

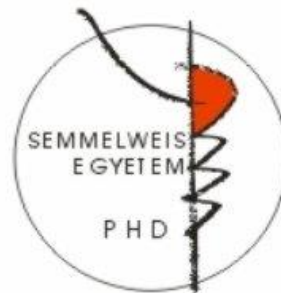
Veseszövődmények és a megelőzés lehetőségei alsó végtagi rekonstrukciós érsebészeti beavatkozások modelljében

ATP-függő kálium csatornákon ható kondicionálási eljárások

Doktori értekezés

Dr. Arányi Péter

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szijártó Attila, D.Sc., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Deák György, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Kiss Levente, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Entz László, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dósa Edit, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Járai Zoltán, D.Sc., c. egyetemi tanár

Budapest
2018

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés	8
2.1. Az iszkémiás rhabdomiolízis és a mionefropátiás metabolikus szindróma patofiziológiája	10
2.1.1. Sejtszintű anyagcsereváltozások iszkémiában a vázizomrostokban	10
2.1.2. Az iszkémiás károsodás	11
2.1.3. A reperfüziós károsodás	12
2.1.4. A végtagi vázizomzat IR-károsodása, rhabdomiolízis, alsó végtagi kompartment-szindróma.....	16
2.1.5. Akut vesekárosodás az alsó végtagi iszkémiás rhabdomiolízis következtében.....	18
2.2. Az ATP-szenzitív K^+ -csatornák (K_{ATP} -csatornák)	21
2.2.1. Molekuláris felépítés	22
2.2.2. A Kir6.x alegység.....	22
2.2.3. A szulfonilurea receptor (SUR) alegység.....	23
2.2.4. Funkció.....	23
2.2.5. A vaszkuláris simaizomsejtek K_{ATP} -csatornái	25
2.2.6. A K_{ATP} -csatornák kardioprotektív hatása iszkémiában.....	26
2.2.7. A mitokondriális K_{ATP} -csatornák	29
2.3. Az iszkémiás poszt kondicionálás	32
2.3.1. A poszt kondicionálás végső effektora: az MPTP csatorna	32
2.3.2. A poszt kondicionálás sejt szintű mechanizmusa: a RISK jelátviteli út vonal 33	
2.3.3. Intramitokondriális jelátvitel: a mito K_{ATP} -csatornák szerepe poszt kondicionálásban	34
2.3.4. Az adenzin szignalizációs út vonal.....	36
2.3.5. A SAFE (survivor activating factor enhancement) jelátviteli út vonal	36
2.3.6. A poszt kondicionálás időfaktora	37
2.3.7. A poszt kondicionálás pH hipotézise.....	38
2.3.8. Klinikai alkalmazhatóság	39
2.4. Levosimendan, mint a K_{ATP} -csatornák agonistája	43
2.4.1. Szerkezet, farmakokinetika	43
2.4.2. Hatásmechanizmus	43

2.4.3.	Klinikai hatások, alkalmazhatóság a humán gyógyászatban.....	45
2.4.4.	Levosimendan alkalmazása iszkémiás szívbetegségben	46
2.4.5.	Fázis II és III klinikai vizsgálatok	49
2.4.6.	A mortalitás kérdése	51
3.	Célkitűzések	54
4.	Módszerek	56
4.1.	Kutatásetikai háttér	56
4.2.	Állatok	56
4.3.	Anesztézia	56
4.4.	Kísérleti elrendezés, műtéttechnika	57
4.4.1.	I. kísérlet: posztkondicionálás vizsgálata alsó végtagi iszkémia-reperfúzió modelljében	57
4.4.2.	II. kísérlet: Levosimendan kezelés alkalmazása alsó végtagi iszkémia-reperfúzió modelljében.....	58
4.4.3.	Csoportbeosztás - I. és II. kísérlet (1. táblázat)	59
4.5.	Módszerek.....	59
4.5.1.	Hemodinamikai monitorozás.....	60
4.5.2.	Kórszövettan.....	62
4.5.3.	Izomrost életképesség vizsgálat	63
4.5.4.	Laboratóriumi vizsgálatok.....	64
4.5.5.	TNF- α mérések.....	65
4.5.6.	Alsó végtagi izomzat és vesekéreg mikrocirkuláció becslése	66
4.5.7.	Sav-bázis vizsgálatok	66
4.5.8.	Anti-mioglobin immunhisztokémia.....	67
4.5.9.	Heat shock protein 72 (HSP72) meghatározás	67
4.5.10.	Lipidperoxidáció.....	68
4.5.11.	Statisztikai feldolgozás	68
5.	Eredmények	70
5.1.	I. kísérlet [320].....	70
5.1.1.	Hemodinamikai monitorozás.....	70
5.1.2.	M. rectus femoris szövettan.....	70
5.1.3.	Vese szövettan	71

5.1.4.	Izomrost életképesség vizsgálat	72
5.1.5.	Laborvizsgálatok – izomsérülés	73
5.1.6.	Laborvizsgálatok – vesekárosodás	74
5.1.7.	TNF- α meghatározás	75
5.1.8.	Alsó végtagi mikrocirkuláció	75
5.1.9.	Vesekéreg mikrocirkuláció.....	76
5.1.10.	Sav-bázis háztartás	77
5.1.11.	Anti-mioglobin immunhisztokémia.....	78
5.1.12.	Heat shock protein 72 (HSP72) meghatározás	79
5.1.13.	Lipidperoxidáció.....	80
5.2.	II. kísérlet [321]	81
5.2.1.	Hemodinamikai monitorozás	81
5.2.2.	Kórszövettan.....	81
5.2.3.	Izom életképesség vizsgálat	83
5.2.4.	Laboratóriumi vizsgálatok.....	84
5.2.5.	Szérum TNF- α mérések	85
5.2.6.	Alsó végtagi izomzat és vesekéreg mikrocirkuláció becslése.....	85
6.	Megbeszélés	88
7.	Következtetések	109
8.	Eredmények	112
9.	Összefoglalás	113
10.	Summary	114
11.	Irodalomjegyzék	115
12.	Saját publikációk jegyzéke	159
	Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények.....	159
	Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények.....	159
13.	Köszönetnyilvánítás	161

1. Rövidítések jegyzéke

ABC: ATP-binding cassette, ATP-kötő kazetta

ADP: adenzin-difoszfát,

ANT: adenin-nukleotid transzlokátor

AMP: adenzin-monofoszfát

AMP-PNP: 5'-adenilil-imido-difoszfát

ATP: adenzin-trifoszfát

BE: base excess; bázistöbblet

CaMKII: Ca²⁺/kalmodulin dependens protein kináz II

CaM: kalmodulin

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CypD: ciklofillin D

DNS: dezoxiribonukleinsav

E: egyensúlyi potenciál

EKG: elektrokardiográfia, elektrokardiogram

GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz

GDP: guanozin-difoszfát

GFR: glomeruláris filtrációs ráta

GSK-3 β : glikogén szintáz kináz-3 β

HB-EGF: heparine-binding EGF-like growth factor, heparin-kötő EGF-szerű növekedési faktor

5-HD: Na-5-hidroxi-dekanoát

HE: hematoxilin-eozin (festés)

HSP72: Heat shock protein 72; hősokk fehérje 72

IC₅₀: fél-maximális gátlás

ir: inward rectifier; befelé rektifikáló

IR: iszkémia-reperfúzió, iszkémiás-reperfúziós

IRI: ischaemia-reperfusion injury, iszkémiás-reperfúziós károsodás

IU: international unit; nemzetközi egység

JNK: c-Jun N-terminális protein kináz

[K⁺]: kálium koncentráció

K_{ATP}: ATP-szenzitív K⁺-csatorna

LAD: left anterior descending coronary artery; bal arteria coronaria elülső leszálló ága
M: mol/L
MAO: monoamin-oxidáz
MAPK: mitogén-aktivált protein kináz
MPTP: mitochondrial permeability transition pore
mtsai.: munkatársai
NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NBT: nitroblue tetrazolium
NCX: sodium-calcium exchanger; nátrium-kalcium kicserélő antiporter
NT-proBNP: a B típusú (vetrikuláris) natriuretikus peptid prohormonjának (proBNP) hasításakor keletkező N-terminális fehérje
 $O_2^{\cdot-}$: szuperoxid gyök
P: permeabilitás
PCWP: pulmonary capillary wedge pressure; pulmonális kapilláris éknyomás
PDE: foszfodiészteráz
PI3K: foszfoinozitol-3-kináz
PIP₂: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PIP₃: foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát
PKC ϵ : protein-kináz C ϵ izoformája
PKG: protein-kináz G
PM: plató maximum
PMSF: fenilmetilszulfonil-fluorid
PostC: poszt kondicionálás, poszt kondicionált csoport
pro-HB-EGF: pro-heparin-kötő epidermalis növekedési faktor-szerű növekedési faktor
pS: picoSiemens, A/V * 10⁻¹²
RA: reperfusion area; reperfüziós terület
RBE: relatív base excess; relatív bázis többlet
RISK: reperfusion injury salvage kinases
rpm: revolutions per minute, fordulatszám
S: Siemens
SAFE: survivor activating factor enhancement

SD: standard deviáció

STAT-3 protein: signal transducer and activator of transcription 3

SUR: szulfonilurea receptor

TMD: transzmembrán domén

TNF- α : tumor nekrosis faktor α

TNFR: tumor nekrosis faktor receptor

tkg: testtömeg kilogram

UDP: uridin-difoszfát

vs.: versus

2. Bevezetés

Az akut alsó végtagi verőér-elzáródások, illetve egyéb alsó végtagi érkirekesztésben végzett verőér-rekonstrukciós sebészeti beavatkozások során elkerülhetetlen a kirekesztéstől, illetve érelzáródástól disztálisan eső szövetek, mindenképp egy nagy tömegű alsó végtagi vázizomzat iszkémiás-reperfúziós károsodása. Ennek mértéke alapvető meghatározója a kirekesztett szerv posztoperatív regenerációjának, a műtét kapcsán megjelenő komplikációknak, és így a betegek életkilátásainak. Az izomzat iszkémiás rhabdomyolízise játszódik le, akár alsó végtagi kompartment szindrómával, a revaszkularizációt követően a károsodott végtagból felszabaduló toxikus anyagcseretermékek, sejtalkotók hatására pedig az ún. reperfúziós szindróma tüneti képe bontakozik ki.[1] Egy mélyreható anyagcserezavar alakulhat ki, melynek jellemzői: hiperkalémia, metabolikus acidózis, hipokalcémia, mioglobínémia, mioglobínuria, valamint egy heveny vesekárosodás. A kórkép terápiája döntően még mindig tüneti jellegű, és a fejlett intenzív terápiás posztoperatív ellátás egyik legnagyobb kihívása.

