, R., Jeevanandam, V., Williams, M., Morales, A., Popilskis, S., Nowygrod, R., Stern, D.M., Rose, E.A., Michler, R.E. Novel preservation solution permits 24-hour preservation in rat and baboon cardiac transplantation. *Circulation* **88**:291-297; 1993.
301. Pace-Asciak, C.R., Hahn, S., Diamandis, E.P., Soleas, G., Golberg, D.M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet

- aggregation and eicosanoid synthesis: Implication for protection against coronary heart disease. *Clin. Chimica Acta* **235**:207-219; 1995.
302. Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**:524-526; 1987.
303. Pearl, J.M., Hiramoto, J., Laks, H., Drinkwater, D.C., Chang, P.A. Fumarate-enriched blood cardioplegia results in complete functional recovery of immature myocardium. *Ann. Thorac. Surg.* **57**:1636-1641; 1994.
304. Philipson, K.D., Bersohn, M.M., Nishimoto, A.Y. Effects of pH on Na⁺-Ca²⁺ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circ. Res.* **50**:287-293; 1982.
-
305. Pietri, S., Culcasi, M., Albat, B., Albérici, G., Menasché, P. Direct assessment of the antioxidant effects of a new heart preservation solution, Celsior. A hemodynamic and electron spin resonance study. *Transplantation* **58**:739-742; 1994.
306. Pietri, S., Culcasi, M., Stella, L., Cozzone, P.J. Ascorbyl free radical as a reliable indicator of free-radical-mediated myocardial ischemic and post-ischemic injury. A real-time continuous-flow ESR study. *Eur. J. Biochem.* **193**:845-854; 1990.
307. Pijl, A.J., Pfaffendorf, M., Mathy, M-J., van Zwieten, P.A. Cardioprotection by nifedipine in isolated working hearts: A comparative study on three different types of experimental ischemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **21**:70-76; 1993.
308. Pisarenko, O.I. Mechanisms of myocardial protection by amino acids: Facts and hypotheses. *Clin. Experim. Pharmacol. Physiol.* **23**:627-633; 1996.
309. Pisarenko, O.I., Lakomkin, V.L., Studneva, I.M., Timoshin, A.A., Kuzmin, A.I., Ruuge, E.K., Kapelko, V.I. Allopurinol-enhanced postischemic recovery in the isolated rat heart involves repletion of high-energy phosphates. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* **51**:16-26; 1994.
310. Pisarenko, O.I., Portnoy, V.F., Studneva, I.M., Arapov, A.D., Korostylev, A.N. Glutamate-blood cardioplegia improves ATP preservation in human myocardium. *Biomed. Biochim. Acta* **46**:499-504; 1987.
311. Pisarenko, O.I., Rosenfelt, F.L., Langley, L., Conyers, R.A.J., Richards, S.M. Differing protection with aspartate and glutamate cardioplegia in the isolated rat heart. *Ann. Thorac. Surg.* **59**:1541-1548; 1995.

312. Pisarenko, O.I., Shulzhenko, V.S., Studneva, I.M., Kapelko, V.I. Effects of gradual reperfusion on postischemic metabolism and functional recovery of isolated guinea pig heart. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* **50**:127-134; 1993.
313. Podesser, B., Wollenek, G., Windischbauer, A., Zegner, M., Hausleithner, V., Seitelberger, R., Losert, U., Wolner, E. Myocardial protection with Bretschneider cardioplegic solution-an evaluation of full oxygenation. *Eur. Surg. Res.* **26**:133-140; 1994.
314. Poole-Wilson, P.A., Harding, D.P., Bourdillon, P.D.V., Tones, M.A. Calcium out of control. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **16**:175-187; 1984.
315. Pou, S., Hassett, D.J., Britigan, B.E., Cohen, M.S., Rosen, G.M. Problems associated with spin trapping oxygen-centered free radicals in biological systems. *Anal. Biochem.* **177**:1-6; 1989.
316. Powell, S.R., Wapnir, R.A. Adventitious redox-active metals in Krebs-Henseleit buffer can contribute to Langendorff heart experimental results. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26**:769-778; 1994.
317. Prasad, M.R., Liu, X., Rousou, J.A., Engelman, R.M., Jones, ZR., George, A., Das, D.K. Reduced free radical generation during reperfusion of hypothermically arrested hearts. *Mol. Cell. Biochem.* **111**:97-102; 1992.
318. Pré, J. La lipoperoxydation. *Path. Biol.* **39**:716-736; 1991.
319. Prichard, B.N. Beta-blockage therapy and cardiovascular disease. Past, present, and future. *Postgraduate Medicine. Spec No*:8-18; 1988.
320. Pryor, W.A., Squadrito, G.L. The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* **268**:L699-L722; 1995.
321. Przyklenk, K. Oxygen-derived free radicals and "stunned myocardium". *Free Radic. Biol. Med.* **4**:39-44; 1988.
322. Przyklenk, K., Kloner, R.A. "Reperfusion injury" by oxygen-derived free radical? *Circ. Res.* **64**:86-96; 1989.
323. Qiu, Y., Bernier, M., Hearse, D.J. The influence of N-acetylcysteine on cardiac function and rhythm disorders during ischemia and reperfusion. *Cardioscience* **1**:65-74; 1990.
324. Qiu, Y., Galinanes, M., Haddock, P.S. Hearse, J. Continuous warm versus intermittent cold cardioplegic infusion: A comparison of energy metabolism,

