

Doktori (Ph.D.) értekezés

Iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások farmakológiai befolyásolási lehetőségei

**Írta:
Bak István**

Témavezető: Dr. Tósaki Árpád

Programvezető: Dr. Gergely Lajos

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI KAR
GYÓGYSZERHATÁSTANI TANSZÉK

DEBRECEN

2003

Az értekezés során használt rövidítések:

FK 506:	tacrolimus
EGb 761:	standardizált kínai páfrányfenyő kivonat
HO-1:	hemoxigenáz-1
CO:	szénmonoxid
PBN:	p-N-tert-butil- α -phenilnitron
ZnPPiX:	cink-protoporfirin-IX
PAF:	Platelet Activating Factor
VF:	kamrafibrilláció
VT:	kamrai tachycardia
HR:	szívfrekvencia
CF:	koronária átáramlás
AF:	aorta kiáramlás
LVDP:	bal kamrai nyomás
+LVdp/dt:	a LVDP első deriváltja
NFAT 3:	T-lymphocita aktivált nukleáris faktor
GATA 4:	zinc-finger transcription factor
ISA:	iszkémia
REP:	reperfúzió
GC:	gázkromatográfia
YVAD-cmk:	nem szelektív kaszpáz inhibitor
Ac-DEVD-cmk:	szelektív, kaszpáz-3 inhibitor
z-LEHD-fmk:	szelektív, kaszpáz-9 inhibitor
TUNEL:	terminal-deoxynucleotidil-transferase deoxyuridine nick end labelling
PKC:	Protein Kináz C
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor- α
p38 MAPK:	p38 Mitogen-Activated Protein Kinase

Bevezetés

Napjainkban a szív és érrendszeri megbetegedések világszerte vezetnek a halálozási statisztikákat (1. táblázat) (1). 1999-ben a halálozások főbb halálokok szerinti megoszlásában a szív-keringési betegségek 51,2 %-al az első helyen szerepelnek.

Haláloki csoportok	1970	1980	1990	1995	1998*	1999*
Fertőző és élősdiék okozta betegségek	2,7	1,4	0,9	0,8	0,7	0,7
Daganatok	21,9	26,1	30,1	32,5	33,6	34
<i>Keringési rendszer betegségei</i>	62,2	71,8	73,7	72,1	71,6	72,8
Légzőrendszer betegségei	5,7	9,4	6,4	6,3	5,2	6,2
Emésztőrendszer betegségei	4,4	6,6	8,7	11,6	10,4	10,2
Morbiditás és mortalitás külső okai	9,2	11,5	12,8	11,2	10,2	10,2
Egyéb	10,3	8,9	7,9	7,7	7,6	8,1
Összes halálozás	116,3	135,7	140,5	142,2	139,3	142,2
* A X. Nemzetközi Haláloki Névjegyzék alapján.						

1. táblázat: Tízezer lakosra jutó halálozás kiemelt haláloki csoportok szerint¹

Az elmúlt három évben nem változott lényegesen a keringési betegségek halálozási gyakorisága, azaz igen magas szinten stagnáló állapotot jelez. Az európai népesség kormegoszlására standardizált halálozási arány ebben a betegségcsoportban Magyarországon 3,2-szer magasabb, mint Franciaországban, 2-szer magasabb, mint további 7 európai országban. A volt szocialista országokban kiemelkedően magas a keringési betegségek miatti halálozás, Magyarország közöttük a középmezőnyben helyezkedik el (2. táblázat) (1). Ez a riasztó statisztika önmagában indokolja a témakör részletesebb vizsgálatát, hogy választ kapjunk arra, vajon milyen mechanizmusok játszanak szerepet és milyen hatással vannak a szív és keringési rendszer funkciójára, a szívritmuszavarok és arhythmia kialakulására.

A szívizom iszkémiás megbetegedéseiben és a szívsebészeti beavatkozások során az iszkémia/reperfúzió jelenségének központi szerepe van. Bár a reperfúzió nélkülözhetetlen az iszkémia által károsodott szervek felépülésében, mégsem kockázatmentes, mivel maga a reperfúzió súlyosbíthatja az iszkémia utáni állapotban lévő szövetek funkcióját. Az iszkémiás szívbetegség leggyakoribb következményei az angina

pectoris, szívinfarktus, és az arrhythmiák következtében, elsősorban a kamrafibrilláció miatt fellépő hirtelen szívhalál.

Ország	Év	Standardizált halálozási arány 100 000 lakosra
Franciaország	1994	182,8
Spanyolország	1994	245,9
Svájc	1994	250,5
Belgium	1992	267,7
Hollandia	1995	269,3
Olaszország	1993	284,8
Luxemburg	1995	284,8
Norvégia	1994	293,8
Svédország	1995	295,9
Dánia (b)	1995	316,5
Nagy-Britannia	1995	317,2
Görögország	1995	340,9
Németország	1995	343,8
Portugália	1995	352,5
Finnország	1995	353,9
Szlovénia	1995	366,5
Ausztria	1995	369,3
Írország	1993	401,3
Lengyelország	1995	532,2
Csehország (b)	1995	559,6
Szlovákia (b)	1995	577,7
Magyarország (b)	1999	588,4
Bulgária	1994	706,4
Románia	1995	747,8
Oroszország	1995	795,8
a) A IX. Nemzetközi Halálóki Névjegyzék alapján.		b) A X. Nemzetközi Halálóki Névjegyzék alapján.

2. táblázat

Az európai népesség kormegoszlására standardizált halálozási arányszámok a keringési rendszer betegségei okozta halálozások szerint, 25 európai országban ^{a):1}

A szívizomban az oxigén és tápanyag ellátás hiánya, és az anaerob anyagcseretermékek felszaporodása következtében funkciózavar, majd szöveti elhalás jön létre. Akut iszkémia során a szívizom ATP tartalma és energiatartaléka csökken. Az intracelluláris szabad Ca^{2+} -ion szint megnő a belső raktárak (szarkoplazmatikus retikulum) ürülése, és az extracelluláris térből való beáramlás következményeként. Ez a kalcium-pumpák működésének zavarához, és kimerüléséhez vezethet. A szív kontrakciós ereje és pumpafunkciója nagymértékben lecsökken. A szívkamrák falmozgásaiban zavarok lépnek fel, melyek következtében vérnyomáscsökkenés vagy emelkedés léphet fel. Reflexes

szívfrekvencia, és vérnyomásnövekedés vagy vérnyomáscsökkenés jelenik meg, ami az oxigén hiánya mellett is jelentős energiát emészt fel, így növelve a szívizom kimerülésének esélyét. A Ca^{2+} -ion felhalmozódás, és a pH csökkenés (acidózis) a sejtek „gap-junction”-it lezárja, ami a sejt-sejt közötti kapcsolatok romlásához vezet. Ebben a fázisban bekövetkezhet a szívizom iszkémia, infarctus, vagy a legrosszabb esetben hirtelen szívhalál. A klinikai tünetek leggyakrabban és legkorábban anginás rohamként jelentkeznek. Mindezen folyamatok mellett az ATP szint csökkenés hatására megnyílnak az ATP függő K-csatornák, ami intracelluláris K^+ veszteséhez és az extracelluláris K^+ szint megnövekedéséhez vezet. Az extracelluláris térben megnőtt K^+ -szint depolarizációt okoz, mely a gyors Na-áram csökkentésén keresztül csökkenti az ingerületvezetés sebességét. Ugyanakkor a megnövekedett extracelluláris K^+ -szint megrövidíti a szívizomsejtek repolarizációját, és a refrakter fázisát. Vagyis e mechanizmus is elősegíti a szív kimerülését, az arrythmiák kialakulását. A fenti folyamatok végül kamrai tachycardián keresztül kamrafibrillációhoz vezethetnek.

Tennant és Wiggers megfigyelte, hogy a kamrafibrilláció nem csak az iszkémiás szakaszban, hanem a keringés visszaállítása után, a reperfúziós szakaszban is nagy intenzitással bekövetkezhet (2). Vagyis a reperfúzió -mely nélkül az iszkémiás szívizom elhal- arrythmiához vezethet. Ennek egyik oka az, hogy azokban a sejtekben, melyek az iszkémia ideje alatt hypoxiássá váltak, a hirtelen reoxigenizáció, nagymértékű enzimfelszabadulással, és strukturális károsodással jár az iszkémiás metabolitok kimosódása és a szabad gyökképződés miatt. A reperfúzió során keletkezett szabad gyökök által okozott fokozott oxidatív stresszt tartják a reperfúzió indukálta károsodások egyik fő összetevőjének. Az egyik lehetséges megközelítés szerint exogén antioxidánsokkal csökkenteni lehet a miokardiális iszkémia/reperfúzió során bekövetkező oxidatív sejt-károsodást. Meglehet, hogy ez a stratégia nem elegendő arra, hogy megvédje a sejteket a szabad gyökök által indukált károsodásoktól, mivel ezen exogén antioxidánsok előfordulása főleg az interstitiális térre korlátozódik (3). Másik lehetőség az iszkémiás/reperfundált szervek védelmében, endogén védekező mechanizmusok indukálása, melyek célzottan szerepet játszanak a sejt homeosztázisában és funkciójában.

A miokardiális iszkémia/reperfúzió a miociták pusztulását okozza, amennyiben megfelelő terápiás beavatkozás nem történik meg. Különböző tanulmányok bizonyították, hogy a miociták pusztulása kétféle mechanizmuson, apoptózison és nekrozison keresztül történhet. Már korábban leírták, hogy az apoptózis, a programozott sejthalál egy morfológiailag jól definiált formája, hozzájárulhat a miociták irreverzibilis károsodásához

(4) DNS fragmentáció útján. Az elmúlt két évtizedben számos vizsgálatot végeztek annak érdekében, hogy csökkentsék az iszkémia/reperfúzió okozta sejthalál, és ez által az infarktusos terület mértékét. Az apoptózis általános, egyik jól ismert „végrehajtói” a kaszpázok aktiválódása és szignálmechanizmusa. Az aktivált kaszpázok indukálják a sejtekben az apoptózis végbemenetelét az által, hogy megváltoztatják különböző intracelluláris proteinek funkcióját (5). Ezért a kaszpázok gátlása célravezető lehet az iszkémia/reperfúzió indukálta apoptózis mértékének csökkentésére.

Célkitűzések

Kísérleteinkben az iszkémia/reperfúzió indukálta arrhythmia farmakológiai befolyásolási lehetőségeit vizsgáltuk, izolált patkányszíveken. Munkáinkat három fő témakörre összpontosítottuk:

- I. Vizsgálni kívántuk az FK 506 jelzésű calcineurin inhibitor és az EGb 761 jelzésű kínai páfrányfenyő kivonat kombinált hatását a posztiszkémiás szívfunkciók felépülésére és a reperfúzió indukálta arrhythmia kialakulásának csökkentésére.
- II. Célul tűztük ki a Hemoxigenáz-1 (HO-1) mRNS expresszióhoz kapcsolódó celluláris védekező mechanizmusok és az endogén szénmonoxid (CO) hatásának vizsgálatát reperfúzió során, fibrilláló és nem fibrilláló szívekben. Vizsgálni kívántuk továbbá a p-n-tert-butil- α -phenilnitron (PBN), mint gyökfogó molekula, hatását a HO-1 mRNS és protein expresszióra, valamint az endogén CO termelésre. Továbbá tanulmányozni kívántuk a cink-protoporfirin IX (ZnPPiX), HO inhibitor, hatását a HO-1 mRNS és protein expresszióra, illetve az enzim aktivitásra.
- III. Célkitűzéseink közé tartozott továbbá a miokardiális apoptózis mechanizmusának vizsgálata. Választ kerestünk arra, hogy kaszpáz apoptotikus mechanizmus gátlásával -általános, vagy specifikus inhibitorok használatával- csökkenthető-e az infarktusz terület nagysága, illetve az apoptózis mértéke a szívizomban, valamint az enzim gátlása elősegíti-e a posztiszkémiás szívfunkciók felépülését.

Kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatok humánus bánásmódban részesültek a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásainak megfelelően (NIH publication no. 86-23, 1985).

I. Az FK 506 és EGb 761 kombinált hatásának vizsgálata

A szívbetegségek, és a szívsebészeti beavatkozások miokardiális iszkémiás állapotot eredményeznek. A vérellátás helyreállása és az iszkémiás szövet reoxigenizációja számos szöveti károsodást okoz, melyet az irodalom alapján reperfüzió-indukálta károsodásként ismerünk, melyek különböző formákban, pl. kamrai arrythmiákban vagy a szívfunkciók romlásában nyilvánulnak meg. Ez többek között a miokardiális membránlipideknek, a reperfüzió kezdeti szakaszában nagy mennyiségben keletkező szabad gyökök általi oxidációjának következménye, mely sejtmembrán károsodást és funkciózavart okoz (6). Alátámasztja ezt az a tény is, hogy a posztisztkémiás szívfunkciók jelentős mértékben javulnak antioxidánsok adagolása következtében (7-9). Több laboratórium a szabad gyököket, mint a reperfüziós sérülés fő okozóit különböző módszerek alkalmazásával bizonyította. Alátámasztotta ezt a megfigyelést, hogy különböző antioxidáns vegyületek (szuperoxid-diszmutáz, kataláz, vitaminok) adagolása javította az iszkémiát követő szívfunkciókat és a szabad gyökök befogásával egyenes arányban csökkentette az arrythmiák kialakulásának a valószínűségét (10, 11).

A különböző szövetek reperfüziós károsodásához jelentős mértékben hozzájárul az ún. vérlemezke aktiváló faktor (Platelet Activating Factor: PAF), egy gyulladási mediátor, mely az arachidon sav metabolizmusa során keletkezik a növekvő intracelluláris kalcium beáramlás következtében (12-15). Kimutatták, hogy PAF receptor antagonistá vegyületek képesek a reperfüzió indukálta sérülések szignifikáns csökkentésére (14, 15).

A Kínából származó páfrányfenyő (*Ginkgo biloba*) leveleiből készült standardizált kivonatot, az EGb 761-et, széleskörben alkalmazzák különböző ér- és idegrendszeri rendellenességek kezelésére (16). A kivonat tartalmaz többek között 24 % flavonoidot, 7 % proanthocianidin származékot, valamint ~6 %-ban terpén eredetű, igen jelentős antioxidáns hatásokkal rendelkező ginkgolidokat és bilobalidokat (17). A flavonoidok és a proanthocianidinek kiváló gyökfogó molekulák (18), míg a terpének -főként a ginkgolidok- inhibitorai a vérlemezke aktiváló faktornak (17). Így az EGb 761 két mechanizmus útján is csökkentheti a reperfüzió indukálta károsodások mértékét: 1) a reperfüzió során keletkező szabad gyökök eliminációjával, illetve 2) PAF antagonistá tulajdonsága következtében.

A calcineurin egy citoplazmában található foszfátáz. Az enzim intracelluláris kalcium-szint szabályozta aktivitása, felerősíti olyan gének expresszióját, melyek

nagymértékben hozzájárulnak a szívhipertrófia és végeredményben a szívelégtelenség kialakulásához (19). Korábban kimutatták, hogy a calcineurin aktivitás FK 506 jelzésű immunszuppresszánsal történő gátlásával a szívhipertrófia kialakulása csökkent, vagy megszűnt, olyan egerekben, melyek hajlamosak erre a rendellenességre (19). A calcineurin-függő pathophysiológias folyamatok hozzájárulnak az iszkémiát követő reperfüziós károsodásokhoz. Ez által jogosan feltételezhetjük, hogy az FK 506 nem csak a hipertrófia, hanem az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások megelőzésére is alkalmas lehet. Mindamelllett humán betegek hosszantartó kezelése a hipertrófia vagy az iszkémiás állapot kezelésére megfelelő dózissal, elfogadhatatlan és súlyos mellékhatásokat eredményezhet az FK 506 toxicitása következtében (19-22). Feltételeztük, hogy az FK 506 terápia EGb 761-el történő kombinációja, lehetővé teszi az FK 506 használatát szubtoxikus koncentrációkban. Ezért kísérleteinkben az FK 506 és az EGb 761 kombinált adagolásának hatásait vizsgáltuk a reperfüzió indukálta arrhythmiai kialakulására és az iszkémiát követő szívfunkciókra.

Módszerek és anyagok

Izolált „dolgozó-szív” preparátum készítése

Kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányok (250-300 g) szívét izoláltuk, és „dolgozó” perfúziós készülékkel perfundáltuk. Nátrium-pentobarbitállal (60 mg/kg) történő általános érzéstelenítést követően iv. heparint adtunk (500 IU/kg) a trombusok kialakulásának megelőzésére. A mellkas megnyitása után a szívet kimetszettük és hideg perfúziós oldatba helyeztük. A preparálást követően a szívet az aortán és a vena pulmonalis-on keresztül ún. „dolgozó-perfúziós” készülékkel perfundáltuk. A perfúziós oldat módosított Krebs-Henseleit puffer volt, melynek összetétele a következő (mM-ban kifejezve): 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.7 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 0.36 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 10 glükóz. A perfúziós oldatot előzőleg 95 % O₂ és 5 % CO₂ keverékével telítettük (pH: 7.4, 37 °C). A szíveket 5 percig Langendorff-módszer szerint perfundáltuk 37 °C-on és konstans perfúziós nyomáson, mely 100 cm-es vízoszlop nyomásával volt egyenértékű (10 kPa). A mosási periódust követően a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk és regisztráltuk a szívfunkciókat. Az aorta kiáramlást kalibrált áramlásmérővel, a koronária átáramlás mértéket pedig a szívből kicsöpögő folyadék határozott ideig történő gyűjtésével mértük.

Iszkémia/reperfúzió kiváltása

Tíz perc aerob perfúziót követően elzártuk a bal pitvarba történő beáramlás és a bal kamrából történő kiáramlás útját, majd meghatározott ideig így iszkémiát hoztunk létre. A reperfúzió indításához megszüntettük az elzárásokat. Az iszkémia teljes ideje alatt, hogy megvédjük a miokardiumot a kiszáradástól, az üvegedény páratartalmát, mely a szívet körülvette befedtük, s így a páratartalmat konstans (90-100 %) értéken tartottuk.

Mért paraméterek

A kísérletek teljes ideje alatt regisztráltuk az epikardiális elektrokardigramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezettünk el és poligráffal rögzítettünk. Az EKG-kat analizáltuk, hogy meghatározzuk a kamrafibrilláció (VF) és kamrai tachycardia (VT) előfordulását, valamint, hogy a VF reverzibilis (a szív spontán visszatért a normális ritmusba), vagy irreverzibilis (a reperfúzió első 3 percében folyamatosan fennállt) volt e. Három perc kamrai fibrillációt követően (irreverzibilis VF) a szíveket defibrilláltuk és regisztráltuk a szívfunkciókat. Iszkémia előtt és reperfúzió során regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a koronária átáramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint a bal kamrai nyomást (LVDP) és annak első deriváltját ($+LVdp/dt_{max}$) (Experimetria, Budapest) a bal pitvaron és a mitrális billentyűn keresztül a bal kamrába helyezett katéter segítségével.

