

# Il preconditionamento cardiaco

*Autore: Alberto Lomuscio*

## RIASSUNTO

Il preconditionamento è un fenomeno recentemente descritto, che consiste nel riassetto miocardico durante brevi episodi ischemia, che determinano la autodifesa del miocardio stesso contro successivi episodi ischemia, anche se prolungati. Il preconditionamento è stato studiato a fondo, ma non è ancora emersa una spiegazione convincente. E' evidente che non si tratta di un fenomeno di "stunning", in quanto il miocardio "intontito" presenta un consumo di ossigeno più elevato del miocardio normale; d'altro canto, lo stunning richiede più tempo del preconditionamento per instaurarsi. Una teoria è basata sulla sintesi di "proteine da stress", che proteggerebbero il miocardio dagli insulti ischemici. Un'altra sottolinea il ruolo dei radicali liberi e dei loro antagonisti (i cosiddetti "scavengers"). Una terza teoria si basa invece sul ruolo dei canali del potassio ATP-dipendenti. Infine, l'adenosina è cresciuta nella considerazione riguardo questo argomento, per la sua capacità di proteggere il miocardio a causa della sua azione vasodilatante sulle coronarie e alla sua capacità di inibire le richieste miocardiche di ossigeno per i suoi effetti dromotropo, cronotropo ed inotropo negativi. Comunque, sono necessari ulteriori studi per valutare se questi risultati preliminari di laboratorio siano applicabili anche all'uomo.

## GENERALITÀ

Con il termine di preconditionamento si intende un fenomeno grazie al quale il tessuto miocardico, in seguito a ripetuti e brevi episodi ischemici, è in grado di sviluppare una serie di processi di adattamento che lo proteggono nei confronti di successivi insulti ischemici, anche se prolungati. Il grande maestro Ippocrate già 2400 anni fa asseriva che la malattia, oltre a causare un danno agli organi, spinge l'organismo a lottare per ristabilire quell'equilibrio che si era spezzato. Anche l'antica medicina tradizionale cinese, pur se su basi anatomiche, fisiologiche e patologiche completamente diverse, considera la malattia come la perdita dell'equilibrio energetico ottimale che si crea all'interno del "microcosmo uomo". Il fine ultimo di entrambe è comunque ricreare l'armonia, l'omeostasi, nonostante si parta da presupposti antitetici e il concetto di energia della medicina occidentale non coincida con quello della medicina orientale. Quindi, in definitiva, ricreare l'equilibrio significa mettere in moto meccanismi di adattamento sia locale che generale, in grado di ripristinare la funzione che è stata persa, ma a un livello "diverso", con modificazioni sia anatomiche che strutturali che possono interessare l'organo o il tessuto direttamente colpito dalla noxa patogena. Ed è proprio questo il significato della "sindrome generale di adattamento" formulata all'inizio degli Anni Cinquanta da Hans Selye. Queste sindromi, che si manifestano con modificazioni non specifiche, si sviluppano in tre stadi:

- A) Reazione di allarme**
- B) Stadio della resistenza**
- C) Stadio dell'esaurimento.**

I primi due stadi sono caratterizzati dalla reversibilità del danno. Anche nel terzo stadio, se non c'è l'esaurimento della cosiddetta "energia di adattamento" vi può essere reversibilità dell'alterazione. L'esaurimento dell'adattabilità locale blocca l'attività del tessuto e dell'organo fino a quando l'energia lo cale non venga ripristinata attingendo ad altri depositi del corpo. E' ciò che accade nel miocardio stordito dopo infarto miocardico acuto (IMA) o nel miocardio ibernato in condizioni di ischemia "cronica", in cui la ridotta perfusione conseguente nel secondo caso alle stenosi ingravescenti che colpiscono l'albero coronarico, costringono il miocardio a entrare in uno stato metabolico "inferiore", dove le ridotte offerte energetiche sia di ossigeno che di substrati, vengono utilizzate per mantenere le funzioni vitali delle cellule (integrità di membrana, equilibrio ionico), a spese di quella contrattile. Il miocardio è dunque costretto a "scendere a