A poszt kondicionálás egy 2003-ban leírt sebésztechnikai módszer, rövid addicionális iszkémiás epizódok és egy fokozatos, szaggatott reperfúziós módszer alkalmazását jelenti egy iszkémiának kitett szerv revaszkularizációjakor, mely egy adaptív védelmi mechanizmust indukál, eredményesen csökkentve az adott szerv iszkémiás-reperfúziós károsodását.[2] A poszt kondicionálás vázizmokra kifejtett protektív hatásáról, illetve a generalizálódott válaszreakcióban betöltött szerepéről csupán szórványos közlemények állnak rendelkezésünkre.[3] A műtét kapcsán kialakuló veseszövődményekre vonatkozóan pedig még nem történt vizsgálat.

A levosimendan kettős hatásmechanizmussal rendelkező, pozitív inotróp és vazodilatátor készítmény, melynek klinikai alkalmazására súlyos heveny vagy előrehaladott krónikus szívelégtelenségben kerül sor.[4] Ismert ugyanakkor egy harmadik hatásmechanizmus, melynek révén iszkémiás-reperfúziós károsodásokat enyhítve kardioprotektív hatást fejt ki, és ennek eszköze éppen ugyanazon mitokondriális ATP-szenzitív K^+ -csatorna (mito K_{ATP}) nyitódásának a serkentése, mely csatorna ismert módon az iszkémiás poszt kondicionálásnak is egy kulcsfontosságú effektor tényezője.[5]

A két kardioprotektív terápiás lehetőség (iszkémiás poszt kondicionálás és levosimendan kezelés) azonos kísérleti modellben való kipróbálásának ötletét éppen az a

tény adta, hogy ismert módon mindkét módszer hatásmechanizmusa közös mitokondriális struktúrán, a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornákon konvergál. Alsó végtagi hosszabb idejű érkirekesztés modelljében és a műtét szövődményeként megjelenő veseelégtelenség vonatkozásában korábban egyik módszer sem volt vizsgálva.

Bevezetesként az alábbiakban részletesen kerül bemutatásra a végtagi iszkémiás-reperfúziós károsodás és a szövődményként kialakuló veseelégtelenség, mint kísérleti modellünk klinikai háttere. Ezt követően bemutatásra kerülnek az irodalmi ismereteink az ATP-szenzitív K^+ -csatornákról, illetve az iszkémiás posztkondicionálás technikájáról és a levosimendan kezelésről, külön kiemelve a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornák szerepét ezen folyamatokban.

2.1. Az iszkémiás rhabdomyolízis és a mionefropátiás metabolikus szindróma patofiziológiája

2.1.1. Sejtszintű anyagszereváltások iszkémiában a vázizomrostokban

A harántcsíkolt izomsejtekben, a vázizomrostokban és kardiomiocitákban lejátszódó iszkémiás károsodásban kiváltó tényező a sejtszintű oxigénhiány. A mitokondriumok belső membránjában lokalizálódó légzési lánc IV. komplex citokrom-oxidáz enzim működése gátolt oxigén nélkül és ez az egész légzési lánc működésére kihatással van.[6] Oxigén hiányban a citokrom-oxidáz nem vesz át elektronokat a citokrom c-től, ez gátolja a légzési lánc III. komplex ubikinol-citokrom c-oxidoreduktáz enzimet, mely így nem képes átvenni elektronokat az ubikinoltól (redukált ubikinon).[7, 8] Ez gátolja a légzési lánc I. és II. komplex NADH-ubikinon-oxidoreduktázt, illetve a szukcinát-ubikinon-oxidoreduktázt. Végeredményben a légzési láncba nem tudnak belépni a redukáló ekvivalens elektronok NADH és $FADH_2$ által szállított formában.[9] Az így oxidálódni képtelen NADH gátolja a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplexet, illetve a citrátciklus három irreverzibilis lépését katalizáló enzimet is: a citrát-szintázt, az izocitrát-dehidrogenázt és az α -ketoglutarát-dehidrogenázt. Összességében leáll a ciktrátkör, nem képződik oxálacetát, mely újabb acetyl-CoA-t lenne képes befogadni a kör reakciófolyamataiba, másrészt a piruvát-dehidrogenáz gátlása miatt a piruvát acetyl-CoA-vá alakulása is leáll.[10] Ekkor lép működésbe a piruvátot laktáttá alakító laktát-dehidrogenáz, melynek koenzime éppen a feleslegbe került NADH. A NADH így oxidálódik vissza NAD^+ -dá, mely a glikolízis folyamataiban képes ismét NADH-vá redukálódni.[11, 12] A laktát keletkezésével záruló anaerob glikolízis energia mérlege igen szerény: egy glukóz molekula két laktáttá való bomlása során összesen 2 ADP ATP-vé való foszforilációja következik be, mely a felgyorsult glikolízis ellenére sem képes egy ponton túl fedezni a sejt energiaigényes folyamatait.[11, 13]

2.1.2. Az iszkémiás károsodás

ATP hiányban gátlódik az ATP-ázok működése, így a szarkolemma Na^+/K^+ -pumpája, melynek hatására Na^+ -többlet alakul ki a sejtben.[11]

Azáltal, hogy a piruvát nem oxidálódik tovább a citrátkörben vízzé, hanem laktáttá alakul anaerob viszonyok között, az intracelluláris pH csökken iszkémia alatt.[14] A nagy mennyiségben termelődő laktát, a keletkező protonokkal csak részben képes elhagyni a sejtet a monokarboxilát transzportereken (MCT) keresztül.[11] A protonok egy másik része a sejtmembrán Na^+/H^+ -kicserélő mechanizmusán át hagyja el a sejtet, mely tovább emeli az intracelluláris Na^+ -szintet.[15] ATP hiányában a szarkoplazmás reticulum Ca^{2+} -pumpája is gátlódik. Ez a folyamat egészül ki azzal, hogy az emelkedő Na^+ -szint másodlagosan, a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő mechanizmuson keresztül vezet az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedéséhez.[16] (Természetesen az iszkémia előrehaladott stádiumában az ATP hiányban elinduló membrán depolarizáció is az excitációs folyamatokhoz hasonló Ca^{2+} -felszabadulást vált ki.[15]) Összességében az eredmény az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedése lesz.[14, 17] Az emelkedett kalcium szint az intracelluláris proteáz kalpain enzimek szarkolemmához való transzlokációjához vezet, de ezen enzimek egyelőre az alacsony pH miatt még nem aktiválódnak.[18]

Az ATP hiány miatt felhalmozódó ADP tovább bomlik AMP-re, majd adozinra, inozinra és hipoxantinra.[19] A hipoxantin xantinná és húgysavvá oxidálna tovább a xantin-oxidáz/-dehidrogenáz enzim segítségével, NAD^+ redukciója mellett. Az iszkémia alatt azonban az enzim működésében egy dehidrogenáz-oxidáz konverzió következik be.[20] NAD^+ és oxigén hiányában a reakció iszkémia során nem folytatódik tovább.

A jelentős intracelluláris Ca^{2+} -többletet ellensúlyozandó, a mitokondriumok nagy mennyiségben képesek kalciumot felvenni, mégpedig a Ca^{2+} -szelektív (elektrogén) uniporterrel keresztül, melynek hajtóereje a mitokondriális membránpotenciál (mely fiziológiás viszonyok között a protontranszportra, és ATP termelésre fordítható).[21, 22] Az intramitokondriális Ca^{2+} -többlet pedig a mitokondriális belső membrán MPTP (mitochondrial permeability transition pore) non-szelektív óriáscsatornáit tudná aktiválni, de ezt iszkémia alatt a savas pH megakadályozza. A további folyamatoknak összességében az ATP hiánya szab határt, és az a tény, hogy az

intracellulárisan felhalmozódó kalcium és nátrium ionok ozmotikus duzzadáshoz, majd sejtnekrózishoz vezetnek.[15, 17, 21]

2.1.3. A reperfüziós károsodás

2.1.3.1. A pH normalizálódása

A véráramlás megindulásával hirtelen emelkedni kezd és normalizálódik az iszkémiának kitett területeken az extracelluláris tér pH-ja. Ez egy nagy protongrádiens teremt a sejtmembrán két oldalán, mely hajtóereje a szarkolemma Na^+/H^+ -kicserélő transzporterének. A protonkiáramlás egyben jelentős Na^+ -többletet hoz így a sejtbe.[14] Az előzőekhez hasonló módon a Na^+ -felesleg aktiválja a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő transzporter reverz működését (Na^+ sejtből kifelé, Ca^{2+} befelé való forgalma), mely ismét intracelluláris Ca^{2+} -felhalmozódáshoz vezet.[23] Ezáltal iszkémia-reperfüzió során az intracelluláris kalcium-koncentráció az időtengely mentén két csúcsot mutat, az egyiket a iszkémia 15-60. perce között, a másodikat a revaszkularizációt követő kb. 30. percnél.[14] Az emelkedett kalcium szint és a normalizálódó pH aktiválja az iszkémia alatt már a szarkolemmába transzportálódott kalpain proteáz enzimeket (pontosabban felszabadítja a korábban alacsony pH miatti inaktívált állapotból).[18] Ezen enzimek különböző szubsztrát proteinek hidrolízisével hoznak létre károsodást a membránstruktúrákon.[18] Ilyen a membrán citoszkeleton α -fodrin és a különböző membrántranszport folyamatokat a citoszkeletonhoz horgonyzó ankirin hidrolízise.[24] Az eredmény egy fragilis membránstruktúra és hiperkontraktúras izomrostkárosodás lesz.[14, 18]

