

APOPTOZA MIOCARDULUI PROTEJAT PRIN MICROCARDIOPLEGIE ÎN VALVULOPATIILE CARDIACE

APOPTOSIS OF MICROCARDIOPLEGIA-PROTECTED MYOCARDIUM IN VALVULAR HEART DISEASE

Guzgan Iu¹., Rusu S¹., Moscalu V¹., Manolache Gh¹., Țurcanu G²., Apostol G²., Vîrlan E²., Grosu I³.

¹ - dr. în med., IMSP Spitalul Clinic Republican

² - medic, IMSP Spitalul Clinic Republican

³ - IMSP IFP „Chiril Draganiuc”

Rezumat

Apoptoza, definită inițial ca moarte programată a celulei, depășește acest cadru când este vorba de stări patologice, cum ar fi ischemia acută a miocardului. Apoptoza prezintă interes sporit ca componentă a schimbărilor survenite în miocardul pacienților cu valvulopatii cardiace, supuși operațiilor pe cord deschis.

Studiul a fost dedicat depistării semnelor de apoptoză pe fundalul ischemiei miocardului cauzate de clamparea aortei de diferită durată în operațiile cu CEC și microcardioplegie la pacienții fără condiționare ischemică. Studiul a inclus 25 de pacienți cu valvulopatii reumatismale supuși operației de protezare a valvei mitrale și anuloplastia valvei tricuspide. Pentru protecția miocardului s-a aplicat cardioplegia sangvină cu K⁺ și Mg⁺⁺. Biopatele din atriu drept prelevate inițial, la 55 și 110 min. de clamp aortal, colorate cu hematoxină-eozină, Van-Gieson și cu picrofuxină după metoda Lie au fost examinate la microscopul fonic.

La momentul clampării aortei concomitent cu schimbările ischemice cronice se evidențiază modificări inițiale caracteristice apoptozei: pierderea contactului intercelular, ondularea și fragmentarea cardiomiocitelor, reducerea volumului celular, nucleul își pierde forma inițială (alungire, bombare, fragmentare). Captarea fuxinei (cea ce denotă gradul de hipoxie celulară) la această etapă este mai mult la nivelul unor organite citoplasmice. La 55 minute de clamp aortal, respectiv după 2 reperfuzii, se observă cele mai vaste modificări microscopice ce definesc apoptoza. Hipoxia celulară este marcantă – fuxinofilia cuprinde toată aria celulară, celule solitare și grupuri de celule.

La 110 minute de clamp aortal, la cea de-a cincia microcardioplegie/reperfuzie, se observă modificări celulare caracteristice apoptozei de intensitate medie. Modificările hipoxice par a fi mai puțin manifestate.

Concluzii: Ischemia miocardului indusă în operațiile cu CEC stimulează procesul de apoptoză a cardiomiocitelor. Reperfuzia repetată a miocardului cu microcardioplegie atenuează schimbările hipoxice, lăsând impresia de condiționare a mușchiului inimii.

Dezvoltarea apoptozei cardiomiocitelor impune aplicarea agenților cu efect antiapoptotic pe perioada arestului cardiac.

Summary

Apoptosis, originally defined as programmed cell death, is beyond the framework when it comes to medical conditions such as acute myocardial ischemia. It is of increased interest as part of changes in the myocardium of patients with valvular heart disease, undergoing open heart surgery.

The study includes 25 patients with rheumatic valvular heart disease undergoing prosthetic mitral valve surgery and tricuspid valve annuloplasty. For myocardial protection blood cardioplegia with K⁺ and Mg⁺⁺ was applied. Samples, taken from the right atrium at 1-2, 55 and 110 minutes after aortic cross-clamping, stained with hematoxylin-eosin, Van Gieson and Lie, were examined in photon microscope. At initial stage of aortic Xclamp, chronic ischemic changes are completed by changes proper for apoptosis: loss of intercellular contact, waving and cardiomyocyte fragmentation, reduced cell volume. The nucleus loses its original shape through elongation, swelling, fragmentation. Fuxin capture (which reveals a cellular hypoxia) at this stage is more of the cytoplasmic organelles. At 55 minutes of aortic clamp, i.e. after 2 reperfusion, were observed the largest microscopic changes that define apoptosis. Cellular hypoxia was marked: fuxinofilia includes all areas of solitary cells and cell clusters. At 110 minutes of aortic clamp, after the fifth microcardioplegy / reperfusion, apoptotic cellular changes are of medium intensity. Hypoxic changes appear to be less manifest.