patti" con una realtà diversa, pena: la necrosi cellulare. Un intervento di rivascolarizzazione può di nuovo modificare il rapporto tra la perfusione e il fabbisogno energetico a vantaggio di una maggiore disponibilità di substrati energetici ed il miglioramento della contrattilità. Allo stesso modo, nel miocardio stordito dopo IMA, l'alterata cinesi di parete non è causata dalla morte cellulare, ma dall'intontimento cui le cellule sono sottoposte a causa dell'insulto ischemico. In questo caso, la ripresa della contrattilità avviene in maniera assolutamente spontanea dopo ripristino della perfusione ed eliminazione dei vari meccanismi di adattamento, come l'acidosi che, riducendo il pH e le reazioni di ossido-riduzione e di fosforilazione ossidativa e aumentando le concentrazioni di calcio intracellulare e intramitocondriale, protegge il miocardio a spese della contrattilità.

Anche il preconditionamento ischemico deve dunque essere considerato in questa ottica, vale a dire come semplice meccanismo di adattamento del cuore a una diversa situazione. Fino a pochi anni fa si credeva che ripetuti episodi ischemici dessero luogo a un accumulo degli effetti negativi di ogni singolo episodio e che il risultato finale fosse comunque la necrosi cellulare, il danno irreversibile. Ma questo non sempre corrisponde a realtà. Il miocardio infatti, dopo un episodio ischemico è in grado di sviluppare diversi meccanismi di adattamento con funzioni protettive nei confronti degli episodi successivi. Questo comportamento autoprotettivo del miocardio è stato definito nel 1986 da Murry e Coll. (1-3) "preconditionamento. Va però ricordato il fenomeno del preconditionamento ischemico è stato osservato anche in altri organi quali cervello e muscolo scheletrico.

## **GLI STUDI E LE OSSERVAZIONI SPERIMENTALI**

Già negli Anni Settanta Meerson aveva a lungo studiato gli effetti dell'adattamento del cuore al sovraccarico di lavoro e all'ipossia, giungendo alla conclusione che l'adattamento all'ipossia cronica riduceva il danno contrattile, l'estensione dell'IMA e la mortalità negli animali da esperimento. Inoltre, egli aveva individuato due sostanze naturali: l'acido gamma-amino-butyrico e gli anti-ossidanti naturali come importanti fattori di protezione contro il danno ischemico e la disfunzione contrattile. Questi risultati furono ulteriormente confermati negli Anni Ottanta da ricercatori del gruppo di Reimer e Jennings (4-6), i quali si occuparono maggiormente dell'aspetto metabolico ed energetico della cellula miocardica, cercando di separare gli effetti causati dall'accumulo di metaboliti che si ha durante l'ischemia (lattato, idrogenioni), da quelli causati dalla riduzione dei substrati cellulari altamente energetici quali ATP e creatinfosfochinasi, che si osservano durante queste fasi critiche. Furono dunque allestiti esperimenti nel cane, che paragonassero da un lato gli effetti causati da molteplici ma brevi episodi ischemici seguiti da riperfusione e dall'altro da quelli causati da un singolo episodio ischemico comparabile in termini di lunghezza con la somma dei singoli episodi provocati nel primo gruppo di esperimenti. Si notò invece che negli esperimenti di ischemia - riperfusione intermittente del primo gruppo i livelli di ATP erano costanti e invariati. A ciò si aggiungono gli studi di Murry (1), che nel 1986 inducendo sempre nel cane brevi episodi ischemici seguiti da riperfusione, notava la riduzione di almeno il 25% dell'area di necrosi rispetto al gruppo di controllo.

Il fenomeno del preconditionamento può essere dunque indotto con brevissimi episodi ischemici della durata oscillante tra i 90" e i 5', e può proteggere il miocardio per circa due ore dai danni di un nuovo episodio ischemico della durata non superiore ai 60', che può insorgere a partire dal momento in cui il cuore attua i vari meccanismi di autoprotezione.

