Pregledi
Reviews

PATOFIZIOLOGIJA ISHEMIJSKO-REPERFUZIJSKE OZLJEDE

PATHOPHYSIOLOGY OF ISCHAEMIA-REPERFUSION INJURY

MAJA SIROTKOVIĆ-SKERLEV, STJEPKO PLEŠTINA, IVAN BILIĆ, ZDENKO KOVAČ*

Deskriptori: Reperfuzijska ozljeda – patofiziologija, metabolizam, prevencija;
Reaktivni kisikovi oblici – metabolizam; Antioksidansi – farmakologija; Ishemijsko prekondicioniranje

Sažetak. Reperfuzija ishemičnog tkiva ili organa osigurava dopremu kisika i supstrata nužnih za oporavak tkiva te odstranjuje toksične metaboličke produkte. No, osim korisnih učinaka reperfuzija pokreće i niz potencijalno štetnih procesa koji mogu uzrokovati dodatno pogoršanje tkivnog oštećenja. Tako nastalo oštećenje označavamo terminom ishemijsko-reperfuzijska ozljeda. Posljedice ishemijsko-reperfuzjijske ozljede mogu varirati od minimalnih funkcionalnih i strukturnih oštećenja i reverzibilne disfunkcije organa do višestrukog organskog zatajenja i smrti. Patogeneza ishemijsko-reperfuzijske ozljede je složena i u njoj sudjeluje više čimbenika kao što su suvišak slobodnih radikala kisika i drugih reaktivnih kisikovih oblika, aktivacija neutrofila, aktivacija komplementa, citokini i drugi upalni posrednici te vazokativne tvari NO i endotelin. U ovom članku raspravljena je patofiziologija ishemijsko-reperfuzijske ozljede, mehanizmi stvaranja reaktivnih kisikovih oblika, kao i značenje drugih čimbenika u razvoju ovog tipa tkivnog oštećenja. Prikazani su i postupci kojima se u različitim pretkliničkim i kliničkim studijama pokušalo utjecati na tijek ishemijsko-reperfuzijske ozljede.

Descriptors: Reperfusion injury – physiopathology, metabolism, prevention and control;
Reactive oxygen species – metabolism; Antioxidants – pharmacology; Ishemic preconditioning

Summary. Reperfusion of ischaemic tissue provides oxygen and substrates that are necessary for tissue recovery and concurrently removes toxic metabolites. However, reperfusion may induce various detrimental processes that may cause further tissue damage. Such deterioration of tissue function after reperfusion is defined as ischaemia-reperfusion injury. The consequences of ischemia-reperfusion injury vary from reversible cell dysfunction to local and remote tissue destruction, multiple organ failure and death. The pathogenesis of ischaemia-reperfusion injury is complex and includes excessive production of reactive oxygen species, activation of neutrophils, activation of complement, involvement of cytokines and other inflammatory mediators, vasoactive substances NO and endothelin. This review discusses the pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury, the mechanisms of reactive oxygen species production, and the role of other factors in the pathogenesis of such injury. Several approaches and procedures used in pre-clinical and clinical studies in order to limit ischaemia-reperfusion injury are also presented.

Liječ Vjesn 2006;128:87–95

Pojam ishemijsko-reperfuzijska (I/R) ozljeda označava pogoršanje tkivnog oštećenja tijekom reperfuzije organa ili tkiva koje je prethodno bilo izloženo određenom razdoblju ishemije (prestanku krvnog optjecaja).[1] Uspostavom protoka i oksigenacije u stanicama istodobno s ispravkom energijskih i strukturnih poremećaja pokreću se štetni procesi. Pritom dolazi do dodatnog oštećenja stanica koje su u razdoblju ishemije bile samo reverzibilno oštećene. I/R ozljeda pridonosi morbiditetu i mortalitetu u stanjima kao što su infarkt miokarda, moždani udar, ishemija crijeva, bolesti perifernih krvnih žila, hipovolemijski šok i stanja nakon transplantacije organa. Na tablici 1. navedena su klinička stanja u kojima je I/R ozljeda važan patogenetski čimbenik. Patogeneza ishemijsko-reperfuzijske ozljede je složena i u njoj sudjeluje više čimbenika kao što su suvišak slobodnih radikala kisika, aktivacija neutrofila, aktivacija komplementa, citokini i drugi upalni posrednici te vazoaktivne tvari NO i endotelin. Posljedice I/R ozljede mogu varirati od minimalnih funkcionalnih i strukturnih oštećenja i reverzibilne disfunkcije organa do višestrukog organskog zatajenja (MODS, engl. multiple organ dysfunction syndrome) i smrti.[16]

Prestanak protoka ili nedostatan protok krvi kroz tkivo onemogućuje dopremu odnosno smanjuje opskrbu tkiva kisikom. Nedostatan protok krvi također smanjuje dopremu hranjivih tvari i uzrokuje sporije odstranjenje metaboličkih produkata. Manjak kisika u tkivima (hipoksija) koči tok oksidativne fosforilacije u mitohondrijima (nastaje manjak akceptora elektrona), a time se razvija manjak ATP-a, ključnog izvora energije za sve stanične funkcije. U stanici se razvija manjak energije – hipoenergoza (hipoksijska hipoenergoza).[22] Zbog smanjenja oksidativne fosforilacije smanjuje se omjer koncentracije ATP/ADP, što potiče glukolizu. Glukoliza se sada zbiva u anaerobnim uvjetima pri čemu se ATP proizvodi fosforilacijom na razini supstrata. Međutim, takav način dobivanja energije nije dostatan za dulje funkcioniranje stanice.

Konačni proizvod razgradnje glukoze u anaerobnim uvjetima je mliječna kiselina čije nakupljanje pridonosi staničnoj acidozi. Zbog izostanka oksidacije NADH u mito-

* **Katedra za patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu** (dr. sc. Maja Sirotković-Skerlev, dr. med.; doc. dr. sc. Stjepko Pleština, dr. med.; mr. sc. Ivan Bilić, dr. med.; prof. dr. sc. Zdenko Kovač, dr. med)

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. M. Sirotković-Skerlev, Katedra za patofiziologiju Medicinskog fakulteta, KBC Zagreb, Rebro, Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb

Primljeno 1. rujna 2005., prihvaćeno 11. siječnja 2006.

Tablica 1. *Klinička stanja u kojima je I/R ozljeda važan patogenetski čimbenik*
Table 1. *Clinical situations in which I/R injury plays important pathogenetic role*

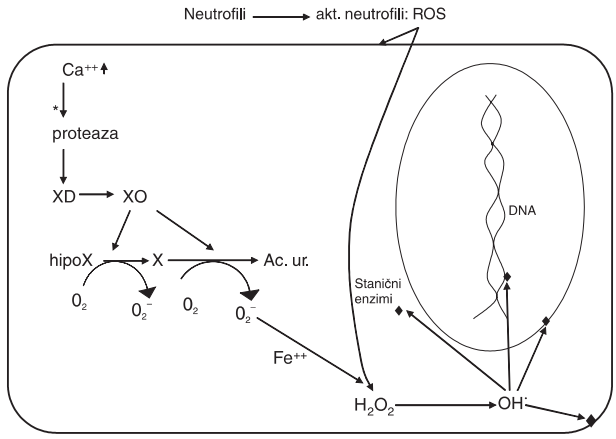
Kliničko stanje	Reference
Hipovolemijski šok / Hypovolaemic shock	2, 3
Moždani udar / Stroke	4, 5
Infarkt miokarda – trombolitička terapija, PTCA* Myocardial infarction – thrombolytic therapy, PTCA*	6, 7
Ishemija crijeva / Intestinal ischaemia	8
Ishemija ekstremiteta – tromboliza, PTA**, kirurška revaskularizacija Lower limb ischaemia – thrombolysis, PTA**, surgical revascularisation	9, 10
Ozljede mozga tijekom trauma glave / Brain injury after head trauma	11
Crush sindrom / Crush syndrome	12
Kardio-pulmonalni »bypass« tijekom kardiokirurških zahvata Cardiac surgery:Cardio-pulmonary pypass	13,14
Postupci tijekom operacije aneurizme aorte i drugih vaskularnih zahvata Aortic aneurysm repair and other procedures in vascular surgery	15,16
Transplantacija organa (srce, pluća, bubreg, jetra) Organ transplantation (heart, lung, kidney, liver)	17,18,19
Djelomična resekcija organa (npr. jetra) Organ resections (for example liver)	17,20
Različiti postupci u plastičnoj kirurgiji npr. uporaba režnjeva tkiva Plastic surgery – for example free flap surgery	21

* PTCA – perkutana transluminalna koronarna angioplastika/percutaneous transluminal coronary angioplasty; ** PTA – perkutana transluminalna angioplastika/percutaneous transluminal angioplasty

hondrijima povisuje se omjer koncentracije NADH/NAD i dodatno potiče prijelaz piruvata u laktat.

