

实验技术

模拟在体心脏缺血-再灌注损伤的离体心脏模型

焦博, 张琳, 余立群, 卢元明, 岳志杰, 余志斌*

第四军医大学航空航天医学教育部重点实验室, 航空航天生理学教研室, 西安 710032

摘要: 本研究旨在比较在体与各种离体心脏缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, I-R)模型心肌损伤程度, 以选择能够较好地模拟在体模型的离体I-R模型。Sprague-Dawley (SD)大鼠随机分为4组进行处理: 在体模型组、Langendorff模型组、电刺激Langendorff模型组、工作心脏模型组, 结扎各组大鼠心脏冠状动脉左前降支60 min, 松开结扎行再灌注120 min, 用压力传感器和TTC/Evans blue双染色法分别检测各模型心脏功能与心肌梗死面积的变化。结果显示, I-R期间Langendorff模型和工作心脏模型心率显著低于在体模型。离体工作心脏、Langendorff与电刺激(300次/min) Langendorff模型组冠脉流量在结扎后下降均大于40%, 再灌注期各组冠脉流量均回升。3种离体模型左心室收缩末期压力(left ventricular end-systolic pressure, LVESP)在缺血期均降低, 再灌注期部分恢复。3种离体模型左心室舒张末期压力(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)在缺血期均升高, 工作心脏模型明显高于Langendorff模型; 在再灌注期工作心脏模型LVEDP缓慢下降, 而Langendorff与电刺激Langendorff模型组LVEDP在再灌注即刻呈现短暂的升高峰, 然后降低。在体心脏I-R模型左室心肌梗死面积为(60.4 ± 5.4)%, 离体工作心脏与Langendorff模型的梗死面积显著低于在体模型, 而电刺激Langendorff心脏I-R模型的心肌梗死面积与在体模型无显著性差别。以上结果提示, 电刺激维持心率300次/min的Langendorff心脏I-R模型可模拟在体心脏I-R模型的心肌损伤程度。

关键词: 大鼠; 心脏; 缺血-再灌注损伤; 相似性

中图分类号: R337.2

In vitro heart models simulating *in vivo* cardiac ischemia-reperfusion injury

JIAO Bo, ZHANG Lin, YU Li-Qun, LU Yuan-Ming, YUE Zhi-Jie, YU Zhi-Bin*

Key Laboratory of Aerospace Medicine, Ministry of Education; Department of Aerospace Physiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: The aim of this study was to compare *in vivo* and several *in vitro* cardiac ischemia-reperfusion (I-R) myocardial injury models, and choose a superior *in vitro* cardiac I-R model. Sprague-Dawley (SD) rats were randomly grouped into *in vivo*, Langendorff, Langendorff + pacing, and working heart groups. Left anterior descending (LAD) coronary artery was ligated for 60 min and then reperfused for 120 min in *in vivo* and *in vitro* rat hearts. Cardiac function and myocardial infarct size were measured by using pressure transducer and TTC/Evans blue double staining, respectively. The results showed that heart rate was greater in *in vivo* model than those in the three *in vitro* models. Coronary flows were dropped after LAD ligation and could recover at early phase of releasing LAD ligation in I-R models of the isolated working heart, Langendorff and Langendorff with 300 beats/min of electrical stimulation. Left ventricular end-systolic pressure (LVESP) decreased during ischemia, and partially restored during reperfusion in the three *in vitro* models. Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) increased during ischemia in the three *in vitro* models. LVEDP was significantly higher in the isolated working heart than those in Langendorff models during ischemia, whereafter decreased slowly during reperfusion. LVEDP elevated further in the initiation of reperfusion period and then decreased, but did not recover to normal levels during reperfusion in Langendorff and Langendorff + pacing groups. Left ventricular myocardial infarct size was (60.4 ± 5.4)% in *in vivo* I-R model, which was significantly higher than that in Langendorff model and the isolated working heart. Notably, there was no significant difference in myocardial infarct size between *in vivo* model and Langendorff model with electrical stimulation. These results suggest that Langendorff I-R model with 300 beats/min of electrical stimulation can simulate the *in vivo* I-R myocardial injury.

Key words: rat; heart; ischemia-reperfusion injury; similarity

Received 2013-07-13 Accepted 2013-09-17

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31071044).