A kísérletek időbeli lefolyása

A vizsgálat első részében a patkányokat (n=12 csoportonként) különböző dózisú (0, 1, 5, 10, 20 és 40 mg/kg/nap) FK 506-al kezeltük 10 napon keresztül. Huszonnégy órával az utolsó kezelést követően a szíveket izoláltuk és 30 perc teljes (totál) iszkémiát követő 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. A vizsgálat második részében az állatokat 10 napon keresztül orálisan kezeltük 25 mg/kg/nap EGb 761-el, 25 mg/kg/nap EGb 761 plusz 1 mg/kg/nap FK 506-al, 25 mg/kg/nap EGb 761 plusz 5 mg/kg/nap FK 506-al, külön-külön. Az utolsó kezelés után 24 órával a szíveket izoláltuk és végrehajtottuk rajtuk, a fentebb említett iszkémia/reperfúziós protokollt. A kísérletek során regisztráltuk az arrhythmiák (VF, VT) előfordulását, valamint a szívfunkciókat (HR, CF, AF, LVDP és $+LVdp/dt_{max}$).

A szíveket a kísérletekből kizáró okok

Azon szíveket zártuk ki a kísérletekből, melyeknél: a) kamrai arrhythmia alakult ki az iszkémia indukciója előtt és b) a preiszkémiás CF és AF értékek 17 ml/perc és 40 ml/perc alatt voltak. Így összesen ebből a kísérletsorozatból 3 szívet zártunk ki.

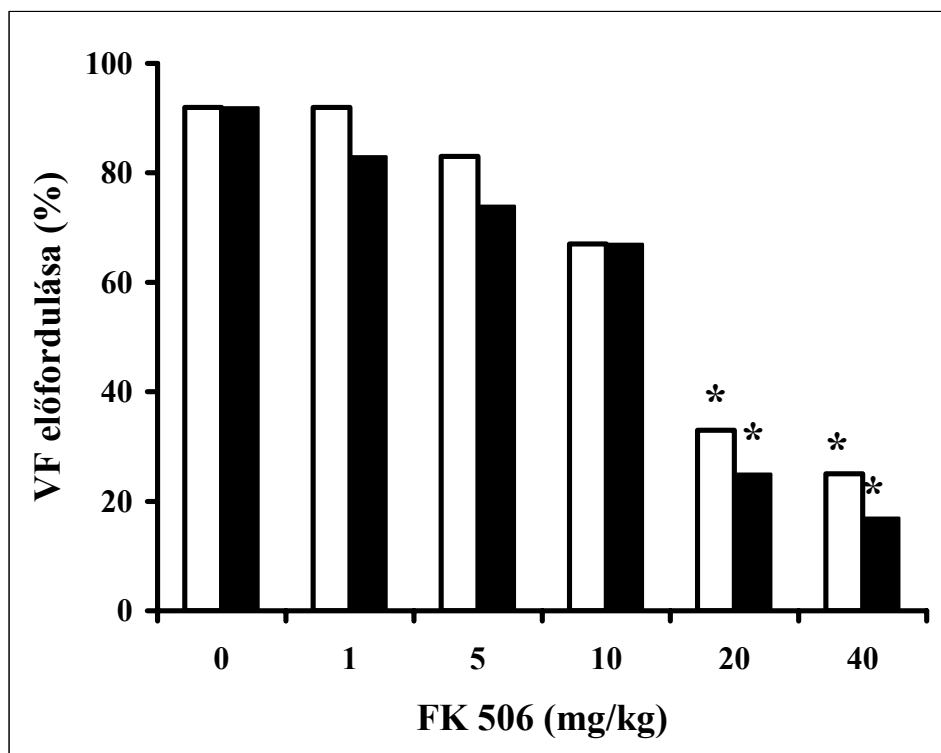
Statisztika

A szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP és $+LVdp/dt_{max}$) értékeinek összehasonlításakor a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Először „egyutas” variancia analízist végeztünk, hogy megtudjuk, van-e különbség a különböző csoportok adatai között. Ha volt különbség, a gyógyszerrel kezelt csoportok értékeit a gyógyszermentes csoportéval a Bonferroni korrekcióval kiegészített kétmintás t-tesztel hasonlítottuk össze. A VF és VT nem parametrikus (nem követi a Gauss eloszlást) eloszlást követ, ezért ezen paraméterek összehasonlításakor hí-négyzet tesztet alkalmaztunk a kezelt és kezeletlen (kontrol) csoportok összehasonlításakor. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $p < 0.05$.

Eredmények

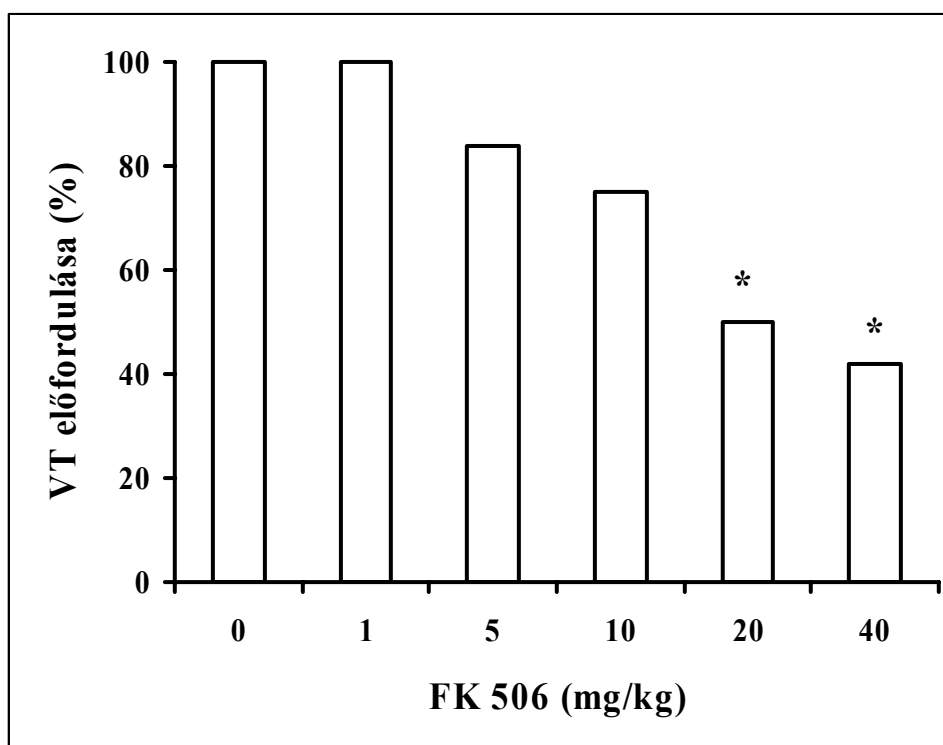
Az FK 506 hatása az arrhythmia kialakulására és a szívfunkciókra

Az eredmények azt mutatják (1. ábra), hogy a különböző dózisú FK 506-al kezelt állatokban a reperfüzió indukálta kamrai fibrilláció kialakulása dózis-függő módon csökkent.



1. ábra: Az FK 506 dózis-függésének vizsgálata a kamrai fibrilláció előfordulására.

□ Total (reverzibilis + irreverzibilis VF); ■ irreverzibilis VF



2. ábra: Az FK 506 dózis-függésének vizsgálata a kamrai tachycardia előfordulására.

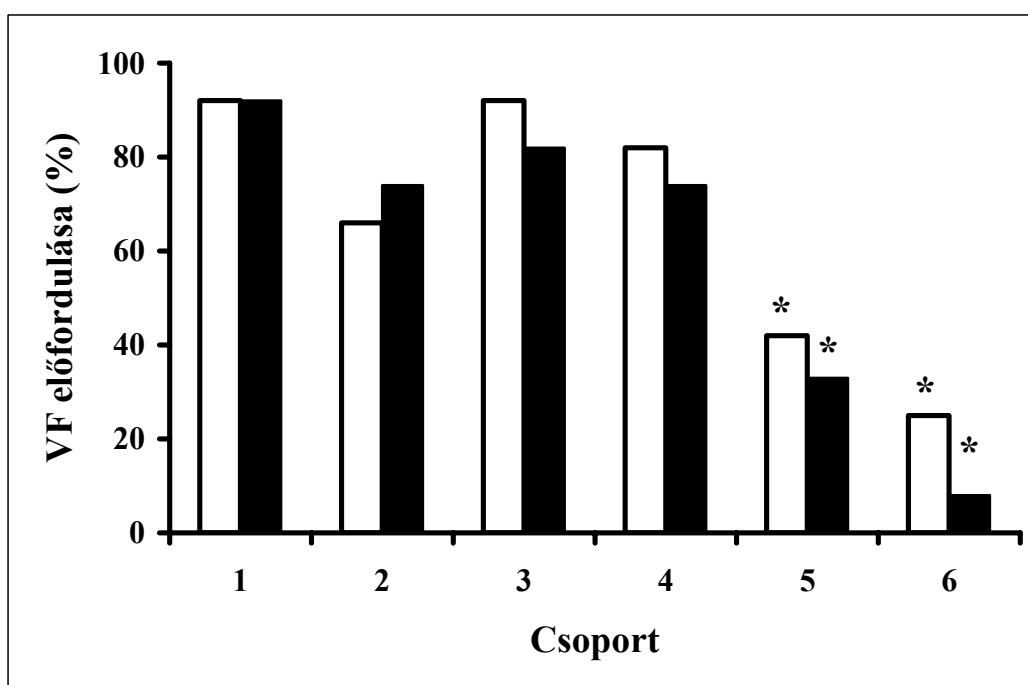
Tehát 1, 5, 10, 20, és 40 mg/kg FK 506 csökkentette a totál (reverzibilis és irreverzibilis) kamrai fibrillációk kialakulását, a gyógyszermentes kontrol értékhez viszonyítva, 92 %-ról 92%-ra, 83%-ra, 67%-ra, 33%-ra ($p < 0.05$) és 25%-ra ($p < 0.05$) egyenként (1. ábra üres oszlopok).

Az irreverzibilis kamrai fibrilláció (1. ábra fekete oszlopok) és a kamrai tachycardia előfordulása (2. ábra) ugyanezt a tendenciát mutatta. Az állatok kiválóan tolerálták az FK 506-ot és semmiféle tünetek nem voltak tapasztalhatók az állatokon a 10 napos kezelés során. Nem volt látható jele toxicitásnak még a legmagasabb alkalmazott dózis esetén sem.

A kezeletlen csoport HR, CF, AF, LVDP és $+LVdp/dt_{max}$ értékei (305 ± 8 ütés/perc, 27.3 ± 0.8 ml/perc, 49.9 ± 1.4 ml/perc, 18.2 ± 0.3 kPa és 807 ± 21 kPa/s) nem változtak szignifikáns mértékben FK 506 kezelés következtében. Az 3. táblázatban a posztisztkémiai szívfunkció értékei láthatóak a kontrol és FK 506-al kezelt csoportokban. Megfigyelhető, hogy 20 és 40 mg/kg FK 506-al történt kezelés a posztisztkémiai szívfunkciók (CF, AF, LVDP és $+LVdp/dt_{max}$) jelentős mértékű javulását eredményezte. A szívfrekvencia nem mutatott szignifikáns változást a kezelt csoportokban a kezeletlen kontroll értékekkel összehasonlítva sem iszkémia előtt, sem pedig az iszkémiát követő reperfúzió során.

Az FK 506 és az EGb 761 kombinált hatása az arrhythmia kialakulására és a posztisztkémias szívfunkciók felépülésére

A 3. ábrán látható, hogy sem 25 mg/kg EGb 761 kezelés, sem pedig 1 vagy 5 mg/kg FK 506 kezelés nem csökkentette szignifikánsan a reperfüzió indukálta arrhythmia (VF és VT) kialakulását. Viszont 25 mg/kg EGb 761 együttdása 1, illetve 5 mg/kg FK 506-al, statisztikailag szignifikáns mértékben csökkentette a total (reverzibilis és irreverzibilis) és az irreverzibilis kamrai fibrillációk előfordulását, a 92-92 %-os kontroll értékekről 42% ($p < 0.05$) és 33%-ra ($p < 0.05$), valamint 25% ($p < 0.05$) és 8%-ra ($p < 0.05$) (3. ábra). A reperfüzió indukálta kamrai tachycardia hasonló mértékű csökkenést mutatott (4. ábra).



3. ábra: Az FK 506 és EGb 761 kombinációjának dózis-függés vizsgálata a kamrai fibrilláció kialakulásának csökkentésére. 1: Kontroll; 2: 25 mg/kg EGb 761; 3: 1 mg/kg FK 506; 4: 5 mg/kg FK 506; 5: 25 mg/kg EGb 761 + 1 mg/kg FK 506; 6: 25 mg/kg EGb 761 + 5 mg/kg FK 506

□ Total (reverzibilis + irreverzibilis VF); ■ irreverzibilis VF

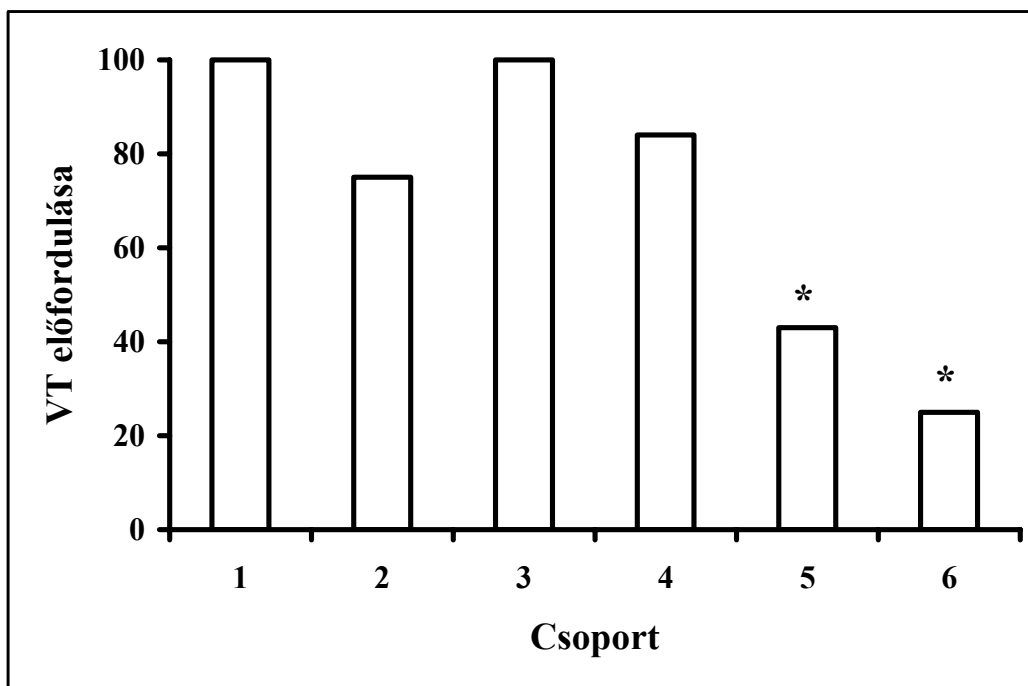
A 4. táblázat szemlélteti, hogy a szívfunkciók nem változtak jelentős mértékben abban az esetben, ha csak az egyik, vagy csak a másik anyaggal kezeltük az állatokat, az alkalmazott dózisok esetén. Abban az esetben, ha 25 mg/kg EGb 761-t kombináltuk 1, illetve 5 mg/kg FK 506-al a posztisztkémias szívfunkciók (CF, AF, LVDP és $LVdp/dt_{max}$) felépülése szignifikáns mértékben javult ($p < 0.05$). A szívfrekvencia az egyetlen paraméter, mely nem mutatott változást sem iszkémia előtt, sem pedig utána a kezelés hatására.

3. táblázat: Az FK 506 hatása a szívfunkciókra, 30 perc iszkémiát követő 120 perc reperfúzió során

FK 506 (mg/kg)	30 perc reperfúziót követően					60 perc Reperfúziót követően					120 perc reperfúziót követően				
	HR	CF	AF	LVDP	+dp/dt _{max}	HR	CF	AF	LVDP	+dP/dt _{max}	HR	CF	AF	LVDP	+dP/dt _{max}
0	306±6	16.8±0.8	9.8±0.8	10.7±0.5	417±16	293±7	18.0±0.7	11.8±0.6	11.2±0.5	439±18	287±6	17.3±0.5	10.4±0.5	10.8±0.4	428±21
1	315±9	18.2±1.0	10.6±0.4	10.7±0.6	422±28	306±8	16.9±0.9	10.9±0.8	11.9±0.5	447±26	302±9	17.5±0.7	10.1±0.6	11.2±0.3	432±17
5	298±7	18.0±1.1	12.0±0.9	11.0±0.4	430±34	282±7	18.4±0.7	13.3±1.0	12.0±0.7	463±23	279±8	18.1±0.8	11.2±0.8	11.5±0.4	451±32
10	308±8	20.0±1.4	12.0±1.2	11.5±0.5	478±44	310±9	19.6±1.2	13.3±1.2	12.3±0.7	472±32	307±7	18.8±1.1	11.4±0.7	11.7±0.6	463±29
20	298±9	23.1±1.1*	17.4±0.8*	13.5±0.6*	536±28*	297±8	22.0±1.1*	19.8±1.5*	14.1±0.6*	544±31*	295±6	21.2±0.9*	17.3±1.1*	13.2±0.5*	519±26*
40	291±7	24.7±1.5*	20.6±1.3*	14.1±0.6*	557±31*	286±9	23.5±0.8*	22.9±2.1*	15.3±0.6*	594±26*	289±8	22.8±1.1*	20.0±1.8*	14.6±0.6*	568±33*

4. táblázat: Az FK 506 és az EGb 761 kombinált hatása a szívfunkciókra 30 perc iszkémiát követő 120 perc reperfúzió során

EGb761/FK506 (mg/kg)	30 perc reperfúziót követően					60 perc Reperfúziót követően					120 perc reperfúziót követően				
	HR	CF	AF	LVDP	+dp/dt _{max}	HR	CF	AF	LVDP	+dP/dt _{max}	HR	CF	AF	LVDP	+dP/dt _{max}
0/0	306±6	16.8±0.8	9.8±0.8	10.7±0.5	417±16	293±7	18.0±0.7	11.8±0.6	11.2±0.5	439±18	287±6	17.3±0.5	10.4±0.5	10.8±0.4	428±21
25/0	294±8	17.4±0.5	11.0±0.7	11.2±0.5	425±17	287±9	19.1±0.9	12.3±0.9	12.2±0.5	458±20	292±8	18.1±0.7	11.1±0.6	11.5±0.5	433±19
0/1	315±9	18.2±1.0	10.6±0.4	10.7±0.6	422±28	306±8	16.9±0.9	10.9±0.8	11.9±0.5	447±26	302±9	17.5±0.7	10.1±0.6	11.2±0.3	432±17
0/5	298±7	18.0±1.1	12.0±0.9	11.0±0.4	430±34	282±7	18.4±0.7	13.3±1.0	12.0±0.7	463±23	279±8	18.1±0.8	11.2±0.8	11.5±0.4	451±32
25/1	300±7	21.5±0.9*	23.9±1.1*	12.9±0.4*	522±23*	296±6	19.5±1.2*	21.8±0.9*	14.1±0.6*	561±24*	292±7	21.8±1.0*	19.2±1.9*	13.8±0.6*	540±30*
25/5	309±6	23.9±1.2*	25.2±1.2*	13.6±0.5*	528±27*	302±9	23.2±1.1*	23.9±1.0*	15.3±0.6*	588±31*	300±8	24.2±1.5*	22.4±1.0*	15.0±0.7*	588±23*