Stanični učinci hipoksije

Hipoksija se očituje na svim staničnim dijelovima i funkcijama.[23] Zbog manjka energije (hipoenergoze) stradaju stanični transportni procesi, ponajprije oni koji održavaju razliku u koncentraciji tvari izvan i unutar stanice. Zbog slabljenja pogona Na-K crpke zadržava se Na^+ u stanici. Posljedično se zadržavaju i Ca^{++} i voda, što pridonosi unutarstaničnom edemu. Porast koncentracije Ca^{++} nastaje i zbog usporenja rada Ca^{++} crpke na staničnoj membrani i membrani endoplazmatske mrežice. Porast unutarstanične koncentracije Ca^{++} dovodi do niza potencijalno štetnih zbivanja za stanicu.[23] Porast unutarstanične koncentracije kalcija i manjak energije u stanici ključni su čimbenici mitohondrijske permeabilitetne tranzicije – poremećaja funkcije mitohondrija zbog stvaranja pora na mitohondrijskoj membrani.[24,25] Zbog pojave pora povećava se propusnost mitohondrijske membrane, što dovodi do gubitka elektrokemijskoga gradijenta H^+ i posljedičnog rasprezanja oksidativne fosforilacije. U fiziološkim uvjetima glavnina kisika u mitohondrijima potpuno se reducira do vode. U manjoj mjeri (2–4% od sveukupno reduciranih molekula tijekom oksidativne fosforilacije) nastaje nepotpuna redukcija kisika do superoksidnog aniona (0_2^-). U uvjetima hipoksije (s posljedičnom permeabilitetnom tranzicijom mitohondrija) znatno se povećava nepotpuna redukcija kisika i nastajanje superoksidnog aniona (0_2^-) u mitohondrijima. Iz superoksidnog aniona nastaju drugi slobodni kisikovi radikali. Tako mitohondriji u velikoj mjeri pridonose oksidativnom stresu, tj. stanju u kojem je proizvodnja slobodnih kisikovih radikala veća od njihova uklanjanja.[23,26] Zbog povećane propusnosti mitohondrijske membrane iz mitohondrija izlaze Ca^{++} i bjelančevine (od kojih citokrom c djeluje proapoptogeno), a u mitohondrij ulazi voda. Izlazak Ca^{++} iz mitohondrija dodatno povećava citosolsku koncentraciju Ca^{++}. Produženo postojanje pora dovodi do nepovratnog oštećenja mitohondrija i stanice.



XD = ksantin dehidrogenaza/xantine-dehydrogenase, XO = ksantin oksidaza/xantine oxydase, X = ksantin/xantine, Ac.ur. = mokraćna kiselina/uric acid, ♦ = oštećenje/injury, * = aktivacija/activation, akt = aktivirani/activated, 0_2^- = superoksidni anion/superoxyde anions, $OH^•$ = hidroksilni slobodni radikal/hydroxyl radical, ROS = reaktivni kisikovi oblici/reactive oxygen species

Slika 1. *Nastanak reaktivnih kisikovih oblika tijekom I/R ozljede i njihovi toksični učinci u stanici*
Figure 1. *Generation of reactive oxygen species during I/R injury and their toxic effects in the cell*

Tablica 2. *Toksični učinci reaktivnih kisikovih oblika*
Table 2. *Toxic effects of reactive oxygen species*

Lipidi Lipids	Peroksidacija nezasićenih masnih kiselina, stvaranje sekundarnih reaktivnih produkata Peroxidation of unsaturated fatty acids, generation of secundary reactive products
Proteini Proteins	Oksidacija sulfhidrilnih skupina, karbonilacija Oxidation of-SH groups, carbonylation
Polisaharidi Carbohydrates	Depolimerizacija Depolymerization
Deoksiribonukleinska kiselina DNA	Hidroksilacija baza, deaminacija, prekidanje polinukleotidnih lanaca Hydroxylation, deamination, strand breakage

Nadalje, Ca^{++} sam ili u kompleksu s kalmodulinom aktivira različite enzime: proteaze, nukleaze. Tako aktivira i proteazu koja cijepa enzim ksantin dehidrogenazu (XD) i prevodi ga u ksantin osidazu (XO). U purinskome metaboličkom putu ksantin oksidaza katalizira oksidaciju hipoksantina i ksantina do mokraćne kiseline. U fiziološkim uvjetima u stanici prevladava oblik XD (90%) koji tijekom oksidacije ksantina prenosi elektrone na vodik i na NAD.[23,27] No, u hipoksičnim uvjetima nastaje ksantin oksidaza koja za razliku od dehidrogenaze prenosi elektrone na molekularni kisik. Tijekom reperfuzije kisik postaje dostupan tkivu u kojem su se izmijenili metabolički uvjeti. Nastala XO prenosi elektrone na molekularni kisik pri čemu nastaje slobodni radikal kisika superoksidni anion (0_2^-). Superoksidni anion u prisutnosti slobodnog Fe^{++} prelazi u vodikov peroksid (H_20_2) iz kojeg nadalje nastaje slobodni hidroksilni radikal ($H\dot{0}$) – jedan od najreaktivnijih i najtoksičnijih produkata molekularnog kisika (slika 1).

Tablica 3. *Posljedice povećane koncentracije Ca^{++}u citosolu*
Table 3. *Consequences of increased Ca^{++} cytosolic concentration*

Učinci povećane koncentracije kalcija u citosolu / Effects of increased Ca^{++} cytosolic concentration	Posljedice / Consequences
Poticanje permeabilitetne tranzicije u mitohondrijima / Mitochondrial permeability transition enhancement	– smanjeno stvaranje energije / lowering of energy production – povećano stvaranje superoksidnog aniona / increased generation of superoxide anion – izlazak bjelančevina i Ca^{++} iz mitohondrija / release of proteins and Ca^{++} from mitochondria
Aktivacija proteaza i nukleaza / Activation of proteases and nucleases	– prijelaz ksantin dehidrogenaze u ksantin oksidazu / xanthine dehydrogenase conversion to xanthine oxidase – oštećenje bjelančevina / protein damage – oštećenje nukleinskih kiselina / nucleic acids damage
Aktivacija fosfolipaze A1 i A2 / Activation of phospholipase A1 and A2	– oslobađanje arahidonske kiseline-preteče prostaglandina i leukotrijena / release of arachidonic acid for synthesis of prostaglandins and leukotrienes – oštećenje stanične membrane / cell membrane damage
Aktivacija fosfolipaze C / Activation of phospholipase C	– pokretanje fosfoinozitolskoga glasničkog puta activation of phosphoinositol pathway
Poticanje aktivnosti Ca^{++}-ATP-aza vezanih uz Ca^{++} crpke / Stimulation of Ca^{++}-ATP ase related extrusion systems (pumps)	– produbljenje hipoenergoze worsening of energy insufficiency
Poticanje aktivnosti konstitutivne NO sintetaze / Stimulation of constitutive NO synthase	– povećano stvaranje NO (NO izravno ili prelaskom u peroksinitritni anion može djelovati citotoksično) increased production of NO (NO may have cytotoxic effects directly or by conversion to peroxynitrite)

