

A myocardialis ischaemia és reperfúzió patofiziológiája

Papp Zoltán
Édes István

PATHOPHYSIOLOGY OF MYOCARDIAL ISCHEMIA AND REPERFUSION

Complete and long lasting loss of coronary circulation results in myocardial cell death (ischemic necrosis). Short lasting ischemia (few minutes) is well tolerated and it may bring certain protection against recurrent ischemia (ischemic preconditioning). Contractile force promptly diminishes following the onset of ischemia and the changes in the intracellular ATP or Ca^{2+} concentration do not explain this phenomenon. With the progression of ischemia, myocardial relaxation ceases and hypertonic muscle activation appears (ischemic contracture). During myocardial reperfusion following short-term ischemia, arrhythmias often develop and pump function is regularly depressed transiently (myocardial stunning). Permanent reduction in coronary blood supply results in sustained ventricular dysfunction (hibernation). It has been established, that pathologic processes leading to ischemic injury are distinct from those of reperfusion injury. Cellular events are complicated (Ca^{2+} -overload, free radical injuries, activation of proteolytic processes, energy loss, membrane damage, hypercontracture, etc.), and complete understanding of the background of ischemic/reperfusion disorders is still awaited.

**myocardial ischemia,
stunned myocardium, hibernation,
ischemic preconditioning**

A szívizom koszorúér-keringésének hosszan tartó teljes felfüggesztése a szívizomsejtek pusztulását eredményezi (ischaemiás necrosis). Rövid ideig (néhány percig) tartó ischaemia jól tolerálható, sőt, az ismételt ischaemiával szemben akár védettséget is nyújthat (ischaemiás prekondicionálás). Az ischaemia kialakulása után a kontraktilis erő gyakorlatilag azonnal megszűnik, bár azt az intracelluláris ATP-koncentráció vagy a Ca^{2+} -szint tranziens változásai nem indokolják. Az ischaemia időtartamának előrehaladásával az izomrelaxációt tónusos izomaktivitás (ischaemiás kontraktúra) váltja fel. A rövid ideig tartó ischaemiát követő reperfúzió során gyakran lépnek fel arrhythmák, és átmeneti ideig rendszerint még a pumpafunkció is csökkent (kábulat myocardium, stunning). A tartósan alacsony vérellátás hosszan tartó kamrafunkció-csökkenést eredményez (hibernáció). Ma már tudjuk, hogy az ischaemiás periódus alatti sejtkárosító folyamatok (ischaemiás károsodás) lényegesen eltérnek a reperfúzió alatt bekövetkező celluláris jelenségektől (reperfúziós károsodás). A celluláris események azonban sokrétűek (Ca^{2+} -túlsúly, szabad gyökök okozta károsodás, proteolitikus folyamatok aktiválódása, energiahány, membránkárosodás, hiperkontraktilitás stb.). Az ischaemiás/reperfúziós funkciózavarok hátterének teljes megértése ezért még várat magára.

**myocardialis ischaemia,
kábulat myocardium, hibernáció,
ischaemiás prekondicionálás**

DR. ÉDES ISTVÁN (levelező szerző/correspondent): Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Orvostudományi Kar, Kardiológiai Klinika, Debrecen/Department of Cardiology, University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Medical School, 4004 Debrecen, Pf. 1. DR. PAPP ZOLTÁN, Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Orvostudományi Kar, Kardiológiai Klinika, Debrecen/Department of Cardiology, University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Medical School

Érkezett: 2000. április 26.
Elfogadva: 2000. május 31.

A szívizomzat átmeneti ideig tartó ischaemiája és azt követő reperfúziója számos, klinikailag jól definiált helyzetben előfordul. Így például instabil vagy variáns angina esetén, acut myocardialis infarctus korai (spontán vagy thrombolysis révén létrejövő) reperfúziója kapcsán, szívkatéterezés során, a cardioplegiával együtt járó nyitott szívműtétek és szívtranszplantációk, sőt, ischaemiás szívbetegek terheléses kardiológiai vizsgálata alatt is (1). A következményes ischaemiás/reperfúziós szívizom-károsodás reverzibilis (káult myocardium, stunning), és irreverzibilis (necrosis) komponensei csökkent pumpafunkcióval járó állapothoz vezetnek (2), amelyek a kóros celluláris elváltozások függvényében veszélyeztetik a vérkeringést. Az ischaemiás szívbetegek magas prevalenciája, a katéteres és műtéti beavatkozások növekvő száma egyaránt szükségessé teszi, hogy bővítsük az ischaemiás/reperfúziós szívizom-károsodás patomechanizmusáról alkotott ismereteinket, és a megszerzett ismereteket lehetőség szerint újabb terápiás beavatkozások céljaira használjuk.

Az elmúlt tíz év állatkísérletei alapján az ischaemiás/reperfúziós szívizom-károsodás számos körülménye vált világossá. Felismertük, hogy a reperfúziót követő, átmeneti ideig tartó oxigén-szabadgyök-képződés és intracelluláris Ca^{2+} -túltöltöttség minőségileg más típusú veszélyeket hordoz (reperfúziós károsodás) (3), mint az ischaemia alatt kóros útra terelődött metabolizmus (ischaemiás károsodás) (1–4).

Ma már az is ismert, hogy a folytonos oxigénhiány dacára az ischaemia beállta után az izomösszehúzódás energiaforrásaként szolgáló ATP kezdetben csak kismértékű koncentrációcsökkenést mutat. Ennek az az oka, hogy az intracelluláris kreatinfoszfát-készlet az ADP-ből végbemenő ATP-szintézist akár 5–10 percig is biztosíthatja (4, 5). A pumpafunkció romlását tehát az ATP hiánya nem magyarázhatja. Azt is leírták, hogy a közel fiziológiai értéken tartott ATP-koncentráció az ischaemia első perceiben a myoplasmaticus Ca^{2+} -homeosztázist is képes még regulálni. Mindezen szempontokat figyelembe véve született meg a kontraktilis erő ischaemiás megszűnésének metabolikus teóriája (5). Ennek értelmében az ischaemia kialakulását követően a pumpafunkció hirtelen romlása azért következik be, mert a myofibrillaris rendszer Ca^{2+} -ra mutatott válaszadó készsége a megváltozott metabolikus viszonyok miatt jelentősen csökken (6). Némileg meglepő, hogy az ischaemia időtartamának előrehaladásával a teljes relaxációt tónusos izomaktiváció (ischaemiás kontraktúra) követi. Elképzelhető, hogy ekkorra az intracelluláris ATP koncentrációja már olyan alacsony értékre csökken, amely

az aktin és a miozin hullamerevséghez hasonló, rigoros összehúzódását okozza (7–9). Azonban az sem zárható ki, hogy ennek a tónusfokozódásnak a hátterében más metabolikus okok állnak.

Az ischaemiát túlélő sejtekben a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció a korai reperfúzió alatt halmozott arrhythmiákat okozhat, de a kontraktilis rendszer átmeneti funkciócsökkenését is eredményezheti (káult myocardium, stunning) (3, 10). Jól ismert, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció szabályozatlan emelkedése jelentős szerepet kaphat számos reperfúziós arrhythmia létrejöttében (2). Az okok között azon felszíni membránfehérjék emelendők ki, amelyek közül némelyek az ionok számára csatornát képeznek, és megnyílásukat vagy becsukódásukat az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásai szabályozzák (úgynevezett kalciumfüggő csatornák). Az arrhythmogen ionáramok összetétele, a szerepet játszó csatornafehérjék típusa és azok denzitása ma még nagyrészt ismeretlen.