- sodium-potassium adenosine triphosphate activity and postischemic functional recovery in the blood-perfused rat heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **112**:797-805; 1996.
325. Quayle, J.M., Nelson, M.T., Standen, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.* **77**:1165-1232; 1997.
326. Racey-Burns, L.A., Burns, A.H., Summer, W.R., Shepherd, R.E. The effect of dichloroacetate on the isolated no flow arrested rat heart. *Life Sciences* **44**:2015-2023; 1989.
327. Radi, R., Cosgrove, T.P., Beckman, J.S., Freeman, B.A. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem. J.* **290**:51-57; 1993.
328. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**:4244-4250; 1991.
329. Raschke, P., Massoudy, P., Becker, B.F. Taurine protects the heart from neutrophil-induced reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.* **19**:461-471; 1995.
330. Rector, T.S., Bank, A.J., Mullen, K.A., Tschumperlin, L.K., Sih, R., Pillai, K., Kubo, S.H. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. *Circulation* **93**:2135-2141; 1996.
331. Reed D.J. Glutathione: Toxicological implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**:603-631; 1990.
332. Reed, M.K., Barak, C., Malloy, C.R., Maniscalco, S.P., Jessen, M.E. Effects of glutamate and aspartate on myocardial substrate oxidation during potassium arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **112**:1651-1660; 1996.
333. Reichenspurner, H., Russ, C., Überfuhr, P., Nollert, G., Schlüter, A., Reichart, B., Klövekorn, W.P., Schüller, S., Hetzer, R., Brett, W., Posival, M., Körner, M.M., Körfer, R. Myocardial preservation using HTK solution for heart transplantation. A multicenter study. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* **7**:414-419; 1993.
334. Reilly, P.M., Schiller, H.J., Buckley, G.B. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* **161**:488-503; 1991.

335. Reimer, K.A., Murry, C.E., Richard, V.J. The role of neutrophils and free radicals in the ischemic-reperfused heart: Why the confusion and controversy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**:1225-1239; 1989.
336. Rice-Evans, C.A., Diplock A.T. Current status of antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **15**:77-96; 1993.
337. Rigobello, M.P., Bindoli, A. Effect of pyruvate on rat heart thiol status during ischemia and hypoxia followed by reperfusion. *Mol. Cell. Biochem.* **122**:93-100; 1993.
338. Robertson R.M., Robertson.D. Chapitre 32: Drugs used for the treatment of myocardial ischemia, p759-777. *The pharmacological basis of therapeutics*, Ninth ed. Goodman & Gilman 1996, McGraw-Hill (Maison d'édition), Montréal.
339. Robinson, L.A., Schwarz, G.D., Goddard, D.B., Fleming, W.H., Galbraith, T.A. Myocardial protection for acquired heart disease surgery: Results of a national survey. *Ann. Thorac. Surg.* **59**:361-372; 1995.
340. Rojas, C., Cdenas, S., Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Barja, G. Increase in heart glutathione redox ratio and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs. *Free Radic. Biol. Med.* **21**:907-915; 1996.
341. Rose, R.C., Bode, A.M. Biology of free radical scavengers: An evaluation of ascorbate. *FASEB J.* **7**:1135-1142; 1993.
342. Rosenkranz, E.R., Buckberg, G.D. Myocardial protection during surgical coronary reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1**:1235-1246; 1983.
343. Rosenkranz, E.R, Okamoto, F., Buckberg, G.D., Robertson, J.M., Vinten-Johansen, J., Bugyi, H.I. Safety of prolonged aortic clamping with blood cardioplegia. III. Aspartate enrichment of glutamate-blood cardioplegia in energy-depleted hearts after ischemic and reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **91**:428-435; 1986.
344. Rosenkranz, E.R. Substrate enhancement of cardioplegic solution: Experimental studies and clinical evaluation. *Ann. Thorac. Surg.* **60**:797-800; 1995.
345. Roth, E., Matos, G., Guarnieri, C., Papp, B., Varga, J. Influence of the beta-blocker therapy on neutrophil superoxide generation and platelet aggregation in experimental myocardial ischemia and reflow. *Acta Physiol. Hungarica* **83**:163-170; 1995.