Slobodi radikali su nestabilne molekule ili dijelovi molekula koji u vanjskoj orbitali sadržavaju jedan ili više nesparenih elektrona.[28] Slobodni radikali kisika (SRK) jesu molekule navedenih svojstava koje nastaju iz molekularnog kisika. SRK su kemijski vrlo reaktivne molekule – vrlo brzo reagiraju s različitim strukturama i makromolekulama u stanici pri čemu prelaze u stabilniji oblik (nespareni elektron predstavlja slobodnu valenciju i teži sparivanju). Vrlo su kratkog poluvijeka (μs), što otežava njihovo dokazivanje u tkivu. Njihovo neprekidno stvaranje i fiziološko uklanjanje unutar stanice omogućuje održavanje optimalnih oksidacijsko-redukcijskih uvjeta u molekularnom mikrookolišu. Time se posredno omogućuje nesmetan tijek prijenosa staničnih signala, regulacija tonusa krvnih žila i drugih redoks-senzitivnih biokemijskih procesa.[29] Osim slobodnih radikala u stanici postoje i drugi reaktivni produkti molekularnog kisika koje zajednički nazivamo reaktivnim kisikovim oblicima – ROS (engl. reactive oxygen species).[26] Slobodni radikali i drugi reaktivni oblici kisika u patofiziološkim uvjetima mogu posredno ili neposredno oštetiti sve stanične dijelove i uzrokovati smrt stanice (slika 1. i tablica 2).[26] Oštećuju membrane tako što potiču njihovu lipidnu peroksidaciju, tj. samoekspandirajući proces stvaranja lipoperoksilnih radikala i drugih bioreaktivnih produkata. Ishod je izmjena strukture i funkcije staničnih membrana – od promjene fluidnosti i propusnosti do potpune lize. Nadalje, ROS inaktiviraju stanične enzime time što reagiraju s njihovim aktivnim skupinama (npr. sulfhidrilnom), oksidiraju neke aminokiseline ili cijepaju peptidni vez. Osim toga depolimeriziraju polisaharide. Također oštećuju DNA tako što mijenjaju (hidroksiliraju) baze u nukleinskim kiselinama i uzrokuju lomove polinukleotidnih tračaka. Osim kisikovih i drugi reaktivni oblici mogu oštetiti stanicu. Tijekom ishemije povećava se koncentracija NO koji u reakciji sa superoksidnim anionom prelazi u peroksinitritni anion ($ONOO^-$) – reaktivni oblik dušika (RNS, od engl. reactive nitrogen species) koji također može djelovati citotoksično.[23]

Oštećenju i mogućoj lizi stanice pridonose i lizosomi. Naime, hipoksija labilizira lizosome, a sniženje unutarstaničnog pH aktivira njihove enzime, što pridonosi oštećenju stanične membrane, kao i jezgre gdje lizosomski enzimi razlažu kromatin.[23]

Manjak proizvodnje energije koči i procese transkripcije u jezgri (koči sintezu RNA). Usporava se i sinteza bjelančevina za koju je također potrebna energija (dolazi do raspada poliribosoma).[23]

Osim poticanja mitohondrijske permeabilitetne tranzicije i aktivacije različitih enzima, porast unutarstanične koncentracije Ca^{++} ima i druge nepoželjne učinke: aktivira fosfolipazu A1 i A2, fosfolipazu C, potiče aktivnost Ca^{++}-ATP-aza vezanih uz Ca^{++} crpke i potiče aktivnost NO sintetaze.[23] Posljedice porasta koncentracije Ca^{++} u citosolu navedene su na tablici 3.

U uvjetima reperfuzije u tkivo dolaze upalne stanice koje otpuštaju brojne posrednike upale i također povećavaju oksidativni stres. Slobodni radikali kisika preko aktivacije transkripcijskog čimbenika NF-κB povećavaju izražaj athezijskih molekula na membranama endotelnih stanica kao što je to ICAM-1 (intercelularna athezijska molekula 1).[23] Leukociti preko receptora za athezijske molekule prianjaju na membrane endotelnih stanica, utkivljuju se i prelaze u izvanžilne prostore. Zbog interakcije endotelnih i upalnih stanica dolazi do njihove aktivacije pri čemu se oslobađaju velike količine slobodnih radikala kisika, proteolitičkih enzima i vazoaktivnih tvari. Ključni čimbenici koji povećavaju oksidativni stres tijekom I/R ozljede navedeni su na tablici 4.

Postupak leukodeplecije može učinkovito smanjiti I/R ozljedu. Primjerice, Allen i sur. su u eksperimentalnim i

Tablica 4. *Čimbenici koji povećavaju oksidativni stres tijekom I/R ozljede*
Table 4. *Factors that enhance oxidative stress related to I/R injury*

Permeabilitetna tranzicija mitohondrija / Mitochondrial permeability transition
Potaknuti metabolizam arahidonske kiseline (tijekom sinteze prostaglandina nastaju slobodni kisikovi radikali) / Activated metabolism of arachidonic acid (prostaglandin synthesis is related to generation of free oxygen radicals)
Prijelaz ksantin dehidrogenaze u ksantin oksidazu koja prenosi elektrone na molekularni kisik / Xanthine dehydrogenase conversion to xanthine oxidase which transfers electrons to molecular oxygen
Oksidativna eksplozija neutrofila (aktivacija NADPH oksidaze) / Neutrophil respiratory burst (activation of NADPH oxidase)
Aktivacija iNOS / Activation of iNOS
Oslobađanje Fe^{++}, Cu^{++} / Increased availability of Fe^{++}, Cu^{++}
Disfunkcija antioksidansa (inaktivacija) / Antioxidants dysfunction (inactivation)

kliničkim ispitivanjima I/R ozljede srca, pluća i donjih ekstremiteta leukodeplecijom reperfuzijske tekućine značajno smanjili opseg oštećenja.[30]

Uloga antioksidansa

U stanici postoje mehanizmi koji je štite od toksičkog djelovanja slobodnih kisikovih radikala. Više staničnih enzima (enzimski antioksidansi) pretvara slobodne kisikove radikale u manje toksične ili netoksične produkte i time smanjuje oksidativni stres.[26] Superoksid dismutaza (SOD) pretvara superoksid u vodikov peroksid. U fiziološkim uvjetima vodikov peroksid se odstranjuje reakcijom s reduciranim glutationom (GSH) pri čemu nastaju oksidirani glutation (GSSG) i voda. Tu reakciju katalizira glutation peroksidaza. Za obnavljanje reduciranoga glutationa potreban je enzim glutation reduktaza. U razgradnji vodikova peroksida sudjeluje i katalaza koja pretvara vodikov peroksid u vodu i molekularni kisik. Ishemija i posljedična hipoenergoza smanjuju aktivnost ovih enzima.[23] Kao što je već spomenuto slobodni radikali kisika oštećuju stanične enzime pa tako i enzimske antioksidanse. U organizmu postoje i neenzimski zaštitni mehanizmi (ligandni »čistači«, engl. scavenger) kao što su vitamin A, vitamin E, vitamin C, albumin, mokraćna kiselina itd.[31] Međutim, u stanju povećanog oksidativnog stresa kao kod I/R ozljede ti mehanizmi nisu dostatni za očuvanje integriteta stanice.

Brojne egzogene tvari imaju svojstva antioksidansa. Tvari koje blokiraju enzimsku aktivnost, kao npr. alopurinol koji inhibira ksantin oksidazu te molekule koje vežu metalne ione, kao npr. desferioksamin koji veže željezo mogu se svrstati u skupinu enzimskih antioksidansa. Neke druge egzogene tvari djeluju neenzimski, kao npr. manitol, probukol, N-acetilcistein. Neki lijekovi koji se primjenjuju u terapiji kardiovaskularnih bolesti, kao npr. inhibitori konvertaze angiotenzina i karvedilol imaju i antioksidantna svojstva.[32]

Brojne studije pokušale su iskoristiti antioksidanse u svrhu sprečavanja ili modificiranja I/R ozljede. Istraživanja SOD, vitamina C, vitamina E, N-acetilcisteina (NAC, prekursor

Tablica 5. *Primjeri kliničkih studija u kojima je ispitivan učinak antioksidansa u I/R ozljedi (početak)*
Table 5. *Examples of clinical studies in which role of antioxidants in I/R injury was assessed (beginning)*