A postischaemiás funkciózavar reverzibilis komponensének (káult myocardium, stunning) létrejöttében bizonyítottan látszik egy Ca^{2+} -függő proteolitikus folyamat szerepe (1, 11, 12). Specifikus proteázinhibitorokkal végzett kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy a proteolízis a kalpain-I-hez (μ -kalpain, neutrális intracelluláris proteáz) kapcsolható (11–14). Azonban nincs egyetértés abban, hogy melyek a proteolízis által elsősorban károsított struktúrák (10, 13–23), ezek milyen módon viszonyulnak a megváltozott myofibrillaris funkcióhoz, és az eddig feltárt összefüggések milyen mértékben vonatkoztathatók az emberi szívizomzat ischaemiás/reperfúziós károsodására (1). Nincs összhang abban sem, hogy az intracelluláris foszforilációs folyamatokat (például a proteinkináz C-t) is mobilizáló ischaemiás prekondicionálás védelemet biztosít-e a proteolitikus folyamatok ellen vagy sem (1, 18, 20).

Hogyan élheti túl a szívizom az ischaemiás/reperfúziós inzultust? Feltételezzük, hogy ez egy kétfázisú adaptáció, az úgynevezett „rövid tartamú védelem” és „hosszú tartamú védelem” révén valósul meg (1). A rövid távú védekezés az O_2 -kínálat és -felhasználás közötti új egyensúly létrehozásával valósul meg, mégpedig a kontraktilitás csökkenésével (down reguláció) és az energiatermelés anaerob útjának (glikolízis) fokozásával. A hosszú távú védelem celluláris folyamata még nem tisztázott. Feltételezhetően az ischaemia olyan sejten belüli szignálok indukálására képes, amelyek védekező jellegű genetikai újraprogramozást eredményeznek. Amennyiben az ischaemia teljessé válik és időtartama nő, úgy a védekező

mechanizmusok elégtelenné válnak, és végül a szívizomsejtek elpusztulnak.

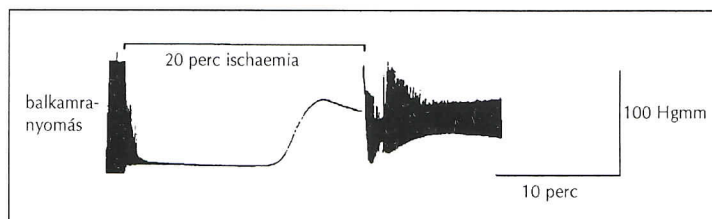
Ebben az összefoglalásban kísérletet teszünk arra, hogy az ischaemiás/reperfúziós funkciózavarok témakörében felmerült kérdések közül néhányat megválaszoljunk.

Izolált szíven végzett kísérletek

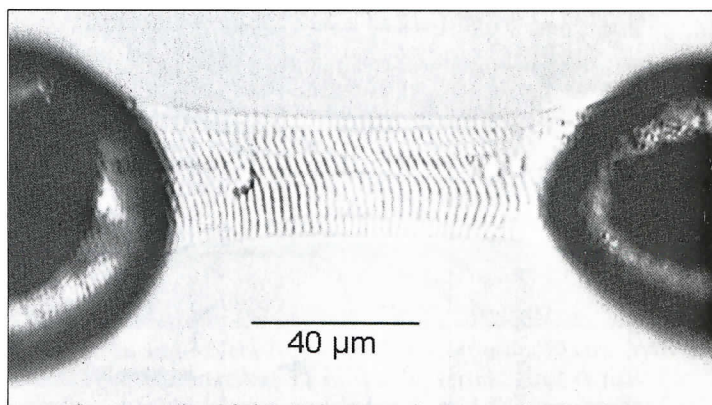
A szívizomzat ischaemiás funkciózavarai jól követhetők a (valós viszonyokat számos szempontból helyesen modellező) izolált szíveket alkalmazó kísérletekben. Ezen megközelítés alapja az, hogy a leggyakrabban kis állatokból (például patkányból) eltávolított szív koszorúér-keringését (az aortába rögzített kanülön keresztül végzett retrográd) perfúzió révén fenntartjuk (Langendorff-szív). Ily módon a kamrák funkciója in vitro körülmények között több órán keresztül tanulmányozható, a bal kamra nyomása pedig mérhető (1. ábra). A perfúzió megszüntetése az egész szívre kiterjedő, úgynevezett globális ischaemiát hoz létre, amely a kontraktilis erő néhány perc alatti teljes megszűnését vonja maga után. A bal kamra nyomásában ilyenkor kialakuló zuhanás tehát az oxigénhiányosá tett izomszövet pumpafunkciójának rohamos csökkenésére hívja fel a figyelmet. Az 1. ábrán egy Langendorff szerint perfundált patkányszív balkamranyomás-változásait tüntettük fel 20 percig tartó globális ischaemiás periódus előtt, alatt és után. Az ischaemia kezdetét követően a bal kamra nyomása gyorsan megszűnt, 10–15 perc elmúltával ischaemiás kontrakúra alakult ki, a reperfúziót halmozott arrhythmiai követték, majd a kamranyomás egy, a praeischaemiás állapothoz viszonyítva csökkent funkcionalitású szinten stabilizálódott (kábul myocardium, stunning).

A kontraktilitás zavara ischaemiában

A myofibrillaris rendszer és annak metabolikus befolyásolhatósága izolált szíveken csak korlátozott mértékben vizsgálható. Az összefüggések pontosabb feltérképezéséhez olyan kísérletes elrendezés szükséges, amelyben az intracelluláris tér összetétele kontrollálható. Ilyen lehetőséget azok a preparátumok biztosítanak, amelyek sejtfelszíni membránjuktól megfosztottak (úgynevezett nyüzött rostok/sejtek). A diffúziós problémák leküzdése érdekében célszerű a preparátum méretét minél kisebbre



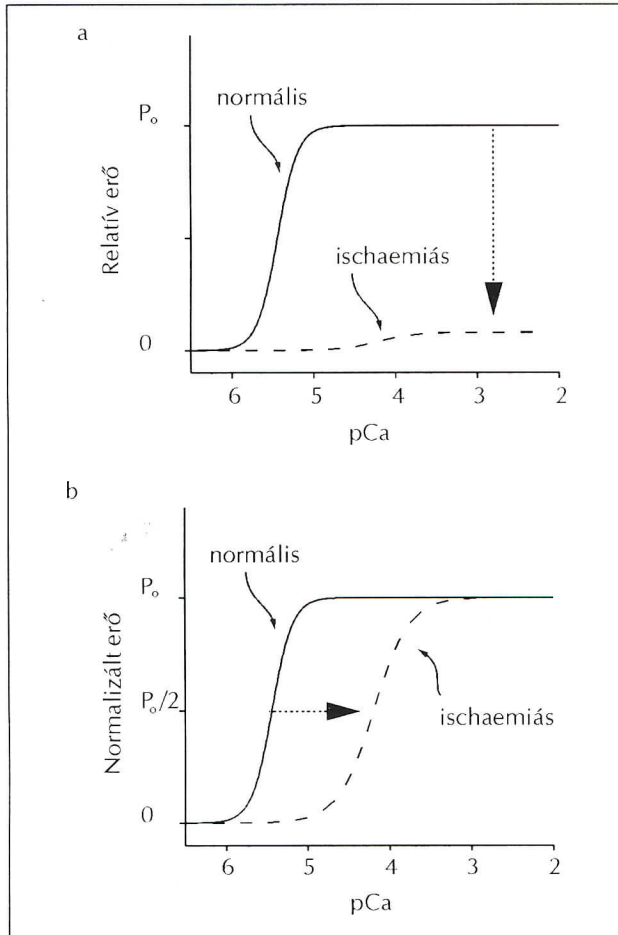
1. ábra. Langendorff szerint perfundált izolált szív (patkány) balkamranyomás-változásai 20 percig tartó globális ischaemiás periódus előtt, alatt és után



2. ábra. Izolált és felszíni membránjától megfosztott szívizomsejt, amelynek két vége a kontraktilis rendszerben ébredő erő és az aktin-miozin rendszer kinetikai jellemzőinek méréséhez szükséges berendezésekhez (erőmérő és piezoelektromos motor) rögzített. A patkány bal kamrájából izolált izomsejt nyugalmi sarcomerhossza 2,2 μm

választani. A 2. ábrán az ebből a szempontból is csak többé-kevésbé ideális, izolált szívizomsejt fénymikroszkópos képe látható. Az izomsejt egyik végét ragasztó segítségével nagy érzékenységu erőmérőhöz rögzítették. Ennek segítségével a sejt különböző összetételű oldatokba merítését követően az aktin-miozin rendszer által generált erő mérhető. A sejt másik végéhez olyan berendezést kapcsoltak, amely az izomrost hosszát szabályozza. Ez a kontaktus az aktin-miozin interakció kinetikai analízisét szolgálja (24).