*Corresponding author. Tel: +86-29-84774807; E-mail: yuzhib@fmmu.edu.cn

缺血性心肌损伤是导致心力衰竭的主要病因之一。因此,已建立许多大动物模型模拟急性缺血-再灌注心脏损伤^[1]。由于大鼠代谢率高,心肌坏死、愈合与重塑发生较快,缩短观测的时间。加之大鼠冠状动脉侧支循环较少或者完全缺乏,与人心脏相似,且大鼠价格低廉,故多采用结扎大鼠心脏冠状动脉左前降支(left anterior descending, LAD)的缺血-再灌注模型^[2]。由于大鼠在体缺血-再灌注模型的心脏位于原位,血液的循环与灌注为生理状态,故大部分研究采用这一模型。但是,在体模型也存在明显不足:一是神经-体液等因素干扰;二是死亡率较高,手术24 h后因人工呼吸和开胸术等手术损伤、气胸与心衰引发肺水肿,导致40%~60%的死亡率。而术后48 h内,因恶性心律失常引起65%的死亡率。在术后的恢复期,当心肌梗死面积小于20%时,死亡率达50%;梗死面积介于20%至40%之间,死亡率达70%;梗死面积介于40%至65%,死亡率达85%;当梗死面积大于65%时,死亡率高达100%^[3];三是不能精确的确定结扎部位,加之大鼠心脏冠状动脉存在变异性,使心肌梗死面积变异较大,梗死面积从最小4%到最大65%^[4],正是由于心肌梗死面积的变异性大,使药物或其它因素干预处理后,难以判定干预因素减少心肌梗死面积的效果;四是心率、应激程度与心脏的前后负荷等影响梗死面积的一些重要因素难以控制,也影响心肌梗死面积的大小,加之结扎线松动不易被察觉,也导致心肌梗死面积变异较大。而离体模型不受神经体液的调节,易操作和可重复性较好,故越来越多的研究采用这类模型开展研究。大鼠心肌缺血-再灌注离体模型包括Langendorff模式和工作心脏模式。离体工作心脏模式可模拟正常的心脏泵血过程,液体循环路径与在体生理状态一致。Langendorff模型容易建立,经主动脉逆向灌流而维持心脏搏动,左右心室均处于无工作负荷的状态,更是缺乏心输出量这一重要的观测指标。有研究报道将乳胶漆囊置于左心室内,采用改良Langendorff模型进行缺血-再灌注研究^[5]。虽然离体心脏缺血-再灌注模型有其优点,但是,这类模型能否模拟在体缺血-再灌注模型对心脏的影响,并未见专门的研究报道。

为了建立与在体心脏缺血-再灌注心肌梗死程度相当的离体心脏缺血-再灌注模型,本研究比较在体与离体缺血-再灌注模型心肌梗死面积,心率、

心室内压与冠脉流量的动态变化,以便能够选择出与在体模型相符的大鼠离体心脏缺血-再灌注模型。

1 实验方法

1.1 实验动物分组 健康Sprague-Dawley大鼠[体重(280±10)g],雌雄不拘,鼠龄大约10周,由第四军医大学动物实验中心提供。动物实验方案已获得伦理委员会批准。实验动物被随机分为4组:在体模型组(*In vivo*)、离体Langendorff模型组(Langendorff)、电刺激Langendorff模型组(Langendorff+pacing)、离体工作心脏模型组(working heart),每组10只大鼠。

1.2 制备在体心脏缺血-再灌注模型 大鼠使用戊巴比妥钠(40 mg/kg体重)腹腔注射麻醉后,仰卧固定于手术台上。行气管插管,接小动物呼吸机(ALC-V8型,上海奥尔科特生物科技有限公司),设置为潮气量10 mL/kg,吸与呼气比为1:2,呼吸频率60次/min。1%肝素钠生理盐水充注PE10导管与压力传感器(SP844, MEMScAP, Skoppum, Norway),行右颈总动脉插管,经PowerLab4/25生理信号采集系统(AD Instruments Inc., Sydney, Australia)记录血压并获取心率数据,采样频率1 kHz。稳定10 min后,剃除大鼠胸部的毛,在心脏搏动最明显处横向剪开约2 cm皮肤,逐层分离,剪断第4肋骨,剪开胸膜。眼睑器撑开切口,湿纱布推开左肺,暴露心脏。在肺动脉圆锥下2 mm处找到LAD,用带线缝合针线穿过一小束心肌,硅胶管置于结扎线与血管之间,拉紧结扎线,使硅胶管压迫动脉而致其闭塞。缺血60 min后,松开结扎线,再灌注120 min。