Conclusions: Myocardial ischemia induced by CPB operations stimulates cardiomyocyte apoptosis process. Repeated reperfusion of hypoxic myocardium with microcardioplegy attenuates hypoxic changes, giving the effect of preconditioning of the heart muscle. Development of cardiomyocyte apoptosis requires the application of antiapoptotic agents during cardiac arrest.

Introducere

Apoptoza este un cuvânt grecesc care, pentru prima dată, a fost folosit de Homer pentru a descrie căderea frunzelor în versurile sale, ulterior, termenul a fost preluat de Kerr (1972), pentru a defini moartea programată a celulei [13].

Prin definiție apoptoza reprezintă moartea celulară programată, energetic dependentă, responsabilă de inactivarea și eliminarea celulelor supranumerice, nefuncționale sau alterate [13].

Apariția apoptozei poate fi declanșată de Proteina p53, care reglează replicarea ADN-ului, proliferarea și moartea celulelor, de glucocorticoizi, neurotransmițători, calciu, unele medicamente (methotrexat, cisplatin, bleomicină, doxorubicină), precum și de radiațiile ionizante și ultraviolete.

Unii factori pot inhiba apoptoza [26]: Proteina Bcl-2 (preîntâmpină moartea limfocitelor limfomului, formând celule – imortale); hormonii (estrogeni, androgeni); viruși (variolic, adenovirusul E1B), inhibitorii cistein proteazei, promotorii tumorali (fenobarbital, esteri de forbol, hexaclorociclohexan, superoxid dismutaza).

Evoluția apoptozei se desfășoară prin faze succesive [14,26,27]:

Etapa I: celulele pierd contactul cu vecinele lor și cu membrana bazală; organele celulare se compactează; volumul celular se reduce.

Etapa II: Pe suprafața celulară se formează pliuri ce fuzionează cu porțiunile dilatate ale complexului Golgi și reticulului endoplasmatic neted – formând cavități și cratere; formarea de mase granulare mari prin condensarea cromatinei, adiacente membranei nucleare.

Etapa III: fragmentarea nucleelor și formarea corpurilor apoptotici fără o reacție inflamatorie și i formarea unei cicatrice, iar arhitectura țesutului este păstrată).

Etapa IV: Fagocitarea corpurilor apoptotici de către macrofage.

După mecanismul de dezvoltare pot fi distinse următoarele forme de apoptoză [11,17,28]:

1. **Apoptoza normală** - eliminarea celulelor disfuncționale sau potențial nocive, datorită leziunilor ADN acumulate în cursul vieții

2. **Apoptoza aberantă** - eliminarea unor celule datorită uzurii suferite în timp de diferite componente ale circuitului de transducție ale semnalelor extracelulare, cu activarea spontană a morții celulare

3. **Apoptoza abuzivă** - eliminarea unui grup numeros de celule normale cărora organismul nu le mai poate asigura necesarul de factori de creștere și supraviețuire, și se dezvoltă în 2 faze:

- a) Declinul – scăderea cantității de semnale necesare supraviețuirii
- b) Senescența – alterarea funcțiilor imunitare și depopularea celulară masivă (involuția glandei mamare și uterului în menopauză)

Principale criterii pentru diferențierea necrozei de apoptoză [9,10]:

Criterii de diferențiere	Necroza	Apoptoza
Stimuli	Este cauzată numai de factori nocivi (patologici)	Este cauzată atât de factori fiziologici cât și de patologici
Extinderea	Grupuri de celule	Celule solitare, individuale
Tipul de moarte	Catasrofică	Programată
Aspecte biochimice	Lizozomii eliberează enzime litice	Fragmentarea ADN-ului nuclear. Lizozomii sunt intacti
Modificări ale volumului celular	Crește	Scade
Modificările densității celulare	Scade	Crește

Liza membranei plasmatic	Etapa inițială	Etapa finală
Organele	Tumifiere incipientă	Tumifiere tardivă
Hidroliza ADN	În etapa finală	În etapa inițială
Modul de fragmentare a ADN-ului	Aleatoriu	La nivel internucleozomal
Reacție inflamatorie	prezentă	absentă
Desfășurarea procesului	Rapid	Lent
Consecințe	Fagocitoza celulelor moarte de neutrofile și macrofagi	Fagocitoza corpurilor apoptotici de către celule parenchimotoase învecinate (fagocite „neprofesionale”) sau macrofagi
Cicatrice	Prezentă	Absentă

Unele maladii pot fi caracteristice apoptozei [14,29], cu prevalarea inhibiției, spre exemplu tumorile maligne, sau cu apoptoză excesiva, observată la leziunile ischemice.

