

## مقایسه اثرات ایسکمیک پره کاندیشنینگ با فارماکولوژیک پره کاندیشنینگ ناشی از مصرف ال - کارنیتین بر روی اندازه انفارکت متعاقب ایسکمی - پرفیوژن مجدد در قلب ایزوله موش صحرائی

\*<sup>۱</sup> مسلم نجفی،<sup>۲</sup> علیرضا گرجانی،<sup>۳</sup> طاهره اعتراف اسکویی

### چکیده

#### هدف

ایسکمیک پره کاندیشنینگ (Ischemic Preconditioning, I/P) پدیده ای است که در طی آن دوره های کوتاه مدت ایسکمی موجب محافظت قلب در مقابل آسیب های ناشی از ایسکمی طولانی می گردد. کارنیتین نیز به عنوان یک ماده بیولوژیک در انتقال اسیدهای چرب به داخل میوسیت ها و تولید انرژی مورد نیاز قلب شناخته شده است. در این مطالعه، اثرات IP و فارماکولوژیک پره کاندیشنینگ (Preconditioning, Pharmacologic, P/P) ناشی از مصرف ال-کارنیتین (L-Car) بر روی اندازه انفارکت متعاقب ایسکمی - پرفیوژن مجدد (Ischemia-Reperfusion, I/R) در قلب ایزوله موش صحرائی بررسی و مقایسه شده است.

#### مواد و روش کار

موش های صحرائی نر (۳۳۰-۲۷۰ گرم) به صورت تصادفی، در یکی از گروه های کنترل، IP و سه گروه PP تحت درمان با L-Car، تقسیم شده و بعد از بیهوشی، قلب آنها به سرعت ایزوله و با اتصال به دستگاه لانگندورف، با محلول کربس کاربوژن دار با فشار ثابت تغذیه شدند. گروه کنترل و IP در طول زمان تثبیت و نیز ۳۰ دقیقه ایسکمی ناحیه ای و ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن مجدد محلول کربس معمولی دریافت داشتند ولی به محلول کربس گروه های PP در طی ۱۰ دقیقه قبل از ایسکمی تا ۱۰ دقیقه بعد از آن، به ترتیب غلظت های ۰/۵، ۲/۵ و ۵ میلی مول L-Car افزوده شد. پس از اتمام پرفیوژن مجدد، قلب موش ها با اوانس بلو رنگ آمیزی و به چند قطعه بریده شدند و با تری فنیل تترازیلیوم کلراید مجاور و در فرمالین ثابت شدند. سپس اندازه نواحی انفارکت با روش پلانیمتری اندازه گیری شد.

#### نتایج

نتایج این مطالعه نشان داد که IP و PP هر دو موجب کاهش کاملاً معنی دار در وسعت ناحیه انفارکت در مقایسه با گروه کنترل می شوند. درصد ناحیه انفارکت در گروه کنترل  $46/3 \pm 2/9$  درصد بود اما در گروه IP به  $22/2 \pm 2/7$  درصد و در گروه های PP تحت درمان با غلظت های ۰/۵، ۲/۵ و ۵ میلی مول L-Car به ترتیب به  $25/9 \pm 3/0$ ،  $19/3 \pm 1/7$  و  $17/2 \pm 1/5$  درصد کاهش یافتند ( $p < 0/001$ ). درصد ناحیه انفارکت در قلب ایزوله موش های صحرائی بین گروه های PP با یکدیگر و همچنین با گروه IP، تفاوت آماری معنی داری نشان نداد.

#### نتیجه گیری

این مطالعه، وجود اثرات محافظتی IP و L-Car را به عنوان یک عامل ایجادکننده PP، علیه آسیب های ایسکمیک قلب و کاهش اندازه انفارکت در طی I/R، نشان داد.