4. ábra: Az FK 506 és EGb 761 kombinációjának dózis-függés vizsgálata a kamrai tachycardia kialakulására.
 1: Kontrol; 2: 25 mg/kg EGb 761; 3: 1 mg/kg FK 506; 4: 5 mg/kg FK 506; 5: 25 mg/kg EGb 761 + 1 mg/kg FK 506; 6: 25 mg/kg EGb 761 + 5 mg/kg FK 506

Diszkusszió

Veszélyes kamrai arrhythmiák -melyek gyakran hirtelen szívhalált eredményeznek- alakulhatnak ki a posztisztkémias reperfüziós károsodások következtében. Az iszkémiát követő reperfüzió során, a miokardiumban nagy mennyiségben felszabaduló szabad gyökök, jelentős mértékben hozzájárulnak az arrhythmiák kialakulásához és a szívfunkciók romlásához. Elégtelen szívfunkciók, valamint arrhythmiák felléphetnek hypertónia, hormonális elváltozások, vagy a szív kontrakciós elemeinek genetikai mutációja következtében kialakuló hipertrófia eredményeként (23, 24). Minden egyes faktor, mely hozzájárul a hipertrófiás válasz kialakulásához, az intracelluláris kalcium szint emelkedését okozza. Ez a patológiás folyamat a calcineurin calmodulin-függő aktiválását eredményezi, mely hatással van az NFAT 3 transzkripciós faktor prekursorára a citoplazmában. Ennek következtében az NFAT 3 áthelyeződik a sejtmagba, ahol kölcsönhatásba lép a szívre korlátozott GATA 4 cink-ujj transzkripciós faktoral, mely jelenlegi ismereteink szerint hipertrófiát okoz (19). Ennek következtében logikusan feltételezhetjük, hogy a calcineurin gátlása megakadályozhatja a hipertrófiás körülmények kialakulását. Bizonyították, hogy mind az FK 506, mind pedig a cyclosporine, melyek calcineurin gátló

immunoszuppresszáns vegyületek, kardioprotektív hatást fejtenek ki calcineurinra transzgenikus egerekben, melyek hipertrófiára hajlamosak (19).

Kísérleteink során feltételeztük, hogy a calcineurin FK 506-al történő gátlása gátolhatja az arrhythmiai kialakulását is, valamint javíthatja az iszkémiát követő szívfunkciókat. Továbbá feltételeztük azt is, hogy a ginkgolidok jól ismert antioxidáns tulajdonságuk mellett, gátló hatást fejtenek ki a vérlemezke-függő intracelluláris kalciumszint növekedésre. Végül feltételeztük, hogy a ginkgolidok hatása additív módon befolyásolhatja az FK 506 hatását.

Eredményeink alátámasztják azon feltételezést, mely szerint az FK 506 antiarrhythmias hatású lehet, továbbá bizonyítják, hogy az FK 506 képes a szívfunkciók javítására, ha azt megfelelő dózisban alkalmazzuk. Az állatok FK 506-al történő előkezelése dózisfüggő módon javította a posztisztkémiás szívfunkciókat, illetve gátolta az iszkémiát követő kamrai arrhythmiai (VF, VT) kialakulását. Valószínűsíthető, hogy ez a hatás a calcineurin/NFAT3/GATA4 folyamatsor gátlásának eredménye, melyről ismert, hogy magába foglalja közvetlen, korai gének aktiválódását, mint pl. a *c-fos* és *c-myc* protoonkogén expresszióját, éppúgy, mint magzati szívspecifikus gének emelkedett aktivitását (25).

Az FK 506 egy calcineurintól független tulajdonságával is magyarázható (26) részben az általunk leírt kardioprotektív hatás. Megfigyelték, hogy fiziológias körülmények között az FK 506 komplexet képez az FKBP 12-vel, egy folyamatosan expresszálandó 12 kDa immunofilin proteinnel, mely következképpen kötődik a calcineurinhoz. Ezáltal gátolja az enzimet, hogy a citoplazmában levő NFAT 3-t defoszforilálja, megakadályozva ezáltal a NFAT 3 függő génextpressziót (27). Mindamellert, mivel a molekuláris jelátviteli útvonalak, melyek a calcineurintól függő génextpressziót összekapcsolják az arrhythmiai kialakulásával és a szívfunkciók változásával, még nem ismertek, ezen munka alapján az észlelt hatások nem magyarázhatóak meg, csupán feltételezések lehetségesek.

Az FK 506-ról leírták, hogy cardiomyopátiát okoz majmokban (20), illetve, hogy általában kevésbé toxikus, mint más immunszuppresszáns vegyületek (21). Mindamellert ismert, hogy a gyógyszer hosszú távú használata vesekárosodást (22), valamint kedvezőtlen interakciókat okoz (22). Ezért feltételezhető, hogy az FK 506 kombinálása más gyógyszerkészítményekkel csökkentik a gyógyszer alkalmazandó dózisát anélkül, hogy csökkentenék kardioprotektív hatását, s ily módon lehetővé válik az FK 506 klinikai alkalmazása különböző szívbetegségek megelőzésében és terápiájában. Kísérleteinkben a

kínai páfrányfenyő standardizált kivonatát (EGb 761) választottuk az FK 506-al történő kombinált kezeléshez, hiszen jól ismert annak kardioprotektív hatása, alacsony toxicitása mellett (10).

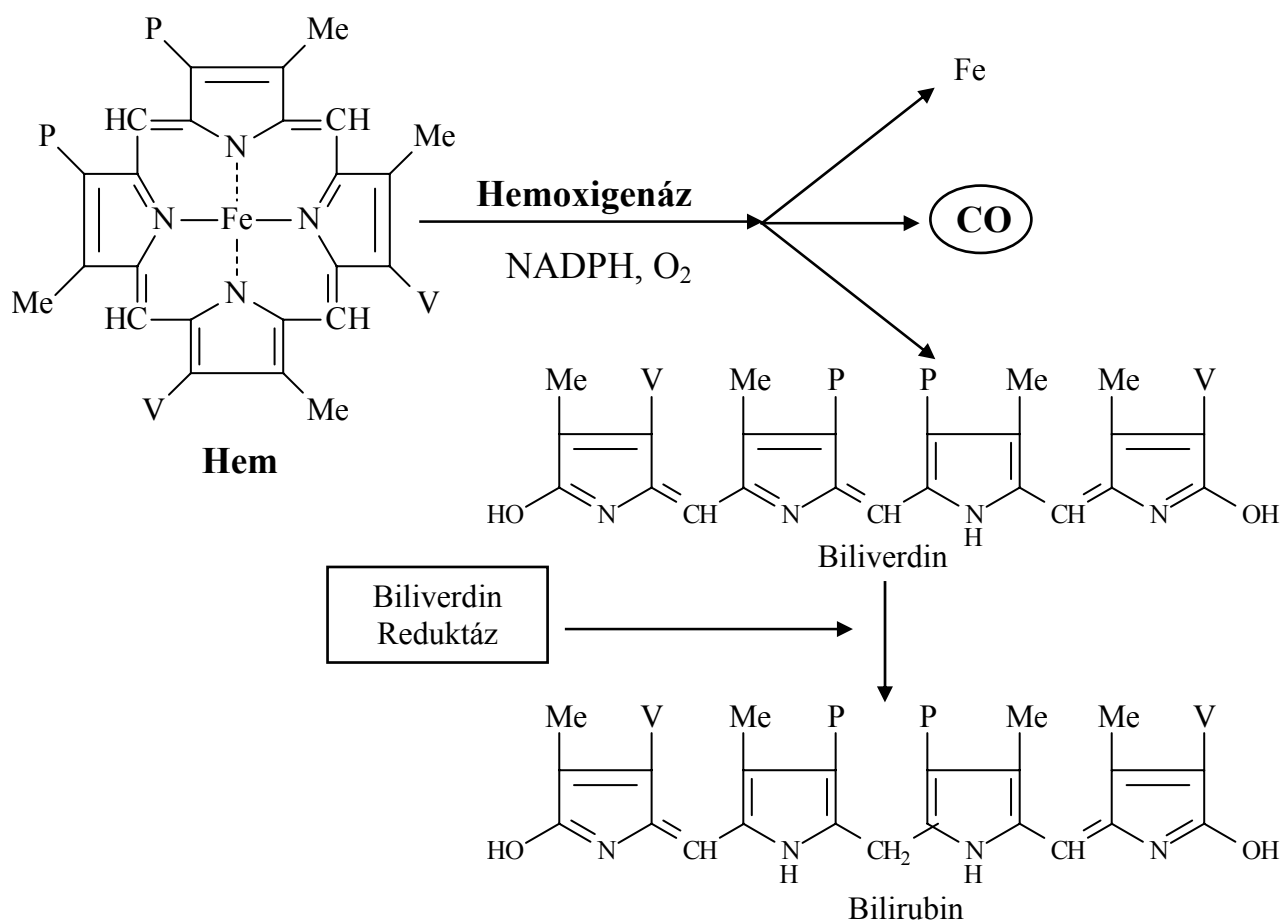
Korábban leírták, hogy az EGb 761 hosszú távú adagolása (200 mg/kg/10 nap) kb. 50 %-os csökkenést eredményezett a reperfúzió indukálta arrhythmia kialakulásában, patkányokon végzett kísérletekben (10). Megjegyzendő, hogy kísérleteinkben a ginkgolid legnagyobb dózisa 25 mg/kg volt, mely nem eredményezett jelentős csökkenést sem a kamrai fibrilláció, sem pedig a kamrai tachycardia kialakulásában. Ehhez hasonlóan 1, 5 és 10 mg/kg FK 506 nem volt hatással az előbb említett kamrai arrhythmiaakra (1-2. ábra). Mindamellett a két anyag kombinációjával történő kezelés csökkentette a posztiszkiémás arrhythmia kialakulási valószínűségét (3-4. ábra) és ezzel párhuzamosan javította az iszkémiát követő szívfunkciókat (4. táblázat). A hatásokhoz hozzájáruló molekuláris mechanizmusok jelenleg még nem ismertek, de majdnem biztosan magukba foglalják az oxigén tartalmú szabad gyökök csökkenését, ami a miociták membránjának kisebb mértékű károsodását okozza, mely az EGb 761 antioxidáns tulajdonságának eredménye. E mellett a ginkgolidok hozzájárulhatnak a Na^+ , K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok membránon keresztül történő fiziológiás cseréjének és eloszlásának helyreállításához. Ezt a feltételezést alátámasztja az a megfigyelés is, mely szerint az EGb 761 és antioxidáns enzimek (SOD, vagy kataláz) együttadása, dózis-függő csökkenést eredményezett a reperfúzió indukálta arrhythmia kialakulásában, párhuzamosan a szabad gyökök koncentrációjának csökkenésével, patkányszíveken végzett kísérletek alapján (10). Mint az korábban említésre került, az EGb 761 PAF antagonistá tulajdonsága következtében is csökkentheti a reperfúzió indukálta arrhythmia kialakulását. A PAF nagymértékben hozzájárul különböző betegségek, többek között szívbetegségek, kialakulásához (12, 13). Továbbá bizonyították, hogy a PAF közvetlenül hozzájárul az iszkémiát követő reperfúziós károsodásokhoz mind a szívizomban, mind pedig egyéb szövetekben. Ezt a hatást meggátolhatjuk PAF-receptor antagonistá vegyületekkel, pl. ginkgolidokkal történő előkezeléssel (14, 15).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a patkányok FK 506 és Ginkgo biloba kombinációjával történő kezelése a posztiszkiémás szívfunkciók javulását és az arrhythmia csökkenését eredményezte. Az alkalmazott két vegyület együtt adása additív szinergista hatást váltott ki. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a mindkét anyagot magába foglaló gyógyszeres beavatkozás, egy új és hatékony lehetőséget biztosíthat a szívbetegségek és sebészeti beavatkozások következtében fellépő iszkémiás károsodások kezelésében. Eredményeink szintén felvetik a lehetőségét annak, hogy szívhipertrófia

kialakulása megelőzhető a kombinált terápia alkalmazásával, lehetővé téve az FK 506 szubtoxikus dózisu alkalmazását, a ginkgolidokkal történő együttadásnak köszönhetően.

II. A hemoxigenáz és az endogén szénmonoxid szerepének vizsgálata iszkémiás/reperfundált szívizomban

Az adaptáció a hypoxiához vagy az iszkémiához, alapvető jelentőségű a fejlődés, fiziológia és patofiziológia folyamataiban. A humán és más emlős sejtek, szövetek, szervek a csökkent oxigén ellátásra fiziológiailag fontos gének, proteinek, enzimek expressziójával válaszolnak. A közelmúltban egy új enzimszisztéma került a kutatások előterébe: a Tenhunen és mtsai által azonosított mikroszómális hemoxigenáz (28), mely a hem oxidatív lebontását katalizálja. A folyamat során az enzim oxigén és NADPH jelenlétében felhasítja a hem porfirinűrűjének α -metin hídját, amely így nyíltláncú biliverdinné alakul, s eközben felszabadul a vas, valamint equimoláris mennyiségű szénmonoxid keletkezik. A biliverdint a biliverdin reduktáz bilirubinná alakítja (5. ábra).



5. ábra: A hemoxigenáz működési mechanizmusának sematikus ábrája.

Me: Metil; V: Vinil; P: Propionát

A HO-nak három izoenzime ismert, HO-1, HO-2 és HO-3, melyek különböző gének termékei. A HO-1, mely hsp (heat shock protein) 32 néven is ismert, indukálható forma és az emlős szervezet szinte minden szövetében előfordul. Expresszióját indukálhatják nehézfém ionok, olyan stimulusok és anyagok, melyek oxidatív károsodást okoznak, pl. hő-sokk, UV sugárzás, hyperoxia, hypoxia és iszkémia is (29, 30). A HO-2 és a HO-3 konstitutívan expresszálódik. Az előbbi főleg a központi idegrendszerben és a tesztiszben található (29, 31), míg utóbbiról melynek aminosav szekvenciája ~ 90 %-ban azonos a HO-2-vel viszonylag keveset tudunk. Kevésbé aktív, mint a HO-2 (32), szerepe még nem teljesen tisztázott.

Az elmúlt néhány évben jelentősen megnőtt azon közlemények száma, melyek különböző biológiai funkciókat tulajdonítanak a HO katalizálta hem metabolizmus termékeinek. A porfirinyűrűből felszabaduló vas prooxidáns tulajdonságú (33), míg ezzel ellentétben a keletkező biliverdin, illetve redukált formája a bilirubin hatékony antioxidáns vegyületek (33, 34). Egyre több bizonyíték van arra is, hogy a folyamat harmadik terméke a CO fiziológiai jelátvivő molekulaként funkcionálhat (35-37) illetve, hogy képes a guanil-cikláz aktiválására, ezáltal a celluláris cGMP szint szabályozására (emelésére), hasonlóan a nitrogén oxidhoz, így szerepet játszhat egyaránt a fiziológiás és patológiás értónus szabályozásában (33, 38, 39). A HO rendszer jelentőségét már számos betegségben, többek között asthmában (40, 41), endotoxémiában (42), cardiomyopathiában (43), és iszkémia/reperfúzió indukálta sérülésekben (34, 44, 45) is leírták. A bizonyítékok növekvő számának tükrében, mely szerint a HO-1 védelmet biztosít az oxidatív károsodások ellen, a kutatók több figyelmet fordítottak a HO-katalízis antioxidáns tulajdonságú „melléktermékeire”, a már korábban említett biliverdinre, illetve bilirubinra. Ezen kívül a hem degradációval járó endogén CO növekedés az iszkémia/reperfúzió okozta sérülések elleni citoprotekció szabályozásának egyik lehetséges célpontjává vált (31, 46-48). A „citoprotektív” CO-ról kimutatták, hogy: (i) a szolubilis guanilát-cikláz aktiválásán keresztül szabályozza a celluláris cGMP szintet, hozzájárulva ezáltal az endotheliumtól-függő vasodilatációhoz, valamint megakadályozza a vérlemezkék aggregációját; (ii) csökkenti a NO képződést a nitrogén oxid szintáz (NOS) gátlása következtében; (iii) gyulladáscsökkentő hatása van; és (iv) gátolja mind az apoptotikus, mind pedig a sejtosztódási mechanizmusokat (31). A HO által termelt CO hatását kifejezheti a keletkezés helyén, vagy pedig a szomszédos sejtekbe diffundálva (31, 38).

Bár a HO-1 funkcióját széleskörűen tanulmányozták, illetve napjainkban is tanulmányozzák, a kutatók relatíve kevés figyelmet szenteltek a HO-1 által termelt

szénmonoxid szerepének vizsgálatára az iszkémiás/reperfundált szívizomban. Csonka és mtsai megfigyelték, hogy iszkémiás/reperfundált fibrilláló szívekben a HO-1 mRNS expressziója és aktivitása jelentős mértékben lecsökkent (49). Ezen megállapítások alapján feltételeztük, hogy a HO-1 mRNS expresszió csökkenése megváltoztatja az endogén CO termelést fibrilláló szívekben, összehasonlítva a nem fibrilláló szívizommal, valamint, hogy a HO-1 által szabályozott endogén CO termelés központi szerepet játszhat a reperfúzió indukálta károsodások szabályozásában.

Módszerek és anyagok

Izolált „dolgozó-szív” preparátum készítése

A szív izolálását, perfundálását, valamint az iszkémia kiváltását és a reperfúziót a korábban leírtak szerint végeztük (I. fejezet 8. oldal).

Mért paraméterek

A kísérletek tejes ideje alatt regisztráltuk az epikardiális elektrokardigramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezettünk el (Haemosys, Experimetria, Budapest). Az EKG-kat analizáltuk, s meghatározzuk a kamrafibrilláció (VF) kialakulását vagy hiányát. Abban az esetben, ha a szív fibrillált, öt perc kamra fibrillációt követően a szívet defibrilláltuk és mértük a szívfunkciókat. Iszkémia előtt és reperfúzió során regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a koronária átáramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint a bal kamrai nyomást (LVDP) (Haemosys, Experimetria, Budapest).

