

УДК 616.12; 616-92; 612.086

АПОПТОЗ КАРДИОМИОЦИТОВ: РОЛЬ ЭНДОНУКЛЕАЗ (экспериментальное исследование)¹

Н. В. Акулич

кандидат биологических наук, доцент

Национальная антидопинговая лаборатория (Минск, Беларусь)

J. E. Woo

главный научный сотрудник отдела медицинской промееотики

Корейский институт бионаук и биотехнологии

А. В. Сорока

кандидат биологических наук, доцент

Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова

В. Э. Сяхович

начальник отдела

Национальная антидопинговая лаборатория (Минск, Беларусь)

В статье изучены структурно-функциональные состояния кардиомиоцитов при моделировании острого инфаркта миокарда. С использованием световой микроскопии и проточной цитометрии проведено изучение роли эндонуклеазы G в апоптозе кардиомиоцитов.

Ключевые слова: Endo G, JC-1, кардиомиоцит, инфаркт миокарда, митохондриальный потенциал, транслокация, флуоресценция, ишемия, реперфузия.

Введение

В настоящее время в интервенционной кардиологии остается неразрешенным ряд проблем, связанных с технологией коронарных интервенций и их медикаментозной поддержкой [1]. В частности, актуальными являются исследования, направленные на минимизацию зоны повреждения миокарда.

В настоящее время оптимальной стратегией, направленной на уменьшение размеров инфаркта в остром периоде, является быстрая и эффективная коронарная реперфузия, которая в ряде случаев не только не приводит к оптимальной тканевой перфузии и нормализации сократительной функции миокарда, но и вызывает его реперфузионное повреждение [1]. Оно является одной из причин неудовлетворительных результатов лечения пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ).

© Акулич Н. В., 2018

© Woo J. E., 2018

© Сорока А. В., 2018

© Сяхович В. Э., 2018

¹ Работа выполнена при финансировании Белорусского фонда фундаментальных исследований (договор с БРФФИ № М13КОРГ-008 от 01.04.2013 г.)

Показано, что при гипоксии, сопряженной с ишемическими и гипоксемическими нарушениями, изменяется роль митохондрий кардиомиоцитов, и развиваются нарушения в их функционировании. Выраженное расстройство микроциркуляции и генерализованное воспаление лежат в основе критических состояний при инфаркте миокарда, сопровождающихся значительными изменениями в метаболизме [1–3], приводя к апоптозу. Процент апоптотических кардиомиоцитов (КМЦ) при острых (инфаркт миокарда) и хронических (сердечная недостаточность) сердечно-сосудистых заболеваниях резко возрастает, что является одной из важнейших проблем медицины.

Индукция апоптоза и активация проапоптотических белков ведет к активации каспаз, расщепляющих внутриклеточные органеллы, приводя к фрагментации клетки на апоптотические тельца.

Помимо каспазного, в последнее время различают некаспазный механизм апоптотической гибели [4], при котором происходит миграция в ядро эндонуклеаз, вызывающих распад ядерной ДНК на крупные фрагменты.

Морфологически апоптоз кардиомиоцитов, в отличие от некроза, не характеризуется набуханием клетки и ее органелл, плазматическая мембрана интактна, не развивается воспалительный процесс. В настоящее время в клинике практически отсутствуют прямые методики детектирования апоптоза кардиомиоцитов, происходящего на всех стадиях инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, несмотря на доступность большинства не прямых.

С другой стороны, в настоящее время известно большое число различных фармакологических агентов, обладающих антиапоптотическим механизмом действия, но их применение ограничено лишь сферой экспериментальной науки. Предпринимаются попытки использования лекарственных средств с плеiotропным эффектом (например, статины) при проведении в комплексном лечении острых заболеваний сердца [5].

Для повышения эффективности оказания помощи пациентам с острым инфарктом миокарда необходим более детальный анализ клеточных механизмов апоптоза кардиомиоцитов для оптимизации технологии коронарных интервенций.

Таким образом, учитывая важность и значимость проблемы лечения пациентов с ОИМ, нам представляется актуальным и значимым выполнение исследования, направленного на изучение механизмов апоптоза кардиомиоцитов для оптимизации терапии пациентов с острым инфарктом миокарда.

Целью исследования является анализ структурно-функциональных свойств кардиомиоцитов при реализации каспаз-независимого апоптоза с участием эндонуклеаз.