Az izolált szívizomsejteken végzett erőméréseknek az az előnye, hogy segítségükkel az intracelluláris térben uralkodó viszonyok modellezhetők, a kialakuló myofibrillaris funkcióváltozások pedig mérhetők. A 3. ábra izolált szívizomsejteken végzett erőmérések alapján azt tünteti fel, hogy a myoplasmaticus Ca^{2+} -koncentráció emelése hogyan fokozza az izometriás (állandó hossz) körülmények között kialakuló kontraktilis erőt (függőleges tengely). A vízszintes tengelyeken a Ca^{2+} koncentrációját az ilyen ábrázolásnál szokásos pCa-értékek jelölik [$pCa = -\log(Ca^{2+})$].



3. ábra. Izolált és felszíni membránjától megfosztott szívizomsejteken történt erőmérések eredményei kontroll- (normális, folytonos vonal) és ischaemiás modell-körülmények között (szaggatott vonal).

a) pCa -relatív erő összefüggések [$pCa = -\log(Ca^{2+})$]. Az ischaemiás körülmények között mért erőértékeket a normális maximális Ca^{2+} -aktivált erőhöz (P_0) viszonyítva relatív egységekként fejeztük ki. A P_0 csökkenése (pontozott nyíl) jól érzékelhető.

b) pCa -normalizált erő összefüggések. Az ischaemiás és a normális körülmények között mért maximális Ca^{2+} -aktivált erőértékeket egyaránt 1-nek tekintettük. A félmaximális erő ($P_0/2$) kifejlődéséhez szükséges Ca^{2+} -koncentrációk különbsége (vízszintes tengely) a Ca^{2+} iránti érzékenység nagyfokú csökkenését jelzi. (A patkány bal kamrájából izolált szívizomsejtek nyugalmi sarcomerhossza $2,2 \mu m$ volt.)

koncentráció), a Ca^{2+} -koncentráció balról jobbra nő]. A 3. ábra a és b részein a folytonos vonalak a kontraktilis erő Ca^{2+} -koncentráció-függését mutatják kontrollkörülmények között (közel neutrális pH, alacsony anorganikusfoszfát-koncentráció). Szaggatott vonalakkal azt tüntettük fel, hogy milyen következménnyel jár, ha az intracelluláris pH savas irányba változik, és eközben

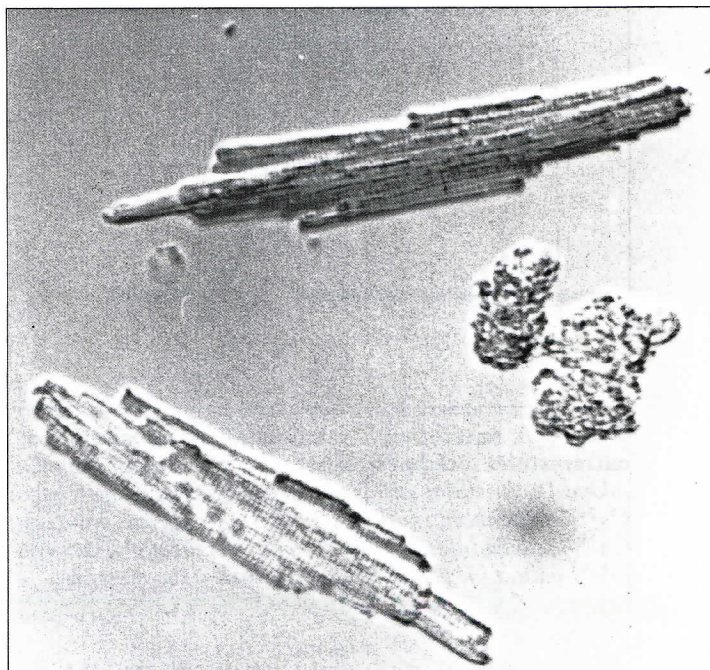
az anorganikus foszfát koncentrációja is emelkedik. A 3. ábra a részén (pCa -relatív erő összefüggés) jól érzékelhető, hogy ezek a metabolikus hatások gyakorlatilag megszüntetik a Ca^{2+} -aktivált erőt. A kontraktilis erő csökkenése két okra vezethető vissza. Egyrészt nagymértékben zuhan a troponin-C teljes Ca^{2+} -telítettsége mellett mérhető, úgynevezett maximális- Ca^{2+} -aktivált erő (P_0). (A P_0 változását a 3. ábra a részén pontozott nyíl jelzi.) Másrészt, a myofilamentális rendszer Ca^{2+} -érzékenysége is kifejezetten csökken. Utóbbi változás akkor érzékelhető a legjobban, ha az ischaemiás körülmények között kapott maximális erőértéket a kontrollgörbe maximumára normalizáljuk (pCa -normalizált erő összefüggés). A 3. ábra b része (pontozott nyíl) világosan mutatja, hogy ischaemiás viszonyok között a kontraktilis erő Ca^{2+} -függése erősen jobbra tolódik, tehát a Ca^{2+} -érzékenység csökken. Az anaerob energiatermelő folyamatok következtében az O_2 -hiányos szívizomzat jelentősen acidotikussá válik, az anorganikus foszfát pedig a kreatinfoszfát és az ATP hidrolízise következtében felszaporodik (4, 25). Az ischaemiás myocardium rohamos funkciócsökkenése mögött tehát jelentős részben metabolikus okok állnak, amelyek részben intracelluláris acidózishoz, részben foszfátakkumulációhoz köthetők (26–28). Ezek a változások azonban nem magyarázzák meg azt, hogy az ischaemia előrehaladásával miért alakul ki ischaemiás kontraktúra (1. ábra). Az ischaemiás kontraktúra létrejöttében más mechanizmusok is szerepet kell, hogy kapjanak, hiszen az acidózis és az anorganikus foszfát egyértelműen depresszív hatású (9, 26–28). Egyesek szerint ez a tónusfokozódás azért fejlődik ki, mert az intracelluláris ATP-koncentráció előbb-utóbb olyan alacsony értékre süllyed, amely hullamerevséghez hasonlítható aktin-miozin kapcsolatot okoz (2, 8, 9, 29). Mások szerint azonban az ischaemiás kontraktúra más, a fentiekben részletezteket egyéb formában kiegészítő metabolikus hatások következtében alakul ki (6). A felfedezett javaslatok közül kiemeljük azt, amely az ATP bomlásából származó ADP bizonyos fokú akkumulációját tartja fontosnak (30, 31). Az ADP-ről ugyanis ismert, hogy fiziológiás és ischaemiás viszonyok között egyaránt jelentősen fokozza az aktin- és a miozinmolekulák által keltett erőt. Az ezzel kapcsolatos kísérleti eredmények azt sugallják, hogy az ischaemia kezdeti szakaszától folyamatosan akkumulálódó foszfát- és hidrogénionok negatív hatásait az ATP-bontásból származó ADP az ischaemia későbbi fázisában bizonyos értelemben ellensúlyozza. Ez azonban

nem jár együtt a pumpafunkció visszatérésével, hiszen ilyenkor a kontraktilis erő tartósan fokozódik (stone heart). Az ischaemiás kontraktúra kifejlődése a myocardium ischaemiás funkciózavarának elmélyülését jelzi.