Altri Autori hanno dimostrato che il preconditionamento può essere ottenuto sottoponendo le cellule miocardiche a circa 5 episodi ischemici della durata di 5' ciascuno, seguiti da 5' di riperfusione, oppure con singoli episodi della durata compresa tra i 5' e i 15', seguiti da riperfusione. In seguito si è notato, sempre nel cane, che mentre un singolo episodio della durata non superiore ai 60' forniva al miocardio un alto potere protettivo, un episodio ischemico della durata di 90', riduceva progressivamente questa protezione. Quindi, in definitiva, il fenomeno del preconditionamento non dà una protezione assoluta, ma prolunga il tempo necessario per avere un danno cellulare irreversibile. E' ancora in aperta discussione l'ipotesi che il fenomeno del preconditionamento sia in qualche modo legato a quello dello stunning, nonostante Murry, Miura e Jennings (7-10) ritengano che lo stunning da solo non sia meccanismo necessario e sufficiente per il preconditionamento ischemico, e che i meccanismi molecolari e biochimici siano diversi da quelli che interessano lo stordimento miocardico. E' stato poi anche ribadito che il preconditionamento non avviene

solo nell'animale in toto, dove può essere anche accettabile l'ipotesi che intervenga il circolo collaterale coronarico a sopperire al deficit ematico o altre influenze di natura neuroendocrina, ma anche nel cuore isolato sottoposto a ischemia globale o regionale. Il preconditionamento è dunque proprietà intrinseca del miocardio. Si è anche dimostrato negli organi isolati che brevi episodi ischemici seguiti da riperfusione sono in grado di ridurre le aritmie da riperfusione e che il fenomeno non è prerogativa di una singola specie, ma può essere indotto in quasi tutti i mammiferi. L'effetto protettivo è infatti stato studiato anche nel maiale, nel coniglio e nel ratto e il fenomeno si verificava in condizioni diverse, a seconda della specie presa in esame. Nel cane, nel gatto e nel coniglio sono infatti sufficienti occlusioni di soli 5'. E' per questo motivo che attualmente esistono diverse definizioni del fenomeno, in quanto distinte in base agli effetti notati e ai modelli sperimentali allestiti, utilizzati proprio per evitare confusione e fraintendimenti, nonostante i diversi protocolli usati e la scarsità di studi comparati tra le specie animali. Milazzotto e Coll. propongono la seguente classificazione:

- 5) Episodi sub-letali di ischemia seguiti da aumento della tolleranza del miocardio a ischemie successive, potenzialmente letali. Ciò è stato osservato nei cani, maiali, conigli e indirettamente anche nell'uomo. Le cellule miocardiche presentano un metabolismo ischemico più lento con insorgenza ritardata del danno irreversibile.
- 6) Nel topo è stata osservata una ridotta incidenza di aritmie da riperfusione dopo un episodio ischemico che seguiva episodi subletali.
- 7) In cuori isolati sono stati osservati recuperi della disfunzione contrattile sempre dopo episodi subletali di ischemia.
- 8) Nei cani è stata invece registrata, sempre dopo episodi subletali di ischemia, una migliore conservazione dei nervi cardiaci.

Nei conigli un'occlusione renale seguita da riperfusione sembra sia in grado di ridurre l'area infartuata e l'effetto protettivo del preconditionamento è presente solo per circa 30' dopo l'insorgenza del fenomeno stesso.

Interessanti poi le osservazioni di Yang e Coll. (11) in uno studio effettuato nel coniglio in cui l'effetto protettivo del preconditionamento è stato ripristinato di nuovo dopo due ore dalla sua scomparsa. L'ipotesi che è stata avanzata in proposito è quella di un mediatore, non comunque di origine ematica, che si esaurisce e la ricomparsa del fenomeno sarebbe da attribuire alla nuova sintesi di questo mediatore.