缺血成功的标志:结扎后局部心肌变白,舒张压显著抬高;再灌注成功的标志:放松结扎线后,变白心肌逐渐红润,舒张压逐渐恢复。退出试验的标准:(1)结扎冠状动脉失败;(2)出血过多或其它原因导致血压下降大于20 mmHg;(3)肺组织损伤或大鼠在缺血、再灌注期间死亡。

1.3 制备Langendorff缺血-再灌注模型 大鼠腹腔注射肝素钠生理盐水(320 U/100 g体重)行全身肝素化。10 min后,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,打开胸腔,迅速摘取心脏,置于经95% O₂-5% CO₂氧合的Krebs-Henseleit缓冲液(118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 2.25 mmol/L MgSO₄, 2.25 mmol/L CaCl₂, 23.8 mmol/L NaHCO₃, 1.2 mmol/L NaH₂PO₄,

0.32 mmol/L EDTA, 11.5 mmol/L *D*-glucose, pH 7.4) 中, 剪除肺组织后, 行主动脉插管。主动脉插管由 18 号注射针头加工而成, 其针头长度为 1 cm, 前端打磨平整。心脏悬垂于 Langendorff 灌流装置 (Radnoti Glass Technology Inc., Monrovia, CA, USA) 上, 以 60 mmHg 压力行心脏逆行灌流。灌流液为氧合的 Krebs-Henseleit 缓冲液, 温度保持在 37 °C。在左心房处剪一小口, 将带有乳胶气囊的测压管经二尖瓣口插入左心室, 连接压力换能器, 调节囊内压为 10 mmHg。收集心尖部流出液体, 记录每分钟流出量即为冠状动脉流量 (coronary flow, CF), 平衡 40 min 后, 用 3 号丝线结扎 LAD, 缺血 60 min, 然后打开结头恢复灌注 120 min。在平衡期第 1、10、20、40 min, 缺血期第 1、30、60 min, 以及再灌注期第 1、10、20、40、60、80、100、120 min, 分别记录 CF。PowerLab 生理信号采集分析系统记录左心室内压力变化, 分析获取左心室收缩末期压力 (left ventricular end-systolic pressure, LVESP)、左心室舒张末期压力 (left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP) 与心率 (heart rate, HR) 数据。

另一组在建立心脏 Langendorff 灌流后, 使用刺激器 (Aurora Scientific Inc., Aurora, Canada) 给予离体心脏电刺激, 刺激频率为 300 次/min, 电压 20 V, 电流 5 mA, 刺激方波脉宽 1 ms。在 Langendorff + pacing 模式下平衡 40 min 后, 结扎 LAD, 缺血 60 min, 然后放松结扎线再灌注 120 min。各期观测 CF、HR、LVESP、LVEDP 等指标的时间点与单纯 Langendorff 模型相同。

LAD 结扎后, CF 降低大于初始值的 30%, 表明缺血成功。放松结扎线后, CF 回升至初始值 80%, 表明再灌注成功。剔除停搏心脏。

1.4 制备离体工作心脏模型 按实验方法 1.3 建立心脏 Langendorff 灌流模式, 探寻到肺静脉开口, 使用 16 号金属针头制成的插管 (内径 1.8 mm, 外径 2.0 mm), 经肺静脉行左心房插管, 而后再将微型压力传感器 Millar 导管 (model SPR-671; Millar Instruments, Houston, TX, USA) 小心地从肺静脉口于左心房插管的外侧插入, 经左心房进入左心室^[6]。在此过程中注意观察 Millar 导管的示波信号, 当示波信号由直线变为有规律的压力变化曲线后, 表示 Millar 导管已插入左心室内。用 1 号丝线将肺静脉固定于左心房插管上, 记录 CF。建立好所有插管后, 将心脏灌流模式由 Langendorff 转换为离体工作心