346. Rousou, J.A., Engelman, R.M., Anisimowicz, L., Lemeshow, S., Dobbs, W.A., Breyer, R.H., Das, D.K. Metabolic enhancement of myocardial preservation during cardioplegic arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **91**:270-276; 1986.
- 346a. Rousou, J.H., Dobbs, W.A., Meeran, M.K., Engelman, R.M. The temperature dependence of recovery of metabolic function following hypothermic potassium cardioplegic arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **83**:117-121; 1982.
347. Rowe, G.T., Manson, N.H., Caplan, M., Hess, M.L. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leucocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum: Participation of the cyclooxygenase pathway. *Circulation Res.* **53**:584-591; 1983.
348. Rowland, R.T., Cleveland, J.C. Jr., Meng, X., Harken, A.H., Brown, J.M. Potential gene therapy strategies in the treatment of cardiovascular diseases. *Ann. Thorac. Surg.* **60**:721-728; 1995.
349. Rubanyi, G.M. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **4**:107-120; 1988.
350. Rubanyi, G.M., Ho, E.H., Cantor, E.H., Lumma, W.C., Parker Botelho, L.H. Cytoprotective function of nitric oxide: Inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **181**:1392-1397; 1991.
351. Rubbo, H., Darley-Usmar, V., Freeman, B.A. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem. Res. Toxicol.* **9**:809-820; 1996.
352. Russell, J., Spickett, C.M., Reglinski, J., Smith, W.E., McMurry, J., Abdullah, I.B. Alteration of the erythrocyte glutathione redox balance by N-acetylcysteine, captopril and the exogenous glutathione. *FEBS Letters* **347**:215-220; 1994.
353. Ruuge, E.K., Ledenev, A.N., Lakomkin, V.L., Konstantinov, A.A., Ksenzenko, M.Y. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.* **261**:81-86; 1991.
354. Saeki, A., Recchia, F.A., Senzaki, H., Kass, D.A. Minimal role of nitric oxide in basal coronary flow regulation and cardiac energetics of blood-perfused isolated canine heart. *J. Physiol.* **491**:455-463; 1996.
355. Sala, R., Moriggi, E., Corvasce, G., Morelli, D. Protection by N-acetylcysteine against pulmonary endothelial cell damage induced by oxidant injury. *Eur. Respir. J.* **6**:440-446; 1993.

356. Samaha, F.F., Heineman, F.W., Ince, C., Fleming, J., Balaban, R.S. ATP-sensitive potassium channel is essential to maintain basal coronary vascular tone in vivo. *Am. J. Physiol.* **262**:C1220-C1227; 1992.
357. Sargent, C.A., Sleph, P.G., Dzwonczyk, S., Smith, M.A., Normandin, D., Antonaccio, M.J., Grover, G.J. Cardioprotection in ischemic rat hearts with the SH-containing angiotensin-converting enzyme inhibitor zofenopril: Possible involvement of the ATP-sensitive potassium channel. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **265**:609-617; 1993.
358. Sawatari, K. J Kadoba, K.; Bergner, K.A.; Mayer, J.E. Influence of initial reperfusion pressure. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **101**:777-782; 1991.
359. Schaefer, S., Prussel, E., Carr, L.J. Requirement of glycolytic substrate for metabolic recovery during moderate low flow ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**:2167-2176; 1995.
360. Schrammel, A., Behrends, S., Schmidt, K., Koesling, D., Mayer, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Molec. Pharmacol.* **50**:1-5; 1996.
361. Schulz, R., Wambolt, R. Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **30**:432-439; 1995.
362. Seccombe, J.F., Schaff, H.V. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. *Ann. Thorac. Surg.* **60**:778-788; 1995.
363. Segel, L.D., Folette, D.M., Contino, J.P., Iguidbashian, J.P., Castellanos, L.M., Berkoff, H.A. Importance of substrate enhancement for long term heart preservation. *J. Heart Lung Transplant* **12**:613-623; 1993.
364. Sellin, L.C., McArdle, J.J. Multiple effects of 2,3-butanedione monoxime. *Pharmacol. Toxicol.* **74**:305-313; 1994.
365. Shekher, A., Singh, M. Role of eicosanoid inhibition in ischemia reperfusion injury: Intact and isolated rat heart studies. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **19**:223-229; 1997.
366. Shug, A.L., Madsen, D.C. Protection of the ischemic rat heart by procysteine and amino acids. *J. Nutr. Biochem.* **5**:356-359; 1994.
367. Shug, A.L., Madsen, D., Dobbie, R., Paulson, D.J. Protection of mitochondrial and heart function by amino acids after ischemia and cardioplegia. *Life Sci.*