Материалы и методы. Исследования проведены на препаратах изолированного сердца 16 беспородных крыс-самцов. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977. Сердце крысы изолировали по методу Лангендорфа. В препаратах сердца определяли величину объемной скорости коронарного потока, а также оценивали сократительную активность миокарда и интенсивность перфузии.

Сердце находилось в установке для перфузии изолированного сердца мелких лабораторных животных, оборудованной датчиками для измерения объемной скорости коронарного потока, аортального и развиваемого внутривентрикулярного давления. Все измерительное оборудование через АЦП было соединено с компьютером, на котором при помощи специализированного программного обеспечения проводились регистрация и обработка измеряемых показателей.

В контрольных опытах сердце перфузировали раствором Кребса-Хензельта. В опытной группе моделировали инфаркт миокарда с последующей реперфузией миокарда. Для моделирования инфаркта у животных выделяли заднюю межжелудочковую ветвь правой коронарной артерии, подводили под нее сосудистый зажим на 10–30 минут, формируя острую тотальную ишемию зоны миокарда, кровоснабжаемой этой артерией, после – восстанавливали кровоток.

Структурные особенности (полутонкие срезы) миокарда желудка изучались в проходящем свете и методом флуоресценции. Для проведения гистологического и цитологического анализа полутонкие срезы подвергались стандартному гистологическому окрашиванию, галлоцианин-хромовыми красителями для выявления хроматина кардиомиоцитов и 5,5', 6,6' – тетрахло-1,1', 3,3' – тетраэтилбензимидазол-карбоцианин йодидом (JC-1), который способен выявлять $\Delta\Psi_m$. Концентрация JC-1 составляла 3 мкг/мл. Накопление мономерной формы JC-1 свидетельствует о снижении $\Delta\Psi_m$ и указывает на наличие повреждений в мембране митохондрий. Красная флуоресценция JC-1 характеризует накопление агрегатной формы флуорохрома и свидетельствует об интактных мембранах митохондрий.

Для проведения иммуноцитохимического анализа полутонкие срезы подвергались окрашиванию Anti-Endo G (Anti-Endo G antibody -ab64668, Abcam, UK). Срезы миокарда фиксировались 100% метанолом, осуществляли демаскирование антигена, пермеабиллизацию. Затем срезы инкубировали в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина в течение 1 ч; инкубация с антителами Anti-Endo G в течение 12 часов в темноте при 4°C. Вторичные конъюгированные с фикоэритрином антитела против кроличьего Ig G использовались в разведении 1/1000 в течение 1 часа. Окрашивания клеточных ядер осуществляли DAPI.

Оценку флуоресценции JC-1- и EndoG-позитивных клеток проводили при увеличении 400× в пяти случайно выбранных полях зрения по каждому препарату. Количество апоптоз-позитивных кардиомиоцитов вычисляли по $\Delta\Psi_m$ и ядерной локализации Endo G на 100 клеток. Митохондрии, в которых выявлялась транслокация Endo G, относили к категории “активных”; все прочие – характеризовались как “спокойные”.

Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 7.0. Для определения степени достоверности полученных результатов и различий между ними использовали непараметрический критерий для независимых выборок U-test Манна-Уитни [6], а для определения зависимостей между различными физиологическими показателями применяли корреляционный анализ по Спирмену. Изменения считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. В контрольной группе (крысы, которым перфузировали сердце раствором Кребса-Хензеляйта) выявлено незначительное число кардиомиоцитов, имеющих зеленую флуоресценцию JC-1. Признаков апоптоза (кариолизис) в клетках не выявлялось (рисунок 1).

В коронарных артериях крыс пристеночные тромбы не выявлены, явление коронаротромбоза не отмечалось. В периваскулярном пространстве нейтрофилов и макрофагов не зарегистрировано. В цитоплазме более 90% кардиомиоцитов имели красную флуоресценцию.