A kísérletek végrehajtásának folyamata

A szíveket (n = 6 csoportonként) 3x 10 perc preiszkémiás periódusban perfundáltuk. Az első 10 perc során Langendorff-módszer szerint, standard perfúziós oldattal kimostuk a vért és annak sejtes alkotórészeit a miokardiumból. A következő periódusban a készüléket „dolgozó” módba kapcsoltuk és regisztráltuk a kontrol értékeket. A harmadik 10 perc során egy másik Langendorff tartályból olyan perfúziós oldattal perfundáltuk a szívet, mely 1 μ M PBN-t tartalmazott. Ezt követően a szíveket 30 perc globál iszkémiának és az azt követő 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. A reperfúzió első 10 percében PBN-t tartalmazó oldattal perfundáltuk a szívet, a reperfúzió során pedig regisztráltuk a szívfunkciókat. A kísérletek végén mértük a szöveti CO tartalmat, az

enzimaktivitást, valamint Northern- és Western-blot segítségével a HO-1 mRNA és protein expressziót.

A szöveti CO tartalom meghatározása

A CO tartalmat gázkromatográf segítségével határoztuk meg (50). A reperfúzió végén a szíveket eltávolítottuk a készülékről, majd négyszeres térfogatú 0.1 M foszfát-pufferben (pH:7.4) homogenizáltuk. A homogenizátumot 4 °C-on, 15 percig, 12800 x g-n centrifugáltuk, és az így kapott felülúszót használtuk a CO tartalom meghatározásához. A reakció elegy összetétele a következő volt: 150 µl 12800 g felülúszó, 60 µl NADPH (4.5 mM) és 50 µl 3.5/0.35 mM methemalbumin. A vak mintákba NADPH helyett 60 µl foszfát-puffert adtunk. A mintákat előinkubáltuk 5 percig 37 °C-on, majd a „headspace”-t oxigénnel átáramoltattuk és a mintákat 37 °C-on, 1 órán keresztül, sötétben tovább inkubáltuk. A reakciót a minták jéggel történő hűtésével állítottuk le, majd a gázteret egy órán belül analizáltuk.

Gáztömör fecskendővel (Hamilton Co., USA), minden egyes üvegcséből, 1000 µl headspace gázt injektáltunk a kolonnára. Az analízis 90 másodpercig tartott egy 240 cm hosszú, 0.3 mm belső átmérőjű rozsdamentes acél kolonnán. A csúcsokat integráltuk, a kapott eredményeket pedig önkényesen választott egységben fejeztük ki. A mérésekhez Chromosorb 80/100 mesh (10 % Carbox 20 M 3.5 % KOH) töltött kolonnát használtunk. A kolonnatér hőmérséklete 120 °C, míg az injektor hőmérséklete 150 °C volt.

Teljes RNS izolálás és Northern-blot

Körülbelül 100 mg patkány szívszövetből TRIzol reagenssel (Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, Germany), izoláltuk a teljes RNS mennyiséget (51), majd Northern-blotot végeztünk el (49).

Western-blot

A mintákat homogenizáltuk Tris-HCl (13.2 mM/l), glicerin (5.5 %), SDS (0.44 %) és β-merkaptoetanol elegyében. Az oldható proteinek azonos mennyiségét (50 µg) Tris-glicin-SDS-poliakrilamid gél (12%) elektroforézissel elválasztottuk és Western blotot végeztünk, ahogy azt Pellacani és mtsai leírták (52), rekombináns patkány HO-1 protein antitestet (1:1,000, Stressgen) használva. A relatív HO-1 protein expressziót denzitometriásan analizáltuk.

A HO-1 enzimaktivitás meghatározása

Száz mg szívszövetet homogenizáltunk 10 ml 200 mM foszfát-pufferben, majd centrifugáltuk (19000 x g, 4 °C, 10 perc). A felülúszót eltávolítottuk, és újra centrifugáltuk (100,000 x g, 4 °C, 60 perc). A kicsapódott frakciót 2 ml 100 mM foszfát pufferben szuszpendáltuk. A Biliverdin-reduktáz tisztítását Tenhunen és mtsai által kidolgozott technikával végeztük (53). A hemoxigenáz aktivitás meghatározását Yoshida és mtsai módszerével hajtottuk végre (54). A reakció elegy összetétele (2 ml végtérfogatra): 100 µM kálium-foszfát (pH: 7.4), 15 nM hemin, 300 µM BSA, 1 mg biliverdin-reduktáz és 1 mg miokardiális mikorszóma frakció. A mintákat 37 °C-on 1 órán keresztül sötétben inkubáltuk. A reakciót a minták jégre helyezésével állítottuk le. A bilirubin mennyiségét a 464 és 530 nm-en mért abszorbanciák különbségéből számítottuk ki (38). A mikroszómális frakció protein tartalmát Lowry és mtsai módszerével határoztuk meg (55).

Statiztika

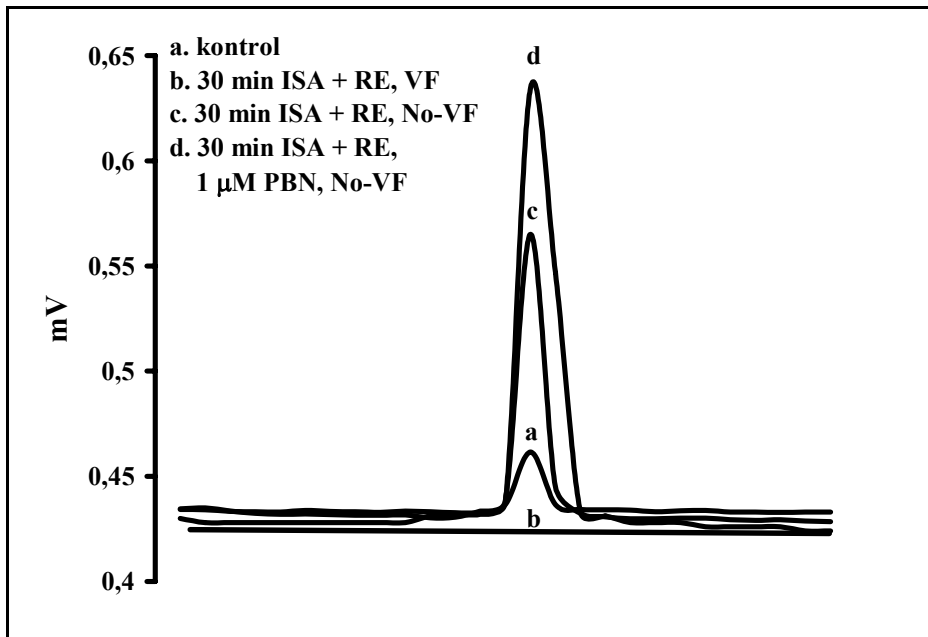
A kapott értékek közlésekor a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Először „egyutas” variancia analízist végeztünk, hogy megtudjuk, vajon van-e különbség a különböző csoportok adatai között. Ha volt különbség, a nem fibrillált, a fibrillált a PBN-el kezelt és a ZnPPIX-el kezelt csoportok adatait a Bonferroni korrekcióval kiegészített kétmintás t-teszttel hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $p < 0.05$.

Eredmények

A 6. ábrán reprezentatív GC kromatogramok láthatók. Megfigyelhető, hogy 30 perc perfúciónak kitett szívekben detektálható mennyiségű CO keletkezett (6. ábra a kromatogram). Abban az esetben, ha a szív fibrillált nem tudtunk CO-t kimutatni a mintákban (6. ábra b kromatogram). Látható, hogy előzetes várakozásainknak megfelelően az enzim által termelt szénmonoxid mennyisége különbözött a fibrilláló, és nem fibrilláló szívekben (6. ábra b, és c-d kromatogram). Megfigyelhető továbbá, hogy 30 perc iszkémiát követő 120 perc reperfúzió következtében az enzim által termelt endogén CO mennyisége nőtt (6. ábra c kromatogram), és ez a növekedés 1 µM PBN kezelés hatására még számottevőbb volt (6. ábra d kromatogram).

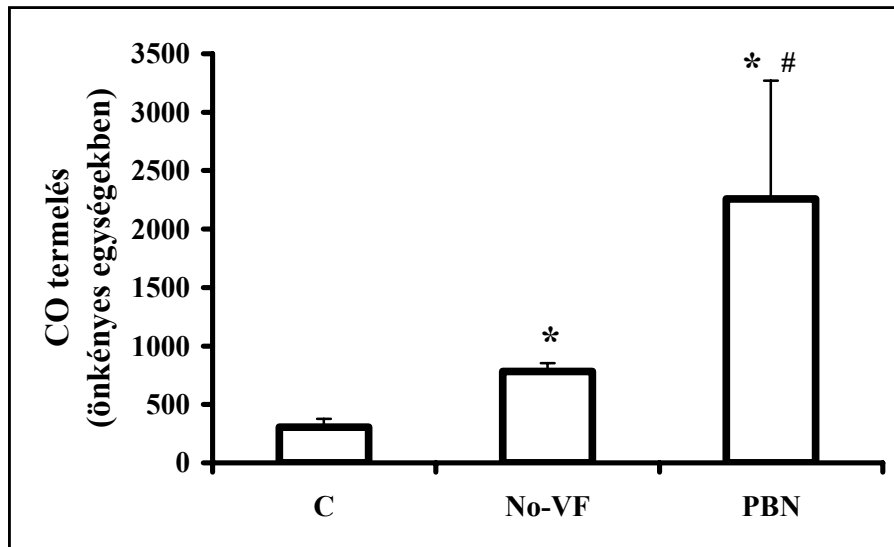
A következő ábrán (7. ábra) a gázkromatográfiás mérések eredménye látható. Megfigyelhető, hogy 30 perc iszkémiát követő 120 perc reperfúzió szignifikáns mértékben

növelte a hemoxigenáz által termelt endogén CO mennyiségét. Egy μM PBN kezelés hatására ez a növekedés még számottevőbb volt.



6. ábra: Reprezentatív GC kromatogramok.

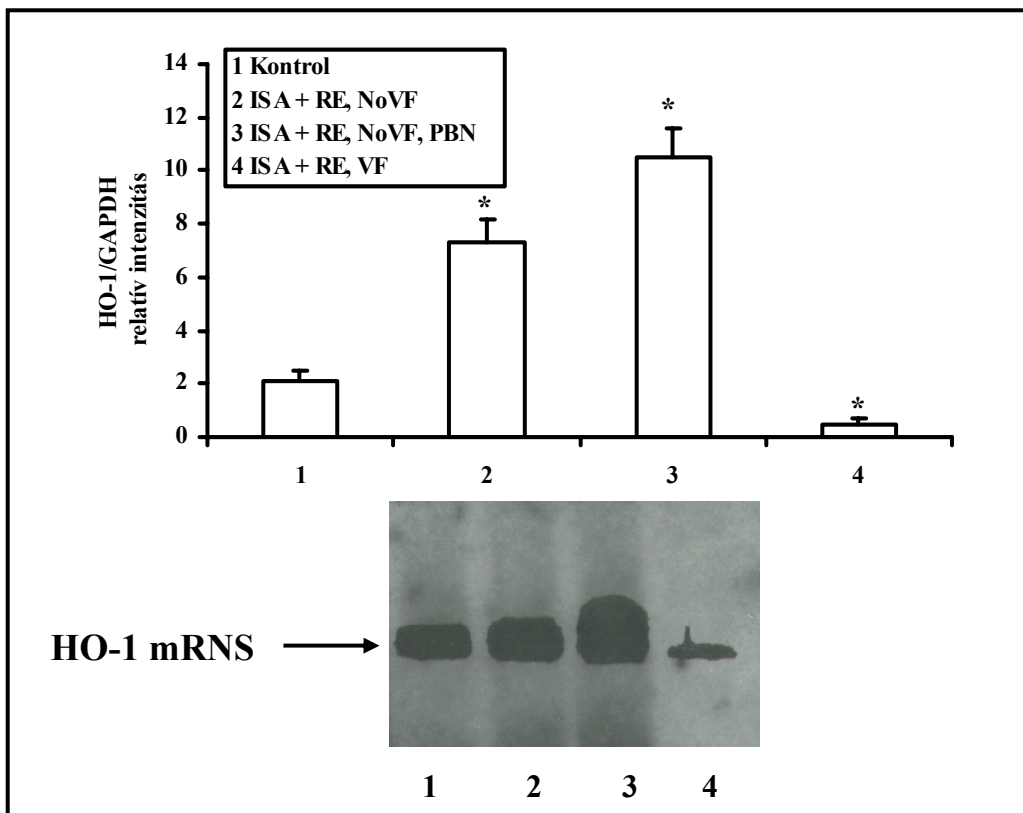
(a) aerob kontrol; (b) iszkémiás/reperfundált-fibrillált miokardium; (c) iszkémiás/reperfundált nem fibrillált miokardium; (d) iszkémiás/reperfundált-PBN kezelt miokardium



7. ábra: A GC-s mérések kvantitatív eredménye.

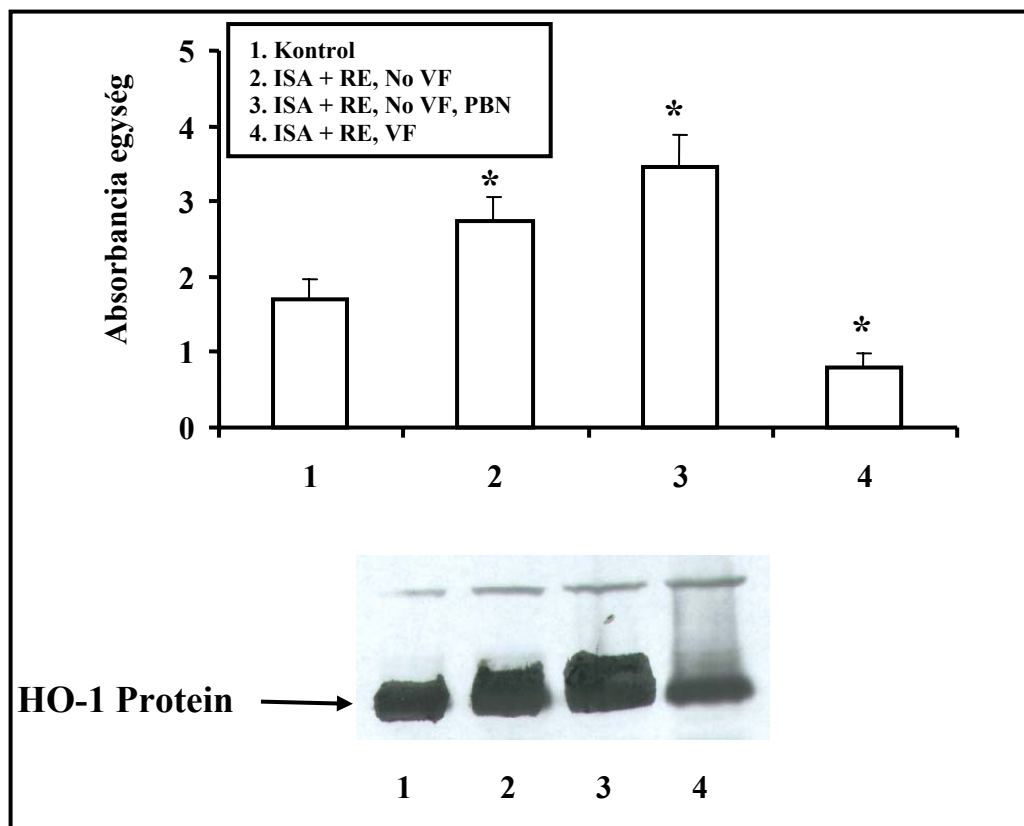
C: aerob kontrol; No-VF: iszkémiás/reperfundált nem fibrilláló miokardium;
PBN: iszkémiás/reperfundált-PBN kezelt miokardium

A 8. ábra a HO-1 mRNS expresszió változását mutatja. Látható, hogy ~ 3.5 x megnövekedett az enzim mRNS expressziója (8. ábra 2. csoport), a nem-iszkémiás kontrol értékekhez viszonyítva (8. ábra 1. csoport). Azokban a szívekben, melyeket 1 μ M PBN-el kezeltünk (8. ábra 3. csoport) a HO-1 mRNS expresszió még tovább növekedett ~ 5x, a kontrol értékhez képest, míg abban az esetben, ha a szív fibrillált szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető (8. ábra 4. csoport). Így elmondhatjuk, hogy a HO-1 expresszió indukciója, mely tükröződik az endogén CO termelés növekedésében, megelőzheti a reperfüzió indukálta kamrai fibrilláció kialakulását. Fontos megjegyezni, hogy a HO-1 protein nem „újjonnan” expresszált protein, minthogy az enzim mRNS és protein jelen van és működik az ép miokardiumban is. Az enzim protein expresszió változása szorosan követte az mRNS szint változását (9. ábra). Azaz, itt is megfigyelhető a kezelésekre hatására bekövetkező növekedés, valamint a fibrilláció következtében fellépő csökkenés.



8. ábra: HO-1 mRNS expresszió iszkémiás/reperfundált szívekben.