Esistono poi osservazioni che non solo le tecniche di ischemia con occlusione meccanica delle coronarie di indurre il fenomeno del preconditionamento, il quale può essere indotto anche dall'ipossia, dal pacing ventricolare, dall'attivazione dei recettori A1 per l'adenosina, dai facilitatori dei canali del potassio, nonostante sia stato rilevato che il meccanismo protettivo così autoindotto possa differire da quello conseguente ad ischemia.

E' possibile inoltre ottenere un preconditionamento di tipo farmacologico, grazie alla somministrazione di sostanze prima dell'episodio ischemico. Queste sostanze, quali l'adenosina, gli agonisti dei recettori muscarinici e l'isoprenalina, potrebbero agire attivando la proteina G e un fattore endocellulare ancora ignoto che sarebbe responsabile del fenomeno. Ma ciò che è davvero importante nello studio del fenomeno del preconditionamento è cercare di capire quali siano i meccanismi molecolari, biochimici e metabolici alla base dello stesso, in quanto questo rappresenta il primo passo verso la terapia, la ricerca di farmaci adatti a proteggere maggiormente la cellula miocardica dagli effetti irreversibili cui gli episodi ischemici possono sottoporla, influenzando positivamente sul metabolismo cellulare. Inoltre, la comprensione dei meccanismi del preconditionamento potrebbe essere estremamente utile per ridurre l'area infartuata nei pazienti ad alto rischio, inducendo un preconditionamento metabolico come quello causato per esempio dalla L-Carnitina, che aumentando i depositi di glicogeno cellulare, aumenterebbe anche il substrato essenziale nelle prime fasi dell'ischemia, in cui il metabolismo aerobico viene sostituito da quello anaerobico e permetterebbe la produzione di energia senza il consumo di ossigeno. Il miocardio arricchito di glicogeno è dunque in grado di affrontare meglio situazioni di stress, come un attacco ischemico acuto. Questo inoltre può spiegare gli effetti positivi della L-Carnitina osservati in pazienti con malattia aterosclerotica coronarica, sottoposti a pacing atriale e in quelli con shock cardiogeno.

## **ATTUALI TEORIE ALLA BASE DEL PRECONDIZIONAMENTO**

Indubbiamente sono molte le teorie avanzate negli ultimi anni per tentare di spiegare il fenomeno del preconditionamento.

Sono stati molti i tentativi di correlare il fenomeno del preconditionamento con quello dello stunning, ma i risultati non sono stati comunque positivi, e del resto tutto è ancora in aperta discussione. L'osservazione che il miocardio stordito presentasse dopo episodio di ischemia-riperfusionem un'alterazione di cinesi di parete, ha fatto supporre che la riduzione della contrattilità fosse responsabile di una ridotta spesa energetica nel momento in cui il miocardio fosse sottoposto a un nuovo episodio ischemico. In definitiva, il fenomeno dello stordimento preparava il miocardio a "sopportare" un nuovo episodio ischemico. Ciò non è assolutamente vero. Studi biochimici hanno infatti dimostrato che il miocardio "intontito" presenta un consumo di ossigeno uguale a quello del miocardio sano, se non addirittura superiore, e che il periodo di ischemia necessario per avere uno stunning è maggiore di quello necessario per indurre il fenomeno del preconditionamento. Lo stunning non è quindi un requisito necessario e sufficiente per ottenere il fenomeno del preconditionamento.

Alcuni Autori hanno studiato le alterazioni dei fosfati altamente energetici durante brevi ischemie in cuori di ratto e di coniglio seguite da riperfusionem. Utilizzando la spettroscopia RNM è stato poi osservato, durante cicli di ischemia-riperfusionem, un aumento reversibile del fosfato inorganico e una diminuzione della fosfocreatina, con variazioni minime dei livelli di ATP.

Il meccanismo alternativo proposto per spiegare la conservazione dei fosfati altamente energetici durante ischemia in cuori già preconditionati, coinvolge l'azione di una proteina ad azione inibente l'ATPasi mitocondriale, la quale durante ischemia, normalmente, determina un notevole aumento del consumo di energia.