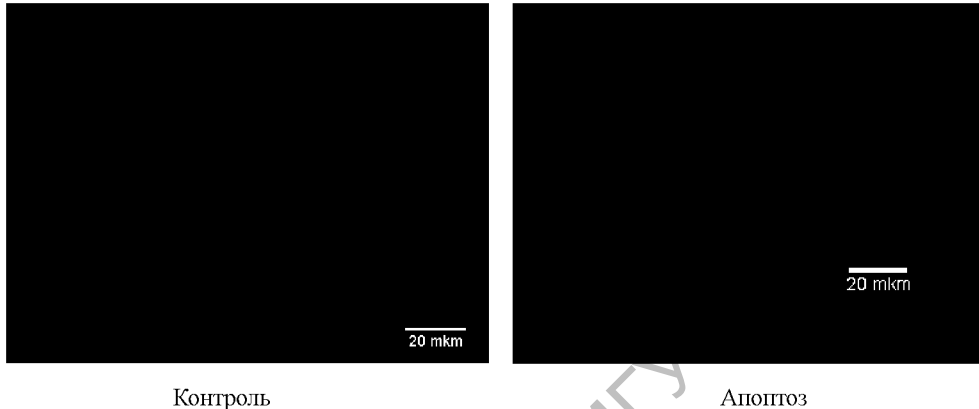


Рис. 1. Флуоресценция DAPI ядер кардиомиоцитов

В основной группе, где была реализована 30-минутная ишемия с последующей 60-минутной реперфузией, в срезах миокарда наблюдалось неравномерное кровенаполнение капилляров, выявлены очаги венозного полнокровия, отек стромы с появлением в ней единичных лейкоцитов. Отмечались резорбция апоптотических миоцитов в перифокальной зоне, некроз единичных КМЦ, выявлялись единичные макрофаги, лимфоциты, фибробласты. В зоне ишемии картина напоминала контрольную группу.

Установлено, что ишемия/реперфузия приводит к снижению доли агрегатных форм JC-1 в кардиомиоцитах, что является признаком снижения $\Delta\Psi_m$ и может рассматриваться как ранний признак апоптоза. Закономерностей в локализации кардиомиоцитов в перифокальной зоне с признаками апоптоза зарегистрировано не было. Хроматин 65% кардиомиоцитов при моделировании ишемии/реперфузии имел тенденцию к компактизации и увеличению оптической плотности. Более 57% кардиомиоцитов имели маргинальное расположение хроматина.

Среднее значение и мода красной флуоресценции в контроле в 3 и 4 раза, соответственно, превышали таковые в основной группе. Среднее значение зеленой флуоресценции в группах практически не отличались. Соотношение красная/зеленая флуоресценция, отражающее величину $\Delta\Psi_m$, в основной группе на 0,95 о.е. ($p < 0,02$) было ниже.

Исследование транслокации Endo G кардиомиоцитов крыс при моделировании острого инфаркта миокарда изучались методом флуоресцентной микроскопии. В контрольной группе Endo G имела равномерную локализацию, как в пределах исследуемых препаратов, так и в отдельной клетке (рисунок 2).

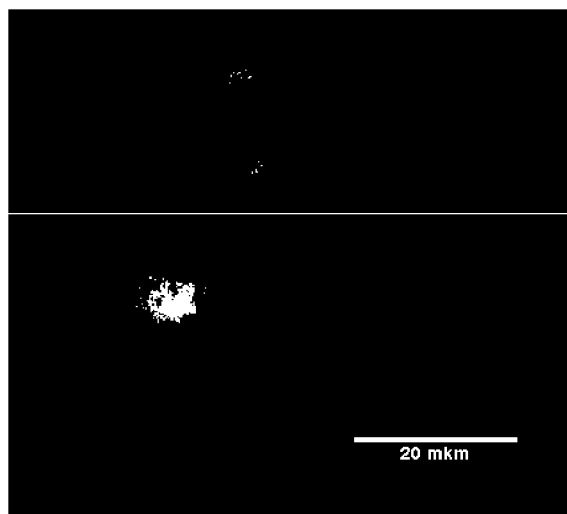


Рис. 2. Транслокация Endo G в кардиомиоцитах крыс

В контрольной группе порядка 30% кардиомиоцитов имели 2 ядра, а в основной – процент таких ядер был небольшим (менее 7%). Первые имеют четкую локализацию вблизи ядер, а вторые распределены диффузно. В этой группе выявлено, что после реперфузии происходит перераспределение активных (транслокация эндонуклеаз) и “спокойных” митохондрий.

Таким образом, ишемия/реперфузия является причиной транслокации эндонуклеаз к ядру кардиомиоцита.

Поскольку хроматин кардиомиоцитов при моделировании ишемии/реперфузии имел тенденцию к компактизации, увеличению оптической плотности и маргинальному расположению, можно предположить, что моделирование острой тотальной ишемии с последующей реперфузией приводит к активации сигнальных путей с участием, как минимум, одной из эндонуклеаз кардиомиоцитов миокарда крыс.