Reperfúziós arrhythmia

Az ischaemiát követő reperfúzió első perceiben a szívizomzat ismét telítetté válik oxigénnel, és az extracellularis térből az ischaemia alatt felszaporodott metabolitok az újraindult coronariakeringéssel gyorsan távoznak (2). Az izomsejtek intracellularis terének regenerációja némileg hosszabb időt igényel, sőt, a hirtelen megváltozott környezetben a sarcolemma transzportfehérjei kezdetben kóros ionmozgásokat is eredményeznek (1, 2). Közismert, hogy a reperfúzió alatt jelentős oxigénszabadgyök-képződéssel kell számolni (1), amely kifejezetten membránkárosító. Ez a transzportfolyamatokat szintén előnytelenül érinti. A részletek elhagyása mellett most csak azt hangsúlyozzuk, hogy a reperfúzió kezdetén a szívizomsejtek intracellularis Ca^{2+} -koncentrációja átmenetileg jelentősen fokozott (32), ez további sejtkárosító folyamatokat indukál (reperfúziós károsodás). Izolált szívekben a reperfúziót követő tranziens Ca^{2+} -koncentráció-emelkedés egy kezdeti fokozott kontraktilis állapot képében tűnik elő (1. ábra). A nyomásgörbe szabálytalanságaiból jól látható azonban az is, hogy az ischaemiát követő reperfúzió első öt perce alatt nagy számban lépnek fel kamrai arrhythmia. Ezek szintén a megnövekedett myoplasmaticus Ca^{2+} -koncentráció következtében jönnek létre. A szívizomsejtek Ca^{2+} -függő arrhythmiaiban a sejtek kalciumtúltöltöttsége (Ca^{2+} -overload) kulcsfontosságú szerepet játszik (2). Ilyenkor a sejtek belső raktáraiból szabályozatlanul (nem akciós potenciál következtében) is létrejöhet Ca^{2+} -felszabadulás. A myocardialis ingerületi folyamatok celluláris mechanizmusát ma leginkább ép felszíni membránnal rendelkező izolált szívizomsejteken tanulmányozzák (4. ábra).

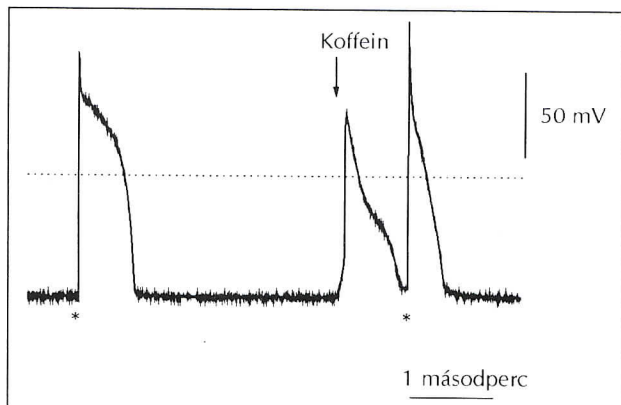
Az izolált sejteken végzett elektrofiziológiai méréseknek (teljessejt-feszültség clamp, whole cell voltage clamp) az az egyik előnye, hogy segítségükkel a kóros ingerületi folyamatok mechanizmusa részletesen analizálható. Whole cell voltage clamp alkalmazásakor az izolált szívizomsejt felszíni membránjában található ioncsatornák megnyílásait és a következményes ionáramok nagyságát és időbeliségét rögzített feszültségviszonyok között méri. A sejtet határoló külső tér és az intracellularis oldat összetételének változtatása révén az ion-



4. ábra. Az ingerületi folyamatok tanulmányozására nyúl bal kamrájából enzimatis úton izolált sejtek. Alul és felül Ca^{2+} -toleráns sejtek ép felszíni membránnal, míg középen sérült, Ca^{2+} -intoleráns (hiperkontrahált, életképtelen) szívizomsejtek láthatók

csatornák farmakológiai szempontból lényeges sajátosságai is vizsgálhatóvá válnak. A külső és belső tér kontrollálása mellett a membránpotenciál-változások (például akciós potenciálok) mérése áramclamp (current clamp) technikai alkalmazásával valósítható meg (5. ábra).

A Ca^{2+} -függő arrhythmiaikat különböző kalciumfüggő csatornamolekulák aktivációja okozhatja. Ezek közül némelyek működése ugyan alapvetően feszültségfüggő, a csatorna (vagy ioncserélő) működése és a következményesen kialakuló ionáram mégis jelentős Ca^{2+} -dependenciát mutat. Ilyen mechanizmus jellemző az L típusú Ca^{2+} -áramra ($I_{\text{Ca,L}}$), a Ca^{2+} -függő K^+ -áramokra ($I_{\text{K(Ca)}}$) és bizonyos mértékben a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ioncserélő által hordozott áramra ($I_{\text{Na/Ca}}$) is. Más ioncsatornák megnyílásait a Ca^{2+} -koncentráció növekedése közvetlenül szabályozza, és a csatorna kapuzóműködésére (de nem a rajtuk keresztül folyó áramra) a membránpotenciál kevésbé hat. Ilyen csatornák felelősek a Ca^{2+} -függő Cl^- -áramokért ($I_{\text{Cl(Ca)}}$) és a Ca^{2+} -függő nem specifikus kationáramokért (I_{NS}). Kalciumtúltöltött szívizomsejtekben a szabályozatlanul felszabaduló Ca^{2+} a systole alatt az akciós potenciál torzulását (például korai utódepolarizációt, early afterdepolarization, EAD), míg diastole alatt kései utódepolarizációt (delayed afterdepolarization, DAD)



5. ábra. A sejten belüli raktárakból felszabaduló Ca^{2+} extrasystolét eredményezhet. Az elektromos impulzusokkal (*) kiváltott akciós potenciálok között a sejten belüli Ca^{2+} -raktárakból koffein (nyíl) segítségével előidézett Ca^{2+} -felszabadulás szintén akciós potenciált („extrasystole”) váltott ki. (Nyúl bal kamrájának szívizomsejtje.)

eredményezhet. Extrasystole létrejöttéhez a késői utódepolarizációnak el kell érnie a küszöbpotenciált. Ezt olyan Ca^{2+} -függő ionszórtnak megnyílásai okozzák, amelyek átmeneti ideig inward (depolarizáló) áramokat (transziens inward áram, I_{TI}) idéznek elő. Az 5. ábrán nyúl szív balkamra-sejtjén két elektromos impulzussal (*) kiváltott akciós potenciált és egy koffeinnel (nyíl) előidézett akciós potenciált („extrasystolét”) tüntetünk fel.

A kései utódepolarizációkat és extrasystolákat előidéző Ca^{2+} -függő transziens inward áramok (I_{TI}) összetétele ma még nem teljesen feltárt. Az eddigi vizsgálatok arra utalnak, hogy különböző speciek-nél eltérő töltéshordozó mechanizmusok kerülnek előtérbe. Nyulaknál például az I_{to2} -ként is ismert $I_{\text{Cl(Ca)}}$ tűnik jelentősnek (33). Emberi szív pitvari izomsejtjein végzett vizsgálatok viszont arra utalnak, hogy az arrhythmogen I_{TI} létrejöttéért (legalábbis pitvari sejtekben) részben az I_{NS} felelős (34). Számos kísérletes megfigyelés támogatja az $I_{\text{Na/Ca}}$ arrhythmogen szerepét is.