**کلمات کلیدی:** پره کاندیشنینگ، ال - کارنیتین، ایسکمی، پرفیوژن مجدد، اندازه انفارکت، قلب ایزوله.

۱-۲- استادیار فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

\* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۷۲۲۵۰، فاکس: ۰۴۱۱-۳۳۴۴۷۹۸، najafimoslem@yahoo.com

۳- رزیدنت فارماکولوژی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

## مقدمه

کاهش تولید ATP مورد نیاز میوکارد، اختلال در نقل و انتقال یون ها، تولید پیک های ثانویه لیپیدی متعدد در طی ایسکمی - پرفیوژن مجدد (Ischemia-Reperfusion, I/R) و در نهایت شروع فرآیند مرگ سلولی همراه است (۱۱، ۱۴-۱۶) و تجویز داروهایی نظیر L-Car با مکانیسم هایی که هنوز به خوبی شناخته نشده اند موجب حفظ متابولیسم و بهبود عملکرد قلب در این شرایط می شود (۱۱، ۱۴). در مطالعه حاضر، L-Car به عنوان یک عامل ایجاد کننده PP و جهت تقلید اثرات IP، به صورت پیشگیرانه در قلب ایزوله موش صحرائی مصرف شده و اثرات آن بر روی اندازه انفارکت متعاقب I/R تعیین شده و با عملکرد IP مقایسه گردید.

## مواد و روش کار

**مواد:** L-Car (شرکت سیگما)، بنتو باربیتال سدیم (شرکت کلا بلژیک)، اوانس بلو و تری فنیل تترازولیوم کلراید و مواد به کار رفته در تهیه محلول کربس شامل: کلرید سدیم، بیکربنات سدیم، کلرید پتاسیم، سولفات منیزیم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، D- گلوکز و کلرید کلسیم (شرکت مرک).

**حیوانات:** موش های صحرائی نر آلبنو از نژاد Sprague Dawley با محدوده وزنی ۲۷۰-۳۳۰ گرم در گروه های ۶ تایی در قفس های پلی اتیلنی شفاف استاندارد در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی در دمای معمول آزمایشگاه (۲۲±۳ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند و تا زمان انجام آزمایش آزادانه به آب و غذای کافی دسترسی داشتند.

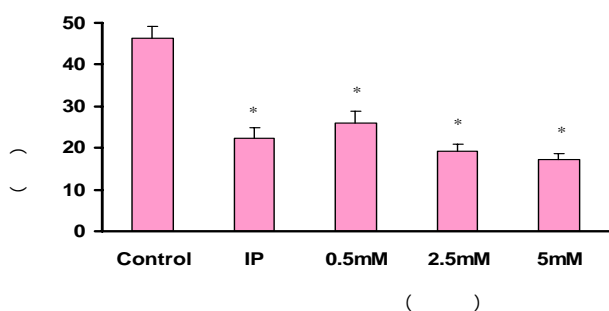
### روش انجام مطالعه

موش ها به صورت تصادفی به ۵ گروه ۶ عددی (شامل یک گروه کنترل، یک گروه IP و سه گروه تحت درمان با غلظت های مختلف L-Car به عنوان گروه های PP تقسیم شده و بعد از بیهوشی با بنتو باربیتال سدیم (۵۰ mg/kg-ip) قلب آنها به سرعت ایزوله شد و پس از اتصال به دستگاه