脏模式。大鼠离体工作心脏的前负荷设为 10 mmHg, 后负荷为 60 mmHg。再次记录 CF, CF 未改变表明肺静脉插管无漏液。平衡 40 min 后, 结扎 LAD, 缺血 60 min, 然后打开结扎线再灌注 120 min。各期观测 CF、HR、LVESP、LVEDP 等指标的时间点与单纯 Langendorff 模型相同。剔除停搏后冷刺激不能恢复搏动的的心脏。

1.5 左心室心肌梗死面积的测定 心脏再灌注结束后, 经主动脉灌注心脏停搏液 (含 25 mmol/L KCl 与 5% 葡萄糖的 PBS 溶液), 使心脏停搏于舒张期。在 37 °C 避光灌注含 1% 2, 3, 5- 三苯基氯化四氮唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 的 PBS 溶液 (pH 7.4) 5 min。将松开的结扎线再次结扎, 灌注含 1% Evans blue 的 PBS 溶液 (经过滤)。将心脏置 -20 °C 冷冻 2 h 后, 沿心脏冠状面以 2 mm 间隔切出 6 片心肌, 切片放入 4% 多聚甲醛过夜。次日称重, 照相。非缺血区的正常心肌被 Evans blue 染成蓝色, 缺血区包括两部分: 危险区心肌因降解 TTC 呈红色, 梗死区呈白色^[7]。用 Image J 软件计算左室心肌与白色区域的面积大小, 计算每一切片红色与白色区域占左室心肌面积的比值 (R_i 与 W_i , i 示切片从心尖到心底的编号), 用 R_i 与 W_i 乘以所对应切片的质量, 获得 IZ_i 与 NZ_i 值。最后, 计算心肌梗死面积 (infarct size, IS) = $(NZ_1 + NZ_2 + \dots + NZ_6) / (IZ_1 + IZ_2 + \dots + IZ_6) \times 100\%$ ^[7]。

1.6 统计分析 数据以 mean \pm SEM 表示, 采用 Origin Pro v8.1 软件进行数据统计学分析。组间平均数比较使用配对样本 Student's *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 与 LSD, $P < 0.05$ 表示具有显著性统计学差异。

2 结果

在体模式结扎 LAD 失败 2 例, Langendorff + pacing 模式结扎 LAD 失败 1 例, Langendorff 模型主动脉插管失败 1 例, 工作心脏模型左心房插管失败 1 例。为便于进行统计学分析, 每组取 8 例。

2.1 各模型组缺血-再灌注期间心率的变化

在体观测结果显示, 平衡期心率稳定于 400 次/min 左右; 60 min 缺血期, 心率降低; 120 min 再灌注即刻, 心率短暂升高, 然后降低, 再逐步恢复至平衡期水平。Langendorff 模型和工作心脏模型心率变化趋势与在体基本一致, 心率维持在 240~290 次/min 之间。与在体模型组心率相比, 在各时期的每一观

测点, 两组离体模型心率均呈显著性降低 ($P < 0.01$, 图 1)。缺血与再灌注后期, Langendorff 模型组心率显著性低于工作心脏模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

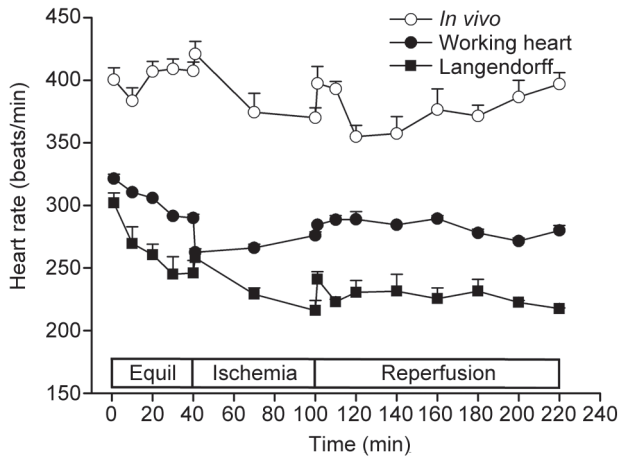


图 1. 在体与离体心脏缺血-再灌注模型心率的动态变化
Fig. 1. Dynamic changes in heart rate during the ischemia-reperfusion period among *in vivo*, working heart and Langendorff-perfused heart models. The working heart and Langendorff groups showed significant decreases of heart rates ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) compared with *in vivo* group at each time point. Values are mean \pm SEM, $n = 8$ hearts for each group.