Apoptoza este considerată ca unul din mecanismele de reducere a cardiomiocitelor în timpul circulației extracorporale (CEC) și arestului cardioplegic al inimii în operațiile de bypass aorto-coronarian. [1,10] Cu toate că diferiți autori se referă la miocardul atrial sau la cel ventricular [7,18,24], studiile recente au arătat, că operațiile de șuntare aorto-coronariană cu CEC și arest cardiac măresc rata apoptozei, preponderent în ventricul [21]. Examinarea biopstatelor din ventricule, însă, este mai dificilă, materialul prelevat fiind foarte mic, cu riscuri de artefacte cauzate de forceps sau bisturiu. Manifestarea apoptozei la diferite perioade de arest cardiac, și, în special, în dependență de tipul cardioplegiei aplicate, rămân neelucidate .

Studiul nostru a fost dedicat depistării semnelor de apoptoză pe fundalul ischemiei miocardului cauzate de clamparea aortei de diferită durată în operațiile cu CEC și microcardioplegie la pacienții cu valvulopatii fără precondiționare ischemică.

Material și metode

Studiul a inclus 25 de pacienți din secția chirurgia viciilor cardiace dobândite a Spitalului Clinic Republican cu valvulopatii reumatismale supuși operației de protezare a valvei mitrale și anuloplastia valvei tricuspide De Vega-Cabrol . Starea clinică a pacienților nu prezenta mari diferențe.

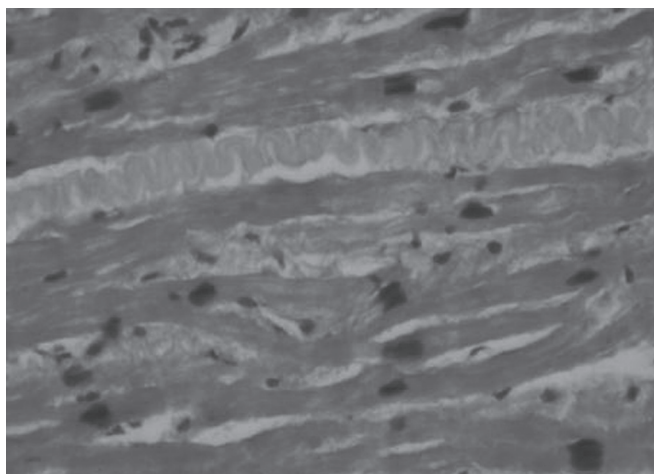
Pacienții cu insuficiență renală și/sau cu cardioversie înainte de operație, FE<35 nu au fost incluși în acest studiu. Anestezia includea: inducția cu midazolam (0,05 mg/kg), propofol (1mg/kg) și fentanil (1-2 mg/kg); menținerea cu fentanil la doza 3 mg/kg/h, propofol (2,5-5 mg/kg/h).

Bypass-ul cardio-pulmonar s-a efectuat prin canularea aortei ascendente și venelor cave, oxigenarea sângelui cu oxigenatorul Terumo Capiox CXSX 25. Priming-ul consta din sol. Ringer acetat 1,2 l., sol. Manitoli 20% 100 ml., bicarbonat de sodiu (după caz). În priming s-a adăugat 1 ml heparină. Pentru atingerea unui ACT ≥ 480 s pacienților li s-e administra pre-CEC heparină în proporție de 300 U/kg. Toți pacienții au primit cardioplegie caldă sangvină după metoda Calafiore modificată de Casalino et al. [4] și modificată ulterior de noi [12]. Cardioplegia a fost administrată antegrad în bulbul aortic, la intervale de 25 minute de ischemie.