ایسکمیک پره کاندیشنینگ پدیده ای است که در طی آن دوره های کوتاه مدت و گذرای ایسکمی، سلول های قلب را در مقابل آسیب های ناشی از ایسکمی طولانی مدت محافظت می کنند. هرچند مکانیسم دقیق این پدیده معلوم نیست ولی باز شدن کانال های پتاسیمی وابسته به ATP در میتوکندری ها از عوامل اصلی دخیل در اثرات محافظتی آن ذکر شده است (۱-۳). برخی از مطالعات نیز اثرات محافظتی آن را در برابر آریتمی ها و اندازه انفارکت نشان داده اند (۶-۴). با وجود اثرات محافظتی پدیده IP، پیاده کردن عملی آن در بیماران مبتلا به اختلالات ایسکمیک قلب به منظور بهره برداری درمانی به سهولت امکان پذیر نیست و لذا امروزه جهت تقلید اثرات IP، مصرف پیشگیرانه عوامل فارماکولوژیک که اصطلاحاً فارماکولوژیک پره کاندیشنینگ نامیده می شود مورد توجه محققان است. تجویز موادی مانند گلوکز، رانولازین، اتوموکسیر، تریمتازیدین و حتی آدنوزین و (Tumor TNF $\alpha$  (necrosis factor alpha در این زمینه مطرح می باشند (۷-۱۰). در همین راستا کاربرد ال-کارنیتین (L-Car) و ترکیبات مشابه نظیر استیل کارنیتین نیز، مورد توجه قرار گرفته است. مهم ترین نقش کارنیتین به عنوان یک ماده بیولوژیک طبیعی، تسهیل اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره دراز برای تولید انرژی مورد نیاز قلب و برخی از بافت های دیگر است (۱۱). کارنیتین به شکل L-Car به عنوان یک فرآورده دارویی نیز کاربردهای بالینی متعددی دارد که تعدادی از آنها عبارتند از: اصلاح کمبود کارنیتین در بیماران مبتلا به سندرم خستگی مزمن، بیماران دیالیزی (درمان Post dialysis syndrome)، افزایش تحمل به ورزش در بیماران مبتلا به آئزین صدری، اصلاح ضعف عضلانی و کندی رشد و اختلال در مهارت های حرکتی کودکان و نوزادان نارس، درمان مسمومیت با آنتراسیکلین ها و والپروات سدیم (۱۲، ۱۳). ایسکمی قلبی با تجمع متابولیت های سمی اسیدهای چرب،

## نتایج

نتایج مربوط به اثرات IP و هر یک از گروه های PP بر روی حجم ناحیه در معرض خطر (Risk Zone)، حجم ناحیه انفارکته و درصد اندازه انفارکت در قلب ایزوله موش های صحرائی در جدول ۱ خلاصه شده اند. همان گونه که در جدول ۱ و نمودار ۱ نیز دیده می شود IP موجب کاهش کاملاً معنی داری در اندازه انفارکت در قلب ایزوله موش های صحرائی در مقایسه با گروه کنترل می گردد. درصد ناحیه انفارکته در گروه کنترل  $46/3 \pm 2/9$  درصد بود اما در گروه IP به  $22/2 \pm 2/7$  درصد کاهش یافت ( $p < 0/001$ ). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که PP ناشی از افزودن L-Car به داخل محلول کربس در طی ۱۰ دقیقه قبل از ایسکمی تا ۱۰ دقیقه بعد از آن، موجب کاهش قابل توجه و کاملاً معنی دار در وسعت ناحیه انفارکته در قلب ایزوله موش های صحرائی گروه های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل می شود ( $p < 0/001$ ). درصد ناحیه انفارکته در قلب ایزوله موش هایی که غلظت های  $0/5$ ،  $2/5$  و  $5$  میلی مول L-Car را دریافت داشته بودند، به ترتیب به  $25/9 \pm 3/0$  درصد،  $19/3 \pm 1/7$  درصد و  $17/2 \pm 1/5$  درصد کاهش یافت (شکل ۱).



نمودار ۱: مقایسه اثرات ایسکمیک پره کاندیشنینگ (IP) و فارماکولوژیک پره کاندیشنینگ ناشی از مصرف غلظت های  $0/5$ ،  $2/5$  و  $5$  میلی مول ال- کارنیتین با گروه کنترل بر روی اندازه انفارکت متعاقب ۳۰ دقیقه ایسکمی و ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن مجدد در قلب ایزوله موش های صحرائی. داده به صورت Mean±SEM بیان شده اند. (تعداد موش در هر گروه = ۶ رأس).  $p < 0/001$  \* در مقایسه با کنترل.