2.2 离体心脏各模型组CF的改变

在平衡期, 三组大鼠心脏 CF 平均为 10 mL/min。在 60 min 缺血期, 工作心脏组的 CF 与未缺血时相比降低约 44%, Langendorff 组降低约 47%, 而 Langendorff + pacing 组降低约 61% (图 2)。再灌注期各组 CF 均回升, 但均未达到平衡期 CF 水平; 随着再灌注时间延长, CF 逐渐降低。

2.3 LVESP与LVEDP的变化

在平衡期, 工作心脏组 LVESP 在 80 mmHg 波动, Langendorff 组在 60 mmHg 左右, Langendorff + pacing 组则较高, 在平均 90 mmHg 左右 (图 3)。在缺血期, 三组 LVESP 均降低, 但下降的幅度并不相同, Langendorff + pacing 组最大, Langendorff 组最小。再灌注期, 各离体模型组 LVESP 部分恢复, 然后逐渐降低 (图 3)。

在平衡期, 工作心脏组 LVEDP 大约为 5 mmHg, 明显高于 Langendorff 组与 Langendorff + pacing 组, 后两组 LVEDP 均为负值 (图 4)。缺血期间, 工作心脏组 LVEDP 大幅升高, 再灌注期则缓慢下降。Langendorff 组与 Langendorff + pacing 组 LVEDP 在缺血期升高, 但幅度较小; 再灌注期则呈现短暂的

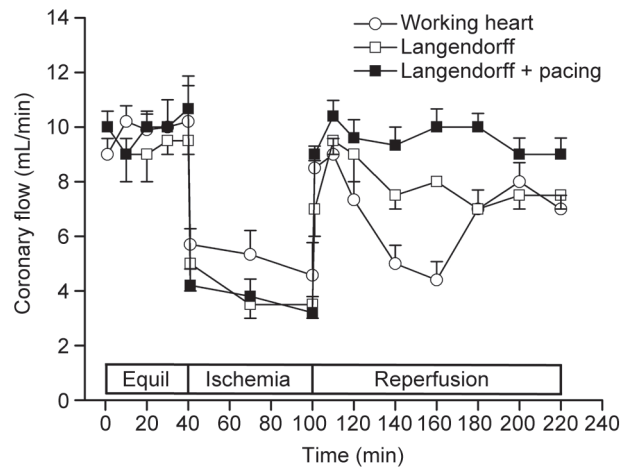


图 2. 离体心脏缺血-再灌注期间冠状动脉流量的变化
Fig. 2. Changes in coronary flow during the ischemia-reperfusion period in Langendorff-perfused heart model, working heart model and Langendorff-perfused heart model with 300 beats/min pacing groups. Coronary flow significantly decreased during ischemic period by 44%, 47%, and 61% in the working heart, Langendorff, and Langendorff with pacing groups, respectively. Values are mean \pm SEM, $n = 8$ hearts for each group.

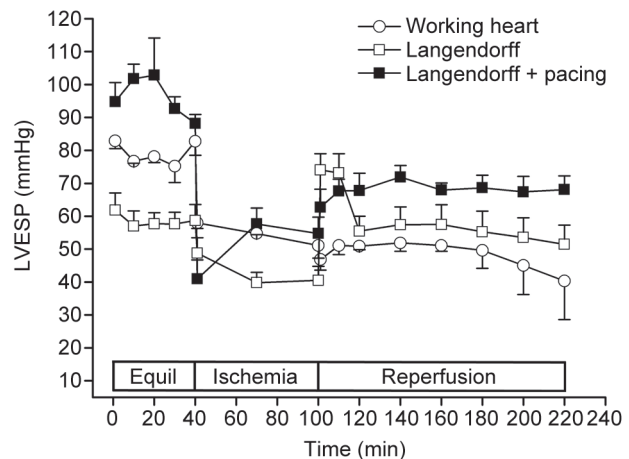


图 3. 离体心脏缺血-再灌注期间左心室收缩末期压力 (LVESP) 的变化
Fig. 3. Changes in left ventricular end-systolic pressure (LVESP) during the ischemia-reperfusion period in Langendorff-perfused heart model, working heart model and Langendorff-perfused heart model with 300 beats/min pacing groups. Values are mean \pm SEM, $n = 8$ hearts for each group.