2.1.3.2. Reaktív szabad gyökök, oxidatív stressz

A reperfüzió során meginduló oxigénellátás káros hatása („oxigén paradoxon”[25]) pedig abban nyilvánul meg, hogy intenzív oxidatív stresszfaktorként reaktív oxigéngyökök termelődését indítja el.[26] Ennek egyik fő forrása a citoplazma xantin-oxidáz enzime, mely a fentiek szerint az iszkémia alatt konvertálódott a xantin-dehidrogenáz enzimből,

és molekuláris oxigén jelenlétében a hipoxantinból xantint képez, majd annak továbbalakulását katalizálja húgysavra.[20] Mindkét reakció mellékterméke a szuperoxid gyök ($O_2^{\cdot-}$), mely számos további reakcióban vesz részt, további reaktív szabadgyökök termelődéséhez vezetve.[27]

A sejt legfőbb reaktív oxigén gyök termelője azonban a mitokondrium, azon is belül a légzési lánc elektrontranszport rendszere a belső membránban.[26] A légzési lánc I-es, illetve III-as komplexuma oxigén többlet, és ADP hiány esetén (éppen ez a konstelláció áll fenn a reperfüzió kezdetén) képes arra, hogy egy elektron átadásával redukálja az O_2 molekulát, és szuperoxidgyök keletkezzen.[28]

A légzési lánc komplexeken kívül egyéb mitokondriális struktúrákról is feltételezik, hogy részt vesznek a reaktív szabadgyökök termelésében. Ilyenek a növekedési faktor adapter fehérje, az Shc ($p66^{Shc}$), a NADPH-oxidáz-4 (Nox4), a monoamin-oxidáz (MAO), stb.[26]

A mitokondriumok érzékenyek az extramitokondriális reaktív oxigén gyökökre, bizonyos belső membrán anion csatornák (IMAC: inner membrane anion channel) extramitokondriális szuperoxid stimulusra átmenetileg kinyílnak, és a mitokondrium belső membránon keresztül „ROS-indukált ROS felszabadulást” provokálnak.[28]

Ezzel együtt említendő meg, hogy az iszkémia után a mitokondriumok saját antioxidáns rendszere elégtelen az oxidatív stressz ellensúlyozására. A glutationperoxidáz és peroxiredoxin enzimek vennének részt a keletkező szabadgyökök vízzé való redukálásában, de ehhez redukált glutationra és tioredoxinra van szükségük, melyek redukciója pedig a citrátkörben képződő NADPH mennyiségéhez kötött, ami az anaerob metabolizmusra áttért sejtekben nem áll rendelkezésre a vérkeringés megindulásakor.[28]

Összességében a reaktív szabadgyökök felszabadulása egy kontrollját vesztett, öngerjesztő láncreakcióhoz vezet, mely szabályozatlan reakciófolyamatokban megtámad membrán lipidstruktúrákat, fehérjeaminosavakat, illetve akár a DNS nukleotidjait is.[20] A lipidperoxidációnak különösen kitett lipidmolekula a mitokondriális belső membrán fő alkotóeleme, a kardiolipin, mely felelős a membrán kötött funkcionális-strukturális épségéért.[20] Oxidációja nemcsak a légzési lánc komponenseire bír károsító hatással, hanem a hozzá kötődő citokróm c-vel való kapcsolódását is meggyengíti, így az a citoplazmába kikerülve pro-apoptotikus folyamatokat képes elindítani. [29, 30]

A reaktív szabadgyökök, illetve a lipidperoxidáció során képződő reaktív aldehidek (malondialdehid, 4-hidroxinonenál) fehérjék denaturációját idézhetik elő aminosavak alfa-karbon csoportjaiból és fenolgyűrű egységeiből hidrogén elvonással, nitrozilálással, különböző peptidkötések bontásával, vagy kötések létesítésével, hidrofobicitás tulajdonságok megváltoztatásával.[20, 31] A protein peroxidációnak és nitrozilációnak leginkább kitett struktúrák a mitokondriális fehérjék, a légzési lánc komplexei (II. komplex, citokróm-oxidáz, alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz), a sejt jelátviteli útvonalaiban szerepet játszó, funkcionális tirozin-oldallánccal bíró tirozin-kinázok, protein tirozin-foszfatazok, és az izomsejtek kontraktilis fehérjéi.

A belső membrán lipidperoxidációja, párosulva a légzési lánc komplexumok aminosavláncainak direkt oxidációjával, végeredményben az oxidatív foszforiláció folyamatait károsítja.[26]

2.1.3.3. Végső effektor: az MPTP csatorna

A reperfüziós károsodások végső közös effektor struktúrája a mitokondriumok belső membránjának MPTP csatornái. Egy ilyen csatorna/pórus kb. 1500 Da méretig enged különböző molekulákat és ionokat (non-szelektív módon) szabadon áramlani a mitokondrium membránján keresztül. Aktiváló tényezőként szerepel a megnövekedett intramitokondriális kalcium-szint, a belső membrán depolarizációja, inorganikus foszfátok magas koncentrációja és maga az oxidatív stressz.[5, 30, 32]

Az aktiválódás, a pórusformálódás folyamata részleteiben még pontosan nem ismert. Az MPTP csatornák feltételezett strukturális elemei mind szenzitívek a reaktív szabad gyökökre: A külső membránban elhelyezkedő és a pórushoz kapcsolódó feszültségfüggő anioncsatorna (VDAC: voltage-dependent anion channel) az intermembrán tér és a citoszol felé is forduló oxidálható aminosav komponenseivel mindkét tér oxidatív folyamataira érzékeny.[30] A belső membránban helyet foglaló adenin-nukleotid transzlokátor (ANT: adenine nucleotide translocator) oxidációjakor a regulátor fehérje ciklofillin D-hez (CypD) való kötődése változik meg.[33] A belső membrán F_0F_1 ATP-szintáza szintén érzékeny reaktív oxigén gyökökre (mégpedig azonosított aminosavakhoz köthető szelektív módon), ezen enzim módosítása

valószínűsíthetően szintén hatással bír az MPTP csatornák nyitódására.[30, 34] A reaktív oxigén gyökök aktiválhatják a p53 tumor szuppresszorfehérjét, mely a mitokondriumokba transzlokálódik és kötődik szintén a CypD-hez, ezáltal nyitva az MPTP csatornákat.[35] Továbbá a p53 fehérje a Bcl-xL és Bcl-2 anti-apoptotikus faktorokkal való interakció révén felszabadítja a gátlásuk alól az MPTP csatornákhöz asszociálódó Bax/Bak proapoptotikus faktorokat, azok így képesek a külső mitokondriális membránban oligomerizálódni és ezáltal részt venni a membránpermeabilitás változásban.[36] A reaktív oxigén gyökök aktiválják a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal egyes tagjait, így a c-Jun N-terminális protein kinázt (JNK), mely foszforilációk révén anti-apoptotikus faktorok gátlásával és proapoptotikus faktorok aktiválásával szintén a Bax/Bak oligomerizációt okoz. [30, 37]

A pórusok nyitódásában minden bizonnyal szerepet játszó intramitokondriális Ca^{2+} -szint pontos hatásmechanizmusa még szintén csak meglehetősen felületesen ismeretes. A CypD egy valószínűsíthető kapcsoló struktúra.[30] Az F_0F_1 ATP-szintáz szerepe is szinte biztosra vehető, tekintve, hogy sikerült azonosítani egy Ca^{2+} -kötő helyet a fehérjekomplexen.[38] Elképzelhető, hogy az intramitokondriális kalcium, a kalmodulinhoz (CaM) kötődve hoz létre MPTP formálódást. A CaM számos intramitokondriális enzimet képes aktiválni, így a kalcium/kalmodulin dependens protein kináz II-t (CaMKII), mely eddig ismeretlen mechanizmussal nyitja az MPTP csatornákat.[39]

A pórusok megnyílásával a membránpotenciál rögtön nullázódik, a folyamat a sejtorganellum duzzadásához és a külső membrán szétrepedezéséhez vezet. A mitokondriumban tárolt Ca^{2+} ismét kijut az intracelluláris térbe, másrészt az intermembrán térben lévő proapoptotikus faktorok, mint a citokróm c, az apoptosis inducing factor (AIF), prokaspáz-9, Smac/DIABLO is kijutnak a mitokondriumból, melyek aktiválják a kaspáz enzimeket és elindítják az apoptózis folyamatát.[21, 40] Ezzel párhuzamosan sejtnekrózis is elindul, mely egy kontrollálatlan kaskádrendszer, melynek része a membrán transzport folyamatok sérülése miatti sejtduzzadás, fehérje struktúrák megrongálódása a kalcium-indukált proteázok által, a legkülönbözőbb sejtalkotókon végbemenő károsodás a túlbujánzó reaktív oxigéngyökök által, végül bekapcsolva a sejt körüli lokális gyulladós folyamatokat.[14]

2.1.4. A végtagi vázizomzat IR-károsodása, rabdomiolízis, alsó végtagi kompartment-szindróma

A rabdomiolízis sokféle lehetséges etiológiájú kórkép, inkább tünetegyüttes, melynek lényege az izomszövetet ért károsodás, és az ennek következményeként létrejövő izomrost dezintegráció (szó szerint az izomrost szöveti feloldódása a szarkolemma folytonosságának megszakadásával), melynek során endocitoplazmatikus anyagok (kálium, foszfát, mioglobín, kreatin-kináz, húgysav) kerülnek akár nagy mennyiségben a szisztémás keringésbe, okozva szisztémás szövődeményeket.[41] Elkülöníthetjük kongenitális formáját (a szénhidrát metabolizmus bizonyos enzimikus defektusai, malignus hipertermia, neuroleptikus malignus szindróma, mioadenilát-deamináz deficiencia) és szerzett formáját.[41, 42] Ez utóbbi kialakulhat excesszív izommunkát követően (akár sportolás, akár konvulzió esetén), külső sérülések során (trauma, égés, fagyási sérülés, áramütés, kompresszió), iszkémiás sérülések esetén (artériás érelzáródás, akár érsebészeti beavatkozások közben az érokklúzió kapcsán), infektív miozitiszekben.[41-45] Továbbá számos gyógyszer mellékhatásaként is megjelenhet: direkt toxikus hatásként (alkoholok, statinok, zidovudin, emetin), hipokalémizáló hatásként (amphotericin B, diuretikumok), mitokondriális károsító hatás révén (tirozin-kináz inhibitorok, propofol), neuromuszkuláris stimuláció révén (fenciklidin, acetilkolinészteráz inhibitorok), illetve a kábítószeres fokozott fizikai aktivitást stimuláló hatása, hipertermia, vazokonstriktió révén, vagy túladagolás esetén az okozott tartós eszméletlenség, izomkompresszió hatására (heroin, kokain, amfetamin, barbiturátok).[41, 46-50]