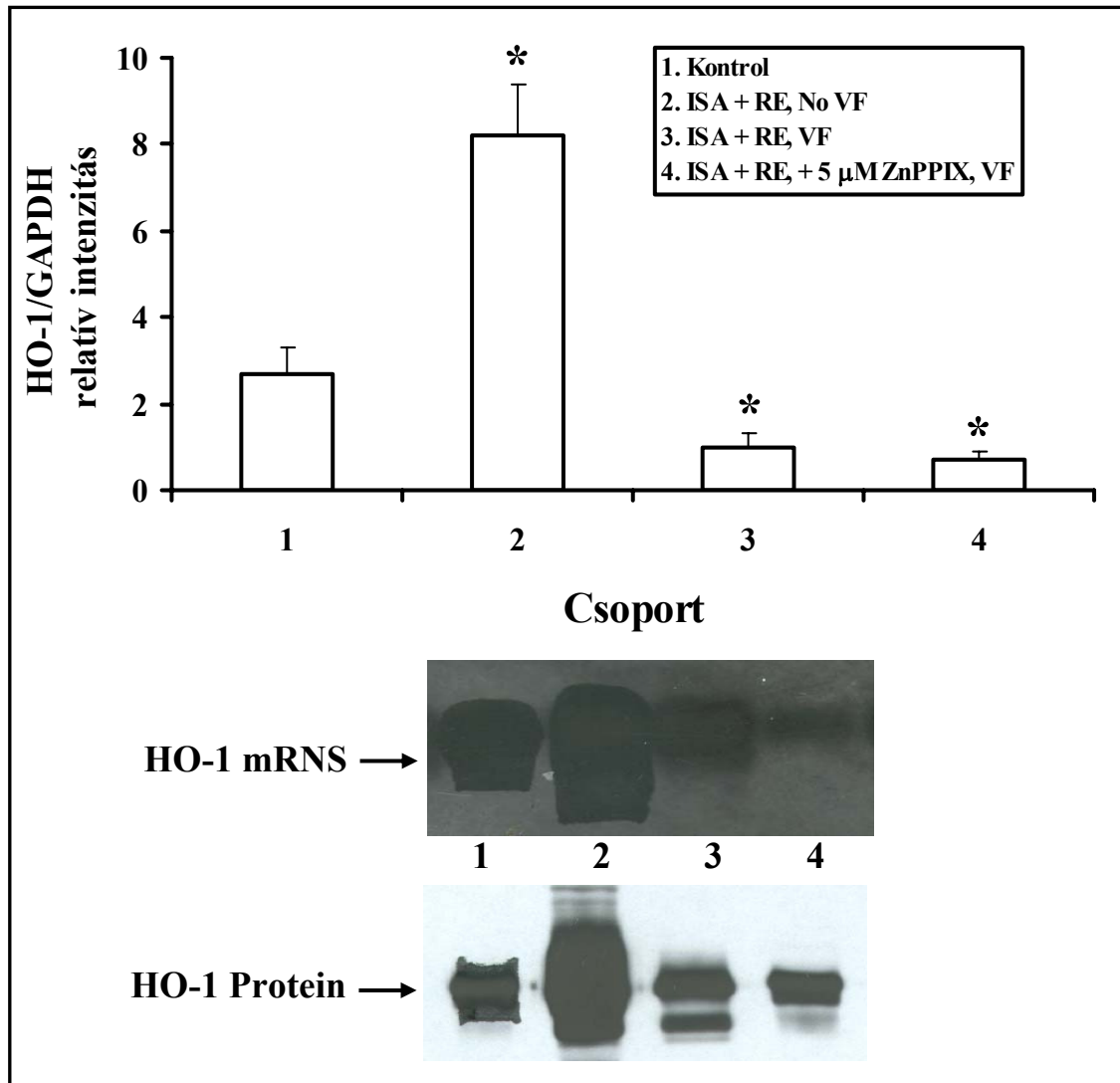
1: nem iszkémiás kontrol; 2: iszkémiás/reperfundált, nem fibrillált miokardium; 3: iszkémiás/reperfundált, PBN-el kezelt miokardium; 4: iszkémiás/reperfundált, fibrillált miokardium



9. ábra: HO-1 protein Western-blot analízise iszkémiás/reperfundált szívekben.

1: nem iszkémiás kontrol; 2: iszkémiás/reperfundált, nem fibrillált miokardium; 3: iszkémiás/reperfundált, PBN-el kezelt miokardium; 4: iszkémiás/reperfundált, fibrillált miokardium

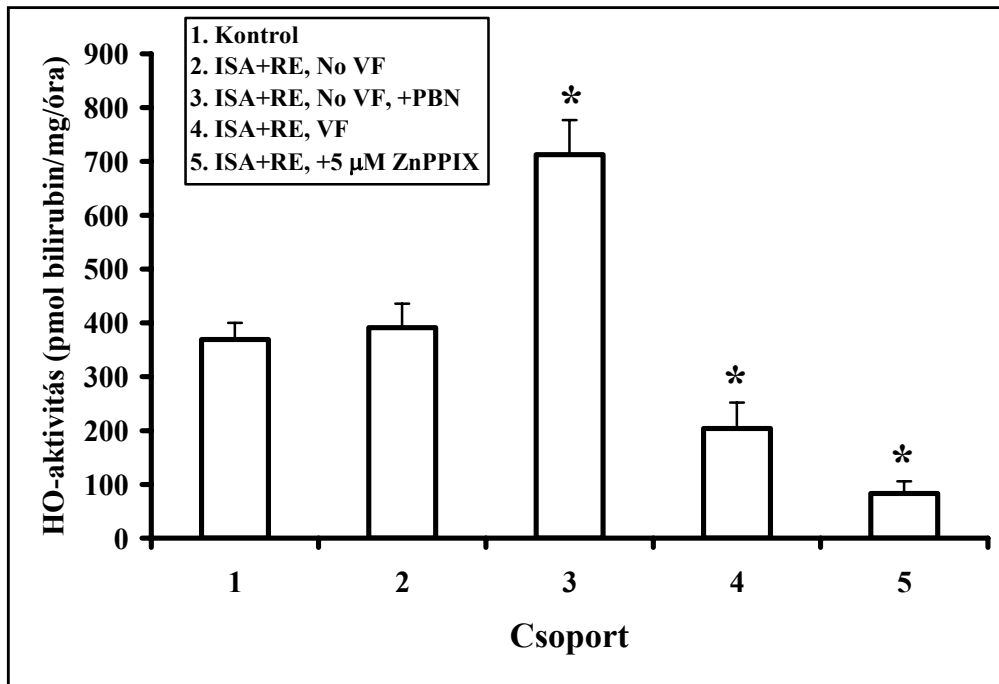
Kísérleteink során megvizsgáltuk a ZnPPIX HO inhibitor hatását az enzim mRNS és protein expressziójára, valamint az enzimaktivitásra. A 10. ábrán az inhibitor hatása látható az mRNS és protein expresszióra. Az adatok mutatják, hogy az enzim mRNS és protein expressziója növekszik az iszkémiás/reperfundált miokardiumban (10. ábra 2. csoport), összehasonlítva a nem iszkémiás szívizommal (10. ábra 1. csoport), amit a fentebb bemutatott eredmények is bizonyítottak. Mivel a ZnPPIX indukálja a kamrai fibrilláció kialakulását, ugyanúgy, mint az iszkémiás/reperfundált fibrillált szívizomban (10. ábra 3. csoport) csökkenést tapasztaltunk az mRNS és protein expresszióban (10. ábra 4. csoport).



10. ábra: A ZnPPIX hatása a HO-1 mRNS és protein expresszióra.

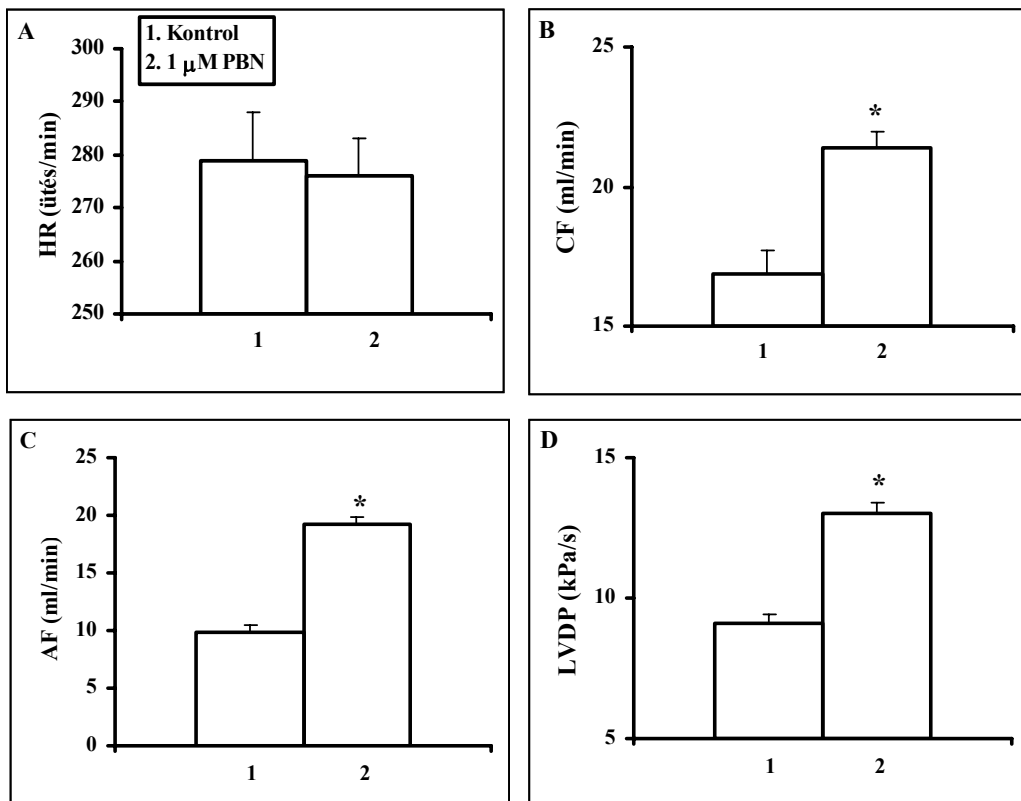
1: nem iszkémiás kontrol; 2: iszkémiás/reperfundált, nem fibrillált miokardium; 3: iszkémiás/reperfundált fibrillált miokardium; 4: iszkémiás/reperfundált, ZnPPIX-el kezelt miokardium

A hemoxigenáz aktivitás 1 μM PBN kezelés hatására szignifikánsan nőtt a kontrol értékekhez képest (11. ábra 3. csoport). Azonban itt is csökkenés figyelhető meg mind a fibrilláló szívekben, mind pedig a ZnPPIX-el kezelt csoportban (11. ábra 4-5. csoport).



11. ábra: A kamrai fibrilláció, PBN és ZnPPIX hatása a HO enzim aktivitására. 1: nem iszkémiás kontrol; 2: iszkémiás/reperfundált, nem fibrillált miokardium; 3: iszkémiás/reperfundált, PBN-el kezelt miokardium; 4: iszkémiás/reperfundált, fibrillált miokardium; 5: iszkémiás/reperfundált, ZnPPIX-el kezelt miokardium

A kísérletek teljes ideje alatt regisztráltuk a szívfunkciókat (12. ábra).



12. ábra: Szívfunkciók iszkémiás/reperfundált szívekben.

1: iszkémiás/reperfundált nem fibrillált miokardium; 2: iszkémiás/reperfundált-PBN kezelt miokardium

Az iszkémia előtti HR, CF, AF és LVDP értékei (312 ± 9 ütés/perc, 26.2 ± 1.3 ml/perc, 51.4 ± 2.2 ml/perc és 18.1 ± 0.4 kPa/s) nem változtak meg szignifikáns mértékben $1 \mu\text{M}$ PBN kezelés hatására. Reperfúzió során a szívfrekvencia nem, de a koronária átáramlás, az aorta kiáramlás és a balkamrai kontrakciós erő statisztikailag szignifikáns mértékben nőtt a kontrol értékekhez képest $1 \mu\text{M}$ PBN kezelés következtében (12. ábra).

Diszkusszió

A hemoxigenáz rendszer központi szerepet játszik a sejtek homeosztázisának fenntartásában, a hem hozzáférhetőségének szabályozása által. Továbbá, azon képessége következtében, hogy egyedülálló módon képes CO termelésre, mind fiziológiailag, mind pedig patológiailag nagy jelentőségre tesz szert a kutatások terén. Hasonlóan a NO-hoz, a CO-t is először neuronális jelátvivőként azonosították, valamint bizonyos eredmények arra utalnak, hogy a CO fontos szerepet játszik a szervek és szövetek hemodinamikai szabályozásban (35). Korábban rámutattak arra, hogy az endogén úton keletkezett CO, mint jelátvivő molekula (29) és a guanilat-cikláz aktivátora, felelős a cGMP szint növekedéséért a vaszkuláris szövetekben (56). Ezen eredmények jól alátámasztják, hogy az érfal által termelt CO endogén modulátoraként szolgálhat az érfal tónusának szabályozásában és a vérlemezke aktivitás befolyásolásában.

Bár a HO mediálta endogén CO termelés jelentőségét -mint lehetséges védekező mechanizmust az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások megelőzésére különböző szervekben (45, 46, 57, 58)- már korábban hangsúlyozták, a CO meghatározást a miokardiumba még nem végezték el. Míg a HO-1 indukcióját széleskörűen tanulmányozták, és tanulmányozzák a géntranszkripció szintjén, addig fiziológiai funkciója a reperfúzió indukálta arrhythmia mechanizmusában és szabályozásában jelenleg teljes mértékben tisztázatlan. Kísérleteink során arra törekedtünk, hogy még közvetlenebb bizonyítékokat szerezzünk a HO-1 által termelt endogén CO szerepéről, a reperfúzió indukálta kamrai fibrilláció kialakulásának megelőzésében. Korábbi eredményeink, melyek szerint a HO-1 mRNS expresszió downregulációja figyelhető meg iszkémiás/reperfundált fibrilláló szívekben (49, 59), utaltak az endogén CO termelés jelentőségére a reperfúzió indukálta kamrai fibrilláció szabályozásában. A celluláris CO termelés mérésével közvetlen bizonyítékokat szolgáltatunk, hogy az említett védekezési mechanizmus a HO-1 mRNS indukción keresztül, az emelkedett endogén CO termelésnek tulajdonítható. PBN használatával, a HO-1 mRNS expresszió (57) és az endogén CO

termelés stimulálására bemutattuk, hogy az endogén CO nélkülözhetetlen a reperfúzió indukálta kamrai fibrillációk megelőzésében. A PBN hatásmechanizmusa, mely a HO-1 mRNA expresszió fokozásán keresztül emelkedett endogén CO termeléshez vezet, magába foglalhatja a következőket: 1) a HO-1 gén azon gének közé tartozik, melyek expresszióját szabad gyökök indukálják. Így az egyik lehetséges magyarázat -az emelkedett HO-1 mRNA szintre- stabil PBN-gyök adduktok képződése, melyek a PBN, és a reperfúzió során keletkező reaktív oxigén speciestek kölcsönhatásából keletkeznek. Ezen magyarázat szerint, a stabil PBN-gyök adduktok, hosszabb féléletidejük következtében, hatékonyak lehetnek a HO-1 génexpresszió szabályozásában, mely emelkedett endogén CO termelésben fejeződik ki; 2) másik lehetséges magyarázat a HO-1 mRNA szupraindukciójára és az emelkedett CO termelésre, a reaktív oxigén speciestek eliminálása és ezáltal ezek és a sejt kompartmentjei közötti közvetlen kölcsönhatások csökkentése. Vagyis az erősen oxidáló sajátosságú reaktív szabad gyökök „befogásával” a HO-1 mRNA sérülés mértéke csökkenthető. Megjegyzendő, hogy -bár kísérleteinkben nem vizsgáltuk- a nitrogén oxid szint emelkedik iszkémiás/reperfundált szívekben (29), s az NO kölcsönhatásba lépve reaktív oxigéntartalmú szabad gyökökkel, még reaktívabb és még toxikusabb származékokat, többek között peroxinitritet képezhet. Ezen származékok inaktiválása, melyek a sejt összetevőinek sérüléseit okozhatják, megvédheti a HO-1 transzkript és protein épségét. A gyökfogó-anyag önmagában, reaktív oxigén speciestek hiányában, nem volt hatékony modulátora a HO-1 génexpresszióknak és a szívfunkcióknak az általunk használt koncentrációban, mivel a preiszkémias szívfunkciók értékei nem változtak meg PBN kezelés hatására, ami jól mutatja, hogy a PBN és a reperfúzió során keletkező reaktív szabad gyökök kölcsönhatása szükséges a HO-1 mRNA expresszió szabályozásához. Bár a PBN antiarrhythmias hatását a reaktív szabad gyökökkel kapcsolatban már a 80-as években leírták (60, 61), pontos mechanizmusát csak 15 évvel később, a HO-1 mRNA által szabályozott endogén CO termelés tükrében magyarázhattuk meg. Továbbá a HO-1 gén 5' végi régiójában már ismert transzkripciós elemeket azonosítottak, bár a mechanizmus, mely során a reaktív gyökök a transzkripció szintjén szabályozzák a HO-1 gént, még nem ismertek, de számos transzkripciós faktor, többek között az NF κ B (62) és a HIF-1 (63) szerepet játszhat a folyamatban. A HO-1 mRNA nem „újjonnan” expresszáldott gén az iszkémiás/reperfundált szívizomban, mivel az ép miokardiumban is megtalálható, így nem meglepő, hogy a gén és a kapcsolódó protein expressziója nagyon gyorsan történik. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a HO-1 protein expressziója szorosan követi az enzim mRNA expressziót. Eredményeink azt mutatták, hogy azok a szívek, melyeket

ZnPPiX HO inhibitorral perfundáltunk, minden esetben fibrilláltak, következésképpen a HO-1 mRNA és protein expresszió jelentős mértékű csökkenését tapasztaltuk a reperfundált fibrilláló miokardiumban. Továbbá az enzim gátlása ZnPPiX-el jelentős mértékben csökkentette a HO aktivitást a fibrilláló szívizomban. Az eredményekből az a következtetés vonható le, hogy a HO-1 mRNA és protein expresszió downregulációja, és a HO enzim aktivitás csökkenése fontos szerepet játszhat a reperfüzió indukálta kamrai fibrillációk kialakulásában. Megjegyzendő, hogy a hypoxia időtől függő növekedést okoz mind a HO-1 mRNA expresszióban, mind pedig a HO aktivitásban, mely fokozatosan csökken a reperfüzió során, ahogy ezt Foresti és mtsai leírták (64), cardiomiocitákon végzett tanulmányaik alapján. Bár kísérleteinkben a miociták irreguláris kontrakcióját nem tanulmányozták. Eredményeink azt is mutatják, hogy a HO-1-hez kapcsolódó endogén CO termelés egy kulcsfontosságú lépés lehet a reperfüzió indukálta kamrai fibrillációk kialakulásának megelőzésében, de még további kísérletekre is szükség van ezen a területen.

Kísérleteink célja a HO-CO rendszer szerepének vizsgálata volt az iszkémiás/reperfundált szívizomban, mindemellett azonban meg kell említenünk a nitrogénoxid szintáz (NOS-NO) rendszer szerepét is. A két rendszer nagyon sok hasonlóságot mutat. Mind a HO, mind a NOS rendszernek van konstitutív és indukálható izoformja, valamint mind a CO és az NO képes aktiválni a guanil-cikláz, melynek következtében megnő a cGMP szint, amely hatékony szekunder-messengerként funkcionál. Továbbá, a legtöbb hatás, melyek indukálják az iNOS expresszióját, mint pl. catecholaminok, citokinek és az iszkémia/reperfüzió, szintén indukálják a HO-1 expressziót. A CO és NO relatív hozzájárulása a guanil-cikláz aktiválásához a kardiovaszkuláris rendszerben, jelenleg még tisztázatlan. Számos patológiai körülmény során, mint pl. hypoxia, hő sokk, és iszkémia/reperfüzió, a CO mediálta hatás lehet a domináló. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint HO inhibitor alkalmazása gátolta a cGMP termelést, ugyanakkor NOS inhibitoroknak nem volt hatásuk (38).