升高峰, 然后下降至高于平衡期的相对稳定的水平 (图 4)。

2.4 各缺血-再灌注心脏模型左室心肌梗死面积的差别

在体、离体工作心脏、离体 Langendorff 与

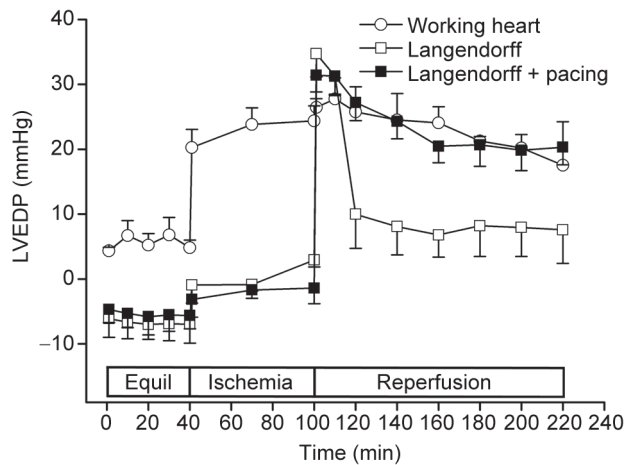


图 4. 离体心脏缺血-再灌注期间左心室舒张末期压力(LVEDP)的变化

Fig. 4. Changes in left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) during the ischemia-reperfusion period in Langendorff-perfused heart model, working heart model and Langendorff-perfused heart model with 300 beats/min pacing groups. Values are mean \pm SEM, $n = 8$ hearts for each group.

Langendorff + pacing 组缺血 - 再灌注心脏左室心肌非缺血面积 (蓝色区域) 分别为 $(29.43 \pm 2.23)\%$ 、 $(30.03 \pm 0.34)\%$ 、 $(29.06 \pm 0.24)\%$ 与 $(29.20 \pm 0.39)\%$ ，4 组间两两比较均无显著性差异。危险区域包括白色的梗死区与红色的可恢复区 (图 5A)。缺血 60 min，再灌注 120 min 处理后，在体模型组左室心肌梗死面积为 $(60.4 \pm 5.4)\%$ ，而工作心脏组与 Langendorff 组分别为 $(47.3 \pm 1.3)\%$ 和 $(41.7 \pm 0.9)\%$ ，均低于在体模型组，均具有非常显著性差别 ($P < 0.01$)。Langendorff + pacing 组心肌梗死面积为 $(61.1 \pm 1.3)\%$ ，与在体模型组无显著性差异 ($P > 0.05$ ，图 5B)。

3 讨论

由于工作心脏模型接近生理上的灌注方式和可靠的测定方法，现已被广泛地应用于心脏保护的实验研究中。工作心脏制备最大的优点是可改变前、后负荷，从而测定心脏泵功能^[8]。在工作心脏模式下，进行心脏缺血 - 再灌注研究，除没有采用血液灌流外，具备了在体与离体心脏的所有优点^[9]。我们原本预期工作心脏模型是最合适的在离体心脏开展缺血 - 再灌注的模型，但是，本研究结果显示，正常条件下离体可搏动 4 h 的工作心脏，缺血后出现停搏。在再灌注期，出现停搏后，即使采用外部冷刺激使心脏搏动，心脏排液量仍降至零，不仅造