Stanje povezano s I/R ozljedom / Situation related to I/R injury	Antioksidans ili njihova kombinacija / Antioxidant/s	Učinak / Effect	Referenca / Reference
Kardiopulmonalni »bypass« / Cardiopulmonary bypass	Vitamini C i E prije zahvata / Pretreatment with vitamin C and E	Smanjenje koncentracije malonaldehida (pokazatelja lipidne peroksidacije) / Decrease in malondialdehyde concentration (a marker of lipid peroxidation)	39
Kardiopulmonalni »bypass« / Cardiopulmonary bypass	Visoke doze vitamina C / High-dose ascorbic acid	Povoljan učinak na biokemijske pokazatelje ozljede miokarda / / Protective effect on biochemical parameters of myocardial injury	40
Elektivni kardiokirurški zahvati / Elective cardiac surgery	iv. primjena vitamina E / i.v. infusion of viramin E	Normalizacija vitamina E u plazmi, no bez učinaka na biokemijske pokazatelje oštećenja miokarda i ishod kirurškog zahvata / Normalization of plasma vitamin E without effect on biochemical markers of myocardial injury	41
Kirurški zahvati na koronarnim arterijama / Coronary artery surgery	Intrakoronarna primjena vitamina E prije odstranjenja stezaljke na aorti / Intracoronary administration of vitamin E at the end of aortic cross-clamping	Povoljan učinak na parametre ozljede miokarda / Protective effect on parameters of myocardial injury	42
Infarkt miokrada / Myocardial infarction	N-acetilcistein / N-acetylcysteine	Smanjenje veličine infarkta / Reduction of infarct size	43
Bolesnici s intrakranijalnim krvarenjem i bolesnici s traumom glave / Patients with intracranial hemorrhage or head trauma	Praćene su promjene koncentracije vitamina C / Plasma vitamin C levels were measured	Plazmatska koncentracija vitamina C bila je niža u usporedbi sa zdravim ispitanicima / Lower plasma levels of vitamin C compared with healthy subjects	44
Resekcija jetre / Liver resection	Vitamini E i C / Vitamins E and C	Povoljan učinak na pokazatelje jetrene funkcije / Positive effect on liver function parameters	45
Resekcija jetre / Liver resection	Vitamin E / Vitamin E	Povoljan učinak na pokazatelje jetrene funkcije / Beneficial effect on liver function parameters	46
Operacija infrarenalne aneurizme aorte / Infra-renal aotic aneurysm repair	Alopurinol, vitamin E i C, N-acetilcistein i manitol / Allopurinol, vitamin E and C, N-acetylcysteine and mannitol	Povoljan učinak na renalnu funkciju / Beneficial effect on renal function	47
Transplantacija bubrega / Renal transplantation	Dodatak vitamina C perfuzijskoj tekućini / Pre-operative perfusion with solution containing vitamin C	Bez učinka na parametre bubrežne funkcije / No significant effect on renal function parameters	18
Ishemija praćena reperfuzijom donjeg dijela tijela – učinak na promjene crijevne propusnosti / Lower torso ischaemia and reperfusion – effect on gut permeability	Alopurinol, vitamin E i C, N-acetilcistein i manitol / Allopurinol, vitamin E and C, N-acetylcysteine and mannitol	Bez učinka na propusnost crijevne stijenke / No influence on gut permeability	48
Ishemija skeletnog mišića praćena reperfuzijom / Sceletal muscle ischaemia and reperfusion	Vitamin E	Povoljan učinak na biokemijske i morfološke promjene / Beneficial effect on biochemical and morphological parameters	49
Arterijska embolija donjeg ekstremiteta, liječena embolektomijom / Arterial embolism of lower extremity treated with embolectomy	Pročišćena frakcija flavonoida / Purified flavonoid fraction	Smanjenje edema nakon revaskularizacije / Reduction of oedema following revascularisation	50

sinteze glutationa) *in vitro* i/ili na animalnim modelima upućuju na moguću korisnu ulogu ovih tvari u I/R ozljedi.[4,33,34] No, rezultati nisu jednoznačni. Tako je npr. u nekim animalnim studijama I/R ozljede bubrega pokazan zaštitni učinak alopurinola, dok u studiji Pleštine i sur. primjena ovog antioksidansa nije bila učinkovita (nije spriječila promjene u sintezi bjelančevina, tj. raspad poliribosoma).[35–37]

Epidemiološke studije upućuju na obrnutoproporcionalni odnos između unosa flavonoida (antioksidansa iz vina) i rizika od kardiovaskularnih bolesti.[38] Međutim, kliničke studije u kojima su antioksidansi primijenjeni u različitim stanjima koja karakterizira povećan oksidativni stres, uključujući i I/R ozljedu, kao i u slučaju pretkliničkih studija nisu dale jednoznačne rezultate. Primjeri nekih kliničkih studija u kojima su ispitivani antioksidansi prikazani su na tablici 5.

Problemi primjene antioksidansa u terapiji vezani su uz pitanja postizanja odgovarajuće koncentracije na mjestu djelovanja. Primjerice, primjena SOD je ograničena veličinom molekule (koja otežava ulazak u stanicu te prijelaz kroz krvno-moždanu barijeru), kratkim poluvijekom, kao i antigeničnošću nekih pripravaka.[4,33] Neki od ovih problema pokušavaju se riješiti uporabom malih molekula koje imaju aktivnost SOD (SOD mimetici).[4,33] Uz to neki antioksidansi osim antioksidantnog djelovanja mogu u određenim uvjetima imati i prooksidativne učinke.[31]

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila potencijalna korist antioksidansa u terapiji I/R ozljede, kao i najpovoljniji način njihove primjene.

Druge biokemijske promjene koje pridonose patogenezi I/R ozljede

Osim prelaska XD u XO, povećanog stvaranja superoksidnog aniona u mitohondrijima i iscrpljenja enzimatskih zaštitnih mehanizama tijekom ishemije nastaju još neke biokemijske promjene koje pogoduju I/R ozljedi kao što je povećanje količine supstrata za ksantin oksidazu i povišenje koncentracije slobodnog Fe^{++}. U uvjetima manjka kisika usporava se stvaranje ATP-a iz ADP-a. ADP se nagomilava i razgrađuje do purina i njegovih produkata uključujući hipoksantin, ksantin i mokraćnu kiselinu. Tako u ishemičnim uvjetima nastaje veća količina hipoksantina – supstrata za ksantin oksidazu (što će nakon dolaska kisika pogodovati stvaranju slobodnih kisikovih radikala). Oksidativni stres može povisiti koncentraciju slobodnog Fe^{++} koja nadalje katalizira stvaranje reaktivnih kisikovih oblika (prijelaz superoksidnog aniona u H_2O_2). Superoksidni anion može mobilizirati ion željeza iz feritina, a H_2O_2 može razgraditi hemoglobin, mioglobin i druge proteine koji sadržavaju hem i tako osloboditi željezo iz prstena hema.[26]

Uloga citokina u I/R ozljedi

Tijekom I/R ozljede povećava se izražaj različitih upalotvornih i upalostatskih (proinflamatornih i antiinflamatornih) citokina. Upalotvorni citokini kao što su TNFα i IL-1 sudjeluju u započinjanju i održavanju upalnog odgovora koji pridonosi I/R ozljedi.[51,52]

Povišenje TNFα uočeno je kako u tkivu različitih organa izloženih I/R ozljedi (bubreg, jetra, srce, mozak, pluća) tako i u serumu.[53] U slučaju I/R ozljede jetre porast plazmatske koncentracije TNFα i IL-1 uočen je već 5 minuta od početka reperfuzije.[17] U jetri tkivni makrofazi – Kupfferove stanice glavni su izvor ovih citokina. U slučaju srca i bubrega pokazano je da osim utkivljenih makrofaga i kardiociti, odnosno glomerularne i tubularne epitelne stanice mogu nakon odgovarajućeg podražaja (ishemije praćene reperfuzijom) stvarati TNFα.[53,54]

TNFα i IL-1 potiču sintezu kemokina kao što su IL-8 i peptid koji aktivira neutrofile (ENA-78 od engl. epithelial neutrophil activating peptide) koji imaju važnu ulogu pri kemotaksiji i aktivaciji neutrofila.[55,56]

TNFα i IL-1 također potiču ekspresiju athezijskih molekula na epitelnim i endotelnim stanicama.[57] Zbog interakcije endotelnih stanica i leukocita dolazi do daljnjeg pojačanja stvaranja citokina.