Pannen és mtsai vérzéses sokk patkány modelljén kimutatták, hogy a CO indukálja a mikrocirkuláris dilatációt és a sejtek védelmét, míg a NO esetében nem tapasztaltak jelentős hatást az alkalmazott modellen (65). Mindemellett, hypertermiás stressz szintén emelte a cGMP szintet CO termelésen keresztül, míg a NO-nak nem volt szignifikáns hatása (66). Újabb kutatások bizonyították, hogy a NO sokkal erősebb stimulátora a guanil-cikláznak, kb. 300-400 x emelkedést eredményez az enzim aktivitásban, összehasonlítva a CO okozta 5-15 x emelkedéssel (67, 68). Valószínűsíthetjük, bár általában a NO

dominánsabb aktivátora a guanil-cikláznak, bizonyos körülmények között, egyes szövetekben, a CO fiziológiai funkciója fontosabb lehet. Mivel mind a NO, mind pedig a CO a guanil-cikláz stimulálásán keresztül fejt ki hatását, ezért további kísérletekre van szükség, hogy bizonyítsuk, hogy az emelkedett cGMP szint legalább részben a CO-nak köszönhető az általunk használt modell estén.

Eredményeink azt mutatják, hogy az endogén CO termelés jelentős mértékben csökkent azokban a szívekben, melyek a reperfúzió során kamrai fibrilláción estek át illetve VF kifejlődött. Ez alapján feltételezhetjük, hogy az endogén CO fontos szerepet játszhat az arrhythmogenesisben. A PBN-el kezelt szívekben a HO-1 mRNS expressziója, és ennek következtében az endogén CO termelés jelentős mértékű emelkedését tapasztaltuk, ezzel párhuzamosan pedig reperfúzió indukálta kamrai fibrillációk kialakulását nem regisztráltuk. Így eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a HO-1 mRNS expresszió farmakológiai stimulálása révén a reperfúzió indukálta kamrai fibrillációk kialakulása kivédhető. Újabb kísérleti eredmények arra engednek következtetni, hogy exogén úton bevitt CO megfelelően és szigorúan kontrollált alkalmazása, hasonlóan az endogén CO termelés stimulálásához, megvédheti a miokardiumot a reperfúzió indukálta károsodásoktól (46, 69). Mindezekon túl még további kísérletek szükségesek az iszkémia/reperfúzió indukálta génexpresszió, a kapcsolódó protein szintézis és HO aktivitás up- és downregulációja közötti kapcsolatok megoldására a fibrilláló és nem fibrilláló szívizomban.

III. Kaszpáz gátlás szerepének vizsgálata iszkémia/reperfúzió indukálta apoptózis során

Az apoptózis vagy programozott sejthalál, a sejt elimináció és sejthalál egy nem gyulladáshoz vezető mechanizmus, mely magába foglalja a citoplazma zsugorodását, a DNS fragmentálódását és kondenzációját, valamint apoptotikus testek képződését (70). Az iszkémiás periódusok szöveti károsodást okoznak, melyek az iszkémia időtartamától függően az irreverzibilis károsodásig vezethetnek, s ez által miociták pusztulását okozhatják. A korai reperfúzió, bár nélkülözhetetlen az iszkémián átesett szövetek túléléséhez, szintén előidézhethet sejthalált gyulladáshoz (nekrózis) és nem gyulladáshoz (apoptózis) válaszreakciók eredményeképpen. Az iszkémia/reperfúzió indukálta sérülések pontos mechanizmusa jelenleg még tisztázatlan és magyarázatra vár. Közismert viszont az a tény, hogy a miokardiális iszkémia/reperfúzió során a sejtvésztes jelentős része nekrotikus mechanizmuson keresztül történik (71-73). Napjainkban azonban megnövekedett az érdeklődés olyan vizsgálatok iránt, mely szerint a sejthalál apoptotikus mechanizmuson keresztül is lejátszódhat (74-79). Az apoptózis okai és pontos mechanizmusa(i) az iszkémiás/reperfundált szívizomban jelenleg még tisztázatlanoknak mondhatók. Azonfelül, még az sem teljesen egyértelmű, hogy a miokardiális apoptózist vajon csupán szívelégtelenség, arrhythmia, vagy maga az iszkémia/reperfúzió idézi-e elő. Az apoptózis kialakulására sokféle kaskád mechanizmust leírtak, de a legtöbbet említett jelátviteli mechanizmusok a tumor necrosis factor- α (TNF- α) (76), protein kinase C (PKC) (80), p53 (81, 82), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) (83, 84) és a kaszpázok (77, 85).

Kísérleteinkben a miokardiális apoptózis kialakulásának mechanizmusát a kaszpázok szemszögéből vizsgáltuk. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az apoptózis mechanizmusa vajon magába foglalja-e a kaszpázok aktivitását izolált patkány szívből, iszkémia/reperfúzió során. Valamint arra is választ kerestünk, hogy általános [acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp chloromethyl-ketone (YVAD-cmk)] vagy specifikus [Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-cmk (Ac-DEVD-cmk): kaszpáz-3; benzoilcarboxyl-Leu-Glu-OMe-His-Asp(OMe)-fluoromethylketone (z-LEHD-fmk): kaszpáz-9] kaszpáz inhibitorok használatával csökkenthető-e az infarktusos terület nagysága és az apoptotikus sejthalál mértéke, illetve javíthatók-e az iszkémia/reperfúziót követő szívfunkciós paraméterek.

Módszerek és anyagok

Izolált „dolgozó-szív” preparátum készítése

A szív izolálását és perfundálását a korábban leírtak szerint végeztük (I. fejezet 8. oldal).

Iszkémia/reperfúzió kiváltása

Tíz perc aerob perfúziót követően a bal leszálló fő koronáriát elszorítottuk egy sebészi fonallal, mely egy meggömbített tűhöz kapcsolódott úgy, hogy a fonalat átvezettük az ér alatt, majd a cérna végeit egy műanyag csövön keresztül fűztük. Az iszkémiát úgy idéztük elő, hogy a műanyag cső végét a szív felszínére szorítottuk egy sebészi szorítóval. A reperfúziót pedig a hurok meglazításával indítottuk el. Az iszkémia teljes ideje alatt - hogy megvédjük a miokardiumot a kiszáradástól- az üvegedény páratartalmát, mely a szívet vette körül, konstans (90-100 %) értéken tartottuk. A reperfúzió indukálta arrhythmia megelőzése érdekében a szíveket előzőleg Langendorff-módszer szerint relative magas K^+ koncentrációjú perfúziós oldattal perfundáltuk (86). Ha a reperfúzió kezdeti szakaszában fibrilláció történt, a szívet defibrilláltuk 20 V-os négyszög hullám impulzust alkalmazva 1 ms-os időtartam alatt.

Az infarktos terület meghatározása

Az infarktos terület meghatározásához a szíveket, minden egyes kísérlet végén, 30 ml 1 %-os trifeniltetrazolium-klorid (TTC) oldattal perfundáltuk, az aorta kanül egyik oldalsó ágán keresztül, majd a mintákat $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a további analízisig. A fagyasztott szíveket (csak a kamrai szövetet) transzverzálisan szeleteltük (87) az apico-bazális axisra merőlegesen, s 1-2 mm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket lemértük, miután a nedvességet eltávolítottuk a szövetről, majd tárgylemezek közé helyeztük, és szkenneltük. A „risk” területet -melyet minden kísérlet végén Evans blue-t használva határoztunk meg (77)- és az infarktos zónát minden egyes metszetben megjelöltük, majd a területeket pixelben megadva számoltuk ki. Az ép kamrai szövetet a TTC oldat vörösre festette, míg az infarktos terület nem vette fel a festéket, így az fehér maradt. A területeket planimetriás software alkalmazásával határoztuk meg, majd a metszetek tömegével felszorzottuk és összegeztük, hogy megkapjuk a veszélyeztetett („risk”), illetve az infarktos terület tömegét (grammban kifejezve). Az infarktos terület nagyságát, a veszélyeztetett területre („risk area”) vonatkozó %-os arányában fejeztük ki.

Az apoptotikus sejtek kimutatása

Az apoptotikus sejthalált a „terminal-deoxynucleotidyl-transferase deoxyuridine nick end labelling” (TUNEL) módszer (88) alkalmazásával határoztuk meg.

Mért paraméterek

A kísérletek tejes ideje alatt regisztráltuk az epikardiális elektrokardigramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezettünk el. Iszkémia előtt és reperfúzió során regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a coronária áramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint a bal kamrai nyomást (LVDP) és annak első deriváltját (+LVdp/dt_{max}) (Haemosys, Experimetria, Budapest) a bal pitvaron és a mitrális billentyűn keresztül a bal kamrába helyezett katéter segítségével. Az aorta kiáramlást kalibrált áramlásmérővel, a coronaria áramlás mértékét pedig a szívből kicsöpögő folyadék határozott ideig történő gyűjtésével mértük. Az infarktusz terület nagyságát és a TUNEL-pozitív apoptotikus sejteket az iszkémia/reperfúziót követően határoztuk meg.

A kísérletek végrehajtásának folyamata

A szíveket (n = 6 csoportonként) két csoportba osztottuk. Az első, kezeletlen kontrol csoportba tartozó szíveket a kezdeti 10 perces stabilizáló perfúziót követően, 30 perc regionális iszkémiának és az azt követő 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. A másik csoportba tartozó szíveket a reperfúzió indítását követő első 10 percben szelektív, vagy nem szelektív kaszpáz inhibitor tartalmú perfúziós oldattal perfundáltuk. Az inhibitorokat és koncentrációikat Holly és mtsai (89), valamint Mocanu és mtsai (77) korábbi munkái alapján választottuk ki, melyek a következők voltak: 0.1 valamint 0.5 μM YVAD-cmk (általános kaszpáz inhibitor); 0.07 valamint 0.2 μM Ac-DEVD-cmk (szelektív kaszpáz-3 inhibitor) és 0.07 valamint 0.2 μM z-LEHD-fmk (szelektív kaszpáz-9 inhibitor). Az inhibitorokat DMSO-ban oldottuk, majd közvetlenül felhasználás előtt a perfúziós oldattal hígítottuk. A DMSO végkoncentrációja a Krebs-Henseleit oldatban nem haladta meg a 0.03 %-ot, mely koncentráció nincs hatással a szívfunkciókra, az alkalmazott modell esetén (77). A kezeletlen szíveket 0.03 % DMSO-t tartalmazó oldattal perfundáltuk a reperfúzió első 10 percében.

A szíveket a kísérletekből kizáró okok

Azon szíveket zártuk ki a kísérletekből, melyeknél: a) kamrai arrhythmia alakult ki a regionális iszkémia indukciója előtt és b) a preiszkémias CF és AF értékek 19 ml/perc és 35 ml/perc alatt voltak. Ez alapján 4 szívet zártunk ki ebből a tanulmányból.

Statisztika

A szív funkcionális paramétereinek (HR, CF, AF, LVDP), az infarktus mértékének és a TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek számának közlésekor a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. A különbségek megállapítására Student t-tesztet végeztünk. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $p < 0.05$.

Eredmények

A 5. táblázatban a szívfunkciók láthatók iszkémia előtt, valamint 60 és 120 perc reperfüziót követően, kezeletlen és kaszpáz inhibitorral kezelt szívekben. 0.1, valamint 0.5 μM YVAD-cmk kezelés hatására a CF, AF, és a LVDP statisztikailag szignifikáns mértékben nőtt a kontrol értékekhez képest (5. táblázat). A szívfrekvencia nem mutatott jelentős mértékű eltérést a kezeletlen kontrol értékektől YVAD-cmk kezelés hatására (5. táblázat). Az alkalmazott szelektív kaszpáz inhibitorok eseteiben nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontrol értékektől (5. táblázat).

A 13. ábrán a kísérletek végén a szívekből készített metszetek láthatók kezeletlen (13. ábra A) és általános (0.1 μM YVAD-cmk) kaszpáz inhibitorral (13. ábra B) kezelt szívekben. A reprezentatív fényképen is szembevető, hogy míg a kezeletlen szívben az infarktus mértéke számottevő volt (13. ábra A-fehér terület-TTC festés), addig 0.1 μM YVAD-cmk kezelés az infarktusos terület nagyságát jelentős mértékben csökkentette (13. ábra B).

Az apoptózis mértékének meghatározásához egy in situ apoptózis kitet használtunk (Apotag, Oncor, Gaithersburg, Md., USA). Holly és mtsi (89) kimutatták, hogy az általános kaszpász inhibitor YVAD-cmk, in vivo körülmények között, nagymértékben képes az iszkémia/reperfüzió okozta miokardiális apoptózis mértékének csökkentésére, valamint, hogy ez az anti-apoptotikus hatás, főleg az infarktusos területre korlátozódik, ahol az apoptózist szenvedett miociták többsége található. Ezért kísérleteinkben a TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek számát az infarktusos területen mértük. Azokban a mintákban, melyeket 30 perc aerob perfúciónak tettünk ki, nem találtunk apoptotikus sejteket (14. ábra A). Harminc perc iszkémiát követő 120 perc reperfüzió átesett minták esetén, meglehetősen nagy számú TUNEL pozitív apoptotikus sejtet detektáltunk a szívszövetben, propidium-jodid és fluoreszcens szűrőket alkalmazva (14. ábra B).

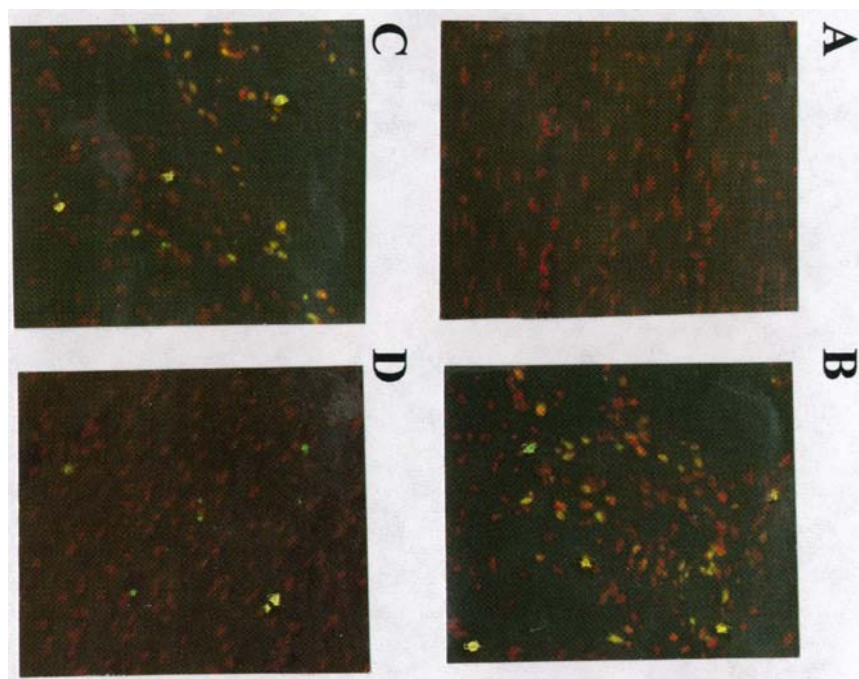
5. táblázat: Szívfunkciók különböző kaszpáz inhibitorokkal kezelt iszkémiás/reperfundált szívekben

Csoport	koncentráció μM/l	Iszkémia előtt				60 perc Reperfúziót követően				120 perc reperfúziót követően			
		HR	CF	AF	LVDP	HR	CF	AF	LVDP	HR	CF	AF	LVDP
Kontrol		309±9	27.3±0.9	52.1±2.3	18.1±0.5	291±7	17.4±1.3	11.1±0.5	10.9±0.5	288±9	16.9±0.9	10.6±0.7	9.9±0.5
YVAD-cmk	0.1	315±8	26.1±1.3	49.3±1.5	17.8±0.4	286±9	21.1±1.5*	17.0±1.9*	13.5±0.4*	279±8	20.3±1.3*	15.6±1.1*	13.1±0.4*
	0.5	320±9	26.9±0.8	50.0±1.2	17.4±0.5	296±8	23.9±1.4*	24.8±1.4*	14.6±0.5*	272±7	23.2±1.8*	23.6±1.9*	14.2±0.7*
ac-DEVD-cmk	0.07	307±6	28.1±1.5	51.4±2.2	18.4±0.3	300±9	18.1±1.2	9.8±0.9	11.7±0.6	280±9	17.2±1.2	10.0±0.8	10.8±0.6
	0.2	311±7	27.8±0.7	48.8±1.9	17.5±0.5	288±7	16.9±0.9	10.7±0.7	10.5±0.7	285±8	18.0±0.7	11.1±1.0	10.5±0.3
z-LEHD-fmk	0.07	304±8	28.4±1.1	49.6±1.2	18.6±0.4	296±9	18.4±1.4	12.0±1.2	12.1±1.2	293±7	15.8±1.2	10.8±0.6	9.5±0.5
	0.2	322±9	26.7±0.6	52.0±1.7	18.0±0.3	301±8	17.6±0.8	11.3±0.8	9.8±0.8	281±9	16.0±0.8	10.5±0.6	9.3±0.4

*P<0.05 vs. Iszkémia/reperfúzió kontrol



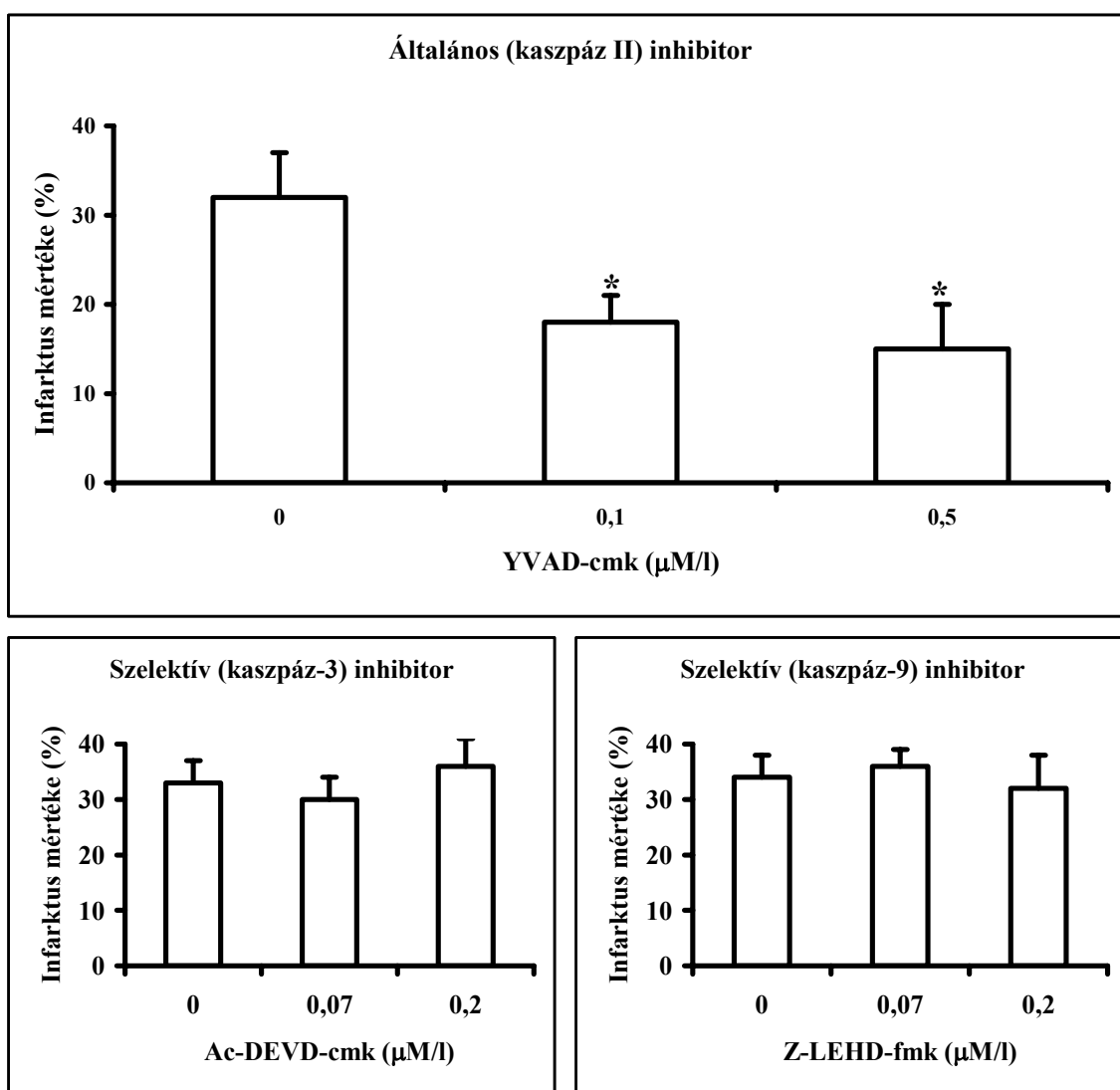
13. ábra: Az infarktusos terület. reprezentatív fényképe kezeletlen (A), és 0.1 μM YVAD-cmk-val kezelt (B) szívizomban



14. ábra: Apoptózis reprezentatív immunhisztokémiai festése. (A) nem iszkémiás kontrol; (B) 30 perc ISA/120 perc REP, kezeletlen; (C) ISA/REP + 0.1 μM Kaszpáz-II inhibitor; (D) ISA/REP + 0.5 μM Kaszpáz-II inhibitor

Általános kaszpáz inhibitor kezelést követően az apoptózist szenvedett sejtek száma, következésképpen az apoptotikus sejthalál mértéke az infarktusos területen, jelentős mértékben csökkent (14. ábra C és D). Szelektív kaszpáz inhibitorok esetében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontrol értékektől.