Questa proteina inibitrice l'azione dell'ATPasi mitocondriale è attivata dall'acidosi citoplasmatica che si instaura nelle prime fasi dell'ischemia e che legandosi all'ATPasi mitocondriale riduce il consumo di ATP. Si è dunque ipotizzato che il preconditionamento, determinando l'attivazione della proteina inibitrice, presente solo in alcuni animali a bassa frequenza cardiaca, quali il coniglio, il cane, il maiale e l'uomo, ridurrebbe la spesa energetica del miocardio durante l'insulto ischemico successivo. Ma purtroppo contro questa ipotesi sta il fatto che il preconditionamento avviene anche in altre specie animali come il ratto, che non presenta nelle proprie cellule cardiache questo inibitore. L'inibizione dell'ATPasi mitocondriale e la ridotta utilizzazione dell'ATP si associano a una riduzione delle riserve di glicogeno e della glicolisi anaerobia.

## **LA SINTESI DI "STRESS PROTEINS" CARDIOPROTETTIVE**

Secondo questa teoria, alla base del meccanismo cardioprotettivo vi sarebbe la sintesi di proteine da stress. Queste verrebbero sintetizzate dalle cellule miocardiche di varie specie animali in risposta a diversi stimoli come l'aumento della temperatura corporea, episodi ischemia o un aumento del post-carico.

Queste proteine, che in alcune specie (ratto e coniglio) hanno un effetto anti-ischemico, aumenterebbero le difese del miocardio contro il successivo episodio ischemico. Tuttavia, anche per questa ipotesi ci sono alcuni risultati contrastanti. Thornton e Coll. (12-14) hanno dimostrato che trattando gli animali sottoposti a questi studi con agenti in grado di inibire la trascrizione e la traduzione del DNA e dell'RNA non si ha l'abolizione del fenomeno del preconditionamento. A questo si deve poi aggiungere che è difficile pensare che la sintesi delle stress-proteins possa avvenire nel giro dei pochi minuti durante il ciclo ischemia riperfusionem.

Infatti, Thornton e Coll., utilizzando un bloccante della sintesi proteica, hanno concluso che la protezione non dipende direttamente dalla sintesi di una proteina. Bisogna però sottolineare anche il fatto che questi Autori non hanno impiegato sostanze in grado di bloccare completamente la sintesi proteica. Al contrario, altri gruppi di ricercatori sostengono che la sintesi delle proteine da stress abbia un ruolo estremamente importante, e che si possa supporre addirittura la sintesi di proteine ad attività anti-ossidante da geni inespresi come la MN superossido dismutasi, la catalasi e la glutatione-perossidasi.

## **IL RUOLO DEI RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO**

Non è ancora chiaro il loro ruolo nel fenomeno del preconditionamento. Si sa che la somministrazione di

"scavengers" dei radicali liberi dell'ossigeno determina una riduzione dell'effetto protettivo nel 50% dei casi, quindi, contrariamente a quanto accade nelle fasi iniziali della riperfusione, dove la produzione dei radicali liberi dell'ossigeno esercita un effetto deleterio sulle membrane delle cellule miocardiche ischemiche, paradossalmente nel preconditionamento i radicali liberi avrebbero un effetto estremamente positivo. E' stato anche supposto, ma senza conferma, che il preconditionamento possa stimolare l'attività degli scavengers superossido-dismutasi e glutatione-perossidasi, aumentando così i meccanismi di difesa contro i danni diretti provocati dai radicali liberi dell'ossigeno.

## **L'ATTIVAZIONE DEI CANALI DEL POTASSIO ATP-DIPENDENTE**

Un'altra teoria che però dai risultati sperimentali ottenuti è solo ipotetica, in quanto valida solo in alcune specie animali ma non in altre, è quella dell'attivazione dei canali del potassio ATP-dipendenti, che aumenta in condizioni di ipossia, e di riduzione dei contenuti di ATP. L'attivazione di questi canali potrebbe, secondo Noma, essere responsabile dell'accorciamento del potenziale d'azione che si accompagna all'ischemia. La fuoriuscita dello ione potassio induce iperpolarizzazione delle membrane cellulari con riduzione dell'entrata dello ione calcio che previene a sua volta l'ipercontrazione e il consumo di ATP. Lo studio di agonisti specifici dei canali del potassio ha dimostrato in cuori isolati di ratto e di altre specie, un netto recupero post-ischemico. L'uso di agonisti dei canali del potassio ha invece dimostrato una riduzione degli effetti positivi.