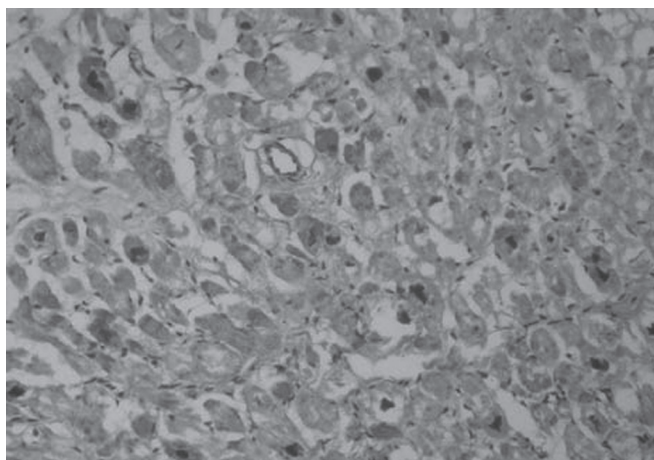
Pentru studiul morfologic s-au prelevat biotparate din atriu drept la momentul clampării aortei, la 55 min și 110 minute de la clamparea aortei, respectiv la prima, a treia și a cincia cardioplegie. Biotparatele au fost fixate în formol 10%, incluse în parafină. Secțiunile au fost colorate cu hematoxilină-eozină, după Van Geison, Lie, examinate în microscopul Olympus CX45.

Rezultate

La analiza morfologică a biotpartelor prelevate imediat după clamparea aortei și instituirea perioadei de ischemie (arest cardiac) au fost depistate schimbări calificate ca un fond precursor al ulterioarelor reacții morfologice. Concomitent cu schimbările ischemice cronice - hipertrofia cardiomiocitelor pe un fundal de carcas fibroelastic (Fig.1.a), se evidențiază modificări inițiale caracteristice apoptozei: pierderea contactului intercelular, ondularea și fragmentarea cardiomiocitelor, reducerea volumului celular, nucleul își pierde forma inițială (alungire, bombare, fragmentare). Captarea fuxinei la colorația Lie (ceea ce denotă gradul de hipoxie celulară) la această etapă este mai evidentă la nivelul unor organite citoplasmice, nefiind uniformă în toată citoplasma (Fig. 1.b).



a) Colorație H.E., x200

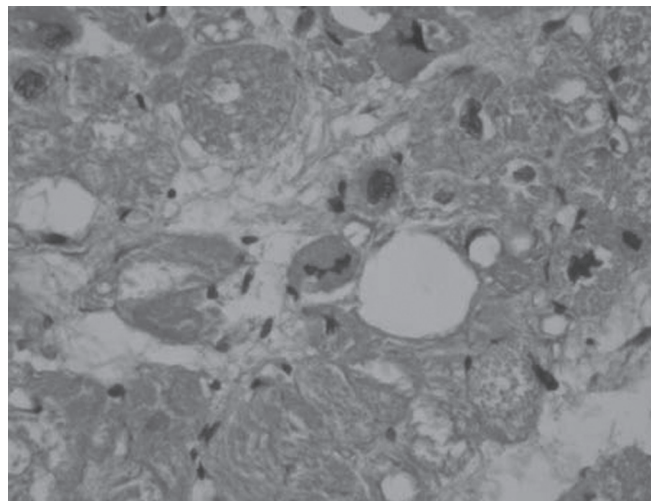


b) Colorație metoda Lie, x200

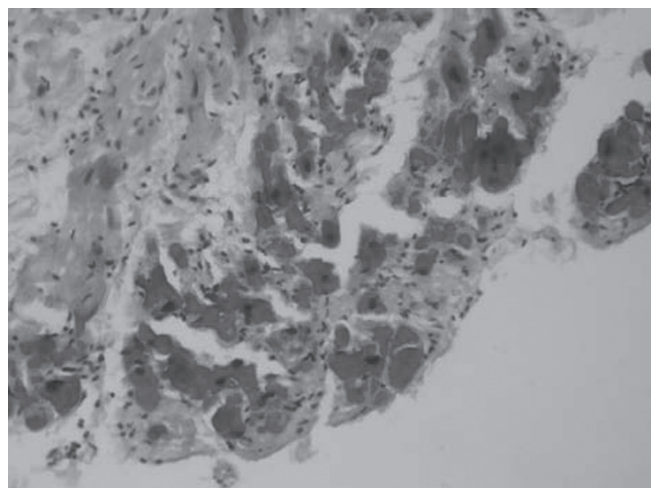
Fig.1 Biotpat din atriu drept la clamparea aortei și inițierea microcardioplegiei

În biotparatele obținute la 55 minute de clamp aortal, respectiv la cea de-a III carfdioplegie cu sânge se observă cele mai vaste modificări microscopice ce definesc apoptoza la etapa de formare a corpurilor apoptotici - fragmentarea cardiomiocitelor,

reducerea volumului celular, nucleii aproape că lipsesc, iar cei rămași pierd forma inițială (alungire, bombare, fragmentare), apar cavități și cratere intracelulare, prin condensarea cromatinei, adiacente membranei nucleare se formează mase granulare mari (Fig 2.a). Gradul de captare a fuxinei prin metoda Lie la această etapă este cel mai înalt - pe toată aria celulară, cuprinzând atât celule solitare cât și grupuri de cardiomiocite (Fig. 2.b).