A 15. ábrán a különböző kaszpáz inhibitorok hatása látható az infarktusos terület nagyságára. Megfigyelhető, hogy 0.1 illetve 0.5 μM YVAD-cmk kezelés jelentős mértékben csökkentette az infarktusos területet a $32\pm 5\%$ kontrol értékről $18\pm 3\%$ -ra ($P < 0.05$), illetve $15\pm 5\%$ -ra ($P < 0.05$), külön-külön (15. ábra felső panel). Szelektív kaszpáz inhibitorok hatására nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést, az általunk használt modell esetén (15. ábra alsó panel).



15. ábra: Általános és szelektív (kaspáz-3 és kaspáz-9) kaszpáz inhibitorok hatása az infarktusos terület nagyságára.

Diszkusszió

A koronária artéria okklúzió/reperfúzió a miokardium sérülését okozza, melynek egyértelmű következménye a posztisztkémiás szívfunkciók romlása. Széles körben elfogadott, hogy olyan anyagok, melyek befolyásolják a celluláris sérülések alapjául szolgáló mechanizmusokat, megváltoztathatják a szívfunkciókat. Az apoptózis fontos folyamat a legkülönbélebb sejtek homeosztázisának kialakításában és fenntartásában, valamint az immunrendszer szabályozásában egyaránt (90). Napjainkban az apoptózist szoros kapcsolatba hozzák a miokardiális iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások folyamatával, de a pre-apoptotikus mechanizmusok érintettségére irányuló bizonyítékok ellentmondónak tűnnek. Kezdetben feltételezték, hogy a hypoxia vagy az iszkémia elegendő stimulus a programozott sejthalál indukciójához (82). Újabb kutatások azonban bizonyították, hogy a hypoxia vagy az iszkémia magában nem, de az acidózis és reoxigenáció elég erős inger az apoptózis indukálásához (91).

Munkánk során bebizonyítottuk, hogy nem szelektív (általános) kaszpáz inhibitor (YVAD-cmk), ha jelen van a reperfúzió indításakor és a folyamat korai fázisában, megfelelő védelmet biztosít a miokardium számára az általunk használt miokardiális infarktus modell esetén. Kísérleteink azt is bizonyították, hogy specifikus kaszpáz inhibitorok (kaspáz-3 és 9) nem nyújtanak védelmet a kontraktilitási károsodások ellen, illetve nem csökkentik az infarktusos terület nagyságát okklúzió/reperfúziós inzultust követően, izolált patkány szívek esetén. Eredményeink jól egyeznek Holly és mtsai (89), valamint Mocanu és mtsai (77) által leírtakkal, mely szerint nem szelektív kaszpáz inhibitor használata javítja a posztisztkémiás szívfunkciókat és csökkenti az infarktusos terület nagyságát. Az általános kaszpáz inhibitor védő hatása kísérleteinkben a TUNEL pozitív apoptotikus sejtek számának jelentős mértékű csökkenésében is tükröződött. Ezzel ellentétben, szelektív kaszpáz inhibitorok alkalmazása nem csökkentette a TUNEL pozitív sejtek számát jelentős mértékben, és nem előzte meg a posztisztkémiás szívizom károsodást. Utóbbi eredményünk, mely szerint szelektív kaszpáz inhibitorok (kaspáz-3 és 9) alkalmazása nem nyújtott védelmet az okklúziós/reperfúziós károsodások ellen, ellentétben áll Mocanu és mtsai (77) által leírtakkal, mely szerint mind nem szelektív, mind pedig specifikus kaszpáz inhibitorok alkalmazása, jelentős mértékben csökkentette az infarktusos terület nagyságát. Ez az ellentmondás magyarázható az adagolás (rögtön a reperfúzió indításakor vagy néhány perccel később), vagy pedig az alkalmazott koncentrációk különbözőségével. Mindamellert feltételezhetjük, hogy nem szelektív vagy

szelektív kaszpáz inhibitorok önmagukban nem képesek teljes mértékben visszafordítani az iszkémia/reperfúzió során bekövetkező kontraktilitási károsodásokat, illetve az infarktusz terület növekedését. Ez önmagában nem vesz figyelembe pro-apoptotikus mechanizmusokat, minthogy vannak különböző kaszkád mechanizmusai az apoptózisnak, melyek kapcsolatba hozhatóak iszkémia/reperfúzióval.

A kaszpázok az apoptózis egyetemes végrehajtói, melyek a cisztein proteázok családjába tartoznak. A kaszpáz proenzimeket proteolitikusan specifikus aszparaginsav egységeknél hasítva, alakulnak ki az aktív alegységek. Az aktivált kaszpázok a sejtekben indukálják az apoptózis végbemenetelét, az által, hogy széthasítanak különböző intracelluláris proteineket és megváltoztatják azok funkcióját. A potenciálisan életképes sejtek vesztese apoptotikus mechanizmusokon keresztül nagymértékben hatással lehet a szívfunkcióra, hiszen a de novo miocita proliferáció hiányát és a miokardium csökkent funkcionális javítási képességét okozza, a szívizom sérülése után. Yaoita és mtsai (92) kimutatták, hogy a z-VAD-fmk, mely egy nem specifikus kaszpáz inhibitor, megfelelő az apoptózis és az infarktus mértékének csökkentésére iszkémia/reperfúzióknak kitett patkányszívben in vivo körülmények között. A kaszpáz gátlás jótékony hatását a miokardiális infarktus mértékének limitálásával kapcsolatban Mocanu és mtsai (77) szintén tanulmányozták. Más kutató csoportok (89) azt találták, hogy a kaszpáz-2, -3 és -7 potenciálisan aktiválódik szívizom iszkémia/reperfúzió során, mely mutatja, hogy bizonyos kaszpázok szimultán aktiválódnak a miokardiumban válaszként az iszkémia/reperfúziós inzultusra. Holly és mtsai (89) bizonyították, hogy az általános kaszpáz inhibitor (YVAD-cmk) kivédi az iszkémia/reperfúzió indukálta apoptózist in vivo körülmények között, valamint, hogy ez az antiapoptotikus hatás főleg az infarktusz területre korlátozódik, ahol az apoptózist szenvedett sejtek többsége található. Bizonyítékok vannak arra is, hogy a kaszpázok központi szerepet játszanak felnőtt szívizomsejtek apoptózisában és citokróm-c felszabadulásában hypoxia során (85). Kang és mtsai azt találták, hogy az apoptózis miocitákban, reoxigenáció után következik be, egy mitokondriumtól függő apoptotikus útvonalon keresztül. Leírták továbbá, hogy a *Bcl-2* gén expressziója megakadályozza a reoxigenáció okozta apoptózist a mitokondriumokból történő citokróm-c felszabadulás gátlása által, illetve megakadályozza a kaszpáz-3 és -9 aktiválódását (93). Egy másik kutatócsoport kimutatta (94), hogy az endogén NO szintézis gátlása iszkémia/reperfúzió során, növeli az apoptózis indukcióját, azt sugallva ezáltal, hogy az endogén NO szintézis megvédi a miokardiumot az apoptotikus sejthaláltól, valamint, hogy a NO szintézis gátlása aktiválja a kaszpáz kaszkádot, míg a *Bcl-2/Bax* protein arány változatlan marad. Így, azon

terápiás beavatkozások, melyeket a hypoxia során indukálódó kaszpáz aktivitás gátlására terveznek, hasznosnak bizonyulhatnak a szívfunkciók megőrzésében, az apoptotikus sejtvesztés gátlása következtében.

Egyéb apoptotikus szignálmechanizmusok

Gottlieb és mtsai felvetették (81, 95), hogy a PKC, mint indító jel, szerepet játszik az apoptózis kialakulásában, prekondicionált, és iszkémia/reperfúzióknak kitett nyúl miokardiumban. Kimutatták, hogy kromatin kondenzáció és nukleoszómális DNS töredezés történik 30 perc iszkémiának és az azt követő négy óra reperfúzióknak kitett nyúl szívizomsejtekben, mind apoptotikus, mind pedig nekrotikus sejthalállal együtt. A nekrosis jellemzői a sejt megduzzadása, ödémásodása, a sejtmembrán integritásának elvesztése és random DNS aprózódás, míg az apoptózis morfológiai jelei a kromatin kondenzáció, a sejtsugorodás és internukleoszómális DNS darabolódás. A PKC a G-protein kapcsolt receptorok aktiválásával intracelluláris jelátviteli folyamatokat indít el. A G-proteinek által aktivált foszfolipáz-c diacil-glicerolt termel, mely aktiválja a citoszolban található PKC-t. Az aktiv formában levő PKC foszforiláció útján aktiválhatja a miokardium védelméért felelős sejtorganelumokat, úgy mint a vacuolaris proton ATPáz-t, illetve az ATP érzékeny K^+ csatornákat (5, 80, 95).

Igen nagy számú sejtbiológiai tanulmányok azt mutatják, hogy különböző celluláris stressz állapotok, többek között az iszkémia/reperfúzió, aktiválják a p38 MAPK-t, illetve hogy a p38 MAPK aktiválása apoptózist eredményez (5). Bizonyították, hogy bár az iszkémia magában képes a p38 MAPK aktiválására, az iszkémia és az azt követő reperfúzió a p38 MAPK sokkal jelentősebb mértékű aktiválását okozza. Ma és mtsai leírták (83), hogy a p38 MAPK gátlása jelentős mértékben csökkentette az iszkémiát követő szívizom apoptózis mértékét. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a p38 MAPK központi szerepet játszhat a posztiszkémiás apoptózishoz vezető jelátviteli folyamatokban. Mivel a p38 MAPK aktivitás az iszkémia indukálta apoptózis szabályozásának egyik kulcs faktora lehet, szelektív gátlása szintén potenciális terápiás célpont lehet az iszkémiás szívbetegségek kezelésében.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy még nem tisztázott, de kísérleteinknek nem is volt célja, hogy megállapítsuk a nekrosis és az apoptózis milyen mértékben vesz részt a miokardiális iszkémia/reperfúzió-indukálta sejtpusztulás és a miokardiális infarktus kialakulásában. Valószínűleg, mindkettő hozzájárul az iszkémia/reperfúzió-indukálta

sérülések kialakulásához, egy „necro-apoptotikus” mechanizmuson keresztül. Egyre több bizonyíték van arra, hogy bizonyos körülmények között a sejthalál e két formája (nekrózis; apoptózis) egymással párhuzamosan lép fel, de különböző mechanizmusokkal (4). Az általunk használt kísérleti modellben egy nem szelektív kaszpáz inhibitor használata jelentős mértékben csökkentette az apoptotikus sejtelhalás mértékét és javította az iszkémiát követő szívfunkciókat. Ez bizonyította, hogy a kaszpáz aktivitás -mely az apoptózis szabályozásában szerepet játszó jelátviteli útvonalak egyik kulcsfontosságú folyamata- szabályozása, befolyásolja a reperfüzió indukálta károsodásokat. Kísérleteinkben szelektív kaszpáz inhibitoroknak nem volt jelentős hatása a vizsgált szívfunkciós paraméterekre. Az irodalomban egyre több adat van arra vonatkozólag, hogy különböző jelátviteli mechanizmusok hozzájárulnak a miokardiális károsodásokhoz vezető apoptózis kialakulásához. Ezt bizonyítja az a megfigyelés is, mely szerint egy p38 MAPK inhibitor alkalmazása olyan koncentrációban, mely képes a p38 MAPK aktivitást teljes mértékű gátlására, nem gátolta meg teljes mértékben az iszkémia/reperfüzió indukálta apoptózis kialakulását (83). Természetesen az itt tárgyalt folyamatok mellett, még több jelátviteli mechanizmus és különböző faktorok is léteznek, melyeket csak említettünk, többek között a TNF- α (76, 96), p53 (81, 82), glükóz és a celluláris ATP tartalom (75, 78, 97) szintén fontos szerepet játszik az apoptózis kialakulásában.

Összegzés

A szívizom iszkémia/reperfúzió egyike a morbiditás és mortalitás általános okozóinak. A csökkent oxigénellátás és perfúzió súlyos klinikai következményekkel járhat. Vizsgálataink során az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások farmakológiai befolyásolási lehetőségeit vizsgáltuk.

Kísérleteink első részében az FK 506 (tacrolimus) és EGb 761 kombinált hatását vizsgáltuk. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a két anyag együtt adása jelentős mértékben csökkentette az iszkémia/reperfúzió következtében fellépő arrythmiák kialakulását, valamint javította a posztiszkémiás szívfunkciókat. A kombinált terápia lehetővé teheti az FK 506 szubtoxikus koncentrációkban történő alkalmazását. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a mindkét anyagot magába foglaló gyógyszeres beavatkozás, egy új és hatékony lehetőséget biztosíthat a szívbetegségek és sebészeti beavatkozások következtében fellépő iszkémiás károsodások kezelésében.

A NO-t már régóta használják a klinikumban az iszkémiás szívbetegségek kezelésére. Kísérleteink második részében, egy másik, endogén úton termelődő gázhalmazállapotú monoxid, a HO-1 által termelt CO szerepét vizsgáltuk az iszkémia/reperfúzió indukálta arrythmiák kialakulásának megelőzésében. Eredményeink azt mutatják, hogy az endogén CO termelés jelentős mértékben csökkent azokban a szívekben, melyekben a reperfúzió során VF kifejlődött. A PBN-el kezelt szívekben a HO-1 mRNS expresszió, és ennek következtében az endogén CO termelés jelentős mértékű emelkedését tapasztaltuk, ezzel párhuzamosan pedig reperfúzió indukálta kamrai fibrillációk kialakulását nem regisztráltuk. Így eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a HO-1 mRNS expresszió farmakológiai stimulálása révén a reperfúzió indukálta kamrai fibrillációk kialakulása kivédhető.

Kísérleteink harmadik részében az iszkémia/reperfúzió indukálta apoptózis gátlásával foglalkoztunk. Az apoptózis elindításában vagy gátlásban több kaszkád mechanizmust azonosítottak, melyek közül a kaspázoknak központi szerepe van. Az apoptózist befolyásolni képes vegyületek nagyon nagy terápiás jelentőséggel bírnak. Általános végrehajtóinak, a kaspázoknak a gátlása lehet az egyik leghatásosabb kezelés az apoptózis gátlására. Eredményeink és az irodalmi adatok is arra utalnak, hogy a kaspázgátlók megfelelőek lehetnek az akut iszkémiás betegségek kezelésére. Megjegyzendő azonban, hogy apoptózis folyamatosan és szinte minden szervünkben folyik, ezért általános gátlása súlyos klinikai következményekkel járhat.

Summary

Cardiac ischemia/reperfusion is among the most common causes of morbidity and mortality. Decreased oxygen supply and perfusion can cause serious injuries. The overall aims of our studies were to investigate pharmacological approaches capable of reducing ischemia/reperfusion induced damage.

In the first part of our experiments we examined the effect of the combined treatment of FK506 (tacrolimus) and EGb 761 (standardized Ginkgo biloba extract). Our results suggest that the combination of these drugs significantly reduces arrhythmias and improves postischemic heart function. The combined therapy could enable to use FK506 in subtoxic doses. This suggests that pharmaceutical interventions incorporating both classes of drug may provide a new and powerful approach to management of ischemic injury associated with heart disease and surgical intervention.

It is a general clinical process to use NO in treatment of ischemic heart diseases. Henceforth in the second part of our experiment we studied the role of an other gaseous endogenous monoxide, carbon monoxide, produced by heme oxygenase in prevention of reperfusion induced arrhythmias. Our results indicate that production of endogenous CO significantly decreased in hearts developed ventricular fibrillation. In hearts perfused with PBN, a significant increase in endogenous CO production via the HO-1 mRNA expression was observed, and with the elevation of endogenous CO production, the development of VF was not recorded during reperfusion. Thus, our findings suggest that pharmacological stimulation of the expression of HO-1 could prevent the development of reperfusion-induced arrhythmias.

Our last experiments were planned to reveal the way of inhibition of ischemia/reperfusion induced apoptosis. A number of cascade mechanisms have been identified in the induction or inhibition of apoptosis but caspases play a crucial role in this process. Drugs capable of influencing apoptosis are of great importance concerning therapeutic treatment. The most useful method for inhibition of apoptosis could be the inhibition of its universal effectors: the caspases. Both our results and publications of other groups suggest that caspase inhibitors may function as potent agents in treatment of acute ischemic diseases, although it must be noted that apoptosis occurs continuously and almost in all of our organs consequently general inhibition of apoptosis may cause serious clinical injuries.