A reperfúziós károsodás kontraktilis komponense

Sokszorosán bizonyított tény, hogy a reperfúzió első 5–10 percét követően a myoplasmaticus Ca^{2+} -koncentráció normalizálódik, a Ca^{2+} -transziensek visszaállnak a praeischaemiás szintre. Ezzel összefüggésben a sejtek metabolizmusa is visszatér az élettani körülmények közöttire. Ennek ellenére

rövid, akár reverzibilisnek tartott ischaemiás periódust követően is számolnunk kell (esetleg több óráig is elhúzódó) csökkent kamrafunkcióval. Ennek az átmeneti funkciócsökkenéssel járó állapotnak a jellemzésére alkották a „kábult”, idegen szóval „stunned” myocardium megjelölést. Izolált szíven végzett kísérletekben a kábult myocardiumra a bal kamra csökkent nyomása jellemző (1. ábra). Igazolódott, hogy a csökkent funkcionalitás hátterében olyan folyamatok állnak, amelyek végeredményben közvetlenül a myofibrillaris rendszert károsítják (3, 12, 32). Felszíni membránjuktól megfosztott szívpreparátumokon végzett mérések segítségével a stunned állapotot jellemző mechanikai károsodás meghatározható (6. ábra).

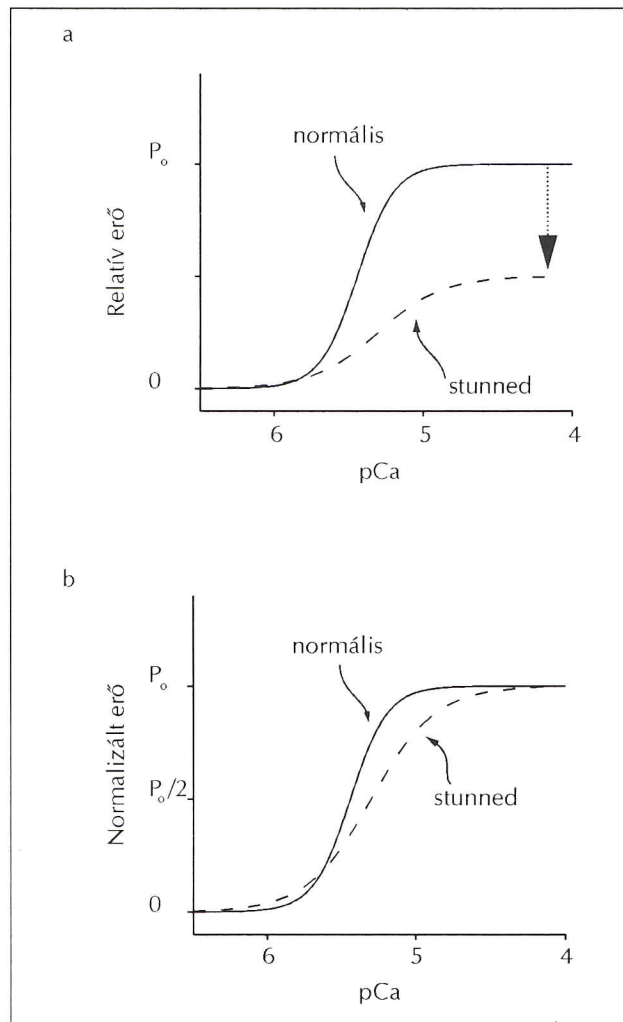
A 6. ábrán jól látható, hogy a normalizált metabolikus viszonyok ellenére a reperfundált myocardiumban (stunned) a maximális Ca^{2+} -aktivált erő jelentősen csökkent (6a ábra), a myofibrillaris erő Ca^{2+} -érzékenysége pedig kismértékben mérséklődött (6b ábra). Ezek a változások némileg hasonlóak az ischaemiás metabolitok hatásakor észlelt eltérésekhez (3. ábra). Az ischaemiás funkciócsökkenés azonban mindkét paraméter esetében sokkal jelentősebb változással jár. (A 3. és 6. ábrák vízszintes tengelyein a beosztások eltérnek egymástól!)

Némileg meglepő, hogy a kiterjedt vizsgálatok ellenére sem világos még, hogy melyek a stunned myocardiumot kísérő mechanikai funkciózavar molekuláris okai. A bizonytalanságok forrása sokrétű. Bár a csökkent kontraktilitás hátterében nagyon valószínű, hogy a reperfúzió legelején (a Ca^{2+} -túlterhelt szakaszban) Ca^{2+} -függő proteolízis zajlik, nincsen abszolút érvényű bizonyítékunk arra, hogy más mechanizmusok (például oxigén-szabadgyökök) milyen mértékben egészítik ki azt. Számos megfigyelés utal arra, hogy a Ca^{2+} -függő proteolitikus folyamatok a kalpain-I-hez (neutrális intracelluláris proteáz) kötődnek (10–14). Ez az enzim a sarcomerek Z-vonalainak környékén raktározódik, és $\mu\text{mol/l}$ -es nagyságrendű koncentrációba emelkedő intracelluláris Ca^{2+} -szint esetén aktiválódik. In vitro körülmények között a kalpain-I számos regulatorikus és strukturális funkciójú myofibrillaris fehérjét degradál (20, 22). Nem ismert azonban, hogy ezek közül melyek elsődlegesek a kábult myocardium csökkent funkcionalitásában. Korábban felmerült, hogy a troponinkomplex troponin-I (Tn-I) alegységének degradációja játszik döntő szerepet (12, 35). Ennek alapján a kábult myocardium a kontraktilis fehérjék regulációs folyamatainak károsodása következtében alakulna ki. Mások eredményei alapján viszont a kábult myocardium kialakulásában a szívizomsejteket érő

strukturális károsodás is valószínűsíthető (10, 14, 16, 36). A kifejezett myofibrillaris funkcióromlást eredményező proteolízis ugyanis megbontja a Z-vonalak egységét, ami a dezmin és feltehetőleg más cytoskeletális fehérjék (például spektrin, α -aktinin) degradációjához köthető. Tovább bonyolítja a képet, hogy a lehasadó degradációs termékeket transzglutamináz aktivitású enzimek más myofibrillaris fehérjékhez kapcsolhatnak. Ilyen kovalens komplexeket a Tn-I hasításából keletkező degradált proteinekkel kapcsolatban is azonosítottak (18). Mindezek alapján a kábult, stunned myocardium kialakulásában számos strukturális és regulatorikus funkciójú fehérje károsodása valószínűsíthető. A funkció romlásához nem szükséges nagymérvű proteindegradáció. Ez a tény magyarázhatja azt, hogy a finom változásokat miért olyan nehéz értékelni. A myocardium kábult állapotának megszűnése (amely óráktól napokig tarthat) valószínűleg összefüggésbe hozható azokkal a sejtszinten érvényesülő reparatív folyamatokkal, amelyek a myofilamentumok károsodott fehérjeit ép proteinekre cserélik.