Как известно [7], эндонуклеазы – ферменты гидролиза нуклеиновых кислот. Они играют важную роль в жизнедеятельности клетки и животного организма, участвуя в процессах репликации, репарации и рекомбинации, активно вовлечены в нуклеиновый обмен, осуществляя деградацию нуклеиновых кислот до низкомолекулярных фрагментов и мононуклеотидов, которые утилизируются для ресинтеза новых молекул нуклеиновых кислот. Многие эндонуклеазы индуцируются или активируются при апоптозе, обладая способностью вызывать гидролиз ДНК до низкомолекулярных утилизируемых фрагментов.

Апоптоз – существенный и обязательный элемент развития животных. Нарушение процесса апоптоза делает невозможным нормальное развитие организма или приводит к различным заболеваниям. В апоптозных клетках прекращается синтез ядерной ДНК, конденсация и маргинация хроматина, межнуклеосомная фрагментация ДНК и сморщивание клеточной мембраны с последующим возникновением т. н. апоптозных телец, на которые распадается гибнущая клетка, эти тельца поглощаются макрофагами или другими клетками [8].

Об индукторах, сигнальных путях и механизмах инициации и протекания апоптоза накопилось уже довольно много данных [7–12]; существенно меньше сведений о завершающих этапах апоптоза.

Деструкция ДНК является одним из обязательных завершающих этапов апоптоза: она служит критичной для умирающей клетки точкой невозврата, а наблюдаемая при этом межнуклеосомная фрагментация ДНК – общепризнанным молекулярным маркером апоптоза. Такая деструкция ДНК – необходимое и обязательное условие сохранения гомеостаза организма в целом [10]. Наличие негидролизованной ДНК во внеклеточном пространстве вызывает иммунный ответ, который в дальнейшем может привести к возникновению аутоиммунных заболеваний.

В деградациии ДНК при апоптозе участвуют многие нуклеазы, относящиеся к различным семействам. Эти ферменты могут быть разделены на две группы – автономные клеточные ДНК-азы, которые гидролизуют ДНК внутри гибнущей клетки, и “нуклеазы-мусорщики”, гидролизующие ДНК в фагоцитах и во внеклеточном пространстве. В зависимости от типа клеток, стадии их дифференцировки и/или внешних стимулов функционируют те или иные нуклеазы или наборы нуклеаз, однако, природа, свойства, механизмы и регуляция действия соответствующих эндонуклеаз в каждом конкретном случае все еще мало изучены [12].

Распад ДНК в апоптозных клетках начинается с расщепления ДНК на протяженные фрагменты длиной 50–300 т.п.н. по АТ-обогащенным сайтам (домены петель) в районах прикрепления ДНК к ядерной мембране, следствием чего является наблюдаемая конденсация хроматина [9]. Такие нуклеазы, осуществляющие расщепление ДНК на высокомолекулярные фрагменты, называют “доменными нуклеазами”. На роль “доменных нуклеаз” предлагались ДНК-аза I, ДНК-азаII, циклофиллины, однако, ни одна из них полностью не соответствовала критериям собственно апоптозных нуклеаз.

К настоящему времени идентифицирована единственная активируемая при апоптозе “крупнощепляющая” эндонуклеаза – гранзин А активируемая ДНК-аза (GAAD) или NM23-N1. Она присутствует в клетке в латентном состоянии и входит в состав “SET-комплекса”, ассоциированного с эндоплазматическим ретикуломом. Под действием гранзинов А или К происходит расщепление белка SET и транслокация активированной эндонуклеазы NM23-N1 в ядро, где она вызывает однонитевые разрывы в цепях яДНК.

Апоптозная ДНК-аза – эндонуклеаза G (EndoG) впервые была обнаружена в клетках HeLa [9], и изначально идентифицирована в нормальных неапоптозных клетках как ядерный белок. Функционирование этой нуклеазы связывают с каспазозависимым апоптозом, индуцированным окислительным стрессом, гипоксией и ишемией.

Под действием EndoG образуются как дву-, так и одноцепочечные разрывы. Активность фермента относительно низка при физиологических значениях ионной силы, она значительно выше при гидролизе одноцепочечной, чем двуцепочечной ДНК. В двуцепочечных ДНК EndoG с наибольшей частотой расщепляет участки $(dG)_n(dC)_n$, а в одноцепочечных – $(dC)_n$, по которым преимущественно осуществляются разрывы в S участках ДНК.