Etiológiától függetlenül a celluláris események és a körlefolyás közös minden esetben: A szarkolemmát károsító hatásra a szigorúan szabályozott membrántranszport folyamatok és ionegyensúlyok (alacsony intracelluláris Na^+ - és Ca^{2+} -szint, magas K^+ -szint) felbomlanak, nagyfokú intracelluláris kalcium többlet alakul ki, mely kalcium-dependens proteázokat és foszfolipázokat aktivál, melyek károsítják a miofibrillumokat, a citoskeletont és a membránstruktúrákat.[51, 52] A rabdomiolízis korai szövődménye lehet szívritmuszavarok jelentkezése a hiperkalémia és hipokalcémia miatt, a későbbi

szövődmények pedig a mioglobin okozta veseelégtelenség és a szétesett izomrostokból a keringésbe mosódó nagy mennyiségű intracelluláris sejtalkotók kiváltotta disszeminált intravaszkuláris koagulopátia (DIC).[41, 53]

Gyakran nehéz a rabdomiolízis diagnózisának felállítása. Az izomkárosodás lokális tünetei, mint az izomfájdalom, -gyengeség és duzzanat, nem mindig kifejezettek, vagy akár hiányozhatnak is. A diagnózis kulcsa ilyen esetekben is az izom eredetű enzimek vizsgálata a plazmában, illetve a mioglobin detektálása a vizeletben. Jellemző tünet a sötétbarna vizelet, ("coca cola" vagy „fekete tea színű” vizelet), mely vizelet gyorsan vörösvértest pozitívítást mutat, de mikroszkóp alatt nem találhatók benne sejtes elemek.[51] A klasszikus klinikai tünetegyüttes triász: izomfájdalom, izomgyengeség és a pigmentált vizelet azonban a rabdomiolízis esetek csak kb. 10 %-ában van jelen.[54] Aspecifikus klinikai tünetek lehetnek a láz, hányinger, hányás, zavartság, agitáció, delírium, anuria.[51] A plazmában kimutathatók a károsodott izomszövetből kiszabaduló anyagok: mioglobin, kreatin-kináz (CK), aldoláz, LDH, aminosztransferázok (AST, ALT). Jellemző laboreltérések továbbá az igen magas szérumsav- (>750 µM) és foszfátkoncentráció (>2,5 mM), illetve hiperkalémia, melyek a sejtkárosodás kapcsán szabadulnak fel a rostokból, és az általában alacsony szérumsav- szint (<1,5 mM), mivel a kalcium a károsodott szarkoplazma struktúrákhoz kapcsolódva, illetve kalcium-foszfát depozitumokként felhalmozódik az izomrostokban).[52, 55] Hetekkel a károsító hatás után, a rabdomiolízis késői fázisában ezek a kalcium-foszfát depozitumok mobilizálódhatnak, és ez a betegek egy részében (kb. egy harmadában) hiperkalcémiát okozhat.[52, 56]

A nagy kiterjedésű izomrostszétesés, membrántranszportfolyamatok károsodása következtében az izomrostokban nátrium- és kalciumfelhalmozódás zajlik le, mely következményesen nagy mennyiségű vizet is von el a keringésből. A rostok duzzadásával a végtagi zárt faszciarekeszekben a nyomás megnövekszik (elérheti a kritikus 35-40 Hgmm-t), és ez szekunder artériás kompresszióhoz vezet. Így tehát egy további iszkémiás károsodás zajlik le.[57] Gyakran megfigyelt szövődmény érsebészeti rekonstrukciós beavatkozások során is, hogy a szabaddá tett érpálya ellenére az oxigéntranszport továbbra is zavart, a sikeres embolotomiát követően, nyitott érpálya mellett a súlyos, generalizált, életet veszélyeztető tünetek miatt a faszciarekeszek felszabadításával

faszciotomiát kell végezni, vagy számos esetben a végtag nem menthető és amputációra kényszerülünk.[58]

2.1.5. Akut vesekárosodás az alsó végtagi iszkémiás rhabdomyolízis következtében

Általánosságban a rhabdomyolízis, illetve a nagyobb rekonstrukciós verőérműtétek legjelentősebb szövődménye az akut vesekárosodás, mely a vesefunkció enye fokú változásától a dialízis kezelést indokló súlyos veseelégtelenségig terjedhet.[51] Az alkalmazott definíciótól függően elég széles tartományban található az irodalomban adatok az előfordulási gyakoriságról. Elektív aorta-rekonstrukciós műtéteken átesett betegek 1-28 %-ában alakul ki átmeneti vagy akár tartós vesefunkcióromlás, akut veseelégtelenség mintegy 1-5 % valószínűséggel alakulhat ki.[59] Általánosságban rhabdomyolízist követően 13-46 %-ban számoltak be heveny vesekárosodásról.[54, 60, 61]

Iszkémizált szövetek revaszkularizációja, különösen, ha végtagi nagy tömegű izomról van szó, metabolikus acidózissal jár, hiperkalémiával, mioglobinémiával, és mindez mioglobinuriához, akut tubuláris nekrozishoz és akár veseelégtelenséghez vezet. Ezen tünetek együttesét foglalja magába a „mionefropátiás metabolikus szindróma” elnevezés.[62]

A perioperatív vesediszfunkció kialakulásának mechanizmusa több komponensű: köthető a szövődményként megjelenő keringési elégtelenséghez, nefrotoxikus anyagok felszabadulásához, neuroendokrin mechanizmusokhoz, és a gyulladásos válaszreakcióhoz.

Nagy mennyiségben kerülnek a keringésbe purinbázisok az izomszövetből, melyek hepatikus metabolizmusa során húgysav képződik, hiperurikémia jön létre, mely potenciálisan nefrotoxikus.[63]

Döntő tényező azonban a rhabdomyolízis során a felszabaduló mioglobin molekula. A mioglobin egy 154 aminosavból felépülő, egyszálú, 17,8 kDa molekulású fehérje.[54] Egyedül a szívizomsejtekben és a vázizomrostokban expresszálódik. A hemoglobinhoz hasonlóan reverzibilisen képes kötni a molekuláris O₂-t, és több szinten vesz részt az izomsejtek intenzív metabolizmusában, lehetővé téve a kontraktilis

működést: (1) Izomműködéskor, hipoxiás körülmények között, anoxiában oxigén-rezervoár szerepet tölt be. (2) pufferele az intracelluláris P_{O_2} -szintet. (3) részt vesz a O_2 mitokondriumokhoz való transzportjában az izomsejtek fokozott működésekor. (Az izomkontrakció megindulásakor gyorsan deszaturálódik, nagy grádienszt teremtve az intra- és extracelluláris oxigén-tenziók között.)[64] Ugyanakkor peroxidáz aktivitással is rendelkezik, szabadgyök-fogóként is funkcionálhat, az NO-t is képes kötni a sejtben.[65, 66]

A mioglobinnal vesekárosodást okozó hatása komplex, többkomponensű folyamat. Mérete lehetővé teszi, hogy szabadon filtrálódjon a vesében. A filtráció után a tubulusfolyadékban nagy koncentrációban megjelenő hemoproteinek képesek kicsapódni a tubuluslumenben, a Tamm-Horsfall proteinekhez asszociálódva, különösen a tubulusfolyadék acidotikus pH-ján. Ez a jelenség szövettani metszeteken hialincilinderekként jelenik meg, melyek már igen korán beszűkítik/elzárják a tubulusok lumenét. [53, 67, 68] A filtrálódó húgysav szintén képes a tubulusok lumenében kicsapódni, tovább súlyosbítva a tubuláris obstrukció fokát.[60]

A tubuláris folyadékáramlást gátoló hialincilinder-képződésen túl a mioglobinnak direkt toxikus hatása is valószínűsíthető. A proximális tubulussejtek endocitózissal veszik fel a mioglobint.[54] A megnövekedett mioglobintermelésre indukálódik többfelé a szervezetben, így a vesében is a hemoxigenáz nevű enzim.[60, 69] A hemoxigenáz a következő reakcióegyenlet szerint katalizálja a hem csoport lebontását: $Hem + 3 AH_2 + 3 O_2 \rightarrow biliverdin + Fe^{2+} + CO + 3A + 3 H_2O$. A mioglobin így felszabaduló vas komponense szabad hidroxil ($\cdot OH$)-gyökök, és egyéb vaskomponensű oxidánsok képzésén keresztül, lipidperoxidáció révén károsítja a tubulussejtek sejtmembránját.[53, 70-72]

Ezek mellett az epitelsejtekbe bekerülő mioglobin a NO megkötésével közvetve renális vazokonstriktiót hoz létre, és iszkémiás tubuláris károsodás is kialakulhat.[73] Ehhez hasonló eredménnyel jár a lipidperoxidáció során F_2 -izoprosztánok keletkezése arachidonsavból, melyek közvetlen renális vazokonstriktorok.[74, 75]

Ezek mellett egy harmadik mechanizmus is megemlíthető, mely a vese vérellátásának csökkenésével tulajdonképpen iszkémiás eredetű vesekárosodást is okozhat.