TNFα u jetri potiče stvaranje slobodnih kisikovih radikala u Kupfferovim stanicama, što je dominantni izvor ROS tijekom I/R ozljede jetre.[58]

Povišenje koncentracije TNFα u miokardu koje nastaje nakon ishemije praćene reperfuzijom korelira s depresijom funkcije miokarda.[59] Taj poremećaj kontraktilne funkcije srca može se poništiti primjenom inhibitora stvaranja TNF ili neutralizacijom TNF.[59]

Osim posredovanjem upalne reakcije TNFα može i izravno oštetiti parenhim organa izloženih I/R ozljedi tako što u njima potiče apoptozu. Mehanizmi kojima TNFα potiče apoptozu detaljno su istraženi u slučaju miokarda, bubrega i jetre.[53,60,61]

Osim lokalnih, TNFa i IL-1 imaju i brojne udaljene učinke. Tako je TNFα uključen u posredovanje ozljede pluća povezane s ishemijom drugih organa. Nakon ishemije praćene reperfuzijom donjih ekstremiteta, kao i nakon I/R ozljede crijeva raste razina TNFα u serumu što korelira s oštećenjem pluća.[62] Prethodno davanje protutijela na TNF ili proteina koji veže TNF djelovalo je zaštitno u ovim eksperimentalnim modelima.[62] Ova i brojna druga istraživanja upućuju na važnu ulogu TNFα u patogenezi akutnoga respiratornog distres sindroma (ARDS, engl. acute respiratory distress syndrome).[63] Uz citokine u patofiziologiji ARDS-a važnu ulogu imaju i ROS i aktivirani neutrofili.[63,64]

TNFα i IL-1 posrednici su odgovora akutne faze koji uključuje: akutnofazni odgovor središnjega živčanog sustava, akutnofazni odgovor jetre, vrućicu, kataboličku reakciju, ubrzanje energijskog metabolizma te sekundarne promjene pojedinih funkcionalnih sustava.[65,66] Stoga su važni u patogenezi sustavnog upalnog odgovora (SIRS – od engl. systemic inflammatory response syndrome) i višestrukog organskog zatajenja (MODS, engl. multiple organ dysfunction syndrome).[67]

Postupci kojima se pokušalo spriječiti djelovanje TNFα jesu inhibicija TNF transkripcije odnosno inhibicija aktivnosti TNFα.[53] Anti TNF i topljivi TNF R istraživani su u stanju sepse bez očekivanog rezultata.[68] Mnogi autori naglašavaju pravodobno započinjanje anticitokinske terapije kao važan čimbenik eventualnog uspjeha. U nekim situacijama povezanim s I/R ozljedom kao što je transplantacija ili djelomična resekcija organa (jetre, bubrega), angioplastika, te intraoperativno privremeno zaustavljanje arterijske cirkulacije moguće je planirati vrijeme primjene terapije usmjerene protiv učinaka upalotvornih citokina.[53]

Tijekom I/R ozljede povećava se i koncentracija upalostatskih citokina, što je dio regulacijskih mehanizama tijekom upale. IL-10 je prototip upalostatskog citokina – inhibira sintezu TNFα i IL-1 i umanjuje (neutralizira) njihove upalotvorne učinke potičući izražaj njihovih antagonista – IL-1ra (od engl. receptor antagonist) i topljivog p75 TNF receptora. Primjena rekombinantnog mišjeg IL-10 smanjila je opseg oštećenja u eksperimentalnome modelu I/R ozljede

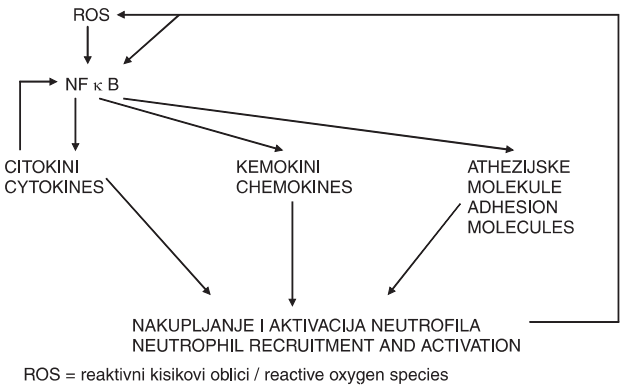
jetre.[69] Huber i sur. ispitivali su primjenu IL-10 klinički i nisu uočili nužne nuspojave u kliničkim pokusima I. i II. faze.[70]

Transkripcijski faktor NF-κB

Transkripcijski faktor NF-κB (nuklearni faktor κB) ima ključnu ulogu u regulaciji aktivacije brojnih gena uključujući i gene čiji produkti sudjeluju u lokalnoj upali te općoj reakciji organizma na ozljedu. Reperfuzija ishemičnog tkiva dovodi do stvaranja ROS. Za vodikov peroksid i superoksidni anion pokazano je da aktiviraju NF-κB koji onda potiče ekspresiju mnogih gena uključenih u upalu i bitnih za tijek I/R ozljede: citokina kao što su TNFα i IL-1, citokinskih receptora, kemokina, athezijskih molekula, interferona β te različitih enzima (fosfolipaze A2, ciklooksigenaze, lipooksigenaze, inducibilne NO sintetaze).[17,71]

NF-κB nalazi se u citoplazmi stanice u kompleksu s inhibicijskom molekulom I-κB. Različiti čimbenici uključujući i slobodne kisikove radikale potiču fosforilaciju I-κB i disocijaciju kompleksa inhibitorne podjedinice i transkripcijskog čimbenika.[72] Tako oslobođeni NF-κB odlazi u jegru gdje potiče prepisivanje gena. Neki od proteinskih produkata tih gena djeluju na regulaciju NF-κB. Tako npr. TNFα i IL-1 aktiviraju sustav NF-κB i tako se zatvara pozitivna povratna sprega (vidi sliku 2). Proizlazi da pojedini posrednici upale imaju brojna međudjelovanja, što dovodi do pojačanja upalne reakcije.

Uloga NF-κB u I/R ozljedi pokazana je u mnogim eksperimentalnim istraživanjima. Yeh i sur. primijenili su inhibitor aktivacije NF-κB u eksperimentalnom modelu I/R ozljede miokarda (na zečevima) i uočili smanjenje ekspresije gena za upalotvorne citokine, kao i ublažavanje mehaničke disfunkcije miokarda.[73] Brown i sur. pokazali su smanjenje veličine infarkta miokarda nakon ishemije i reperfuzije u transgeničnih miševa u kojih je bila blokirana aktivnost NF-κB.[74] Luedde i sur. pokazali su u eksperimentalnom modelu I/R ozljede jetre zaštitnu ulogu kemijskog inhibitora NF-êB (AS602868).[75] Rezultati Souze i sur. upućuju na važnu ulogu NF-κB u patogenetskim zbivanjima vezanim uz I/R ozljedu crijeva. U njihovu istraživanju primjena inhibitora NF-κB smanjila je oštećenje tkiva i smrtnost eksperimentalnih životinja, što je bilo povezano s inhibicijom stvaranja TNFα i smanjenjem infiltracije neutrofilima.[76]



Slika 2. *Ključna uloga NFκB u posredovanju upalne reakcije tijekom I/R ozljede. Nastaje pozitivna povratna sprega između ROS, NFκB i posrednika upale*

Figure 2. *Central role of NFκB activation in mediating inflammatory response during I/R injury. Positive loop develops between ROS, NFκB and inflammatory mediators*

Aktivacija komplementa i I/R ozljeda

Uloga komplementa u patogenezi I/R ozljede pokazana je u više eksperimentalnih modela I/R ozljede, kao i u kliničkim situacijama u kojima I/R ozljeda ima važnu ulogu.[77]

Aktivacija komplementa rani je događaj u tijeku I/R ozljede.[78] Hipoksija može aktivirati alternativni, kao i klasični put aktivacije komplementa.[79,80] Nedavno je pokazano da hipoksija praćena reoksigenacijom (preko citokeratina 1) aktivira i treći put aktivacije komplementa koji se zbiva preko lektina (MBL put od engl. mannose-binding lectin).[81]

Aktivirane komponente komplementa mogu utjecati na funkciju drugih čimbenika uključenih u patofiziologiju I/R ozljede: stvaranje ROS, aktivaciju neutrofila i stvaranje produkata aktiviranog endotela.77,78,82 Zhou i sur. istraživali su značenje pojedinih komponenti komplementa u eksperimentalnom modelu I/R ozljede bubrega. Njihovi rezultati upućuju na ključnu ulogu litičkog kompleksa C5b-9 (MAC, od engl. membrane attack complex) u oštećenju tkiva u modelu I/R ozljede bubrega u miša.[78]