ЭндоG – один из главных инструментов деградации ДНК при апоптозе. Она обладает выраженным процессивным характером действия. Сначала она расщепляет ДНК в хроматине на очень крупные домены, а затем осуществляет межнуклеосомную фрагментацию ДНК с последующим гидролизом до мелких фрагментов – олигонуклеотидов. Хроматин при апоптозе подвергается атаке множества нуклеаз с разной активностью и специфичностью действия.

Таким образом, в работе было установлено, что в возникновении ишемического повреждения сердца при моделировании тотальной ишемии центральную роль играют митохондрии. До настоящего времени сведений об их функции в условиях ишемии/реперфузии было недостаточно [7], поскольку большинство сведений о функции митохондрий получены в исследованиях на изолированных митохондриях.

Данные литературы свидетельствуют о том, что в сердечной мышце высокая плотность митохондрий, что связано с ее способностью к непрерывной работе.

Исследования проведены с целью изучения $\Delta\Psi_m$ в интактных клетках или тканях с использованием методов, основанных на клеточном распределении липофильных зондов [13]. К их числу относится JC-1, который позволяет оценивать $\Delta\Psi_m$: специфическое связывание JC-1 с агрегатами/мономерами приводит к флуоресценции на 590 и 530 нм, соответственно, а, в свою очередь, флуоресценция JC-1 коррелирует как с сократительной функцией кардиомиоцитов, так и с содержанием в них АТФ.

На культуре миоцитов показано [10], что в начале аноксии эмиссия на 590 нм начала уменьшаться, достигая плато в течение 16–25 мин. После этих изменений постепенно уменьшается амплитуда сокращения клеток, вплоть до остановки. При этом, клетки различались по степени дисфункции, которая зависела от содержания гликогена и/или уровня гликогенолиза. Так, в интервале от трех до пяти минут после остановки сокращений, клетки были в состоянии двух третей от их первоначальной длины, что соответствует истощению АТФ. До, или, в начале мышечной контрактуры эмиссия на длине волны 530 нм резко возрастала, достигая плато при полностью развившейся контрактуре. Во время этой фазы эмиссия на 590 нм практически отсутствовала [14].

При поступлении кислорода, которое было восстановлено в течение короткого времени после контрактуры, миоциты повторно удлинились и постепенно восстановили способность сокращаться. Сразу же после реоксигенации эмиссия на длине волны 530 нм резко снизилась, а затем постепенно приблизилось к значениям, соответствующим фазе аноксии [11].

Эмиссия на длине волны 590 нм характеризовалась большей изменчивостью. Так в течение реоксигенации красная флуоресценция агрегатов практически не изменялась. С другой стороны, реваскуляризация вызывала быстрое, но непродолжительное увеличение эмиссии при 590 нм. При реоксигенации $\Delta\Psi_m$ частично восстанавливается, независимо от восстановления механической функции кардиомиоцитов.

В наших исследованиях получены данные, согласно которым и моделирование ишемии/реперфузии у крыс приводило к апоптозу относительно небольшого числа кардиомиоцитов. Это указывает, во-первых, на то, что реперфузия

миокарда инициирует целый ряд неблагоприятных метаболических изменений, способствующих повреждению и гибели кардиомиоцитов. С другой стороны, именно восстановление кровотока приводит к появлению градиента рН внеклеточного пространства за счет вымывания протонов водорода. В результате этого могут активироваться внутриклеточные механизмы коррекции кислотно-основного статуса, включающие обмен Na^+/H^+ и транспорт $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, что влечет за собой увеличение внутриклеточной концентрации натрия. Избыток натрия в цитоплазме ведет к электрической нестабильности миокарда, усиливает гидратацию клеток и активирует обмен $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, что способствует дополнительному притоку кальция в клетку [12].

В погибших клетках нами обнаруживались – сжатие ядра, маргинация и конденсация хроматина. Эти результаты согласуются с данными литературы, где на клетках культуры кардиомиоцитов и на модели изолированных кардиомиоцитов желудочка сердца донор NO – SNAP (S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин) приводил к коллапсу митохондриального дыхания [14]. При этом выявлялись признаки апоптоза: конденсация хроматина на периферии ядра, сжатие клетки.

С другой стороны, NO может оказывать противоишемический эффект, приводя к кардиопротекции через открытие митохондриальных АТФ-чувствительных калиевых каналов (mito_KATP) [15]. mito_KATP ингибируются физиологическими внутриклеточными концентрациями АТФ и открываются при его снижении. Таким образом, гипотетически следует предполагать, что в механизме реализации кардиопротекторного эффекта NO лежат АТФ-зависимые калиевые каналы.