لانگندورف، جریان محلول کربس ( $pH = 7/4$ ) محتوی گاز کاربوژن ( $95\%$  اکسیژن و  $5\%$  دی اکسید کربن) با فشار ثابت و دمای  $37$  درجه سانتی گراد برقرار شد. محلول کربس به کار رفته در این مطالعه محتوی مواد زیر برحسب میلی مول بر لیتر بود (۱۷): کلرید سدیم ( $118/5$ )، بیکربنات سدیم ( $25$ )، کلرید کلسیم ( $1/7$ )، سولفات منیزیم ( $1/2$ )، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ( $1/2$ )، گلوکز ( $12$ ) و کلرید پتاسیم ( $4/8$ ). برای ایجاد ایسکمی ناحیه ای، یک نخ بخیه به دور شریان کرونر نزولی چپ قلب به صورت موقت گره زده شد و پس از ۳۰ دقیقه ایسکمی، گره باز شده و به مدت ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن مجدد، انجام گرفت. همچنین برای ایجاد IP در قلب، ۲ بار ایسکمی کوتاه مدت هر یک به مدت ۵ دقیقه و سپس ۵ دقیقه پرفیوژن مجدد قبل از القای ۳۰ دقیقه ایسکمی ناحیه ای ایجاد شد (۱۸).

موش های صحرائی گروه کنترل و IP در طول زمان تثبیت و نیز ۳۰ دقیقه ایسکمی ناحیه ای و ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن مجدد، محلول کربس معمولی دریافت داشته درحالی که محلول کربس گروه های PP از ۱۰ دقیقه قبل از ایسکمی تا ۱۰ دقیقه بعد از آن، حاوی غلظت های  $0/5$ ،  $2/5$  و  $5$  میلی مول L-Car بود. با اتمام پرفیوژن مجدد، قلب موش ها با محلول  $1\%$  Evans Blue رنگ آمیزی شده و به چند قطعه بریده شدند و بلافاصله با محلول  $1\%$  تری فنیل تترازولیوم کلراید مجاور و در فرمالین ثابت شدند. با این رنگ آمیزی، نواحی انفارکته به صورت رنگ پریده و نواحی غیر انفارکته به رنگ قرمز آجری دیده می شوند (۱۹). در نهایت اندازه و درصد نواحی انفارکته و نواحی غیر انفارکته با روش پلانیمتری و نرم افزار Land Calc (شرکت آلدکس - انگلستان) اندازه گیری شد (۱۷).

**آنالیز آماری:** کلیه داده ها به صورت Mean±SEM بیان شده و تفاوت بین هر یک از گروه های PP (تحت درمان با L-Car) و گروه IP با گروه کنترل با آزمون آماری Unpaired T-test و تفاوت بین گروه های سه گانه PP با یکدیگر با ANOVA یکطرفه (با پس آزمون LSD) بررسی شدند. مقادیر  $p < 0/05$  معنی دار تلقی گردید.

خطر (Risk Zone) آن ها نیز برای کلیه گروه ها با یکدیگر مقایسه گردید که در این مورد هم تفاوت آماری معنی داری مشاهده نشد (جدول ۱).

مقایسه درصد ناحیه انفارکته قلب ایزوله موش ها در گروه های PP با یکدیگر و همچنین با گروه IP تفاوت آماری معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ). برای حصول اطمینان از یکنواختی القای ایسکمی ناحیه ای، وسعت ناحیه در معرض

جدول ۱: اثرات ایسکمیک پره کاندیشنینگ (IP) و فارماکولوژیک پره کاندیشنینگ ناشی از مصرف ۰/۵، ۲/۵ و ۵ میلی مول ال- کارنتین (L-Car) بر روی حجم ناحیه در معرض خطر (Risk zone volume)، حجم ناحیه انفارکته (Infarcted volume) و درصد اندازه انفارکت (Infarct size) در قلب ایزوله موش های صحرایی متعاقب ۳۰ دقیقه ایسکمی و ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن مجدد.