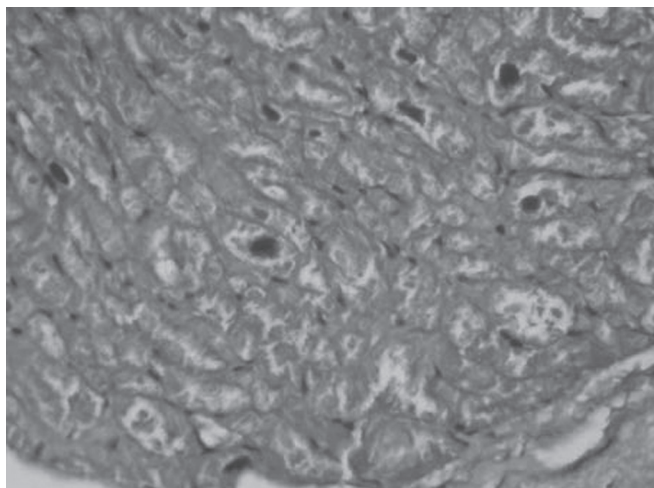
a) Colorație H.E., x250



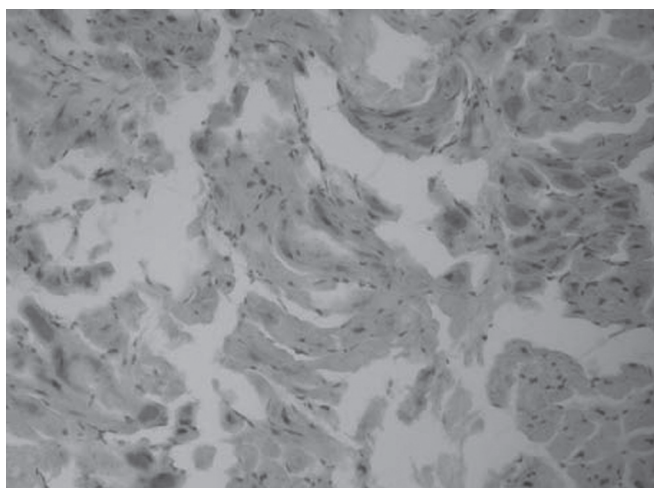
b) Colorație metoda Lie, x200

Fig.2 Biotpat din atriu drept la 55 min de clamp aortal și 2 reperfuzii

La etapa de 110 minute de clamp aortal, sau la cea de-a cincia microcardioplegie/reperfuzie se observă modificări celulare caracteristice apoptozei de intensitate medie (luând în calcul modificările din primele 2 etape). Se observă zone în care cardiomiocitele își pierd contactul intercelular, sunt ondulate, unele fragmentate, nucleul își pierde forma inițială (alungit, bombat), dar se păstrează (Fig.3.a); în alte sectoare cardiomiocitele sunt la etapele ireversibile caracteristice apoptozei cu formarea corpurilor apoptotici - nucleii lipsesc, se pun în evidență cavități și cratere intracelulare, mase granulare mari prin condensarea cromatinei. Gradul de captare a picrofuxinei la această etapă este de gravitate medie, cu caracter neuniform (în unele pe toată suprafața, iar în altele - granular), afectând atât celule solitare cât și grupuri de celule (Fig. 3.b).



a) Colorație H.E., x250



b) Colorație picrofuchsină Lie, x200

Fig.3 Biopat din atriu drept la 110 min de clamp aortal și 5 reperfuzii

Discuții

Principala diferențiere dintre necroză și apoptoză constă în faptul că necroza este întotdeauna un proces patologic, iar apoptoza are loc și în condiții fiziologice, și nu se asociază obligatoriu cu necroza. Uneori însă aceste procese se asociază, spre exemplu, în modificările ischemice ale miocardului în cadrul infarctului miocardic: în zona centrală – necroză tisulară; la periferie, unde gradul de hipoxie este mai diminuat – apoptoza celulară. [14,19]. Concomitent cu lungirea timpului de ischemie în miocard se atestă o creștere a fenomenului de apoptoză, fapt demonstrat experimental [5].