- 54:567-577; 1994.
368. Siegmund, B., Klietz, T., Schwartz, P., Piper, H.M. Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **260**:H426-H435; 1991.
 369. Sies, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**:213-219; 1993.
 370. Singal, P.K., Beamish, R.E., Dhalla, N.S. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **161**:391-401; 1983.
 371. Singh, A., Lee, K.J., Lee, C.Y., Goldfarb, R.D., Tsan, M-F. Relation between myocardial glutathione content and extent of ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **80**:1795-1804; 1989.
 372. Skjelbakken, T., Valen, G., Vaage, J. Perfusing isolated rat hearts with hydrogen peroxide: An experimental model of cardiac dysfunction caused by reactive oxygen species. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **56**:431-439; 1996.
 373. Smith, L.C., Eisensmith, R.C., Woo, S.L. Gene therapy in heart disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **369**:79-88; 1995.
 374. Smith, M.P., Humphrey, S.J., Kerr, S.W., Mathews, W.R. In vitro vasorelaxant and in vivo cardiovascular effects of S-nitrosothiols: Comparison to and cross tolerance with standard nitrovasodilators. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **16**:323-335; 1994.
 375. Snaith, C.D., Wright, G., Lofkin, M. The effects of aspartate and 2-oxoglutarate upon glycolytic energy metabolites and mechanical recovery following global ischaemia in isolated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **24**:305-315; 1992.
 376. Sochman, J., Kolc, J., Vrana, M., Fabian, J. Cardioprotective effects of N-acetylcysteine: The reduction in the extent of infarction and occurrence of reperfusion arrhythmias in the dog. *Int. J. Cardiol.* **28**:191-196; 1990.
 377. Sochman, J., Peregrin, J.H. Total recovery of left ventricular function after acute myocardial infarction: Comprehensive therapy with streptokinase, N-acetylcysteine and percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Int. J. Cardiol.* **35**:116-118; 1992.
 378. Sochman, J., Vrbska, J., Musilova, B., Rocek, M. Infarct size limitation: Acute N-acetylcysteine defense (ISLAND) trial. Start of the study. *Int. J.*

- Cardiol. **49**:181-182; 1995.
379. Southard, J.H., Belzer, F.O. Organ preservation. *Annu. Rev. Med.* **46**:235-247; 1995.
380. Stacpoole, P.W. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* **38**:1124-1144; 1989.
381. Statistics Canada. Heart disease and stroke in Canada. Ottawa, June 1997.
382. Ste-Marie, L., Boismenu, D., Vachon, L., Montgomery, J. Evaluation of sodium 4-hydroxybenzoate as an hydroxyl radical trap using gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Biochem.* **241**: 67-74; 1996.
383. Steeves, G., Singh, N., Singal, P.K. Preconditioning and antioxidant defense against reperfusion injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **723**:116-127; 1994.
384. Stein, D.G., Drinkwater, D.C., Laks, H., Permut, L.C., Sangwan, S., Chait, H.I., Child, J.S., Bhuta, S. Cardiac preservation in patients undergoing transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **102**:657-665; 1991.
385. Stephens, N. Anti-oxidant therapy for ischaemic heart disease: Where do we stand? *Lancet* **349**:1710-1711; 1997.
386. Stewart, J.R., Frist, W.H., Merrill, W.H. Oxygen scavengers in myocardial preservation during transplantation. *Methods in Enzymology* **186**:742-748; 1990.
387. Stringham, J.C., Paulsen, K.L., Southard, J.H., Fields, B.L., Belzer, F.O. Improved myocardial ischemic tolerance by contractile inhibition with 2,3-butanedione monoxime. *Ann. Thorac. Surg.* **54**:852-860; 1992.
388. Stringham, J.C., Paulsen, K.L., Southard, J.H., Mentzer, R.M., Belzer, F.O. Prolonging myocardial preservation with a modified University of Wisconsin solution containing 2,3-butanedione monoxime and calcium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **107**:764-775; 1994.
389. Sultan, I., Sunamori, M., Suzuki, A. Heart preservation: Analysis of cardioprotective infusate characteristics. Membrane stabilization, calcium antagonism, and protease inhibition on myocardial viability: A biochemical, ultrastructural, functional study. *J. Heart Lung Transpl.* **11**:607-618; 1992.
390. Suzuki, Y.J., Edmondson, J.D., Ford, G.D. Inactivation of rabbit muscle