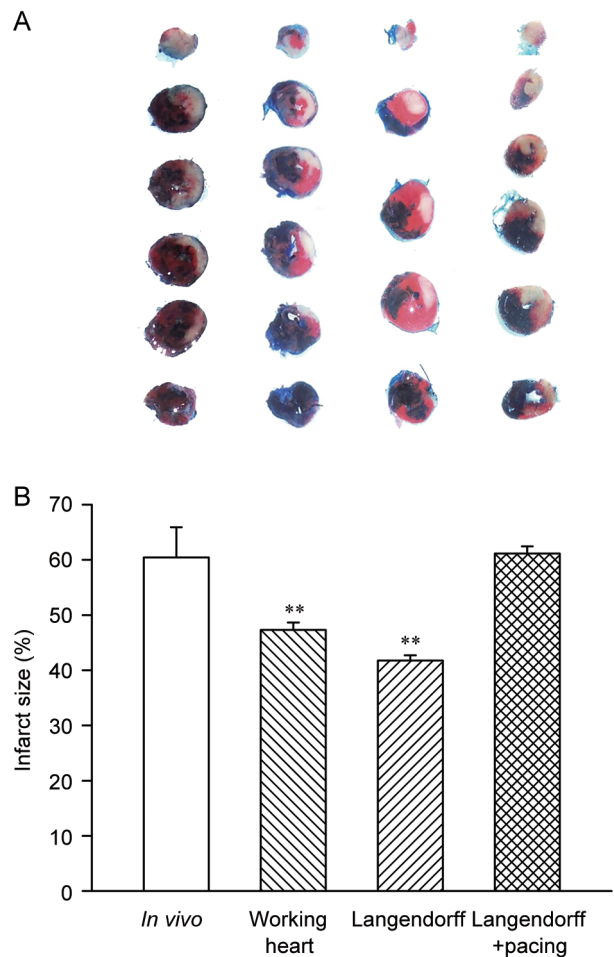


图 5. 各缺血-再灌注心脏模型左室心肌梗死面积

Fig. 5. Infarct size of left ventricular myocardium after the ischemia-reperfusion in *in vivo* model, working heart model, Langendorff-perfused heart model and Langendorff-perfused heart model with 300 beats/min pacing groups. A: Representative myocardial sections in different models. Myocardial infarction was induced by 60 min of left anterior descending occlusion followed by 120 min of reperfusion. Red, viable myocardium stained with TTC. White, infarcted tissue. Blue, normal non-ischemic tissue. B: The infarct size was quantified and expressed as a percentage of the ischemic area at risk area (red plus white region). Values are mean \pm SEM, $n = 8$ hearts for each group. ** $P < 0.01$ vs *in vivo* group.

成 CF 较大的波动 (图 2)，而且只好被迫改为 Langendorff 模式继续实验，这可能是心肌梗死面积明显小于在体模型 (图 5) 的原因之一。

有研究表明：心率是决定心脏做功功率的重要因素之一，同时亦与心肌耗氧量呈正相关^[10]。降低心率可减小缺血 - 再灌注心肌的梗死面积^[11]。另外，心肌缺血 - 再灌注损伤后，心交感活性增强^[12] 或心

率失常引发的心动过速^[13]也可增加心肌梗死面积。离体工作心脏与 Langenforff 模式下, 心率明显小于在体模型的心率(图 1), 这可能是离体心脏模型缺血-再灌注损伤后, 心肌梗死面积明显小于在体模型的主要原因。虽然在体模型存在再灌注期血源性炎性细胞粘附, 释放炎性因子而造成心肌的进一步损伤, 但是, 炎性因子损伤一般发生在再灌注后的修复过程中^[14]。另一方面, 临床上对急性心肌梗死患者采取抗炎治疗, 对心肌梗死的防治效果并不理想^[15], 甚至出现相反的结果^[16]。因此, 保持与在体心脏搏动心率相近似, 可能使离体心脏遭受缺血-再灌注的损伤程度与在体相当。

为此, 我们改用左心室腔放置水囊的 Langendorff 模式, 前负荷调节为 10 mmHg, 使左心室具有工作负荷^[17], 然后进行缺血-再灌注心脏损伤观测。虽然结扎 LAD 后 CF 的下降与工作心脏模式无差别(图 2), 但是, 由于心率显著低于在体模型(图 1), 心肌梗死面积也明显小于在体模型(图 5)。这一结果提示在 Langendorff 模式上进行心脏的缺血-再灌注损伤研究, 不调控心率, 心肌的损伤程度未达到在体模型的水平。在此基础上, 外加电刺激, 使心脏搏动频率保持在 300 次/min。在此条件下, 结扎 LAD 后 CF 的下降与其它模式下基本相同(图 2), LVESP 与 LVEDP 的变化与单纯 Langendorff 模式相同(图 3 与 4), 心肌梗死面积均值也与在体模型无显著差别。表明在 Langendorff + pacing 模型上开展心脏缺血-再灌注实验, 造成心肌梗死的程度可较好模拟在体模型的变化。另外, 4 组模型左心室非缺血面积无统计学差异, 表明在实验中能保证在基本相同的部位结扎 LAD; 在体模型组的标准误差较大, 提示在体模型结扎 LAD 的精准度不及离体灌流心脏。