گروه	تعداد	حجم ناحیه در معرض خطر (mm <sup>۳</sup> )	حجم ناحیه انفارکته (mm <sup>۳</sup> )	اندازه انفارکت (%)
کنترل	۶	۴۷۴/۹±۳۹/۱	۲۱۴/۸±۱۷/۸	۴۶/۳±۲/۹
ایسکمی پره کاندیشنینگ	۶	۵۲۸/۹±۵۱/۳	۱۲۶/۹±۱۶/۳*	۲۲/۲±۲/۷*
ال-کارنتین (۰/۵ mM)	۶	۴۸۵/۳±۴۰/۳	۱۲۴/۷±۱۵/۸*	۲۵/۹±۳/۰*
ال-کارنتین (۲/۵ mM)	۶	۴۸۷/۷±۲۹/۴	۹۱/۸±۵/۵*	۱۹/۳±۱/۷*
ال-کارنتین (۵ mM)	۶	۴۴۱/۶±۴۴/۱	۸۰/۰±۶/۴*	۱۷/۲±۱/۵*

داده ها به صورت Mean±SEM بیان شده اند. \* $p < 0/001$  در مقایسه با کنترل

معنی دار ( $p < 0/001$ ) در وسعت ناحیه انفارکته در قلب ایزوله موش های صحرایی می گردد (۲۰). همچنین Cui و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که تجویز ۵ میلی مول L-Car قبل از القای ایسکمی کامل (Global Ischemia)، موجب کاهش اندازه انفارکت و مهار مرگ سلولی در قلب ایسکمیک موش های صحرایی شده است (۲۱). با وجود تفاوت های اساسی در روش کار از جمله زمان و طول مدت مصرف دارو و همچنین نوع ایسکمی، نتایج حاصل از مصرف L-Car به صورت PP در مطالعه حاضر، با یافته های قبلی نویسنده و همچنین با نتایج حاصل از مصرف قبل از ایسکمی غلظت ۵ میلی مول دارو در مطالعه Cui و همکاران مشابه است (۲۰)، (۲۱). به دنبال ایسکمی، ذخایر کارنتین قلب کاهش یافته و تجمع متابولیت های سمی اسیدهای چرب در قلب از جمله: Acyl-Carnitine, Acyl-CoA, beta-hydroxy fatty acid intermediates مشاهده می شود.

## بحث و نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که PP ناشی از مصرف کوتاه مدت غلظت های ۰/۵، ۲/۵ و ۵ میلی مول L-Car در طی ۱۰ دقیقه قبل از ایسکمی تا ۱۰ دقیقه بعد از آن، موجب کاهش کاملاً معنی داری در اندازه انفارکت در قلب ایزوله موش های صحرایی گروه های دریافت کننده دارو در مقایسه با گروه کنترل می شود. مقایسه درصد ناحیه انفارکته در گروه های PP با یکدیگر تفاوت آماری معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ) به طوری که کلیه غلظت های به کار رفته دارو تقریباً به یک اندازه و بدون اختلاف فاحش در کاهش اندازه انفارکت موثر بودند. یافته های مطالعه قبلی نویسنده نیز که در طی آن L-Car در طی پروتکل آزمایشی کاملاً متفاوتی به مدت ۱۵۰ دقیقه و در همه مدت زمان ایسکمی (۳۰ دقیقه) و پرفیوژن مجدد (۱۲۰ دقیقه) به قلب پرفیوژن شد حاکی از آن بود که L-Car به صورت وابسته به غلظت موجب کاهش

از سوی دیگر نتایج این مطالعه، حاکی از آن است که ایجاد IP اثرات محافظتی برجسته و معنی داری در کاهش اندازه انفارکت قلب ایزوله موش های صحرایی داشته و با اثرات گزارش شده گذشته که مربوط به این پدیده است مطابقت دارد (۴-۶). مقایسه اثرات محافظتی IP با گروه های PP بر کاهش درصد ناحیه انفارکته، تفاوتی نشان نداد به این معنی که هر دو تقریباً به یک میزان و بدون وجود اختلاف معنی داری در کاهش اندازه انفارکت موثر بودند.