Tip oštećenja posredovan aktivacijom komplementa može varirati ovisno o organu koji je izložen I/R ozljedi. Tako su Zhou i sur. u eksperimentalnome modelu I/R ozljede bubrega pokazali dominantno oštećenje parenhima, dok je u modelu I/R ozljede miokarda uočeno oštećenje i endotela i parenhima.[78]

Različiti inhibitori sustava komplementa iskorišteni su u eksperimentalnim modelima I/R ozljede: rekombinantni sCR1 koji inhibira aktivaciju C3, inhibitor C1 (C1-INH) koji blokira klasični put aktivacije komplementa, antitijela protu-C5 koja blokiraju C5a i formiranje MAC (litičkog kompleksa).[83] U više eksperimentalnih modela I/R ozljede (bubreg, jetra, skeletni mišić, tanko crijevo) Arumugam i sur. pokazali su povoljan učinak antagonista C5a receptora.[84–87] Studija de Zwaana i sur. na malom broju bolesnika pokazala je povoljan učinak C1-INH na I/R ozljedu miokarda.[88] U tijeku su kliničke studije II. i III. faze gdje se monoklonsko protutijelo na C5 komponentu komplementa rabi kod bolesnika kojima se ugrađuje premosnica koronarnih arterija i kod bolesnika s akutnim infarktom miokarda kao dodatak reperfuzijskoj terapiji.[89]

Patogenetska uloga vazoaktivnih tvari u I/R ozljedi

Brojna istraživanja upućuju na značenje vazoaktivnih čimbenika u patogenezi I/R ozljede[17,90] Posebice se istražuje endotelin 1 kao najsnažnija vazokonstriktorna tvar i dušični monoksid (NO) kao snažni vazodilatator. Povišenje plazmatske koncentracije endotelina opisano je u ranim satima nakon infarkta miokarda.[91] U eksperimentalnome modelu Watanabe i sur. pokazali su da primjena antitijela na endotelin smanjuje veličinu infarkta miokarda.[92] Međuodnos endotelina i NO detaljno je istražen u slučaju I/R jetre. Koncentracija endotelina povećava se u plazmi i jetrenom parenhimu u ranoj fazi reperfuzije.[93] S druge strane, koncentracija NO je niska tijekom prvih sati reperfuzije jetre, što je posljedica niske unutarstanične koncentracije NADPH i kisika (kofaktora potrebnih za sintezu NO) i oslobađanja arginaze koja razgrađuje L-arginin (prekursor u sintezi NO).[17] Proizvodnja NO uspostavlja se tek više sati nakon početka reperfuzije i ovisna je o indukciji inducibilne forme NO sintetaze (NOS).[94] Važnost međuodnosa ovih vazoaktivnih čimbenika u patofiziologiji I/R ozljede jetre potvrđena je i istraživanjima u kojima je primjena antitijela na endotelin 1 i endotelin 2, odnosno antagonista receptora na endotelin

(bonsetan) smanjila opseg I/R ozljede, odnosno poboljšala jetrenu mikrocirkulaciju.[95] S druge strane, primjena inhibitora NOS rezultirala je pogoršanjem parametara jetrene mikrocirkulacije u animalnim modelima I/R ozljede.[96] Ovi podaci upućuju na važnost međuodnosa endotelina i NO u patogenezi I/R ozljede.

Smrt stanice i I/R ozljeda

Produljena ishemija dovest će u pravilu do krajnje hipoenergoze i smrti stanica procesom nekroze, dok u slučaju I/R ozljede smrt stanice može nastati i procesom apoptoze.[24]

Nekroza je pasivan i nepovratan događaj povezan s rupturom stanične membrane, što vodi do otpuštanja staničnog sadržaja i pokretanja upalne reakcije.[97] Za razliku od nekrotične smrti programirana stanična smrt je ovisna o *de novo* sintezi proteina koji započinju program staničnog »samoubojstva« kao odgovor na različite podražaje.[60] Apoptotski procesi troše ATP. Stoga će raspoloživost energije utjecati na sudbinu stanice i vrstu njezina eventualnog propadanja.

Apoptoza je regulirana aktivacijom intracelularnih proteaza – kaspaza koje su direktno ili indirektno odgovorne za morfološke i biokemijske promjene koje karakteriziraju apoptotske stanice (kao što je fragmentacija DNA, zbijanje kromatina i stvaranje tzv. apoptotskih tjelešaca).[98,99] Eksperimentalne studije s inhibitorima kaspaza upućuju na korisni učinak ovih tvari u I/R ozljedi.[97]

Brojni izvanstanični i unutarstanični čimbenici mogu potaknuti apoptozu. Od čimbenika uključenih u I/R ozljedu važnu ulogu u posredovanju apoptoze imaju receptori iz »superporodice« TNF (tzv. receptori smrti od engl. death receptors), zatim porast unutarstanične koncentracije Ca++ te permeabilitetna tranzicija mitohondrija (prilikom koje iz mitohondrija istječu bjelančevine poput citokroma c koji djeluje proapoptogeno – aktivira kaspaze).[100]

Citoplazmatski čimbenici koji prenose signale i aktiviraju transkripciju – STAT (od engl. signal transducers and activators of transcription) također reguliraju proces apoptoze. Tako npr. STAT-1 inducira apoptozu, dok STAT-3 djeluje zaštitno na srčane stanice (miocite) tijekom I/R ozljede.[97] U istraživanju Townsenda i sur. na kulturama kardiocita i izoliranom srcu štakora pokazano je da tvar EGCG (engl. epigallocatechin-3-gallat) – glavni sastojak zelenog čaja i snažni inhibitor aktivacije STAT-1 štiti miokard od I/R ozljede.[101]

STAT aktiviraju različite protein kinaze kao što su Janus kinaze (JAKs, engl. Janus kinases) i kinaze koje aktiviraju mitogeni (MAP kinaze, engl. mitogen-activated kinases). Istraživanja su pokazala da se tijekom I/R ozljede aktiviraju dvije porodice MAP kinaza: JNK (c-Jun N-terminal kinase) i p38-MAP kinaze. U tijeku je klinička studija II. faze s VX702 – inhibitorom p38-MAP kinaze u akutnome koronarnom sindromu.[102]

Ishemijsko prekondicioniranje

Opetovano izlaganje kratkim razdobljima ishemije (ishemijsko prekondicioniranje, IP) smanjuje opseg naknadne ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Taj postupak opisan je najprije u slučaju eksperimentalnog modela I/R ozljede miokarda 1986.[103] Ishemijsko prekondicioniranje pokreće temeljni prilagodbeni odgovor stanice na stres. Nakon kratkotrajnog izlaganja ishemiji, u zahvaćenim stanicama mijenja se genski izražaj koji pridonosi većoj otpornosti stanice i tkiva na sljedeću veću ishemiju (koja inače uzrokuje nekrozu). Smanjuje se izražaj gena koji sudjeluju u energijskome metabolizmu, transportu elektrona, staničnom ciklusu i koagulaciji u odnosu na izražaj istih gena bez prekondicioniranja.[104] S druge strane, pojačava se izražaj gena za proteine staničnog stresa (HSP, od engl. heat shock proteins). Prilagodbeni obrazac sličan IP može pokrenuti izlaganje adenozinu, bakterijskom lipopolisaharidu, izofluranu i nekim drugim tvarima.[105] Takvim reprogramiranjem genskog izražaja smanjuje se intenzitet metabolizma (metabolički zastoj), aktivnost ionskih kanala i aktivnost staničnog ciklusa, što je slično obrascu metaboličkog prigušivanja u vrijeme zimskog sna nekih sisavaca. Brojne studije na animalnim modelima pokazale su da se IP ne odnosi samo na srce već i na druga tkiva i organe koji mogu biti izloženi I/R ozljedi: skeletne mišiće, jetru, pluća, bubrege, crijevo i mozak.[106] Malobrojne su kliničke studije, no i njihovi rezultati upućuju na zaštitnu ulogu ishemijskog prekondicioniranja u slučaju I/R ozljede jetre, pluća i skeletnih mišića.[106]

Grupa stručnjaka iz Nacionalnog instituta za zdravlje Sjedinjenih Američkih Država u svom nedavnom izvještaju naglašava važnost i nužnost provođenja kontroliranih kliničkih studija koje bi provjerile spoznaje iz dosadašnjih višegodišnjih pretkliničkih i kliničkih istraživanja vezane uz zaštitu miokarda od ishemije. Oni predlažu što skorije provođenje kliničkih studija III. faze vezanih uz primjenu adenozina u akutnom infarktu miokarda i kardijalnoj kirurgiji.[107]

Mogu se očekivati slične studije i u drugim situacijama u kojima je I/R ozljeda bitna za sudbinu tkiva, organa ili cjelokupnog organizma.