Nagy kiterjedésű izomszövetek elhalása esetén a rostokba szekvesztrálódó folyadék intravaszkuláris folyadékdeplációhoz vezethet, mely a renin-angiotenzin-aldoszteron tengely, vazopresszin és a szimpatikus idegrendszer aktivációja révén preglomeruláris arteriolák vazokonstrikióját okozza, a vese véráramlása csökken, mely immáron prerenális veseelégtelenséget okozhat és tovább károsítja a tubulussejteket.[54, 76, 77]

Ehhez hozzájárul még a hipovolémiás shock egy másik, közvetve káros hatása is. Nagymértékű keringésdinamikai átrendeződések kapcsán, a béltraktusban is perfúziós elégtelenség alakul ki, és számos toxin szabadul fel, melyek már önmagukban is akut veseelégtelenséget okozhatnak. A máj szűrőfunkciójának károsodásával pedig a belek Gram-negatív baktérium-flórájából endotoxinok áramlanak a szisztémás keringésbe. Ez az „endogén” endotoxin központi mediátor szerepet játszik a kibontakozó szisztémás gyulladásos válaszreakcióban és sokszervi elégtelenségben (MODS: multiorgan dysfunction syndrome). Végeredményben az izomnekrózis által aktivált endotoxin/citokin kaszkád (különösen a TNF- α szerepe emelendő ki) a vesére is káros következményekkel bírhat.[78]. Feltételezhetően a rhabdmiolízis során az izomrostokból felszabaduló reaktív szabad gyökök, gyulladásos citokinek, vazokonstriktor hatású anyagok tovább súlyosbítják ezt a folyamatot.[54]

A fenti folyamatokat tetézendő, nagy mértékű izomszétésés során a keringésbe kerülő szöveti trombolasztin disszeminált intravaszkuláris koagulopátiát indukál, mely mikrotrombus képződés által vezethet iszkémiás veseparenchima károsodáshoz szélsőséges esetben.[53]

2.2. Az ATP-szenzitív K⁺-csatornák (K_{ATP}-csatornák)

Az K_{ATP}-csatornák első, 1983-as leírása óta ([79] és [80]), az elmúlt három évtizedben az ioncsatorna igen intenzív és szerteágazó kutatások témája lett.

Az ATP-szenzitív K⁺-csatornák számos sejttypusban leírt (szívizomsejtek, vaszkuláris simaizomsejtek, endotelsejtek, vázizomsejtek, pancreas β-sejtek, vese endoteliális sejtek[81]), a sejtmembránban és a mitokondriális belső membránban egyaránt megtalálható, így számos fontos élettani folyamatban, illetve egyben kórállapotban szerepet játszó ioncsatornák. Nagy mértékben szelektív K⁺-ionokra (a Na⁺-ionokra és a K⁺-ionokra vonatkozó permeabilitási arány: P_{Na}/P_K kb. 0,01-es nagyságrendben van).[82] Legmélyebben tanulmányozott és így leginkább ismert élettani szerepe az inzulinelválasztásban van a pancreas β-sejtjeiben. A posztprandiálisan emelkedő vér glukóz szint, illetve a glukóz felvételével a sejten belül lejátszódó metabolizmus kapcsán emelkedő intracelluláris ATP szint hatására ezen ioncsatornák nyitási valószínűsége csökken, ami lehetőséget nyújt a sejtek depolarizációjára, feszültségfüggő Ca²⁺-csatornák nyitódására, mely triggere az inzulint tartalmazó granulumok exocitózisának.[83, 84] Emellett a szívben található K_{ATP}-csatorna izoformák nyertek nagy tudományos érdeklődést, mert bizonyos kardiovaszkuláris kórfolyamatokban (így hipertóniában, a miokardiális iszkémiában és szívritmuszavarokban) felmerült szerepük felvetette farmakoterápiás befolyásolási lehetőségüket is ezen kórállapotok kezelésére.

A csatornák névadó tulajdonsága, hogy intracelluláris nukleotidokkal, ATP-vel gátolhatók. Fél-maximális gátlása (IC₅₀) kb. 10-50 μM ATP-koncentráció mellett mérhető.[85] AMP-PNP-vel (5'-adenilil-imido-difoszfát) és más nem hidrolizálható nukleotid-trifoszfát analóggal is gátolható, mely jelzi, hogy a gátlás nem egy esetleges foszforiláció eredménye, hanem a csatornához való direkt kötődés kapcsán alakul ki.[86, 87] Magnézium-mentes közegben ADP is képes gátolni a csatornát, feltehetően ugyanazon kötőhelyhez való kötődés által[85], azonban Mg jelenlétében az ADP épp ellentétes módon hat, az ATP által gátolt csatorna nyitódását serkenti.[88]

2.2.1. Molekuláris felépítés

Szerkezetét tekintve hetero-oktamer, négy Kir6.x alegységből (ir = „inward rectifier”, az ún. befelé rektifikáló K^+ -csatorna család tagja, a tulajdonképpeni pórus-formáló alegység) és négy SUR alegységből (szulfonilurea receptor, az ATP-binding cassette (ABC) fehérjecs család tagja) épül föl.[89] Ezek az alegységek párosával (egy pórusformáló Kir6.x és a hozzá kapcsolódó SUR fehérje), tetramer alakzatban veszik körül a membránon átvezető ioncsatornát.[90] A tetramer szerkezet kialakítása szigorúan szabályozott, az alegységek csak párokban tudnak a membránba beépülni. Ennek szabályozó elemei feltehetően a mindkét alegységben megtalálható argininben gazdag RKR motívumok, melyek nem megfelelő konformáció (pl. a Kir6.x egységekből esetlegesen felépülő önálló tetramer csatorna formák, illetve SUR monomer csatorna egységek esetén) az endoplazmás retikulumba való visszazállításra jelzést adó „trafficking” szignálokként szolgálnak, és a hibás elrendezésű fehérjekomplex így nem épül be a membránba.[91]

2.2.2. A Kir6.x alegység

A Kir6.1 és Kir6.2 alegységek egyaránt két-két transzmembrán hélixet tartalmaznak (TM1, illetve TM2), NH_2 és $COOH$ terminálisuk is intracellulárisan helyezkedik el. Mindkét alegység típus egy magasan konzervált aminosav szekvenciát tartalmaz (TVGYG)[92], mely szekvencia megjelenik minden K^+ -csatorna típusban, így vélhetően ez a szekvencia felelős a csatornák K^+ -szelektivitásáért („ K^+ channel signature sequence”, H5 szegmentum).[93, 94] Az ATP-szenzitív K^+ -csatornák ezen alegységei felelősek az ATP által okozott gátlásért.[85] A csatornafehérje intracelluláris oldalán, az NH_2 és $COOH$ terminálisok, illetve egyéb peptidláncok részvételével alakul ki egy ATP-kötő zseb, fehérjénként egy darab, így a csatorna az öt alkotó négy Kir6.x fehérjelánc részvételével összesen négy ATP-kötő helyet hordoz.[95]

2.2.3. A szulfonilurea receptor (SUR) alegység

A SUR1, SUR2A és SUR2B fehérjék az ABC (ATP-binding cassette), vagy ABC-ATP-áz fehérje szupercsaládba tartoznak, mely fehérjecsalád tagjai között vannak sejtmembránba épülő, membrántranszport-folyamatokban szerepet játszó, illetve a citoszolban és a nukleuszban lokalizálódó, non-transzporter (elsősorban DNS repair mechanizmusokban, gén regulációs folyamatokban szerepet játszó) típusai.[96] Ezen meglehetősen konzervált felépítésű, az élővilágban igen elterjedt fehérjecsalád tagjai bizonyos közös strukturális vonásokkal jellemezhetőek. Az ABC transzporterek, melyek közé a SUR fehérjék is tartoznak, két transzmembrán doménnel (TMD) és két nukleotidkötő doménnel (nucleotide-binding domain, NBD, vagy más néven ATP-kötő kazetta, ATP-binding cassette) rendelkeznek. [97] Az ATP-szenzitív K^+ -csatornák SUR alegységei bár nagyfokú hasonlóságot mutatnak a megszokott ABC transzporterek felépítésével, mégis néhány ponton eltérnek a megszokott szerkezettől. Egyrészt a szokásos két transzmembrán domén (TMD1 és TMD2) mellett egy harmadik, TMD0 jelzésű transzmembrán elemet is tartalmaznak, mely a megszokott 6 helyett 5 membránon áthaladó hélix struktúrát foglal magába. Másrészt a nukleotidkötő egység is „aszimmetrikus”, ugyanis az NBD2 domén a megszokott LSGGQ szekvencia („signature sequence”) helyett FSQGQ aminosavsorrendet tartalmaz, illetve a Walker-B motívumban a szokásos aszpartát helyett egy glutamát szerepel a magasan konzervált glutamát (D) aminosav mellett.[98] A SUR alegység funkcionális morfológiájáról megjegyzendő, hogy a TMD0-L0 egység felelős feltehetően a Kir6.x csatornához, mégpedig annak TM1 transzmembrán hélixéhez való kapcsolódásban, másrészt a nukleotidkötő régiók a csatornák működésének szabályozásában játszanak szerepet.[99] A két NBD domén egymáshoz való kapcsolódása szükséges feltehetően a nukleotidkötő hely kialakításáért, és az ATP-hidrolíziséért.[95, 100]

2.2.4. Funkció

Szerkezeti felépítés és funkcionális tulajdonságok alapján a K_{ATP} -csatornák a befelé rektifikáló K^+ -csatornák csoportjába tartoznak, melyekben polivalens kationok

(poliaminok és Mg^{2+}) képeznek az ioncsatornában akadályt a mindenkori membránpotenciáltól függő módon, mégpedig a K^+ -ok egyensúlyi potenciáljánál (E_K) pozitívabb membránpotenciál esetén. A befelé rektifikáló elnevezés tehát azt jelenti, hogy bizonyos membránpotenciál felett a csatornán keresztül csak befelé irányuló K^+ -áram lehetséges, kifelé irányuló nem. [101] A feszültségfüggőség valójában így nem intrinzik tulajonsága ezen csatornáknak, mert hiányzik belőlük a specifikus, minden feszültségfüggő csatornában megtalálható S4 feszültség szenzor régió.[101]

Megfigyelések alapján a csatorna Kir alegységeihez köthető strukturálisan az ATP által létrehozott gátlás, a SUR alegységhez pedig a Mg-ADP által létrehozott aktiválódás.[102] Így a csatornának kiemelt jelentőségét feltehetően pont az adja, hogy a sejtszintű anyagcsere változásait kapcsolja össze a membránpotenciállal (és fordítva is: a membránpotenciál változásait kapcsolja össze az intracelluláris metabolizmussal és energiaháztartással), és ezen keresztül az excitábilis sejtek membránpotenciál-függő egyéb szubcelluláris mechanizmusaival.