- creatine kinase by hydrogen peroxide. *Free Radic. Res. Com.* **16**:131-136; 1992.
391. Svedjeholm, R., Ekroth, R., Joachimsson, P.O., Ronquist, G., Svensson, S., Tyden, H. Myocardial uptake of amino acids and other substrates in relation to myocardial oxygen consumption four hours after cardiac operations. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **101**:688-694; 1991.
392. Svedjeholm, R., Hakanson, E., Vanhanen, I. Rationale for metabolic support with amino acids and glucose-insulin-potassium (GIK) in cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.* **59**:S15-22; 1995.
393. Swanson, D.K., Myerowitz, P.D., Watson, K., Banaszak, S.A., Lasser, T.A. Effect of reperfusion temperature and pressure on the functional and metabolic recovery of preserved hearts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **86**:242-251; 1983.
394. Taegtmeyer, H., Goodwin, G.W., Doenst, T., Frazier, O.H. Substrate metabolism as a determinant for postischemic functional recovery of the heart. *Am. J. Cardiol.* **80**:3A-10A; 1997.
395. Takahashi, A., Braimbridge, M.V., Hearse, D.J., Chambers, D.J. Long-term preservation of the mammalian myocardium. Effect of storage medium and temperature on the vulnerability to tissue injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **102**:235-245; 1991.
396. Takayanagi, R., Takeshige, K., Minakami, S. NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particules. *Biochem. J.* **192**:853-860; 1980.
397. Takemura, G., Onodera, T., Ashraf, M. Quantification of hydroxyl radical and its lack of relevance to myocardial injury during early reperfusion after graded ischemia in rat heart. *Circulation Res.* **71**:96-105; 1992.
398. Takemura, G., Onodera, T., Millard, R.W., Ashraf, M. Demonstration of hydroxyl radical and its role in hydrogen peroxide-induced myocardial injury: Hydroxyl radical dependent and independent mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **15**:13-25; 1993.
399. Takeo, S., Liu, J-X., Tanonaka, K., Nasa, Y., Yabe, K., Tanahashi, H., Sudo, H. Reperfusion at reduced flow rates enhances postischemic contractile recovery of perfused heart. *Am. J. Physiol.* **268**:H2384-H2395; 1995.
400. Takeuchi, K., McGowan, F.X., Danh, H-C., Glynn, P., Simplaceanu, E., del Nido, P.J. Direct detrimental effects of L-arginine upon ischemia-reperfusion injury to myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**:1405-1414; 1995.

401. Tang, L.D., Sun, J-Z. Wu, K., Sun, C-P. Tang, Z-M. Beneficial effects of N-acetylcysteine and cysteine in stunned myocardium in perfused rat heart. *Br. J. Pharmacol.* **102**:601-606; 1991.
402. Tanonaka, K., Kamiyama, T., Takezono, A., Sakai, K., Takeo, S. Beneficial effects of angiotensin I converting enzyme inhibitor on post-ischemic contractile function of perfused rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**:1659-1670; 1996.
403. Tardif, J-C., Côté, G., Lespérance, J., Bourassa, M., Lambert, J., Doucet, S., Bilodeau, L., Nattel, S., de Guise, P. Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *New Engl. J. Med.* **337**:365-372; 1997.
404. Taylor, A.L., Golino, P., Eckels, R., Pastor, P., Buja, L.M., Willerson, J.T. Differential enhancement of postischemic segmental systolic thickening by diltiazem. *J. Am. Coll. Cardiol.* **15**:737-747; 1990.
405. Teboul, J., Doustaly, C., Monnot, F., Sanchez, B., Popoff, G. Kreitmann, P. Protection et reperfusion du myocarde par cardioplégie au sang enrichie en aspartate et glutamate. Technique et résultats préliminaires. *Ann. Chir.* **44**:615-623; 1990.
406. Tesfamariam, B., Cohen, R.A. Role of superoxide anion and endothelium in vasoconstrictor action of prostaglandin endoperoxide. *Am. J. Physiol.* **262**:H1915-H1919; 1992.
407. Thaulow, E., Dale, J., Myhre, E. Effects of a selective thromboxane synthetase inhibitor, dazoxiben, and of acetylsalicylic acid on myocardial ischemia in patients with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* **53**:1255-1258; 1984.
408. Thoenes, M., Förstermann, U., Tracey, W.R., Bleese, N.M., Nüssler, A.K., Scholz, H., Stein, B. Expression of inducible nitric oxide synthase in failing and non-failing human heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**:165-169; 1996.
409. Thomassen, A.R. Myocardial uptake and effects of glutamate during non-ischaemic and ischaemic conditions. *Danish Med. Bulletin* **39**:471-488; 1992.
410. Thompson-Gorman, S.L., Zweier, J.L. Evaluation of the role of xanthine oxidase in the myocardial reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* **265**:6656-6663; 1990.
411. Tosaki, A, Bagchi, D., Pali, T., Cordis, G.A., Das, D.K. Comparisons of ESR and HPLC methods for the detection of ·OH radicals in ischemic/reperfused