Un proces asemănător se observă în operațiile pe cord deschis cu clamparea aortei și sistarea fluxului coronarian

pe diferite perioade de timp. Apoptoza în acest caz poate fi stimulată de câteva mecanisme, inclusiv ischemia - reperfuzia [1] și eliberarea citochinelor și factorilor de inflamare [7]. Este considerat, că lungirea timpului de clamp aortal corelează cu creșterea numărului de celule apoptotice. Această pierdere progresivă a cardiomiocitelor poate contribui la dereglarea contractilității inimii. [22,23].

O problemă a studiilor clinice de acest gen este faptul că probele sunt obținute de la atriu drept, pe când țesutul ventricular ar fi mai relevant clinic. Însă obținerea unei cantități suficiente de țesut din ventriculul cardiac pentru a efectua mai multe investigații de laborator, ridică probleme etice. Pe un model experimental a fost demonstrată similitudinea dintre schimbările țesutului atrial și a celui ventricular în timpul by-pass-ului cardiopulmonar.[2]. Ulterior, pe material clinic, a fost confirmat procesul de activare a apoptozei în biopatele prelevate din atriul [20].

Efectul cumulativ al ischemiei reluate de mai multe ori este discutabil. Există un punct de controversă, privind faptul dacă ischemia singură sau ischemia-reperfuzia activează procesul de apoptoză în cardiomiocite [9,25]

În experiment a fost demonstrată sporirea apoptozei în dependență de durata perioadei de clamp aortal, cardioplegia aplicată fiind cea cristaloïdă [8]. În ultimul timp tot mai mulți autori se axează însă pe importanța tipului de cardioplegie. Folosind microcardioplegia pe baza de sânge integră, considerăm că, practic, am obținut reperfuzia miocardului în condiții maximale fiziologice cu asigurarea sistemelor tampon, substraturi energetice și conținutul necesar de oxigen.

În biopatele obținute după 110 min. de clamp aortal și patru perioade de reperfuzie la fiecare 25 min s-a evidențiat diminuarea progresării numărului de celule ischemice, depistată la etapele precedente. Noi suntem înclinați a considera, ca are loc o "adaptare" a miocardului de genul condiționării, aportul la efectul pozitiv revenindu-i cardioplegiei sanguine (microcardioplegiei). În ce privește variația numărului de celule apoptotice, devine importantă prezenta acestui fenomen, evoluția căruia este greu de prognozat în perioada postoperatorie pe fundalul condițiilor hemodinamice noi ale bolnavilor valvulari și efectelor CEC-ului.

Tentative de a reduce rata apoptozei sunt făcute prin punerea accentului pe reducerea timpului de clamp aortal sau prin aplicarea agenților citoprotectivi care diminuează efectele ischemiei - reperfuziei.[23]. De asemenea, în scopul diminuării numărului de celule apoptotice, ar fi binevenită intervenirea atât pre - cât și în timpul CEC-ului cu diferiți agenți (Lidocaina cu efect de stabilizare a sarcolemei, Eritropoetina și altele), care reduc fenomenul de apoptoză [2,3].

Bibliografie

1. Anselmi A., Abbate A., Girola F., Nasso G., Biondi-Zocci G., Possati G., et al. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;25. p.304-11.
2. Araujo EG, Bianchi C, Sato K, Faro R, Li XA, Sellke FW. Inactivation of the MEK/ERK pathway in the myocardium during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121. p.773-781.
3. Bullard AJ, Govewalla P, Yellon D.M. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol.* 2005;100. p. 397-403.
4. Casalino S. et al. The efficacy and Safety of Extending the Ischemic Time with a Modified Cardioplegic Technique for Coronary Artery Surgery. *J Card Surg.* 2008;23. p.444- 9.
5. Cobet V. Reactivitatea de efort a cordului și a sistemului coronarian în insuficiența cardiacă experimentală și efectul de corecție al remediilor naturale. *Dis.d.hab.m. Chișinău.* 2011, 278 p.
6. Curran R.C.: *Colour atlas of Histopathology.* Oxford University Press, 1995. 127 p.
7. Fischer UM., Tossios P., Huebner A, Geissler H.J., Bloch W., Mehlhorn U. Myocardial apoptosis prevention by radical scavenging in patients undergoing cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;128. p.103-8.