Zaključak

Rana reperfuzija optimalan je postupak sprečavanja ili ublažavanja I/R ozljede. Unatoč brojnim pretkliničkim i rjeđim kliničkim istraživanjima nema drugih općenito prihvaćenih i na temelju rezultata kontroliranih kliničkih studija dokazanih postupaka kojima bi se spriječila ili umanjila I/R ozljeda.

Istraživanje mehanizama uključenih u razvoj I/R ozljede važno je kako za razumijevanje tog složenog zbivanja tako i za prepoznavanje točaka na koje bismo mogli terapijski utjecati.

S obzirom na složenost patogeneze i brojna međudjelovanja čimbenika tijekom I/R ozljede moguće je očekivati razvoj multimodalnih terapijskih postupaka koji će zahvaćati u više točaka patofiziološkog procesa.[4,14,25]

LITERATURA

1. *McCord JM*. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 1985;312:159–63.
2. *Parks DA, Bulkley GB, Granger DN*. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. Surgery 1983;94:428–32.
3. *Fink MP*. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2002;5:167–74.
4. *Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I*. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. J Exp Biol 2004;207:3221–31.
5. *Aliev G, Obrenovich ME, Seyidova D, de la Torre JC*. Exploring ischemia-induced vascular lesions and potential pharmacological intervention strategies. Histol Histopathol 2005;20:261–73.
6. *Park JL, Lucchesi BR*. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. Ann Thorac Surg 1999;68:1905–12.
7. *Quintana M, Kahan T, Hjemdahl P*. Pharmacological prevention of reperfusion injury in acute myocardial infarction. A potential role for adenosine as a therapeutic agent. Am J Cardiovasc Drugs 2004;4: 159–67.
8. *Kozuch PL, Brandt LJ*. Review article: diagnosis and management of mesenteric ischaemia with an emphasis on pharmacotherapy. Aliment Pharmacol Ther 2005;21:201–15.

9. *Defraigne JO, Pincemail J*. Local and systemic consequences of severe ischemia and reperfusion of the skeletal muscle. Physiopathology and prevention. Acta Chir Belg 1998;98:176–86.
10. *Blaisdell FW*. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. Cardiovasc Surg 2002;10:620–30.
11. *Muizelaar JP*. Cerebral ischemia-reperfusion injury after severe head injury and its possible treatment with polyethyleneglycol-superoxide dismutase. Ann Emerg Med 1993;22:1014–21.
12. *Odeh M*. The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome. N Engl J Med 1991;324:1417–22.
13. *Boyle EM Jr, Canty TG Jr, Morgan EN, Yun W, Pohlman TH, Verrier ED*. Treating myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting endothelial cell transcription. Ann Thorac Surg 1999;68:1949–53.
14. *Baines M, Shenkin A*. Use of antioxidants in surgery: a measure to reduce postoperative complications. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2002;5:665–70.
15. *Paterson IS, Klausner JM, Pugatch R i sur*. Noncardiogenic pulmonary edema after abdominal aortic aneurysm surgery. Ann Surg 1989;209: 231–6.
16. *Bown MJ, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD*. Cytokines and inflammatory pathways in the pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair. Eur J Vasc Endovasc Surg 2001; 22:485–95.
17. *Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT*. Hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Surg 2001;181:160–6.
18. *Norio K, Wikstrom M, Salmela K, Kyllonen L, Lindgren L*. Ascorbic acid against reperfusion injury in human renal transplantation. Transpl Int 2003;16:480–5.
19. *Land WG*. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. Transplantation 2005;79:505–14.
20. *Kim YI*. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2003;10:195–9.
21. *al-Qattan MM*. Ischaemia-reperfusion injury. Implications for the hand surgeon. J Hand Surg 1998;23:570–3.
22. *Gamulin S*. Poremećaji energijskog metabolizma. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, ur. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 133–53.
23. *Krvavica S, Gamulin S*. Integralna reakcija stanice na ozljedu. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, ur. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 115–23.
24. *Gamulin S.* Stanični energijski naboj i funkcija mitohondrija. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, ur. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 108–9.
25. *Hoffman JW Jr, Gilbert TB, Poston RS, Silldorff EP*. Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies. J Extra Corpor Technol 2004;36:391–411.
26. *Halliwell B*. The biological significance of oxygen-derived species. U: Valentine JS, Foote CS, Greenberg A, Liebman JF, ur. Active oxygen in biochemistry. New York: Blackie Academic & Professional; 1995, str. 313–335.
27. *McCord JM, Roy RS, Schaffer SW*. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. Adv Myocardiol 1985;5:183–9.
28. *Halliwell B, Gutteridge JMC*. Free radicals in biology and medicine. 3. izd. New York: Oxford University Press; 2001, str. 22–4.
29. *Nathan C*. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. J Clin Invest 2003;111:769–78.
30. *Allen BS*. The role of leukodepletion in limiting ischemia/reperfusion damage in the heart, lung and lower extremity. Perfusion 2002;17: 11–22.
31. *Pincemail J*. Free radicals and antioxidants in human diseases U: Favier i sur. ur. Analysis of free radicals in biological systems. Basel: Birkhauser Verlag; 1995, str. 83–98.
32. *Book WM*. Carvedilol: a nonselective beta blocking agent with antioxidant properties. Congest Heart Fail 2002;8:173–7,190.
33. *Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D*. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev 2001;53:135–59.
34. *Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M*. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. Arch Biochem Biophys 2003;420:222–36.
35. *Ratych RE, Bulkley GB*. Free-radical-mediated postischemic reperfusion injury in the kidney. J Free Radic Biol Med 1986;2:311–9.
36. *Paller MS*. Free radical-mediated postischemic injury in renal transplantation. Ren Fail 1992;14:257–60.
37. *Plestina S, Gamulin S*. Kidney ischaemia-reperfusion injury and polyribosome structure. Nephron 2001;89:201–7.
38. *Cotelle N*. Role of flavonoids in oxidative stress. Curr Top Med Chem 2001;1:569–90.
39. *Barta E, Pechan I, Cornak V, Luknarova O, Rendekova V, Verchovodko P*. Protective effect of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid against the ischemic-reperfusion injury in patients during open-heart surgery. Bratisl Lek Listy 1991;92:174–83.
40. *Dingchao H, Zhiduan Q, Liye H, Xiaodong F*. The protective effects of high-dose ascorbic acid on myocardium against reperfusion injury during and after cardiopulmonary bypass. Thorac Cardiovasc Surg 1994; 42:276–8.
41. *Lassnigg A, Punz A, Barker R i sur*. Influence of intravenous vitamin E supplementation in cardiac surgery on oxidative stress: a double-blinded, randomized, controlled study. Br J Anaesth 2003;90:148–54.
42. *Canbaz S, Duran E, Ege T, Sunar H, Cikirikcioglu M, Acipayam M*. The effects of intracoronary administration of vitamin E on myocardial ischemia-reperfusion injury during coronary artery surgery. Thorac Cardiovasc Surg 2003;51:57–61.
43. *Sochman J*. N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: what do we know and what would we like to know?! J Am Coll Cardiol 2002;39:1422–8.
44. *Polidori MC, Mecocci P, Frei B*. Plasma vitamin C levels are decreased and correlated with brain damage in patients with intracranial hemorrhage or head trauma. Stroke 2001;32:898–902.
45. *Cerwenka H, Bacher H, Werkgartner G i sur*. Antioxidant treatment during liver resection for alleviation of ischemia-reperfusion injury. Hepatogastroenterology. 1998;45:777–82.
46. *Bartels M, Biesalski HK, Engelhart K, Sendlhofer G, Rehak P, Nagel E*. Pilot study on the effect of parenteral vitamin E on ischemia and reperfusion induced liver injury: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. Clin Nutr 2004;23:1360–70.
47. *Wijnen MH, Vader Hl, Van Den Wall Bake AW, Roumen RM*. Can renal dysfunction after infra-renal aortic aneurysm repair be modified by multi-antioxidant supplementation? J Cardiovasc Surg 2002;43:483–8.
48. *Wijnen MH, Vader HL, Roumen RM*. Multi-antioxidant supplementation does not prevent an increase in gut permeability after lower torso ischemia and reperfusion in humans. Eur Surg Res 2002;34:300–5.
49. *Novelli GP, Adembri C, Gandini E i sur*. Vitamin E protects human skeletal muscle from damage during surgical ischemia-reperfusion. Am J Surg 1997;173:206–9.
50. *Filis KA, Georgopoulos SE, Papas SC, Votteas V, Bastounis EA*. Therapeutic efficacy of flavonoids in oedema following reperfusion on acutely ischaemic legs. Int Angiol 1999;18:327–30.
51. *Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC*. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. Crit Care Med 1993;21 (10 Suppl): S447–63.
52. *Ferrari R*. The role of TNF in cardiovascular disease. Pharmacol Res 1999;40:97–105.
53. *Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR*. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. J Urol 1999;162:196–203.
54. *Furuichi K, Wada T, Yokoyama H, Kobayashi KI*. Role of cytokines and chemokines in renal ischemia-reperfusion injury. Drug News Perspect 2002;15:477–482.
55. *Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL*. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. J Immunol 1990;144:2609–13.
56. *Chang MS, McNinch J, Basu R, Simonet S*. Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. J Biol Chem 1994;269:25277–82.
57. *Pober JS*. Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Physiology and pathology. Am J Pathol 1988;133:426–33.
58. *Jaeschke H, Farhood A*. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. Am J Physiol 1991; 260:G355–62.
59. *Schulz R, Aker S, Belosjorow S, Heusch G*. TNFalpha in ischemia/reperfusion injury and heart failure. Basic Res Cardiol 2004;99:8–11.
60. *Meldrum DR*. Tumor necrosis factor in the heart. Am J Physiol 1998; 274:R577–95.
61. *Ding WX, Yin XM*. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. J Cell Mol Med 2004;8:445–54.
62. *Al-Mehdi AB, Fisher AB*. Invited editorial on »tumor necrosis factor-alpha in ischemia and reperfusion injury in rat lungs«. J Appl Physiol 1998;85:2003–4.
63. *Bhatia M, Moochhala S*. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. J Pathol 2004;202: 145–56.
64. *Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP*. Oxidative stress and acute lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol 2003;29:427–31.
65. *Kovač Z, Gamulin S*. Upala – odgovor akutne faze. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, ur. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 507–14.
66. *Gabay C, Kushner I*. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 1999;340:448–54.
67. *Kovač Z, Gamulin S*. Sustavni upalni odgovor i višesustavno zatajenje organizma. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, ur. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 514–16.
68. *Abraham E, Wunderink R, Silverman H i sur*. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients

with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. JAMA 1995;273:934–41.
69. *Yoshidome H, kato A, Edwards MJ, Lentsch AB*. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. Hepatology 1999;30:203–8.
70. *Huber TS, Gaines GC, Welborn MB 3rd, Rosenberg JJ, Seeger JM, Moldawer LL*. Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. Shock 2000;13:425–34.
71. *Ghosh S, May MJ, Kopp EB*. NF-kappaB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol 1998;16:225–60.
72. *Gamulin S*. Poremećaji vjesničkih molekula i putova. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, ur. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002;69–73.
73. *Yeh CH, Lin YM, Wu YC, Lin PJ*. Inhibition of NF-kappaB activation can attenuate ischemia/reperfusion-induced contractility impairment via decreasing cardiomyocytic proinflammatory gene up-regulation and matrix metalloproteinase expression. J Cardiovasc Pharmacol 2005;45: 301–9.
74. *Brown M, McGuinness M, Wright T i sur*. Cardiac-specific blockade of NF-škappaćB in cardiac pathophysiology: differences between acute and chronic stimuli in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 289:H466–76.
75. *Luedde T, Assmus U, Wustefeld T i sur*. Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury. J Clin Invest 2005;115:849–59.
76. *Souza DG, Vieira AT, Pinho V i sur*. NF-kappaB plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. Br J Pharmacol 2005;145:246–54.
77. *Acosta J, Qin X, Halperin J*. Complement and complement regulatory proteins as potential molecular targets for vascular diseases. Curr Pharm Des 2004;10:203–11.
78. *Zhou W, Farrar CA, Abe K i sur*. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. J Clin Invest. 2000;105:1363–71.
79. *Pemberton M, Anderson G, Vetvicka V, Justus DE, Ross GD*. Microvascular effects of complement blockade with soluble recombinant CR1 on ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle. J Immunol 1993;150:5104–13.
80. *Murohara T, Guo JP, Delyani JA, Lefer AM*. Cardioprotective effects of selective inhibition of the two complement activation pathways in myocardial ischemia and reperfusion injury. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1995;17:499–507.
81. *Collard CD, Montalto MC, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL*. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1. Am J Pathol 2001;159:1045–54.
82. *Kilgore KS, Friedrichs GS, Homeister JW, Lucchesi BR*. The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury. Cardiovasc Res 1994;28:437–44.
83. *Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM*. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. Shock 2004;21:401–9.
84. *Arumugam TV, Shiels IA, Strachan AJ, Abbenante G, Fairlie DP, Taylor SM*. A small molecule C5a receptor antagonist protects kidneys from ischemia/reperfusion injury in rats. Kidney Int 2003;63:134–42.
85. *Arumugam TV, Woodruff TM, Stocks SZ i sur*. Protective effect of a human C5a receptor antagonist against hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. J Hepatol 2004;40:934–41.
86. *Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Tylor SM*. Protective effects of a potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia-reperfusion in rats. J Surg Res 2004;116:81–90.
87. *Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Reid RC Fairlie DP, Tylor SM*. Protective effect of a new C5a receptor antagonist against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. J Surg Res 2002; 103:260–7.
88. *de Zwaan C, Kleine AH, Diris JH i sur*. Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. Eur Heart J 2002;23:1670–7.
89. *Patel MR, Granger CB*. Pexelizumab: a novel therapy for myocardial ischemia-reperfusion. Drugs Today 2005;41:165–70.
90. *Grace PA*. Ischaemia-reperfusion injury. Br J Surg 1994;81:637–47.
91. *Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P*. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 1991;18:38–43.
92. *Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A*. Contribution of endogenous endothelin to the extension of myocardial infarct size in rats. Circ Res 1991;69:370–7.
93. *Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, Tomoda F, Furukawa K*. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. Hepatology 1995;21:1138–43.
94. *Hur GM, Ryu YS, Yun HY i sur*. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. Biochem Biophys Res Commun 1999;261:917–22.
95. *Scommotau S, Uhlmann D, Loffler BM, Breu V, Spiegel HU*. Involvement of endothelin/nitric oxide balance in hepatic ischemia/reperfusion injury. Langenbecks Arch Surg 1999;384:65–70.
96. *Koeppel TA, Thies JC, Schemmer P i sur*. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. J Hepatol 1997;27:163–9.
97. *Stephanou A*. Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. J Cell Mol Med 2004;8:519–25.
98. *Reed JC*. Apoptosis mechanisms: implications for cancer drug discovery. Oncology 2004;18 (13 Suppl 10):11–20.
99. *Thornberry NA, Lazebnik Y*. Caspases: enemies within. Science 1998; 281:1312–6.
100. *Philchenkov A*. Caspases: potential targets for regulating cell death. J Cell Mol Med 2004;8:432–44.
101. *Townsend PA, Scarabelli TM, Pasini E i sur*. Epigallocatechin-3-gallate inhibits STAT-1 activation and protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-induced apoptosis. FASEB J 2004;18:1621–3.
102. *Force T, Kuida K, Namchuk M, Parang K, Kyriakis JM*. Inhibitors of protein kinase signaling pathways: emerging therapies for cardiovascular disease. Circulation 2004;109:1196–205.
103. *Murry CE, Jennings RB, Reimer KA*. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986; 74:1124–36.
104. *Stenzel-Poore MP, Stevens SL, Xiong Z i sur*. Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. Lancet 2003;362:1028–37.
105. *Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC*. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. Anesthesiology 1997;87:361–70.
106. *Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S*. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. Eur J Vasc Endovasc Surg 2005;29:106–15.
107. *Bolli R, Becker L, Gross G i sur*. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. Circ Res 2004; 95:125–34.