- hearts. A relation between the genesis of free radicals and reperfusion arrhythmias. *Biochem. Pharmacol.* **45**:961-969; 1993.
412. Tosaki, A., Das, D.K. Cardiovascular controversies. Reperfusion induced arrhythmias are caused by generation of free radicals. *Cardiovasc. Res.* **28**:422; 1994.
413. Tosaki, A. DMPO and reperfusion injury: Arrhythmia, heart function, electron spin resonance, and nuclear magnetic resonance studies in isolated working guinea pig hearts. *Am. Heart J.* **120**:819-830; 1990.
414. Toshima, Y., Kohno, H., Matsuzaki, K., Mitani, A., Mayumi, H., Yasui, H., Tokunaga, K. Collin's solution for cold storage of the heart for transplantation must be reversed with cardioplegic solution before reperfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **104**:1572-1581; 1992.
415. Toshima, Y., Matsuzaki, K., Mitani, A., Kohno, H., Mayumi, H., Yasui, H., Tokunaga, K. The myocardial recovery mode after cold storage for transplantation with Collin's solution and cardioplegic solution. A functional and metabolic study in the rat heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **104**:1320-1328; 1992.
416. Tricarico, D., Conte Camerino, D. ATP-sensitive K⁺ channels of skeletal muscle fibers from young adult and aged rats: Possible involvement of thiol-dependent redox mechanisms in the age-related modifications of their biophysical and pharmacological properties. *Molec. Pharmacol.* **46**:754-761; 1994.
417. Tsao, P.S., Aoki, N., Lefer, D.J., Johnson, G., Lefer, A.M. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* **82**:1402-1412; 1990.
418. Tsunoda, R., Okumura, K., Ishizaka, H., Matsunaga, T., Tabuchi, T., Tayama, S., Yasue, H. Enhancement of myocardial reactive hyperemia with manganese-superoxide dismutase: Role of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc. Res.* **31**:537-545; 1995.
419. Urban, Th., Hurbain, I., Urban, M., Clément, A., Housset, B. Oxydants et antioxydants. Effets biologiques et perspectives thérapeutiques. *Ann. Chir.* **49**: 427-434; 1995.
420. Valen, G., Vaage J. The effect of exogenous adenosine on functional injury caused by hydrogen peroxide in the isolated rat heart. *Free Rad. Res.* **24**:31-38; 1996.

421. Vandenberg, J.I., Metcalfe, J.C., Grace, A.A. Mechanisms of pHi recovery after global ischemia in the perfused heart. *Circ. Res.* **72**:993-1003; 1993.
422. Vandeplassche, G., Thoné, F., Borgers, M. Cytochemical evidence of NADH-oxidase activity in the isolated working rabbit heart subjected to normothermic global ischemia. *Histochem. J.* **22**:11-17; 1990.
423. van der Vusse, G.J., Glatz, J.F.C., Stam, H.C.G., Reneman, R.S. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol. Rev.* **72**:881-940; 1992.
424. van Jaarsveld, H., Kuyl, J.M., Alberts, D.W., Wiid, M.N. Antioxidant supplementation partially protects against myocardial mitochondrial ischemia-reperfusion injury, but ascorbate in the perfusate prevented the beneficial effect. *Res. Comm. Molec. Pathol. Pharmacol.* **85**:33-44; 1994.
425. van Jaarsveld, H., Kuyl, J.M., Schulenburg, D.H., Wiid, N.M. Effect of flavanoids on the outcome of myocardial mitochondrial ischemia/reperfusion injury. *Res. Comm. Molec. Pathol. Pharmacol.* **91**:65-75; 1996.
426. Vanoverschelde, J-L., Depré, C., Wijns, W., Bol, A., Dion, R., Gerber, B., Borgers, M., Melin, J. Physiopathologie de l'hibernation myocardique chronique: Apports de la tomographie par émission de positrons. *Médecine/Sciences* **11**:1315-1322; 1995.
427. Vanoverschelde, J-L. J., Janier, M.F., Bakke, J.E., Marshall, D.R., Bergman, S.R. Rate of glycolysis during ischemia determines extent of ischemic injury and functional recovery after reperfusion. *Am. J. Physiol.* **267**:H1785-H1794; 1994.
428. Vercillo, A.P., Squier, R.C., Chawla, S., Houser, S., Hashmi, F., Becker, D.R. Procaine versus magnesium in cardioplegia solution. A prospective study. *Connecticut Medicine* **51**:74-76; 1987.
429. Villa, L.M., Salas, E., Darley-Usmar, V.M., Radomski, M.W., Moncada, S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12383-12387; 1994.
430. von Oppell, U.O., King, L.M., Du Toit, E.F., Owen, P., Reichart, B., Opie, L.H. Effect of pH shifts induced by oxygenating crystalloid cardioplegic solutions. *Ann. Thorac. Surg.* **52**:903-907; 1991.
431. von Oppell, U.O., Pfeiffer, S., Preiss, P., Dunne, T., Zilla, P., Reichart, B. Endothelial cell toxicity of solid-organ preservation solutions. *Ann. Thorac.*