با وجود مطالعات نسبتاً فراوان در سال های اخیر، مکانیسم محافظتی دقیق پدیده IP به درستی معلوم نیست ولی مهم ترین مکانیسم های پیشنهاد شده مربوط به نقش داشتن مواد درون زادی مانند آدنوزین، برادی کینین، کاتکول آمین ها و اپیوئیدهاست به صورتی که این مواد با فعال کردن گیرنده های متصل شونده به آنزیم پروتئین کیناز C موجب شروع فعالیت مسیرهای پیام رسانی (Signaling) تیروزین کینازی و سپس فعالیت c-Jun-N-terminal kinases (JNK) و در نهایت فسفریلاسیون کانال های پتاسیمی وابسته به ATP در میتوکندری ها می گردند و به نظر می رسد که باز شدن این کانال ها از عوامل اصلی دخیل در اثرات محافظتی IP باشند (۱-۳). همچنین گزارش شده که اثرات محافظتی IP به دنبال I/R ممکن است ناشی از ایجاد تغییرات عملکردی، متابولیک و یا یونی در زمان پرفیوژن مجدد باشد (۲). به علاوه، یکی از علل پیشنهاد شده دیگر ایجاد اثرات محافظتی IP، آزاد شدن رادیکال های آزاد اکسیژن است که عوامل به دام اندازنده این مولکول ها موجب مهار شدن این اثرات محافظتی می گردند (۳). در مجموع، نتایج حاصل از این مطالعه وجود اثرات محافظتی IP و PP ناشی از مصرف L-Car در برابر آسیب های ایسکمیک قلب را به صورت کاهش اندازه انفارکت در قلب ایزوله نشان داد بدون آن که تفاوت آماری معنی داری بین اثرات محافظتی آن ها وجود داشته باشد.

نتایج حاصله می تواند به عنوان یک گام به جلو جهت مشخص نمودن جایگاه مصرف پیشگیرانه L-Car در شرایط

متابولیت های مذکور موجب آسیب غشا و آنزیم های متصل به آن شده و انتقال یون ها از غشا را مختل می کنند. فعال شدن مسیرهای پیام رسانی و پیک های ثانویه لیپیدی هم پس از آن منجر به فعال شدن پروتئین کینازها و در نتیجه نسخه برداری ژنی و شروع فرآیند مرگ سلولی می گردند (۱۱، ۱۴، ۱۶).

Yamada و همکاران نشان دادند که مولکول های با زنجیره دراز آسپیل کارنیتین در بافت های ایسکمیک تجمع یافته و به غشای اجزای داخل سیتوزول نظیر رتیکولوم سارکوپلاسمیک متصل می شوند که این امر منجر به افزایش غلظت یون های کلسیم و سدیم داخل سلولی شده و به دنبال اختلالات انقباضی و الکتروفیزیولوژیک میوکارد به وجود می آید (۲۲). در مطالعات حیوانی، مصرف L-Car موجب کاهش اتلاف فسفات های پر انرژی بدن در طی دوره های ایسکمی و کاهش نکرور بافتی و حفظ عملکرد میتوکندری ها و عملکرد مکانیکی و الکتروفیزیولوژیک قلب شده است. در مقایسه با مطالعات حیوانی، مطالعات بالینی اندکی در این رابطه صورت گرفته است.

برخی از این مطالعات بالینی، نشانگر تاثیرات مثبت L-Car در بهبود اعمال فیزیولوژیک و متابولیک در بیماران مبتلا به اسپاسم حاد کرونری می باشد (۲۱). مصرف L-Car در شرایط ایسکمی موجب حفظ متابولیسم و عملکرد قلب با مکانیسم های ناشناخته ای می گردد. برخی از مکانیسم های پیشنهاد شده برای این اثرات، عبارتند از:

افزایش اکسیداسیون گلوکز، برقراری و حفظ تعادل بین اکسیداسیون اسیدهای چرب و گلوکز در قلب، کاهش اثرات سمی آسپیل-کوآ با زنجیره طولانی و آسپیل کارنیتین در میوکارد، مهار اثرات مضر رادیکال های آزاد اکسیژن که در طی پرفیوژن مجدد آزاد می گردند و مقاوم سازی سلول های قلبی در برابر آسیب های I/R (با تثبیت غشای سلول های قلب). شاید مجموعه ای از مکانیسم های احتمالی فوق در ایجاد اثرات محافظت قلبی L-Car نقش داشته باشند (۱۱، ۲۰، ۱۴).