Hibernált myocardium

Amennyiben a myocardium perfúziója tartósan (hetekig-hónapokig) csökken, a szívizomzat úgynevezett hibernált állapota alakulhat ki. A hibernált myocardium súlyos, krónikus koszorúér-eltérések következtében jön létre, és a systolés és diastolés funkció (de nem az életképesség) elvesztésével jár (1, 37, 38). Valószínűsíthető, hogy a krónikus hipoperfúzió egy metabolikus adaptáción (down regulation) keresztül ugyan lehetővé teszi a szívizom túlélését, de az anyagcsere a kontraktilis funkcióra már nem elegendő. Az életképesség megőrzése érdekében a myocardium tehát a kontraktilitás feláldozásával igyekszik csökkenteni energiaigényét. A klasszikus elképzelés szerint a hibernált myocardium kialakulásához nem szükséges akut ischaemiás epizód (angina vagy infarctus). További jellegzetesség, hogy revascularisációval a csökkent funkció általában napok, hetek alatt teljesen (vagy nagy részben) helyreállítható. A többi ischaemiás szindrómához hasonlóan (prekondicionálás, stunning, necrosis) a hibernáció patogenezise sem tekinthető teljes mértékben tisztázottnak. A legelfogadottabb hipotézis szerint az anyagcsere folyamataiban kiterjedt áthangolódás (remodeling) következik be. A hibernált myocardiumban biokémiaiilag az anaerob glikolitikus folyamatok kerülnek előtérbe, szövettanilag pedig a dedifferenciálódás jellemző. A szívizomsejtek mikroszkóp alatt különböző

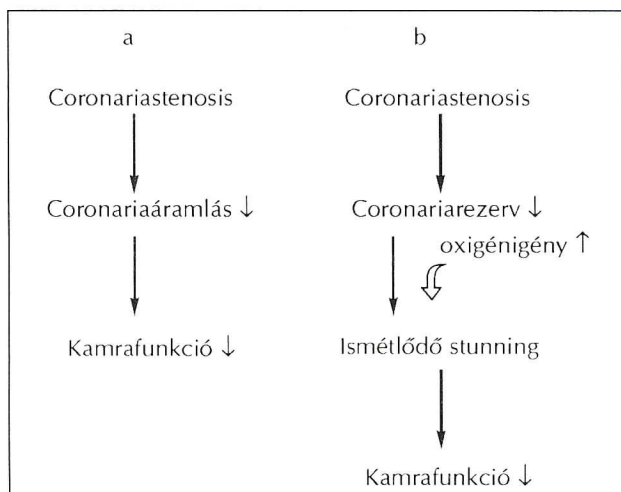


6. ábra. Izolált és felszíni membránjától megfosztott (patkány bal kamrájából származó) szívizomsejteken végzett erőmérések eredményei normális és kábult (stunned) myocardium esetén.

a) pCa-relatív erő összefüggések. A kábult myocardium erőértékeit a kontroll (normális) maximális Ca^{2+} -aktivált erőhöz (P_0) viszonyítva, relatív egységekben fejeztük ki. A P_0 csökkenése (pontozott nyíl) jól látható.

b) pCa-normalizált erő összefüggések. A stunned myocardiumban és a kontrollkörülmények között mért maximális Ca^{2+} -aktivált erőértékeket egyaránt 1-nek tekintettük. A kábult myocardium Ca^{2+} -érzékenysége kissé csökkent. (A szívizomsejtek nyugalmi sarcomerhossza $2,2 \mu\text{m}$ volt.)

súlyosságú myolysis képét mutatják: a myofilamentumok, a mitochondriumok száma csökken, a sarcoplasmaticus reticulum visszafejlődik, és a citoplazmatikus térben glikogénszemcsék szaporodnak fel. Extracellulárisan rendszerint interstitialis fibrosis képe látható. Minél több kóros jel alakul ki, és minél dominánsabbak a kóros átépülés ismérvei, annál kisebb az esély a teljes funkciónak a revascu-



7. ábra. A hibernált myocardium kialakulásának feltételezett mechanizmusai.

a) A coronariastenosis következtében nyugalmi körülmények között is elégtelen a koszorúér-keringés, amely csökkent kamrafunkciót eredményez (klasszikus elképzelés).

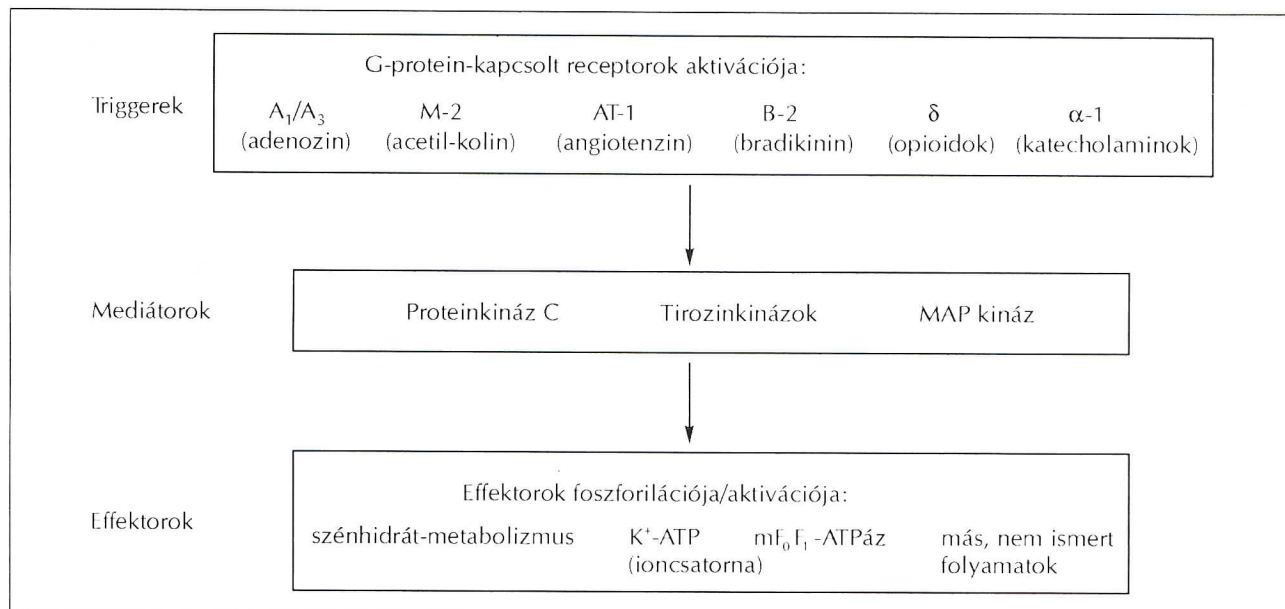
b) A coronariastenosis nyugalmi körülmények között nem okoz vérellátási zavart, a coronariarezerv viszont beszűkül. A fokozott oxigénigénnyel járó rendszeres megterhelések a myocardium közel folytonos kábult (stunned) állapotát idézik elő. Ez szintén magyarázhatja a kamrafunkció csökkenését (alternatív elképzelés)

larisatiót követő visszanyerésére. Úgy tűnik, hogy a mikroszkopikus eltérések arányosak a relatív ischaemia időtartamával. Ez azt sugallja, hogy a rövid ischaemiák utáni akut hibernáció kevésbé mélyreható myocardialis változásokat indukál, mint a hosszabb szubakut vagy a még hosszabb ischaemia után létrejövő krónikus hibernáció. Az időrendi összefüggés azért érdekes, mert minél hosszabb a relatív ischaemia, annál hosszabb időt igényel a koszorúér-keringés helyreállása utáni funkcióvisszatérés is. Jelenleg sokan vitatják, hogy a hibernációhoz vezető relatív keringési zavar nyugalomban is jelentkezik-e vagy csak terheléskor (1). Az utóbbi eset gyakorlatilag csak a coronariarezerv beszűkülését jelentené, a koszorúerek betegsége csak (fizikai, pszichés) terheléskor okozna ellátási zavarokat, és vezetne így módon állandóan ismétlődő kábult (stunned) állapothoz (repetitive stunning). Ez a feltevés a hibernáció patogenetikai folyamatának alternatív magyarázata (7. ábra). A hibernáció klinikai jelentőségét fokozza, hogy megfelelő kezeléssel (revascularisációval) a balkamra-funkció adott esetben helyreállítható. Ezért lényegesek a myocardiumviabilitási vizsgálatok (pozitronemissziós tomográfia, PET), amelyek a hibernált myocardium jelenlétét igazolhatják [metabolikus/perfúziós eltérés (mismatch)].