- Surg. **50**:902-910; 1990.
432. Wahr, J.A., Olszanski, D., Childs, K.F., Bolling, S.F. Dichloroacetate enhanced myocardial functional recovery post-ischemia: ATP and NADH recovery. *J. Surg. Res.* **63**:220-224; 1996.
 433. Wajner, M., Harkness, R.A. Distribution of xanthine dehydrogenase and oxidase activities in human and rabbit tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **991**:79-84; 1989.
 434. Walker, M.J.A., Curtis, M.J., Hearse, D.J., Campbell, R.W.F., Janse, M.J., Yellon, D.M., Cobbe, S.M., Coker, S.J., Harness, J.B., Harron, D.W.G., Higgins, A.J., Julian, D.G., Lab, M.J., Manning, A.S., Northover, B.J., Parratt, J.R., Riemersma, R.A., Riva, E., Russell, D.C., Sheridan, D.J., Winslow, E., Woodward, B. The Lambeth Conventions: Guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **22**:447-455; 1988.
 435. Wang, P., Zweier, J.L. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. *J. Biol. Chem.* **271**:29223-29230; 1996.
 436. Wang, Q-D., Morcos, E., Wiklund, P., Pernow, J. L-arginine enhances functional recovery and Ca²⁺-dependent nitric oxide synthase activity after ischemia and reperfusion in the rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **29**: 291-296; 1997.
 437. Warner, T.D., Schmidt, H.H., Murad, F. Interactions of endothelins and EDRF in bovine native endothelial cells: Selective effects of endothelin-3. *Am. J. Physiol.* **262**:H1600-H1605; 1992.
 438. Watkins, M.W., Slinker, B.K., Goto, Y., LeWinter, M.M. 2,3-Butanedione monoxime increases contractile efficiency in the rabbit ventricle. *Am. J. Physiol.* **263**:H1811-H1818; 1992.
 439. Weik, R., Neumcke, B. ATP-sensitive potassium channels in adult mouse skeletal muscle: Characterization of the ATP-binding site. *J. Membrane Biol.* **110**:217-226; 1989.
 440. Weldner, P.W., Myers, J.L., Miller, C.A., Arenas, J.D., Waldhausen, J.A. Improved recovery of immature myocardium with L-glutamate blood cardioplegia. *Ann. Thorac. Surg.* **55**:102-105; 1993.
 441. Werns, S.W., Shea, M.J., Mitsos, S.E., Dysko, R.C., Fantone, J.C., Schork, M.A., Abrams, G.D., Pitt, B., Lucchesi, B.R. Reduction of the size of infarction