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در تامین هزینه های مالی اجرای این پژوهش سپاسگزاری می نماید.

آسیب های ایسکمیک قلب محسوب شود. با انجام دادن آزمایشهای بعدی در حیوانات آزمایشگاهی به ویژه در شرایط *In vivo* و سپس در بیماران، اثرات دقیق تر و مکانیسم های دخیل در این اثرات محافظتی بهتر شناسائی خواهند شد.

## References

1. Ghosh S, Standen BN, Galinanes M. Failure to precondition pathological human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 37: 711–718.
2. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Rodriguez-Sinovas A, Mirabet M. Gap junction-mediated intercellular communication in ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 456–465.
3. Yue Y, Qin Q, Cohen VM, Downey MJ, Critza DS. The relative order of mK channels, free radicals and p38 MAPK in ATP preconditioning's protective pathway in rat heart. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 681–689.
4. Smith MR, Suleman N, McCarthy J, Sack NM. Classic ischemic but not pharmacologic preconditioning is abrogated following genetic ablation of the TNF $\alpha$  gene. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 553–560.
5. Dernek S, Ikizler M, Uyguc O, Alatas O, Kural T. The effectiveness of ischemic preconditioning on myocardial protection and comparison with cardioplegia. *Cardiovasc Surg* 2000; 8: 466–473.
6. Domenech R, Macho P, Schwarze H, Sanchez G. Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 561–566.
7. Lee L, Horowitz J, Frenneaux M. Metabolic manipulation in ischaemic heart disease, a novel approach to treatment. *Eur Heart J* 2004; 25: 634–641.
8. Essop MF, Opie LH. Metabolic therapy for heart failure. *Eur Heart J* 2004; 25: 1765–1768.
9. Fryer MR, Auchampach AJ, Gross JG., Therapeutic receptor targets of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 520–525
10. Smith MR, Suleman N, McCarthy J, Sack NM. Classic ischemic but not pharmacologic preconditioning is abrogated following genetic ablation of the TNF $\alpha$  gene. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 553- 560.
11. Lango R, Smolenski RT, Narkiewicz M, Suchorzewska J, Lysiak-Szydłowska W. Influence of L-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and function in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 21–29.
12. Martindale. The Extra Pharmacopoeia, Carnitine. London & Chicago: Pharmaceutical Press; 2002. 1356.
13. Furlong HJ. Acetyl-L-Carnitine: Metabolism and Applications in Clinical Practice, *Altern. Med Rev* 1996; 1: 85-93.
14. Calvani M, Reda E, Arrigoni-Martelli E. Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: 75-83.
15. Suleiman MS, Halestrab AP, Griffithsa EJ. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 2001; 89: 29- 46.
16. Morin D, Hauet T, Spedding M, Tillement JP. Mitochondria as target for antiischemic drugs, *Adv Drug Del Rev* 2001; 49: 151–174.
17. Hausenloy JD, Maddock LH, Baxter FG, Yellon MD. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 534-543.
18. De Jonge R, Out M, Maas JW, De Jong WJ. Preconditioning of rat hearts by adenosine A<sub>1</sub> or A<sub>3</sub> receptor activation. *Eur J Pharmacol* 2002; 441: 165-172.
19. Zacharowski K, Blackburn B, Thiemeermann C. Ranolazine. A partial fatty acid oxidation inhibitor reduces myocardial infarct size and cardiac troponin T release in the rat. *Eur J Pharmacol* 2001; 418: 105-110.
20. Najafi M, Garjani A. Study the effect of L-carnitine on infarct size in the ischemic-reperfused isolated rat hearts. *Pharm Sci J* 2005;1: 47-52.
21. Cui J, Das KD, Bertelli A, Tosaki A. Effects of L-carnitine and its derivatives on post ischemic cardiac function, ventricular fibrillation and necrotic and apoptotic cardiomyocyte death in isolated rat hearts. *Mol Cell Biochem* 2003; 254: 227–234.
22. Yamada KA, Kanter EM, Newatia A. Long-chain acylcarnitine induces Ca<sup>2+</sup> efflux from the sarcoplasmic reticulum. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 14–21.