На клетках культуры кардиомиоцитов исследовалось влияние аноксии и реоксигенации на индукцию апоптоза [12]. Установлено, что после действия реперфузии, следующей за часовой гипоксией, происходило “округление” клеток, которые в норме имели вытянутую форму. В таких клетках митохондрии располагались на периферии клетки, а актин саркомеров – в центре. После действия аноксии/реоксигенации в клетках культуры происходила разборка миофибрилл кардиомиоцитов, конденсация хроматина. Ингибирование каспаз частично отменяло процесс деформации клеток.

В ходе выполнения исследования установлено:

1. В качестве одной из причин, лежащих в основе гибели кардиомиоцитов в ишемических участках сердца, является реперфузия миокарда, инициирующая каспазезависимый апоптоз кардиомиоцитов.
2. Впервые обнаружена неизвестная ранее транслокация Endo G митохондрий как при экспериментальной ишемии/реперфузии.
3. На модели острого инфаркта миокарда, реализованной на изолированном сердце крысы, исследована функция митохондрий и состояние ядра кардиомиоцитов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Estimation of infarct size in man and its relation to prognosis / B. E. Sobel [et al.] // Circulation. – 1972. – Vol. 46. – P. 640–648.
2. Switch from Caspase-dependent to Caspase-independent Death during Heart Development Essential Role of Endonuclease G in Ischemia-Induced DNA Processing

- of Differentiated Cardiomyocytes / Núria Bahi [et al.] // The J. of Biological Chemistry. – 2006. – Vol. 281, № 32. – P. 22943–22952.
3. The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by Thrombolysis / R.J. Burns [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2002. – Vol. 39. – P. 30–36.
 4. Apoptosis in myocytes in end stage heart failure / J. Narula [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1996. – Vol. 335. – P. 1182–1189.
 5. Eloisa Arbustini, Agnese Brega, Jagat Narula. Ultrastructural definition of apoptosis in heart failure // Heart Fail Rev. 2008. 13:121–135.
 6. **Сергиенко, В. И.** Математическая статистика в клинических исследованиях / В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева. – Москва : ГЭОТАР – МЕД, 2001. – 256 с.
 7. **Holly, T. A.** Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo / T. A. Holly, A. Drincic, Y. Byun // J Mol Cell Cardiol. – 1999. – Vol. 31. – P. 1709–1715.
 8. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization / D. Arnoult [et al.] // EMBO J. – 2003. Vol. 22. – P. 4385–4399.
 9. **Li, L.Y.** Wang Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria / L.Y. Li, X. Luo // Nature. – 2001. – P. 412.
 10. **Yellon, D. M.** Myocardial reperfusion injury / D. M. Yellon, D. J. Hausenloy // N. Engl. J. Med. – 2007. – Vol. 357. – P. 1121–1135.
 11. **Chance, B.** The energy-linked reaction of calcium with mitochondria / B. Chance // J. Biol. Chem. – 1965 – № 240. – P. 2729–2748.
 12. **Mathur A., Hong Y., Kemp B.K., Barrientos A. A., Erusalimsky J. D.** Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes // Cardiovasc. Res. – 2000.– № 46. – P. 126–138.
 13. **Chen, M.** Initiator caspases in apoptosis signaling pathways / M. Chen, J. Wang // Apoptosis. – 2002. – Vol. 7. – P. 313–319.
 14. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction / P. A. J. Krijnen [et al.] // J Clin Pathol. 2002. – Vol. 55. – P. 801–811/
 15. **Sato T, O'Rourke B., Marban E.** Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. Circ Res. 1998. – V. 83. – P. 110–114.

Поступила в редакцию 17.01.2018 г.

Контакты: akulichn@gmail.com (Акулич Николай Васильевич)

Akulich N., Woo J., Soroka A., Siahovich V. APOPTOSIS OF CARDIOMYOCYTES: THE ROLE OF ENDONUCLEASE (EXPERIMENTAL STUDY).

The structural and functional states of cardiomyocytes in the modeling of acute myocardial infarction have been studied. Using the light microscopy and flow cytometry, the role of endonuclease G in the apoptosis of cardiomyocytes has been defined.

Keywords: Endo G, JC-1, cardiomyocyte, myocardial infarction, mitochondrial potential, translocation, fluorescence, ischaemia, reperfusion.