- by allopurinol in the ischemic-reperfused canine heart. *Circulation* **73**:518-524; 1986.
442. Weyrich, A.S., Ma, X-L., Lefer, A.M. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* **86**:279-288; 1992.
443. Wheeldon, D., Sharples, L., Wallwork, J., English, T. Donor heart preservation survey. *J. Heart Lung Transplant* **11**:986-993; 1992.
444. Wicomb, W.N., Collins, G.M. 24-Hours rabbit heart storage with UW solution. Effects of low-flow perfusion, colloid and shelf storage. *Transplantation* **48**:6-9; 1989.
445. Wiklund, L., Mantovani, V., Nilsson, B., Nilsson, F.N., Berggren, H.E. Temperature-dependent coronary reactivity after perfusion with University of Wisconsin solution in the isolated rat heart. *Transplantation* **57**:1314-1317; 1994.
446. William, M.W., Taft, C.S., Ramnauth, S., Z-Q., Zhao, Vinten-Johansen. Endogenous nitric oxide (NO) protects against ischaemia-reperfusion injury in the rabbit. *Cardiovasc. Res.* **30**:79-86; 1995.
447. Woodman, O.L., Pannangpeth, P. N-nitro-L-arginine and indomethacin do not affect endothelin-induced constriction of large and small coronary arteries in the anaesthetized greyhound. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23**:50-56; 1996.
448. Wu, M., Pritchard, K.A., Kaminski, P.M., Fayngersh, R.P., Hintze, T.H., Wolin, M.S. Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am. J. Physiol.* **266**:H2108-H2113; 1994.
449. Xia, Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Snyder, S.H., Zweier, J.L. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:6770-6774; 1996.
450. Xia, Y., Zweier, J.L. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. *J. Biol. Chem.* **270**:18797-18803; 1995.
451. Yamamoto, F., Manning, A.S., Braimbridge, M.V., Hearse, D.J. Cardioplegia and slow calcium-channel blockers. Studies with verapamil. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **86**:252-261; 1983.
452. Yamazaki, S.; Fujibayashi, Y.; Rajagopalan, R.E.; Meerbaum, S.; Corday, E. Effects of staged versus sudden reperfusion after acute coronary occlusion in

- the dog. *J. Am. Coll. Cardiol.* **7**:564-572; 1986.
453. Yang, B.C., Mehta, J.L. Inhibition of nitric oxide does not affect reperfusion-induced myocardial injury, but it prevents lipid peroxidation in the isolated rat heart. *Life Sciences* **61**:229-236; 1997.
 454. Yasmin, W., Strynadka, K.D., Schulz, R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc. Res.* **33**:422-432; 1997.
 455. Yau, T.M., Ikonomidis, J.S., Weisel, R.D., Mickle, D.A., Hayashida, N., Ivanov, J., Carson, S., Mohabeer, M.K., Tumati, L.C. Which techniques of cardioplegia prevent ischemia? *Ann. Thorac. Surg.* **56**:1020-1028; 1993.
 456. Yeh, T., Hanan, S.A., Johnson, D.E., Rebeyka, I.M., Abd-Elfattah, A.S., Lee, F., Wechsler, A.S. Superior myocardial preservation with modified UW solution after prolonged ischemia in the rat heart. *Ann. Thorac. Surg.* **49**:932-939; 1990.
 457. Yellon, D.M., Jennings, R.B., eds. *Myocardial protection. The pathophysiology of reperfusion injury.* New York: Raven Press; 1992.
 458. Yokoyama, H., Lingle, D.M., Crestanello, J.A., Kamelgard, J., Kott, B.R., Momeni, R., Millili, J., Mortensen, S.A., Whitman, G.J. Coenzyme Q₁₀ protects coronary endothelial function from ischemia reperfusion injury via an antioxidant effect. *Surgery* **120**:189-196; 1996.
 459. Zhai, X., Ashraf, M. Direct detection and quantification of singlet oxygen during ischemia and reperfusion in the rat hearts. *Am. J. Physiol.* **269**:H1229-H1236; 1995.
 460. Zughaib, M.E., Tang, X-L., Sun, J-Z., Bolli, R. Myocardial reperfusion injury: Fact or myth? A 1993 appraisal of a seemingly endless controversy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **723**:218-228; 1993.
 461. Zweier, J.L., Broderick, R., Kuppusamy, P., Gorman-Thompson, S., Luty, G.A. Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J. Biol. Chem.* **269**:24156-24162; 1994.
 462. Zweier, J.L., Flaherty, J.T., Weisfeldt, M.L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:1404-1407; 1987.
 463. Zweier, J.L., Jacobus, W.E. Substrate-induced alterations of high energy

phosphate metabolism and contractile function in the perfused heart. *J. Biol. Chem.* **262**:8015-8021; 1987.

464. Zweier, J.L., Kuppusamy, P., Lutty, G.A. Measurement of endothelial cell free radical generation: Evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:4046-4050; 1988.
 465. Zweier, J.L., Kuppusamy, P., Williams, R., Rayburn, B.K., Smith, D., Weisfeldt, M.L., Flaherty, J.T. Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J. Biol. Chem.* **264**:18890-18895; 1989.
 466. Zweier, J.L., Wang, P., Kuppusamy, P. Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **270**:304-307; 1995.
-