综上所述, 离体工作心脏缺血-再灌注模型因缺血与再灌注损伤引起心脏心输出量降低至不能保障冠脉灌流的水平, 使心肌损伤程度达不到在体模型水平。单纯采用 Langendorff 心脏缺血-再灌注模型, 由于心率远低于在体水平, 故梗死面积亦达不到在体程度。只有在控制心率于 300 次/min 的 Langendorff 心脏缺血-再灌注模型, 心肌梗死面积才与在体模型相当。所以, 在不需要观测研究缺血-再灌注的重塑期改变的急性实验中, Langendorff + pacing 模型是较好的大鼠离体心脏缺血-再灌注模型。

参考文献

- 1 Lukacs E, Magyari B, Toth L, Petrasi Z, Repa I, Koller A, Horvath I. Overview of large animal myocardial infarction models (review). *Acta Physiol Hung* 2012; 99: 365-381.
- 2 Balakumar P, Singh AP, Singh M. Rodent models of heart failure. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2007; 56: 1-10.
- 3 Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93: 434-440, 426-432.
- 4 Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44: 503-512.
- 5 Granado M, Fernandez N, Monge L, Figueras JC, Carreno-Tarragona G, Amor S, Garcia-Villalon AL. Effects of coronary ischemia-reperfusion in a rat model of early overnutrition. Role of angiotensin receptors. *PLoS One* 2013; 8: e54984.
- 6 Wang YY, Jiao B, Guo WG, Che HL, Yu ZB. Excessive thyroxine enhances susceptibility to apoptosis and decreases contractility of cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 320: 67-75.
- 7 Ferrera R, Benhabbouche S, Bopassa JC, Li B, Ovize M. One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009; 23: 327-331.
- 8 Feng HZ, Jin JP. Coexistence of cardiac troponin T variants reduces heart efficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299: H97-H105.
- 9 van Vuuren D, Genis A, Genade S, Lochner A. Postconditioning the isolated working rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 2008; 22: 391-397.
- 10 Cotter G, Williams SG, Vered Z, Tan LB. Role of cardiac power in heart failure. *Curr Opin Cardiol* 2003; 18(3): 215-222.
- 11 Hu K, Naumann A, Fraccarollo D, Gaudron P, Kaden JJ, Neubauer S, Ertl G. Heart rate reduction by zatebradine reduces infarct size and mortality but promotes remodeling in rats with experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1281-H1288.
- 12 Jardine DL, Charles CJ, Ashton RK, Bennett SI, Whitehead M, Frampton CM, Nicholls MG. Increased cardiac sympathetic nerve activity following acute myocardial infarction in a sheep model. *J Physiol* 2005; 565: 325-333.
- 13 Hennan JK, Swillo RE, Morgan GA, Keith JJ, Schaub RG, Smith RP, Feldman HS, Haugan K, Kantrowitz J, Wang PJ, Abu-Qare A, Butera J, Larsen BD, Crandall DL. Rotigaptide (ZP123) prevents spontaneous ventricular arrhythmias and reduces infarct size during myocardial ischemia/reperfusion

- injury in open-chest dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317: 236–243.
- 14 Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res* 2012; 94: 276–283.
- 15 Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* 2003; 107: 3133–3140.
- 16 Timmers L, Sluijter JP, Verlaan CW, Steendijk P, Cramer MJ, Emons M, Strijder C, Grundeman PF, Sze SK, Hua L, Piek JJ, Borst C, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Cyclooxygenase-2 inhibition increases mortality, enhances left ventricular remodeling, and impairs systolic function after myocardial infarction in the pig. *Circulation* 2007; 115: 326–332.
- 17 Salling HK, Dohler KD, Engstrom T, Treiman M. Postconditioning with curaglutide, a novel GLP-1 analog, protects against heart ischemia-reperfusion injury in an isolated rat heart. *Regul Pept* 2012; 178: 51–55.