8. Flesch M, Knipp S, Kessler G, Geissler HJ, Massoudy P, Wilhelm H, et al. ARTA: AT1-receptor blocker therapy in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Clin Res Cardiol.* 2009;98. p.33-43.
 9. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32. p.197-208.
 10. Gill C, Mestrlil R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target? *FASEB J.* 2002;16. p.135-46.
 11. Goljan Edward F., *Rapid review Pathology. Third edition 2010, pag.19.*
 12. Guzman Iu., Moscalu V., Batrânac A., Manolache G., Ureche A., Morozan V., SarnaciucB. Cardioplegia caldă sangvină suplimentată cu MG++-. *Bul Acad Șt. a Mold.. Șt med.* 2011, nr.3 , p.68-72
 13. Hălăău Florin, Ardeleanu Carmen: *Anatomie patologică. Editura Medicală, 2003. vol. I, p. 43.*
 14. Knaapen M. et al. Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *CardiovascularResearch*, 2001, vol. 51, nr. 2, p. 308
 15. Manolescu N. : *Aspecte de patologie celulară comparată, Edit. Didactică și Pedagogică, 1999. 78p.*
 16. Malmberg M., Vahasilta T., Saraste A., Kyto V., Kiss J., Kentala E., Kallajoki M., Timo Savunen T. Cardiomyocyte apoptosis and duration of aortic clamping in pig model of open heart surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30. p.480-484.
 17. Matsui Y. et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*, 2007, vol. 100, nr. 6, p. 914.
 18. Mehlhorn U, Krahwinkel A, Geissler HJ, LaRosee K, Fischer UM, Klass O, et al. Nitrotyrosine and 8-isoprostane formation indicate free radical-mediated injury in hearts of patients subjected to cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125.p.178-83.
 19. Moldoveanu Elena, Popescu L.M. : *Apoptoza. Mecanisme moleculare. Edit. Universitară Carol Davila, 1999, pag 58.*
 20. Ramlawi B., Feng J., Mieno S., Szabo C., Zsengeller Z., Clements R., Sodha N., Boodhwani M., Bianchi C., Sellke F., Indices of Apoptosis Activation After Blood Cardioplegia and Cardiopulmonary Bypass. *Circulation* 2006, 114: [suppl I].p.I-257-I-263.)
 21. Ruifrok W.T., B.D. Westenbrink, R.A. de Boer, I.J. den Hamer, M.E. Erasmus, H.E. Mungroop, A.H. Epema, A.A. Voors, D.J. van Veldhuisen, and W.H. van Gilst. Apoptosis during CABG surgery with the use of cardiopulmonary bypass is prominent in ventricular but not in atrial myocardium. *Neth Heart J.* 2010; 18(5).p.236-242.
 22. Schmitt JP, Schröder J, Schunkert H, Birnbaum DE, Aebert H. Role of apoptosis in myocardial stunning after open heart surgery. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(4).p.1229-35.
 23. Shalaby A, Rinne T, Järvinen O, Saraste A, Laurikka J, Porkkala H, Saukko P, Tarkka M. Initial results of a clinical study: adenosine enhanced cardioprotection and its effect on cardiomyocytes apoptosis during coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008 Apr;33(4).p.639-44
 24. Tossios P, Bloch W, Huebner A, Raji MR, Dodos F, Klass O, et al. N-acetylcysteine prevents reactive oxygen species-mediated myocardial stress in patients undergoing cardiac surgery: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126.p.1513-20.
 25. Uchiyama T, Engelman RM, Maulik N, Das DK. Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning. *Circulation.* 2004;109.p.3042-3049.
 26. Zota Ieremia, Vataman Vladimir. *Morfopatologie generală. Chișinău – 2010, p. 60.*
 27. Zeiss C.J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *VetPathol*, 2003, vol. 40, p.481
 28. Попович М.И., Костин С.И., Кобез В.А. и др. Клеточная смерть и инотропный ответ миокарда при сердечной недостаточности. *Материалы конференции РФ, посвященной 80-летию академика Е.И.Чазова. Москва, 2009, стр. 211.*
 29. Черешнев В.А. *Патология. 2007, 245 pag.*
-