## **L'ADENOSINA**

L'adenosina sta assumendo un ruolo di grande rilievo nello studio del preconditionamento, in quanto potrebbe essere uno dei più importanti mediatori, se non addirittura l'unico, responsabile del fenomeno, o al limite il "trait d'union" di molte delle ipotesi sopra elencate.

L'adenosina è un nucleotide formato da una base purinica e da ribosio, presente sia nelle cellule miocardiche che in quelle dell'endotelio vascolare coronarico, le quali sono in grado di produrla e metabolizzarla. Tuttavia, l'adenosina cardiaca prodotta in condizioni di ipossia o di acidosi proviene generalmente dalle cellule miocardiche, mentre le cellule endoteliali sono in grado di rimuovere l'adenosina dalla circolazione. Gli effetti fisiologici già conosciuti nel 1929 da Drury e Szent-Gyorgyi, sono correlati attraverso l'interazione con specifici recettori purinergici, distinti in base all'effetto sull'enzima adenilato ciclasi in A1 (inibitori) e A2 (stimolatori). I recettori A1, localizzati sulle membrane cellulari dei miociti, regolano le richieste di energia, mentre i recettori A2, localizzati sulle membrane delle cellule endoteliali e muscolari lisce, regolano l'apporto di ossigeno.

E' noto che l'adenosina rilasciata dai miociti in condizioni di vari stress, ha una importante azione di regolazione locale, in grado di modulare, attraverso diversi meccanismi, la funzione della cellula. L'infusione di agonisti del recettore A1 dell'adenosina, sia in preparati in vivo che in vitro, esercita un effetto protettivo simile a quello osservato nel fenomeno del preconditionamento. Liu e Coll. (15-18) hanno dimostrato che il fenomeno è abolito qualora vengano somministrati antagonisti del recettore A1, tipicamente localizzato sul sarcolemma. Altri Autori hanno suggerito l'ipotesi che il recettore A1 agisca sulla subunità inibitoria della proteina G. L'inibizione della proteina G mediante la tossina della pertosse attenua infatti la protezione mediata dal preconditionamento. Inoltre, l'attivazione del recettore A1 determina importanti effetti metabolici, come un aumento della glicolisi anaerobia e la riduzione del rilascio di catecolamine e del consumo di ATP. Essa, inoltre, sempre mediante un'interazione con la proteina G, potrebbe essere responsabile dell'attivazione dei canali del potassio. In conclusione, l'adenosina liberata dal cuore in condizioni di ischemia sembrerebbe esercitare un effetto globale di protezione miocardica. Da una parte essa aumenterebbe la disponibilità di ossigeno mediante vasodilatazione coronarica, dall'altra ne ridurrebbe il consumo grazie agli effetti dromotropi, inotropi e cronotropi negativi. E' noto che essa inibisce l'aumento del consumo di ossigeno causato dalla stimolazione simpatica, migliora la glicolisi e potrebbe contribuire anche a limitare il danno vascolare in corso di ischemia agendo sulla produzione dell'anione superossido da parte dei leucociti attivati.

Sono però necessari ulteriori studi che dimostrino questa efficacia anche nell'uomo, affinché dalle fasi sperimentali di laboratorio si possa passare all'uso clinico dell'adenosina nella protezione del miocardio

ischemico, ma non solo, visto il suo recente impiego clinico anche per la conversione farmacologica di TPSV. Inoltre, come sopra già accennato, la conoscenza dei meccanismi biochimici alla base del precondizionamento, potrebbe facilitare l'uso di altre sostanze sia endogene, che naturali ancora in corso di sperimentazione, come gli antiossidanti, il fattore di rilascio di derivazione endoteliale, o la L-Carnitina, che inducendo un precondizionamento farmacologico del miocardio, lo proteggerebbero dai successivi insulti ischemici in soggetti predisposti.