A központi szabályozó elemek minden bizonnyal a SUR alegység nukleotidkötő helyei, azonban az ATP-hidrolízis pontos mechanizmusa és ennek szabályozó szerepe egyelőre még meglehetősen kevésbé tisztázott. Az NBD2 Mg^{2+} jelenlétében köt ATP-t (MgATP-t), és katalizálja a hidrolízist nagy sebességgel. Az NBD1 ennél kisebb sebességgel, Mg^{2+} nélkül hidrolizálja az ATP-t. [103]

Szívizomsejtek szarkolemmális K_{ATP} -csatornáinál bizonyítást nyert, hogy a sejt excitabilitásának és energetikai státuszának kapcsolatát tovább erősíti, hogy a csatornák csatlakoznak a sejt két legfontosabb foszforaszfer rendszeréhez is: az adenilát-kináz és a kreatin-kináz enzimek közvetlenül kapcsolódnak a csatornákhöz.[104, 105] Ehhez hasonlóan leírták, hogy a laktát-dehidrogenáz enzim (mégpedig annak izom típusú M-LDH izoenzime) is valamilyen módon részét képezi a membrán K_{ATP} -ioncsatornájának, és az általa termelt laktát a sejtben a csatornát gátló koncentrációnál nagyobb mennyiségben jelen lévő ATP mellett is képes a csatornát nyitni.[106, 107] A K_{ATP} -csatorna ezen enzimrendszerekkel való kapcsolata lehet a kulcsa annak, hogy a sejt ATP koncentrációinak igen kis változásaira is érzékenyen tud reagálni, pl. iszkémia alatt.[82] Ahogy fentebb említésre került, a csatornát alkotó alegységeknek számos izoformája ismeretes, és ezen formák egymással való variációi az oktamer szerkezeten belül különböző csatorna-altípusokat hoznak létre. Ezek a strukturális különbségek jelennek

meg a különböző szövetek specifikus ATP-szenzitív K^+ -csatornáiként, és ez a variabilitás magyarázhatja a különböző szövetek K^+ -csatornáinak eltérő sejtszintű regulációs tulajdonságait és farmakológias befolyásolási lehetőségeit.[87] A Kir6.2 és SUR2A által alkotott csatorna a kardiomiociták sarkolemmális K_{ATP} -csatorna típusa, bár egyes adatok alapján felmerül, hogy ez csak a kamraizomzatra jellemző, és a pitvari szívizomsejtekben a SUR2A alegységet SUR1 fehérje helyettesíti (Kir6.2/SUR1 komplex).[108] A szív ingerületvezető rendszerében feltehetően Kir6.1 és Kir6.2 fehérjék heteromultimerként együttesen is részt vehetnek a csatornák alkotásában, szabályozó alegységként pedig valószínűleg SUR2B fehérjék szerepelnek.[109] A vaszkuláris simaizomsejtek membránjában Kir6.1/SUR2B alegységekből áll a csatorna, bár a koszorúerek (artériák) simaizomzatában szintén leírták heteromultimerek jelentését: Kir6.1/Kir6.2 + SUR2B.[95, 110]

2.2.5. A vaszkuláris simaizomsejtek K_{ATP} -csatornái

A vaszkulátúra simaizomsejtjeinek domináns K_{ATP} -csatornái Kir6.1 és SUR2B alegységekből épülnek fel.[111] Jellemző tulajdonságuk, hogy nukleotid difoszfátok (ADP: adenzin-difoszfát, UDP: uridin-difoszfát, GDP: guanozin-difoszfát) jelenléte nélkül zárt állapotban vannak, ezért szokás nukleozid-dependens K^+ -csatornának is hívni ezen ioncsatornákat.[112] A vaszkuláris simaizomsejtek membránjában viszonylag alacsony denzitással (kb. 300 csatorna sejtenként) fordulnak elő ATP-szenzitív kálium-csatornák, ellenben annál nagyobb jelentőséggel bírnak a sejtek kontrakciójának, így az érátmérőnek a szabályozásában.[95] A csatornák nyitódásával a kifelé irányuló kálium-áram hiperpolarizációt okoz, mely a feszültségfüggő kalcium-csatornák szabályozásával csökkenő Ca^{2+} -beáramlást, így simaizomrelaxációt vált ki.[113] A vazodilatációt kiváltó különböző vazoaktív anyagok is hatással bírnak a K_{ATP} -csatornákra: Az adenzin, CGRP (calcitonin gene-related peptide), β -adrenoreceptor agonisták, vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP), NO, prosztaciklin a simaizmot körülvevő struktúrákból szabadulnak fel (endotelsejtek, perivaszkuláris idegvégződések, környező simaizomsejtek), vagy a véráram útján kerülnek a sejtek közelébe. G_s -fehérje kötött receptorok intracelluláris adenilát-ciklázot aktivál, a cAMP szintje megemelkedik, mely aktiválja a protein-kináz A

enzimet, mely a SUR2A fehérjék direkt foszforilációjával aktiválja az ioncsatornát.[114, 115] Ezzel szemben a vazokonstriktor szerotonin, angiotenzin II, endotelin-1, hisztamin a G_i és G_q kötött receptoraikhoz kötődve a protein kináz C ϵ izoformát aktiválják, mely a Kir6.1 foszforilációjával vezet az ioncsatorna nyitódási valószínűségének csökkenéséhez, sőt a Kir6.1/SUR2B csatorna komplex internalizációjához, membrán depolarizációhoz és vazokonstriktációhoz.[116-119]

2.2.6. A K_{ATP} -csatornák kardioprotektív hatása iszkémiában

Az K_{ATP} -csatornák iszkémiás-reperfúziós károsodásban való esetleges szerepéről elsősorban a szívizomsejtek vonatkozásában vannak kísérletes ismereteink. Már egy 1976-os tanulmány megfigyeléseiből ismert volt, hogy hipoxiában a miokardiális sejtmembrán K^+ -konduktanciája megnő, a sejtekből K^+ -ok lépnek ki.[120] A megnövekedett K^+ -konduktancia, a K^+ -kiáramlás szerepet játszik a miokardiális akciós potenciál hipoxiában megfigyelhető megrövidülésével. [121, 122] Noma és munkatársainak izolált tengerimalac kardiomiocitákon végzett kísérleteiből vált ismertté, hogy az akciós potenciál időtartama összefüggést mutat az intracelluláris ATP-szinttel[123], hipoxiás sejtek K^+ -konduktanciája szintén befolyásolható az ATP-szint által[79] (ez volt tulajdonképpen az ATP-függő K^+ -csatornák első leírása[79, 80]), és ebből adódott a feltételezés, hogy éppen a hipoxiás sejtekben lecsökkenő ATP-tartalom által nyitódó ATP-függő K^+ -csatornák felelősek az iszkémiában megfigyelhető K^+ -kiáramlásért.[124] (Érdekes tehát megjegyezni, hogy a K_{ATP} -csatornák első leírásakor is már felmerült, és azóta is intenzíven kutatót kérdéskör a csatornák iszkémiában betöltött esetleges kardioprotektív hatása.)

A molekuláris klónozás technikájával lehetővé vált a különböző csatorna alegységek azonosítása[125], és az így izolált egységekből kísérletes körülmények között felépített ioncsatornák tulajdonságainak (ionszelektivitás és konduktancia jellemzők, befelé rektifikálás és a különböző intracelluláris és farmakológias anyagokra való szenzitivitás viszonyainak) elemzésével került leírásra, hogy a SUR2A és Kir6.2 egységekből felépülő heterooktamer feleltethető meg a ventrikuláris kardiomiociták domináns szarkolemmális K_{ATP} -csatornáinak.[126, 127]

A csatornák kardioprotektív hatásának megismerésében nagy előrelépést jelentett a csatornák felépítésének, és sejtekben való kifejeződésének molekuláris biológiai módszerekkel való genetikai módosítása. Géndelációval létrehozott homozigóta Kir6.2^{-/-} (így defektes, nem funkcionáló szarkolemmális K_{ATP}-csatornával rendelkező) egérmodell sérülékenyebb iszkémiával szemben.[128] Génamplifikációs molekuláris biológiai technikával előállított transzgenikus egerek, melyek a SUR2A csatornaalegységet, ezáltal a kardiomiociták szarkolemmális K_{ATP}-csatornáit is a vad típusnál nagyobb mennyiségben expresszálják, hipoxiára és iszkémiás-reperfúziós károsodásra rezisztensebbek.[129]

A K_{ATP}-csatornák iszkémiában való aktivációjával, és ennek kardioprotektív hatásával kapcsolatos számos kísérletes bizonyíték ellenére a jelenség magyarázatáról, ezen feltételezhető endogén védelmi mechanizmusnak a részleteiről még meglehetősen homályos ismereteink, sok ponton inkább csak feltételezéseink vannak. Az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy fiziológias körülmények között a szarkolemmális K_{ATP}-csatornák döntően zárva vannak, így az excitáció-kontrakció folyamatában nem vesznek részt.[95] Egy súlyosabb külső inzultus, illetve metabolikus hatásra, mint az iszkémia, a csatornák azonban megnyílnak, és a rajtuk keresztül megvalósuló káliumion mozgás repolarizáló hatására az akciós potenciál időtartama (a platószakasz) lerövidül.[130] Emiatt a feszültségfüggő L-típusú Ca²⁺-csatornák nyitott állapota is lerövidül, és a sejtekbe történő Ca²⁺-belépés mértéke egy szívciklus alatt lecsökken, és a miociták kontrakciója gátlódik.[131] Ennek következménye egyrészt, hogy az ATP-raktárak kevésbé használódnak el[132], másrészt az iszkémia alatt megfigyelhető excesszív Ca²⁺-belépés is csökken a sejtbe, megelőzve ennek káros következményeit, mint az arritmiák, kontraktilis diszfunkció és sejthalál.[21] Az akciós potenciál időtartamának lerövidülésével ugyanakkor a diasztolés időtartam hosszabbodik, mely segíti a miokardium relaxációját.[95] Mi több, az iszkémiás behatáshoz hasonló módon, a szív fizikai terheléshez való adaptációjában, az ekkor megfigyelhető szívfrekvencia-növekedés, és az ezt kísérő akciós potenciál megrövidülésben is egyes adatok szerint szerepet játszanak a szarkolemmális K_{ATP}-csatornák.[133] Ismétlődő terhelés hatására az adaptáció részét képezi, hogy a csatornák expressziója és a sejtmembránba való beépülése is fokozódik.[134] Ez a terhelés hatására létrejövő miokardiális „remodelling” hozzájárul a szívizom iszkémia toleranciájához.[135, 136] Jelen ismereteink alapján ezen adaptív

mechanizmusban a SUR2A csatornaalegységet kódoló ABCC9 gén transzkripcióját serkentő cJun/NH2-terminális kináz szignalizációs kaszkád játszhat szerepet.[134, 137, 138] Újabb eredmények alapján nemcsak a fokozott transzkripció figyelhető meg iszkémia hatására, hanem sejten belüli membránstruktúrákba, vezikulákba (mint egyfajta rezervoárba) ágyazott preformált K_{ATP} -csatornák membránba való kihelyeződése (a membrán K_{ATP} -csatorna denzitásának megemelkedése) is hozzájárul a protektív hatáshoz.[139]