Irodalomjegyzék

1. Statisztikai adatok Magyarország 1999. évi egészségügyi helyzetéről *Népegészségügy*, 6/2000
2. Tennant R., Wiggers C. (1935) The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am. J. Physiol.* **112**: 351-362
3. Tosaki A., Das D. K. (2002) The role of heme oxygenase signaling in various disorders. *Mol. Cell. Biochem.* **232**: 149-157
4. Zhao Z-Q., Vinten-Johansen J. (2002) Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **55**: 438-455
5. Tosaki A., Engelman R. M., Maulik N., Das D. K. (2001) Mechanisms and consequences of apoptosis in myocardial ischemia/reperfusion-induced injury. *New Surgery* **1**: 67-71.
6. Tosaki A., Engelman D. T., Engelman R. M., Das D. K. (1996) The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts. *Cardiovasc. Res.* **31**: 526-536
7. Kloner R. A., Przyklenk K., Whittaker P. (1989) Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion: resolved and unresolved issues. *Circulation* **80**: 1115-1127
8. Manning A. S., Coltart D. J., Hearse D. J. (1984) Ischemia and reperfusion induced arrhythmias in the rat: effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ. Res.* **55**: 545-548
9. Murohara Y., Yui Y., Hattori R., Kawai C. (1991) Effects of superoxide dismutase on reperfusion arrhythmias and left ventricular function in patients undergoing thrombolysis for anterior wall acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* **67**: 765-767
10. Tosaki A., Pali T., Droy-Lefaix M. T., Das D. K. (1993) Effects of SOD, catalase, and a novel antiarrhythmic drug, EGb 761, on reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat hearts. *Free. Radic. Biol. Med.* **14**: 361-370
11. Wang P., Chen H., Qin H., Sankarapandi S., Becher M. W., Wong P. C., Zweier J. L. (1998) Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD I) prevents postischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4556-4560

12. Braquet P., Touqui L., Shen T. S., Vargaftig B. B. (1987) Perspectives in platelet activating factor research. *Pharmacol. Rev.* **39**: 97-145
13. Barnes P. J., Chung K. S., Ewans T. W., Rogers D. S. (1986) Increased vascular permeability induced by platelet activating factor: effect of specific antagonism and platelet depletion. *Br. J. Pharmacol.* **89**: 764
14. Minamiya Y., Tozawa K., Kitamura M., Saito S., Ogawa J. (1998) Platelet activating factor mediates intracellular adhesion molecule-1-dependent radical production in the nonhypoxic ischemia rat lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **19**: 150-157
15. Qayumi A. K., English J. C., Godin D. V., Ansley D. M., Loucks E. B., Lee J. U., Cei-Whan Kim (1998) The role of platelet activating factor in regional myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.* **65**: 1690-1697
16. Pierre S., Jamme I., Droy-Lefaix M-T., Nouvelot A., Maixent J-M. (1999) *Ginkgo Biloba* extract (EGb 761) protects Na, K-ATPase activity during cerebral ischemia in mice. *NeuroReport* **10**: 47-51
17. Teris A. van Beek (2002) Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. *J. Chromatography A* **967**: 21-55
18. Pataki T., Bak I., Kovacs P., Bagchi D., Das D. K., Tosaki A. (2002) Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. *Am. J. Clin. Nutr.* **75**: 894-899
19. Molkenstin J. D., Lu J. R., Antos C. L., Markham B., Richardson J., Robbins J., Grant S. R., Olson E. N. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**: 215-228
20. Tiebosch A., Ericzon B. G., Winjen R., Arend J. W., Groth C. G., Kootstra G. (1990) Side effects of FK 506 in cynomolgus monkeys: a histopathologic study. *Transplant. Proc.* **22**: 1652.
21. Busuttil R. W., Holt C. D. (1997) Tacrolimus (FK 506) is superior to cyclosporine in liver transplantation. *Transplant. Proc.* **29**: 534-538
22. Mignat C. (1997) Clinically significant drug interactions with new immunosuppressive agents. *Drug Safety* **16**: 267-278
23. Meghji P., Nazir S. A., Dick D. J., Bailey M. E., Johnson K. J., Lab M. J. (1997) Regional workload induced changes in electrophysiology and immediate early gene expression in intact in situ porcine heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**: 3147-3155

24. Messerli F. H., Michalewicz L. (1997) Hypertensive heart disease, ventricular dysrhythmias, and sudden death. *Adv. Exp. Med. Biol.* **432**: 263-272
25. Sadoshima J., Izumos S. (1997) The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* **59**: 551-571
26. Kaftan E., Marks A. R., Ehrlich B. E. (1996) Effects of rampamycin on ryanodine receptor/calcium release channels from skeletal and cardiac muscle. *Circ. Res.* **78**: 990-997
27. Harding M., Galat A., Uehling D., Schreiber S. (1989) A receptor for the immunosuppressant FK 506 is a *cis-trans* prolyl isomerase. *Nature* **341**: 758-760
28. Tenhunen R., Marver H. S., Schmid R. (1969) Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **244**: 6388-6394
29. Maines M. D. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 517-554
30. Immenschuh S., Ramadori G. (2000) Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem. Pharmacol.* **60**: 1121-1128
31. Katori M., Anselmo D. M., Busuttill R. W., Kupiec-Weglinski J. W. (2002) A novel strategy against ischemia and reperfusion injury: cytoprotection with heme oxygenase system. *Transplant. Immunol.* **9**: 227-233
32. McCoubrey W. K., Huang T. J., Maines M. D. (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* **247**: 725-732
33. Zhang F., Kaide J-I., Rodrigez-Mulero F., Abraham N. G., Nasjletti A. (2001) Vasoregulatory function of the heme-heme oxygenase-carbon monoxide system. *Am. J. Hypertens.* **14**: 62S-67S
34. Clark J. E., Foresti R., Sarathchandra P., Kaur H., Green C. J., Motterlini R. (2000) Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **278**: H643-H651
35. Verma A., Hirsch D. J., Glatt C. E., Ronnett G. V., Snyder S. H. (1993) Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* **259**: 381-384
36. Zakhary R., Gaine S. P., Dinerman J. L., Ruat M., Flavahan N. A., Snyder S. H. (1996) Heme oxygenase-2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium dependent relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 795-798
37. Ingi T., Ronnett G. V. (1995) Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons. *J. Neurosci.* **15**: 8214-8222

38. Morita T., Perrella M. A., Lee M-E., Kourembanas S. (1995) Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1475-1473
39. Sammut I. A., Foresti R., Clark J. E., Exon D. J., Vesely M. J. J., Sarathchandra P., Green C. J., Motterlini R. (1998) Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br. J. Pharmacol.* **125**: 1437-1444
40. Lim S., Groneberg D., Fischer A., Oates T., Caramori G., Mattos W., Adcock I., Barnes P. J., Chung K. F. (2000) Expression of heme oxygenase isoenzyme 1 and 2 in normal and asthmatic airways. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **162**: 1912-1918
41. Choi A. M. K., Alam J. (1996) Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress inducible protein in oxidant induced lung injury. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **15**: 9-19
42. Wiesel P., Patel A. P., DiFonzo N., Marria P. B., Sim C. U., Pellacani A., Maemura K., LeBlanc B. W., Marino K., Doerschuk C. M., Yet S. F., Lee M. E., Perrella M. A. (2000) Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation* **102**: 3015-3023
43. Liu H., Song D., Lee S. S. (2001) Role of heme oxygenase-carbon monoxide pathway in pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in the rat. *Am. J. Physiol.* **280**: G68-G74
44. Yoshida T., Maulik N., Ho Y. S., Alam J., Das D. K. (2001) H_{mox-1} constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection. *Circulation* **103**: 1695-1703
45. Yet S-F., Tian R., Layne M. D., Wang Z. Y., Maemura K., Solovyeva M., Ith B., Melo L. G., Zhang L., Ingwall J. S., Dzau V. J., Lee M-E., Perrella M. A. (2001) Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ. Res.* **89**: 168-173
46. Sato K., Balla J., Otterbein L., Smith R. N., Brouard S., Lin Y., Csizmadia E., Seigny J., Robson S. C., Vercellotti G., Choi A. M., Bach F. H., Soares M. P. (2001) Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J. Immunol.* **166**: 4185-4194

47. Motterlini R., Gonzales A., Foresti R., Clark J. E., Green C. J., Winslow R. M. (1998) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circ. Res.* **83**: 568-577
48. Choi A. M. K. (2001) Heme oxygenase-1 protects the heart. *Circ. Res.* **89**: 105-107
49. Csonka C., Varga E., Kovacs P., Ferdinandy P., Blasig I. E., Szilvassy Z., Tosaki A. (1999) Heme oxygenase and cardiac function in ischemic/reperfused rat hearts. *Free. Radic. Biol. Med.* **27**: 119-126
50. Cook M. N., Nakatsu K., Marks G. S., McLaughlin B. E., Vreman H. J., Stevenson D. K., Brien J. F. (1995) Heme oxygenase activity in adult rat aorta and liver as measured by carbon monoxide formation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**: 515-518
51. Chomczynski P., Sacci N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159
52. Pellacani A., Wiesel P., Sharma A., Foster L. C., Huggins G. S., Yet S. F., Perrella M. A. (1998) Induction of heme oxygenase-1 during endotoxemia is downregulated by transforming growth factor- β 1. *Circ. Res.* **83**: 396-403
53. Tenhunen R., Ross M. E., Harver H. S., Schmid R. (1970) Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization. *Biochemistry* **9**: 298-303
54. Yoshida T., Takahashi S., Kikuchi G. (1974) Partial purification and reconstitution of the heme oxygenase system from pig spleen microsomes. *J. Biochem.* **75**: 1187-1191
55. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
56. Christodoulides N., Durante W., Kroll M. H., Schafer A. I. (1995) Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation* **91**: 2306-2309
57. Maines M. D., Raju V. S., Panahian N. (1999) Spin trap (N-t-butyl- α -phenylnitron)-mediated suprainduction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: role of oxygenase in protection against oxidative injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**: 911-919
58. Ito K., Ikeda S., Shibata T., Yano T., Horikawa S. (1997) Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-I in rat liver after ischemia. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**: 551-556

59. Pataki T., Bak I., Csonka C., Kovacs P., Varga E., Blasig I. E., Tosaki A. (2001) Regulation of ventricular fibrillation by heme oxygenase in ischemic/reperfused hearts. *Antioxid. Redox. Signal.* **3**: 125-134
60. Hearse D. J., Tosaki A. (1987) Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the heart. *Circ. Res.* **60**: 375-383
61. Bolli R., Jeroudi M. O., Patel B. S., DuBose C. M., Lai E. K., Roberts R., McCay P. B. (1989) Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4695-4709
62. Alam J., Shibahara S., Smith A. (1989) Transcriptional activation of heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 6371-6375
63. Wang G. L., Semenza G. L. (1993) General involvement of hypoxia inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4304-4308
64. Foresti R., Goatly H., Green C. J., Motterlini R. (2001) Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. *Am. J. Phys.* **281**: H1976-H1984
65. Pannen B. H., Kohler N., Hole B., Bauer M., Clemens M. G., Geiger K. K. (1998) Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J. Clin. Invest.* **102**: 1220-1228
66. Ewing J F., Raju V. S., Maines M. D. (1994) Induction of heart heme oxygenase-1 (HSP32) by hyperthermia: possible role in stress-mediated elevation of cyclic 3', 5'-guanosine monophosphate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**: 408-414
67. Hoenicka M., Becker E. M., Apeler H., Sirichoke T., Schroder H., Gerzer R., Stasch J. P. (1999) Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J. Mol. Med.* **77**: 14-23
68. Sharma V. S., Magde D. (1999) Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide: a mechanistic model. *Methods* **19**: 495-505
69. Fujita T., Toda K., Karimova A., Yan S-F., Naka Y., Yet S-F., Pinsky D. J. (2001) Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat. Med.* **7**: 598-604
70. Hockenberry D. (1995) Defining apoptosis. *Am. J. Pathol.* **146**: 3-15

71. Reimer K. A., Jennings R. B. (1984) Verapamil in two reperfusion model of myocardial infarction. Temporary protection of severely ischemic myocardium without limitation ultimate infarct size. *Lab. Invest.* **51**: 655-666
72. Bolli R., Kuo L. C., Roberts R. (1984) Influence of acute arterial hypertension on myocardial infarct size in dogs without left ventricular hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **4**: 522-528
73. Kingma J. G., Dennis A. R., Hearse D. J., Downey J. M., Yellon D. M. (1987) Limitation of infarct size for 24 hours by combined treatment with allopurinol plus verapamil during acute myocardial infarction in the dog. *Circulation* **75**: V25-V33
74. Maulik N., Sato M., Price B. D., Das D. K. (1998) An essential role of NF- κ B in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. *FEBS Lett.* **429**: 365-369
75. Jonassen A. K., Brar B. K., Mjos O. D., Sack M. N., Latchman D. S.; Yellon D. M. (2000) Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**: 757-764
76. Kurrelmeyer K. A., Michael L. H., Baumgarten G., Taffet G. E., Peschon J. J., Sivasubramanian N., Entman M. L., Mann D. L. (2000) Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5456-5461
77. Mocanu M. M., Baxter G. F., Yellon D. M. (2000) Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.* **130**: 197-200
78. Schaffer S. W., Ballard-Croft C., Solodushko V. (2000) Cardioprotective effect of chronic hyperglycemia: effect on hypoxia-induced apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol.* **278**: H1948-H1954
79. Palojoki E., Saraste A., Erikson A., Pulkki K., Kallajoki M., Voipio-Pulkki L. M., Tikkanen I. (2001) Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J. Physiol.* **280**: H2726-H2731
80. Takashi E., Wang Y., Ashraf M. (1999) Activation of mitochondrial KATP channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circ. Res.* **85**: 1146-1153

81. Gottlieb E., Haffner R., Rudin T. von, Wagner E. F., Oren M. (1994) Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal. *EMBO J.* **13**: 1368-1374
82. Long X., Boluyt M. O., De Lourdes H. M., Lundberg M. S., Zheng J. S., O'Neill L., Cirielli C., Lakatta E. G., Crow M. T. (1997) p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* **99**: 2635-2643
83. Ma X. L., Kumar S., Gao F., Louden C. S., Lopez B. L., Christopher T. A., Wang C., Lee J. C., Feuerstein G. Z., Yue T. L. (1999) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* **99**: 1685-1691
84. Mackay K., Mochly-Rosen D. (1999) An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J. Biol. Chem.* **274**: 6272-6279
85. De Moissac D., Gurevich R. M., Zheng H., Singal P. K., Kirshenbaum L. A. (2000) Caspase activation and mitochondrial cytochrome c release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**: 53-63
86. Curtis M. J., Hearse D. J. (1989) Ischemia induced and reperfusion induced arrhythmias differ in their sensitivity to potassium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**: 21-40
87. Schultz J. E. J., Yao Z., Cavero I., Gross G. J. (1997) Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart. *Am J. Physiol.* **272**: H2607-H2615
88. Schmitz G. G., Walter T., Seibl R., Kessler C. (1991) Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenine by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* **192**: 222-231
89. Holly T. A., Drincic A., Byun Y., Nakamura S., Harris K., Klocke F. J., Cryns V. L. (1999) Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**: 1709-1715
90. Rudel T. (1999) Caspase inhibitors in prevention of apoptosis. *Herz* **24**: 236-241
91. Webster K. A., Discher D. J., Kaiser S., Hernandez O., Sato B., Bishopric N. H. (1999) Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p 53. *J. Clin. Invest.* **104**: 239-252
92. Yaoita H., Ogawa K., Maehara K., Maruyama Y. (1998) Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* **97**: 276-281

93. Kang P. M., Haunstetter A., Aoki H., Usheva A., Izumo S. (2000) Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ. Res.* **87**: 118-125
94. Weiland U., Haendeler J., Ihling C., Albus U., Scholz W., Ruetten H., Zeiher A. M., Dimmeler S. (2000) Inhibition of endogenous nitric oxide synthase potentiates ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis via a caspase-3 dependent pathway. *Cardiovasc. Res.* **45**: 671-678
95. Gottlieb R. A., Gruol D. L., Zhu J. Y., Engler R. L. (1996) Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J. Clin. Invest.* **97**: 2391-2398
96. Birks E. J., Owen V. J., Burton P. B., Bishop A. E., Banner N. R., Khaghani A., Polak J. M., Yacob M. H. (2000) Tumor-necrosis-alpha is expressed in donor heart and predicts right ventricular failure after human heart transplantation. *Circulation* **102**: 326-331
97. Elsasser A., Suzuki K., Schaper J. (2000) Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**: 711-724

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tósaki Árpádnak, témavezetőmnek, támogatásáért, hasznos tanácsaiért, valamint, hogy Ph.D. tanulmányaim alatt végig biztosította számomra a megfelelő tudományos és anyagi háttérrel.

Köszönöm mindenkinek a segítségét, aki hozzájárult értekezésem létrejöttéhez. Külön köszönöm Koszorús Zsuzsának és Papp Gábornak a kísérletek elvégzéséhez nyújtott segítségét.

Köszönöm családom segítségét és támogatását, végül, de természetesen nem utolsó sorban, köszönettel tartozom feleségemnek, Edinának, aki mindvégig mellettem állt, biztatott, és aki nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. Haines D. D., **Bak I.**, Ferdinandy P., Mahmoud F. F., Al-Harbi S. A., Blasig I. E., Tosaki A. (2000) Cardioprotective effects of the calcineurin inhibitor FK506 and the PAF antagonist free radical scavenger, EGb 761, in isolated ischemic/reperfused rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **35**: 37-44; IF: 1.553
2. Kovacs P., **Bak I.**, Szendrei L., Vecsernyes M., Varga E., Blasig I. E., Tosaki A. (2001) Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **364**: 501-507; IF: 2.472
3. **Bak I.**, Papp G., Turoczi T., Varga E., Szendrei L., Vecsernyes M., Joo F., Tosaki A. (2002) The role of heme oxygenase related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *Free. Radic. Biol. Med.* **33**: 639-648; IF: 5.082

Absztrakt

1. **Bak I.**, Tosaki A. (2001) Caspase inhibition on infarct size and cardiac function in ischemic and reperfused isolated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**: A7; IF: 3.396
2. **Bak I.**, Papp G., Joo F., Tosaki A. (2002) Heme oxygenase related carbon monoxide and ventricular fibrillation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34** (6): A6; IF: 3.396

Az értekezéshez fel nem használt, de a témához kapcsolódó közlemények

1. Pataki T., **Bak I.**, Csonka C., Kovacs P., Varga E., Blasig I. E., Tosaki A. (2001) Regulation of ventricular fibrillation by heme oxygenase in ischemic/reperfused hearts. *Antioxid. Redox. Signal.* **3**: 125-134; IF: 2003-ban várható.
2. Pataki T., **Bak I.**, Kovacs P., Bagchi D., Das D. K., Tosaki A. (2002) Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. *Am. J. Clin. Nutr.* **75**: 894-899; IF: 5.021