## SUMMARY

Preconditioning is a recently described phenomenon of myocardial resetting during short ischemic episodes, by which myocardium protects itself against new ischemic episodes, even if prolonged. Preconditioning has been thoroughly studied, but a definite explanation has not yet been given. It is clear that preconditioning is not a "stunning" phenomenon, because stunned myocardium shows a higher oxygen consumption than does normal myocardium: on the other hand, stunning requires more time to appear in respect of preconditioning. One theory is based on synthesis of "stress proteins" which protect myocardium. Another theory stresses the concept of free radicals and of their antagonists (the so-called "scavengers"). A third theory is based on the ATP-dependent potassium channels.

Finally, adenosine has grown up in consideration for its ability to protect ischemic myocardium, due to coronary vasodilation and to inhibition of oxygen need for its negative chronotropic, dromotropic and inotropic effects.

However, further study is needed to show whether these preliminary laboratory results are the same in the human being.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) *Murry CE, Jennings RB, Reimer KA*: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136,1986
- 2) *Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA*: Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am.J.Physiol.* 260:H796-H804, 199
- 3) *Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB*: Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ.Res.* 66:913-931,1990
- 4) *Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB*: Four brief periods of myocardial ischemia cause on cumulative ATP loss or necrosis. *Am.J.Physiol.* 251 :H1306-H1315,1986
- 5) *Jennings RB, Murry CE, Reimer KA*: Preconditioning myocardium with ischemia. *Cardiovasc. DrugsTher.* 5:933-938, 1991
- 6) *Jennings RB, Murry CE, Reimer KA*: Energy metabolism in preconditioned and control myocardium: effect of total ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23:1449-1458,1991
- 7) *Miura T, Adachi T, Ogawa T, Iwamoto T, Tsuchida A, limura O*: Myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning: its natural decay and the effect of repetitive preconditioning. *Cardiovasc. Pathol.* 1:147-154,1992
- 8) *Miura T, Goto M, Urabe K, Endoh A, Shimamoto K, Limura O*: Does myocardial stunning contribute to infarct size limitation by ischemic preconditioning? *Circulation* 84:2504-2512,1991
- 9) *Miura T, limura O*: *Infarct size limitation by preconditioning*: its phenomenological features and the key role of adenosine. *Cardiovasc. Res.* 27:36-42,1993
- 10) *Miura T, Ogawa T, Iwamoto T, Shimamoto K, limura O*: Dipyridamole potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning. *Circulation* 86:979-985,1992
- 11) *Yang XM, Arnoult S, Tsuchida A*: The protection of ischemic preconditioning can be reinstated in the rabbit heart after the initial protection has waned. *Cardiovasc. Res.* 27:556-558,1993
- 12) *Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM*: Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. *Circulation* 85:659-665,1992
- 13) *Thornton J, Striplin S, Liu GS*: Inhibition of protein synthesis does not block myocardial protection afforded by preconditioning. *Am.J.Physiol.* 259:H1822-H1825,1990
- 14) *Thornton JD, Thornton CS, Sterling DL, Downey JM*: Blockade of ATP-sensitive potassium channels increases infarct size but does not prevent preconditioning in rabbit heart. *Circ. Res.* 72:44-49,1993
- 15) *Liu GS, Stanley AW, Downey J*: Ischemic preconditioning is not dependent on neutrophils or glycolytic substrate at reperfusion in rabbit heart. *Cardiovasc. Res.* 26:1195-1198,1992
- 16) *Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM*: Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84:350-356,1991
- 17) *Liu GS, Downey JM*: Preconditioning against infarction in the rat heart does not involve a pertussis toxin sensitive G protein. *Cardiovasc. Res.* 27: 608-611,1993

18) *Liu GS,Downey JM*: Ischemie preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am.J.Physiol.* 263:H1107-H1112,1992.