Mindenesetre a kísérletes eredmények humán viszonyokra való alkalmazhatóságának határt szabhat az a tény, hogy a legtöbb kisállatkísérlet egér modellen történt a téma vonatkozásában. Egér fiziológias szívfrekvenciája az emberének kb. tízszerese ($>600/\text{min}$), mely tényből kifolyólag ebben a modellben feltehetően a szarkolemmális K_{ATP} -csatornák iszkémiában való protektív szerepe jóval nagyobb lehet, mint nagyobb emlősmodellek esetében, így humán vonatkozásban is.[128]

A K_{ATP} -csatornák nyitódásának kardioprotektív hatásának háttérében feltételezett fenti mechanizmusokkal kapcsolatban azonban felmerülnek kétségek. Bizonyos KCO-k (potassium channel opener, K_{ATP} -csatornák agonista vegyületei) különböző kísérletes modellekben igazolt kardioprotektív hatása mellett nem volt tapasztalható érdemi megrövidülése az akciós potenciál időtartamának.[140, 141] Ez azt sugallja, hogy kell, hogy létezzen egy ettől független mechanizmus is, esetleg egy másik sejt szintű célpontja ezen farmakológias szerekeknek.[142] A K_{ATP} -csatornák iszkémiás károsodásban betöltött kardioprotektív hatásának és az iszkémiás prekondicionálásban betöltött szerepének kutatása vetette fel 1991-ben a csatornák nemcsak a miociták szarkolemmájában, hanem mitokondriumainak belső membránjában való lokalizációjának a lehetőségét, az úgynevezett mitokondriális K_{ATP} -csatornák (mito K_{ATP}) létezését.[143]

Az összes ismert KCO képes kiváltani kardioprotekciót.[144, 145] A pinacidil, a cromakalim és a nicorandil, a SUR2A alegységek agonistái csökkentik az IR-károsodást, azonban nincsenek hatással a pancreas β -sejtjeire (ahol a K_{ATP} -csatornáknak SUR1 alegység található).[146] A diazoxid, mely nem kapcsolódik a SUR2A alegységhez, de kapcsolódik a SUR1 alegységhez, hatással bír az inzulinválasztásra, de mindemellett kardioprotektív hatást is kifejt.[142] A döntő bizonyíték amellet, hogy a kardioprotektív hatás inkább a mitokondriális K_{ATP} -csatornához köthető, az volt, hogy a diazoxid ugyanolyan effektív az iszkémiás károsodás csökkentésében, mint a cromakalim, de

hatását nem kíséri az akciós potenciál rövidülése. Így vélhetően a cromakalim kardioprotektív hatása is a mitokondriumok szintjén érvényesül, és ettől függetlenül hat a szarkolemmális K_{ATP} -csatornákra.[145]

2.2.7. A mitokondriális K_{ATP} -csatornák

A Mitchell-féle kemiozmotikus elmélet[147, 148] szerint a mitokondriális terminális oxidáció folyamata során az organelum belső membránjának két oldala között felépülő elektromos potenciálkülönbség (szokásos jelölése: $\Delta\psi$) a mátrixból kipumpált H^+ -okon kívül a K^+ -okra is egyértelműen hatással van (a membrán mátrix felőli oldala elektronegatív az intermembrán tér felőli oldal ionösszetételéhez képest). A beáramló K^+ -ok feltehetően egy K^+/H^+ antiporterrel keresztül hagyják el a mátrixot, melynek szabályozója a membrán két oldala között lévő pH-grádiens (ΔpH).[149, 150] Arról azonban, hogy a K^+ -ok hogyan jutnak át a belső membránon keresztül a mátrixba, sokáig nem voltak ismereteink[151], és még ma is csak keveset tudunk a valószínűsíthető belső membrán K^+ csatornák pontos tulajdonságairól.

Inoue és mtsai. patkány májból izolált mitokondriumok fúziójával nyert óriás mitoplastokon feszültségbeállítós („patch-clamp”) technikával igazolták egy nagy K^+ -szelektivitású, alacsony (kb. 10 pS) konduktanciájú ioncsatorna jelenlétét a mitokondriális belső membránban, mely gátolható volt ATP, 4-aminopyridin és glibenclamid alkalmazásával.[143]

Ehhez hasonló eredményekre jutottak Paucek és mtsai. egy mitokondrium belső membránból nyert és tisztított[152] fehérje frakció liposzómákba, illetve lipid kettősréteg membránokba való ágyazott modelljében.[153] Ezen modell felhasználásával, illetve a régóta alkalmazott „intakt mitokondrium” izolálási technikával a későbbiekben több munkacsoport (elsősorban Garlid és munkacsoportja) azonosította a feltételezett mitokondriális K^+ -csatorna egyes tulajdonságait, ionszelektivitását, konduktanciáját, különböző farmakológias befolyásolási lehetőségeit.[142, 154, 155]

Fény derült arra is, hogy a kardioprotektív hatásáról ismert diazoxid és ennek hatását gátolni képes 5-HD (Na-5-hidroxi-dekanoát) sokkal nagyobb szelektivitással kötődik a mitokondriális K_{ATP} -csatornához, mint a szarkolemmális K_{ATP} -

csatornához[142], és ez a tény egyre inkább a mitokondriális csatornára irányította a figyelmet, mint a kardioprotektív hatás lehetséges közvetítőjére.

Nagy kihívást jelentett, és még a mai napig sem megoldott rejtély a mitoK_{ATP}-csatornák szerkezeti felépítésének kérdése. A kezdeti feltételezés az volt, hogy a sejtmembránban megismert szerkezethez hasonló Kir6.x és SURy alegységek alkotják a mitokondriális belső membránban található csatornákat is.[156] Azonban antigénjelöléses módszerrel[157-159], illetve géndeléciónal létrehozott mutáns törzsek vizsgálatával[128, 160] sem a Kir6.1, sem a Kir6.2 csatornaformáló alegységet nem sikerült egyértelműen igazolni a mitokondriumokban, legalábbis több egymásnak ellentmondó kísérletes adat látott napvilágot. Bár több vizsgálat azonosította antigénjelöléses immuncitokémiai módszerrel a SUR2A alegység jelenlétét mitokondriumokban[156], és erre utal a csatornák érzékenysége glibenclamidra is[161], mégis megkérdőjelezhető ezen alegység szerepe a mitoK_{ATP}-csatornák felépítésében, ugyanis ezen alegységeket tartalmazó csatornáknál nem tapasztalható az egyébként a mitoK_{ATP}-csatornákra ismert módon hatással bíró diazoxid aktiváló és 5-HD gátló hatása.[162] Lacza Zs. és mtsai. pedig beszámoltak arról, hogy az immuncitokémiai módszerrel azonosított, anti-SUR2 antigénnel reagáló mitokondriális protein sokkal kisebb mólsúlyú, mint a sejtmembránban azonosított SUR2 alegység (kb. 25 kDa, szemben a kb. 140 kDa-nal), ráadásul ez a SUR-jellegű fehérje nem kapcsolódik a szokott módon a Kir6.1 és Kir6.2 alegységekhez, és nem vesz részt a funkcionáló mitoK_{ATP}-csatorna alkotásában.[163]

Egészen újszerű meglátás volt, hogy a fentebb említett, mesterségesen létrehozott, proteoliposzómákba ágyazott mitokondriális belső membrán részletek által rekonstruált mitoK_{ATP}-csatornák kísérletes modelljében vizsgálódva 2004-ben Ardehali és mtsai. felvetették a lehetőségét, hogy a mitoK_{ATP}-csatornák az addig elképzelt felépítéssel ellentétben valójában legalább öt fehérjéből (SDH: szukcinát-dehidrogenáz, mABC1: mitokondriális „ATP-binding cassette protein-1”, PiC: foszfát-karrier, ANT: adenin nukleotid traszlokátor, ATP-szintáz) felépülő makromolekula komplexek a mitokondriumok belső membránjában.[164] (Bár egyértelműen megfogalmazható kifogásként, hogy egy membránfehérje komplex egyáltalán nevezhető-e ATP-függő K⁺-csatornának akkor, ha nem ismert a pórusformáló alegysége, nem szelektív K⁺ ionokra,

és az ATP és egyéb feltételezett $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ blokkoló és aktiváló szerekre való válaszkészsége is korlátozott?[165])

Egy még újabb elképzelés szerint az egyébként a vese Henle-kacs felszálló szegmentumában, az összekötő csatornában és a gyűjtőcsatornák kortikális részén a tubulussejtek luminális membránjában elhelyezkedő konduktív ROMK („renal outer medullary K^+ channels”[166]) csatornákkal megegyező káliumcsatorna képezi a szívműködés mitokondriumainak belső membránjában a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornák membránon átvezető csatornaformáló egységét (mitoROMK csatorna).[167] Ez az azonosított csatorna azért is valószínűsíthető megfelelője a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornáknak, mert szenzitív ATP-re, a pH változásaira, glibenclamidra, foszfatidil-inozitol-difoszfátra (PIP_2) és PKC-re egyaránt.[168]