Ischaemiás preconditionálás

Ischaemiás preconditionálás alatt azt a mechanizmust értjük, amely rövid ideig (néhány percre) tartó, necrosist nem okozó ischaemia és azt követő reperfúzió révén nyújt védelmet egy később bekövetkező, hosszabb és potenciálisan szövetkárosító másik ischaemiával szemben (39). A korai reperfúzió után ezt a jelenséget tekinthetjük a legerősebb endogén antiischaemiás védelmi mechanizmusnak. Hangsúlyozandó, hogy az ischaemiás preconditionálás csak késlelteti, de véglegesen nem odázza el az ischaemiás szövetkárosodást. Ez azt jelenti, hogy a preconditionálás csak átmeneti ideig hatásos, és rendszerint nem nyújt védelmet a kifejezetten hosszú (>60–90 perces) ischaemiákkal szemben. A preconditionálás által előidézett védelem két egymást követő fázisban jelentkezik. A klasszikus preconditionálásnak is nevezett kezdeti védettség (first window of protection, FWOP) 1–3 óráig tart, majd folyamatosan elvész. Érdekes, hogy körülbelül 24 órával a preconditionáló ischaemia után a védettség (12–72 órára) ismét visszatér (second window of protection, SWOP). Legtöbbször úgy vélik, hogy a klasszikus preconditionálás nem védi ki a kábult myocardium kialakulását (1), nem mobilizál kollaterális keringést, és nem igényel fehérjeszintézist. Ezzel szemben a kései védettség szoros összefüggést mutat az úgynevezett hősokkfehérjék szintézisével. A jelenség felfedezése óta eltelt közel másfél évtizedben az ischaemiás preconditionálás mechanizmusát tudományos közlemények ezreiben latolgatták, a celluláris folyamatok mégsem ismertek pontosan. Az eddigiek alapján a védettséget indukáló extracelluláris triggereket, intracelluláris mediátorokat és végül a védettséget közvetlenül biztosító intracelluláris effektor (end-effectors) mechanizmusokat érdemes elkülöníteni (8. ábra). Úgy tűnik, hogy a felsorolás sorrendjében a három egymást követő folyamatról egyre bizonytalanabbak az ismereteink. Tehát az effektorokról ismereteink erősen hiányosak. Azonban valamennyi eddig javasolt effektormechanizmusra igaz az, hogy azok végül is a sejtek ionháztartását védelmezik, késleltetik az intracelluláris Na^+ - és Ca^{2+} -akkumulációt, a túlzott Ca^{2+} -felvételt követő hiperkontraktilis állapotot és a következő mélyes membránrupturát.

A klasszikus preconditionálás egyértelműen receptormediált folyamat. A védelmet nyújtó lépéseket ugyanis a preconditionáló ischaemia alatt felszabaduló humorális ágensek indítják el (triggerelik). Kísérletes körülmények között szá-



8. ábra. Az ischaemiás prekondicionálás valószínű triggerei, mediátorai és effektormechanismusai. Az ischaemiás prekondicionálás triggerei között azokat a sejtfelszíni receptorokat (és a rájuk ható humorális ágenseket) tüntettük fel, amelyek a citoprotektív folyamatokat elindíthatják. A receptoraktivációt követően intracelluláris foszforilációs folyamatok indulnak (mediátorok), amelyek érinthetik a szívizomzat anyagcseréjét (szénhidrát-metabolizmus), az ioncsatornák működését (K^+ -ATP), a mitochondriális funkciókat (mF_0F_1 -ATPáz), és más, ma még nem kellően feltárt folyamatokat

mos parakrin/autokrin úton ható faktor trigger-szerepe igazolódott (adenozin, katecholaminok, bradikinin, acetil-kolin, opiooidok, endotelin, angiotenzin-II stb.). Úgy tűnik azonban, hogy a tranziens ischaemiák alatt mindössze az adenozin, a bradikinin és az opiooidok szabadulnak fel hatásos triggerhatást jelentő mennyiségben. A különböző vizsgált specioseknél az egyes receptorok fontossága nagymértékben eltérhet. A receptormechanismusok sokrétűsége miatt fogalmazódott meg, hogy a prekondicionálás kialakulása szempontjából nem a kiváltó trigger és a hozzá kapcsolt receptormechanismus a döntő, hanem a receptorokhoz kapcsolt intracelluláris proteinkináz C-rendszer aktivitása. Ha ez nem megfelelő aktivitású, akkor nincs védetség, ha küszöb feletti az aktivitása, akkor van. Sajnos az a feltevés, miszerint a proteinkináz C-rendszer az ischaemiás prekondicionálás elsődleges mediátora, nem mindig igazolható. Más alá-, fölé- vagy esetleg mellérendeltségben működő proteinfoszforilációs rendszerek (tirozinkinázok, mitogén-aktivált proteinkinázok) szintén szerepet kaphatnak a mediátorfunkciókban. A prekondicionálás révén védetséget biztosító effektormechanismusokról viszonylag régóta ismert, hogy azok kapcsolatban állnak az ATP-dependens K^+ -csatorna (K^+ -ATP) működésével. Az ATP-dependens K^+ -

csatorna nyitásához vezető farmakológiai ágensek védetséget nyújtanak, a csatornát gátló szerek viszont felfüggesztik azt. A sarcolemmalis ATP-dependens K^+ -csatorna nyitása az akciós potenciál időtartamát rövidíti, ezáltal mérsékli a platófázis alatt belépő Ca^{2+} mennyiségét. Ennek következtében csökken a kontraktilitás, amely elsősorban a kisebb energiaigény révén nyújthat antiischaemiás védelmet. Problematikus, hogy az akciós potenciál időtartama nem mutat abszolút érvényű korrelációt az ischaemiás prekondicionálással, ezért a fenti elképzelés nem tűnik minden szempontból megalapozottnak. Ezért alternatívaként az is elképzelhető, hogy nem sarcolemmalis, hanem mitochondriális ATP-dependens K^+ -csatornák működnek közre az ischaemia elleni védetség biztosító folyamatokban. Figyelmet érdemel, hogy az ATP-dependens K^+ -csatornákon kívül más sarcolemmalis transzportfolyamatok foszforilációfüggő szabályozása is szerepelhet citoprotektív mechanizmusként (például az úgynevezett vakuoláris proton-ATPáz). Az ischaemiát követő másodpercekben a mitochondriális H^+ -grádiens megszűnik, és az egyébként ATP-t szintetizáló F_0F_1 -partikulumok ATP-t kezdenek bontani (mF_0F_1 -ATPáz). Feltételeztük, hogy az intracelluláris foszforilációs folyamatok esetleg ezeket az ATPázokat gátol-

A KÖZLEMÉNY FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI

- A myocardialis ischaemia szövethárosodás nélkül csak néhány percig tolerálható.
- Az ischaemia következtében megszűnő kontraktilitás hátterében metabolikus okok állnak. Ilyenkor a myofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége csökken.
- Hosszan tartó ischaemia alatt a szívizomsejtek tartálékai kimerülnek, ischaemiás kontraktúra, majd sejthalál alakul ki.
- A reperfundált myocardiumban tapasztalt arrhythmia háttérében gyakorta Ca^{2+} -függő ionáramok húzódnak meg.
- Az ischaemia/reperfúzió talaján kialakuló kábult myocardiumban a myofilamentumok Ca^{2+} -ra adott válasza szintén csökken. Ennek kialakulásában intracellularis proteolitikus folyamatok kapnak szerepet.
- A hibernált myocardium szerkezete átépül.
- Az ischaemiás preconditionálás mechanizmusa intracellularis foszforilációhoz kötött.

nák. Különösen érdekesek azok a fejtegetések is, amelyek az ischaemia elleni védelmet a glikolitikus, glikogenolitikus és egyéb metabolikus folyamatok áthangolásával magyarázzák. Utóbbiak a szívizomsejteken belüli energia-háztartás térbeli elkülönülésének lehetőségeit is feszegetik, ame-

lyek ma még nem tekinthetők teljes mértékben felderítettnek.

Az eddigiekben leírt, erősen egyszerűsített összefüggések jelzik, hogy az ischaemiás preconditionálás témakörében még számos kérdés megválaszolatlan. Az eddigi kísérletes tapasztalatok azonban máris felvetik a védettséget biztosító mechanizmusok kiaknázását a terápiában. Szív-műtétek során (például működő szíven végzett coronariaműtéteknél) többszörös rövid lefogás és felengedés (repetitív ischaemia) után helyezik el a végleges graftot, ilyenkor átmenetileg hosszabb időre leszorítják a megfelelő coronariaágat. A farmakológiai úton előidézett preconditionálás jelenleg még nem tekinthető rutineljárásnak. Az angina pectoris kezelésére a nicorandil alkalmazása azonban már felmerült. Ez a szer az ATP-dependens K^{+} -csatornák aktivitását fokozza.

Kevert ischaemiás szindróma

A klinikumban a különböző ischaemiás szindrómák (stunning, hibernáció, preconditionálás, necrosis) általában kevert formában jelentkeznek. Ezek a klinikai szindrómák egy betegen belül is átfedhetik egymást és folyamatosan változhatnak (38). Ezekre az esetekre a kevert ischaemiás szindróma megjelölést javasolják.

IRODALOM

1. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation and preconditioning. *Circulation* 1998;97:1848-67.
2. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998;38:291-300.
3. Marban E, Koretsune Y, Coretti M, Chacko VP, Kusuoka H. Calcium and its role in myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Circulation* 1989;80(Suppl IV):17-22.
4. Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res* 1987;60:153-68.
5. Allen DG, Morris PG, Orchard CH, Pirolo JS. A nuclear magnetic resonance study of the metabolism in ferret heart during hypoxia and inhibition of glycolysis. *J Physiol* 1985;361:185-204.
6. Eisner DA, Nichols CG, O'Neill SC, Smith GL, Valdeolmillos M. The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and pH in isolated rat ventricular cells. *J Physiol* 1989;411:393-418.
7. Koretsune Y, Marban E. Mechanism of ischemic contracture in ferret hearts: relative roles of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation and ATP depletion. *Am J Physiol* 1990;258:H9-H16.
8. Ventura-Clapier R, Veksler V. Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ Res* 1994;74:920-29.
9. Stapleton MT, Allshire AP. Modulation of rigor and myosin ATPase activity in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1349-58.
10. Matsumura Y, Saeki E, Inoue M, Hori M, Kamada T, Kusuoka H. Inhomogeneous disappearance of myofilament-related cytoskeletal proteins in stunned myocardium of guinea pig. *Circ Res* 1996;79:447-54.
11. Matsumura Y, Kusuoka H, Inoue M, Hori M, Kamada T. Protective effect of the protease inhibitor leupeptin against myocardial stunning. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22:135-42.
12. Gao WD, Liu Y, Mellgren R, Marban E. Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium: consequence of Ca^{2+} -dependent proteolysis? *Circ Res* 1996;78:455-65.
13. Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res* 1997;80:393-9.
14. Yoshida K, Inui M, Harada K, Saido TC, Sorimachi Y, Ishihara T, et al. Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circ Res* 1995;77:603-610.
15. McDonald KS, Mammen PPA, Strang KT, Moss RL, Miller WP. Isometric and dynamic contractile properties of porcine skinned cardiac myocytes after stunning. *Circ Res* 1995;77:964-72.
16. Van Eyk JE, Powers F, Law W, Larue C, Hodges RS, Solaro RJ. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation

- products and effects on the pCa-force relation. *Circ Res* 1998;82:261-71.
17. Barbato R, Manebo R, Dainese P, Carafoli E, Schiaffino S, Di Lisa F. Binding of cytosolic proteins to myofibrils in ischemic rat hearts. *Circ Res* 1996;78:821-8.
 18. McDonough JL, Arrell DK, Van Eyk JE. Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 1999;84:9-20.
 19. Sato H, Hori M, Kitakaze M, Iwai K, Takashima S, Kurihara H, et al. Reperfusion after brief ischemia disrupts the microtubule network in canine hearts. *Circ Res* 1993;72:361-75.
 20. Di Lisa F, De Tullio R, Salamino F, Barbato R, Melloni E, Siliprandi N, et al. Specific degradation of troponin T and I by μ -calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *Biochem J* 1995;308:57-61.
 21. Westfall M, Solaro RJ. Alterations in myofibrillar function and protein profiles after complete global ischemia in rat hearts. *Circ Res* 1992;70:302-313.
 22. Goll DE, Dayton WR, Singh I, Robson RM. Studies of the α -actinin/actin interaction in the Z-disk by using Calpain. *J Biol Chem* 1991;266:8501-10.
 23. Thomas SA, Fallavollita JA, Lee TC, Feng J, Canty JM. Absence of troponin I degradation or altered sarcoplasmic reticulum uptake protein expression after reversible ischemia in swine. *Circ Res* 1999;85:446-56.
 24. Van der Velden J, Klein LJ, Van der Bijl M, Huybregts MAJM, Stoker W, Witkop J, et al. Force production in mechanically isolated cardiac myocytes from human ventricular muscle tissue. *Cardiovasc Res* 1998;38:414-23.
 25. Elliott AC, Smith GL, Eisner DA, Allen DG. Metabolic changes during ischaemia and their role in contractile failure in isolated ferret hearts. *J Physiol* 1992;454:467-90.
 26. Kentish JC. The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle. *J Physiol* 1986;370:585-604.
 27. Kentish JC. Combined inhibitory actions of acidosis and phosphate on maximum force production in rat skinned cardiac muscle. *Pflügers Arch* 1991;419:310-18.
 28. Palmer S, Kentish JC. The role of troponin C in modulating the Ca^{2+} -sensitivity of mammalian skinned cardiac and skeletal muscle fibres. *J Physiol* 1994;480:45-60.
 29. Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KSR, Cobbold PH. Cytosolic free Ca^{2+} in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J* 1987;244:381-5.
 30. Pate E, Cooke R. A model of crossbridge action: the effects of ATP, ADP and P_i . *J Muscle Res Cell Mot* 1989;10:181-96.
 31. Hoar PE, Mahoney CW, Kerrick WGL, Montague D. MgADP increases maximum tension and Ca^{2+} -sensitivity in skinned rabbit soleus fibers. *Pflügers Arch* 1987;410:30-36.
 32. Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium: direct evidence for decreased myofilament Ca^{2+} responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ Res* 1995;76:1036-48.
 33. Szigeti Gy, Rusznák Z, Kovács L, Papp Z. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -activated transient membrane currents are carried mainly by Cl^- in isolated atrial, ventricular and Purkinje cells of rabbit heart. *Exp Physiol* 1998;83:137-53.
 34. Köster OF, Szigeti GyP, Beuckelmann DJ. Characterization of a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -dependent current in human atrial and ventricular cardiomyocytes in the absence of Na^+ and K^+ . *Cardiovasc Res* 1999;41:175-87.
 35. Kristóf É, Szigeti Gy, Papp Z, Bódi A, Ball NA, Walsh RA, et al. The effects of levosimendan on the protein phosphorylation in post-ischemic guinea pig hearts. *Bas Res Cardiol* 1999;94:223-30.
 36. Papp Z, Van der Velden J, Stienen GJM. Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart. *Cardiovasc Res* 2000;45:981-93.
 37. Opie LH. Stunning, hibernation and calcium in myocardial ischemia and reperfusion. *Boston: Kluwer Publishers, 1992.*
 38. Opie LH. The heart physiology from cell to circulation. *Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.*
 39. de Jonge R. Adenosine, carbohydrates and ischemic preconditioning. *Erasmus University Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands, 1999.*