A másik fontos, mégis megválaszolatlan kérdés, hogy fiziológias körülmények között milyen szerepe van a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornáknak, és milyen mechanizmussal vezet a csatorna nyitódása a kardioprotektív hatáshoz iszkémiában? Egyes leírások szerint a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornák nyitódásában a fő hangsúly a mátrix volumen és Ca-háztartás szabályozásában lenne.[169] A csatornák megnyílásakor a kálium ionok befelé való áramlásával nem tart lépést a kifelé való áramlás, azt inkább a protonok (kifelé való) mozgása kompenzálja, illetve ezzel párhuzamosan a foszfátok és víz befelé áramlása történik. Egy enyhe mátrix volumen-növekedés zajlik le ezáltal.[170, 171] A mátrix volumennövekedésével az intermembrán tér szűkül le, mely egyes feltételezések szerint biztosítéka a normális oxidatív foszforilációnak, a mitokondriális külső membrán stabilitásának, az azon keresztüli nukleotid áramlásnak és citoplazma irányában történő ATP-transzportnak.[167] Normálisan a mitokondriális belső membránon szinte egyáltalán nem zajlik K^+ -ionok áramlása, a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornák nyitódásával azonban egy enyhe depolarizáció indul meg, és ez megakadályozza kalciumionok túlzott mértékű beáramlását a mátrixba (melynek következménye lenne az MPTP: mitokondriális „permeability transition pore” óriáscsatornák nyitódása).[167, 172] Végül egy elmélet szerint a csatorna nyílás hatására a mitokondriális légzési lánc egy enyhe fokú „szétkapcsolásával” lenne összefüggésbe hozható a kardioprotektív hatás. Az ennek hatására kis mennyiségben keletkező reaktív szabadgyökök a mitokondriális protein-kináz C ϵ aktiválásával vezetnek az MPTP csatornák nyitódásának gátlásához.[173]

2.3. Az iszkémiás poszt kondicionálás

Az iszkémiás poszt kondicionálás, rövidebben csak poszt kondicionálás (PostC) egy iszkémiának kitett szerv reperfúziójának kezdetén a szöveti véráramlás ismételt, több rövid ciklusban alkalmazott megszakítása, rövid reperfúziós-reokklúziós ciklusok alkalmazása a végleges és teljes reperfúzió előtt. 2003-ban Vinten-Johansen és munkatársai írták le a jelenséget elsőként.[2] Kuttyában a bal arteria coronaria elülső leszálló ága (LAD: left anterior descending coronary artery) egy óras kirekesztését követően 30 másodperces reperfúziós epizódokból és 30 másodperces reokklúziókból álló ciklusok alkalmazásával az egy óras iszkémia okozta infarktus kiterjedése 44 %-kal volt csökkenthető. Továbbá az iszkémiának kitett területen a poszt kondicionált állatokban szignifikánsan alacsonyabb neutrofil granulocita akkumuláció (szöveti mieloperoxidáz és polimorfonukleáris granulocita adreherencia meghatározásokkal) volt tapasztalható.[2] A módszert a már 1986-ban leírt iszkémiás prekondicionálás[174] (ahol a hosszabb iszkémia előtt kerül sor egy vagy több ciklus rövid iszkémiára és reperfúziós epizódra) már jól bevált kardioprotektív hatására utalva, illetve attól megkülönböztetendő nevezték poszt kondicionálásnak. A módszer hatékonyságát azóta számos kísérletes elrendezésben igazolták, *in vitro* izolált kardiomiocitákon[175], Langendorff-szerint izolált és perfundált patkányszíven[176], *in vivo* számos állatmodellen és a legkülönbözőbb szervek tekintetében[177-181], izolált humán miokardiumon *in vitro*[182], végül klinikai vizsgálatokban humán iszkémiás szívizomkárosodás során.[183, 184]

2.3.1. A poszt kondicionálás végső effektora: az MPTP csatorna

Bár még meglehetősen hiányosak az ismereteink a poszt kondicionálás pontos sejt szintű mechanizmusával kapcsolatban, de az nagy biztonsággal kijelenthető, hogy a protektív jelátviteli útvonalak végső effektor tényezője a mitokondriális MPTP póruscsatorna.[145] A reperfúziós károsodás végső támadáspontja a mitokondriális integritás ellen szintén ezen óriáscsatornák mitokondriális belső membránban való megjelenése és megnyílása. Iszkémia alatt a csatornák zárva vannak, majd a reperfúzió első perceiben rendeződnek alkotóelemei egy pórusformáló egységbe és nyílnak meg, non-szelektív kontrollálatlan

transzportfolyamatokhoz és végső soron a mitokondrium és az egész sejt pusztulásához vezetve.[185] Ezen rövid időablak a reperfüzió első perceiben pont az, amelyben a poszt kondicionálással beavatkozhatunk a szubcelluláris szintű biokémiai folyamatokba. Számos, egymással részben összefüggő, részben független, egymással párhuzamosan kapcsolt jelátviteli kaszkád végső soron a mitokondriumok szintjén, az MPTP csatornák nyitódásának gátlásán konvergál.

2.3.2. A poszt kondicionálás sejt szintű mechanizmusa: a RISK jelátviteli útvonal

Több sejtfelszíni receptorhoz köthető szignálmechanizmussal veszi kezdetét a poszt kondicionálás. A pontosan még nem ismert forrásból felszabaduló opioidok és a bradikinin szintén külső stimulusként indítják el a sejt szintű jelátviteli folyamatokat. Emellett a poszt kondicionálás során meg-megszakított reperfüzió késlelteti ezen metabolitok kimosódását az iszkémián átesett szövetekből.[186] Az opioidok és a bradikinin, bár más receptorhoz kötődve, de hasonló jelátviteli útvonalat indítanak el. G_i -fehérjéhez kötött sejtfelszíni receptorukhoz (GPCR: G-protein coupled receptor) kapcsolódva mátrix metalloproteinázok közreműködésével a membránhoz asszociált pro-heparin-kötő epidermális növekedési faktor-szerű növekedési faktor (pro-HB-EGF) hasítása játszódik le.[187] A felszabaduló HB-EGF aktiválja receptorát a membránban (EGFR), mely által ezen receptorok dimerizálódnak, autofoszforilálódnak, majd szarkoma (src) tirozin-kinázok aktiválásán keresztül aktiválják a foszfoinozítid-3-kinázt (PI3K).[188]

Azt ezt követő jelátviteli folyamatot RISK (reperfusion injury salvage kinases) útvonalnak is nevezik.[189]

A PI3K a sejtmembrán foszfatidil-inozitol zsírsavait foszforilálja, foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfáttá (PIP_2) és foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfáttá (PIP_3), melyek egyrészt az Akt (PKB: protein-kináz B) kinázt kihorgonyozzák a plazmamembránhoz, másrészt aktiválják a foszfoinozítid-dependens protein kinázokat (PDK1 és PDK2, más néven mTORC2), melyek foszforilálással aktiválják az Akt protein-kinázt, mely további kinázokat aktivál foszforilációval.[188, 190, 191] Innentől

az események és a foszforilációs kaszkád szereplőinek sorrendisége még pontosan nem ismert. Az Akt közvetlenül is foszforilálja a glikogén szintáz kináz-3 β -t (GSK-3 β), mely ezáltal inaktiválódik, és az inaktív forma gátolja a mitokondriális MPTP csatornák nyílását.[190, 192] Az Akt hatására ugyanakkor foszforilálódnak és aktiválódnak az Erk 1/2 (p42/p44) mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK), majd pro-apoptotikus faktorok (BAK, Bax, BIM, p53), melyek a foszforiláció hatására inaktiválódnak.[189] A szarkoplazmában aktiválódik az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS), melynek hatására NO képződik, mely aktiválja a guanilil-ciklázt (GC), mely cGMP produkcióját katalizálja, mely végül aktiválja a protein-kináz G-t (PKG).[188, 189]

2.3.3. Intramitokondriális jelátvitel: a mitoK_{ATP}-csatornák szerepe posztkondicionálásban

A PKG aktiválja a mitokondriális belső membrán ATP-függő K⁺-csatornáit (mitoK_{ATP}).[190] A kapcsolat azonban nem direktleges, és még máig kutatott kérdés. Feltételezhetően egy szigorúan szabályozott mechanizmus kell, hogy közvetítse a szarkoplazma jelátviteli mechanizmusait a mitokondriális belső membránhoz. Továbbá ezeknek a kaszkád-szerű protein-foszforilációknak térben és időben rendezetten, megfelelő sorrendben és rapidan kell le játszódniuk. Ezért merült fel egy preformált struktúra létezésének a lehetősége, melyet szignallozómanak neveztek.[193] Az elmélet szerint GPCR receptorok, ligandkötődés hatására aktiválódva, membránlefűződéssel kaveolákba rendeződnek, melyekben helyet foglalnak a jelátviteli folyamatsor egyéb szereplői is, mint a G-fehérjék, különböző tirozin-kinázok, Na⁺/K⁺-ATPázok, az eNOS, GC, PKC és PKG enzimszerek. A szignallozóma a citoskeleton proformált struktúráit használva a mitokondriumhoz vándorol, ahol annak külső membránjához kötődik a kináz-kaszkád utolsó elemének foszforilációja által, ott internalizálódik, és az intermembrán téren és a belső membránon is áthaladva eléri a mátrixot.[145] A terminális kináz vélhetően a protein-kináz C ϵ izoformája (PKC ϵ), melynek aktivációjához anionikus foszfolipidek is szükségesek, pl. a mitokondriális belső membrán kardiolipinje.[145] Konformációs változások után a PKC ϵ képes kötődni ligandjaihoz (RACK: receptor for activated C kinase).[194] Pontosán nem ismert mechanizmus révén a PKC ϵ hatására

nyílnak a belső membrán $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornái, és rajtuk keresztül K^+ ionok áramlanak az intermembrán tér felől a mátrixba, melyet H^+ ionok ellentétes irányú áramlása kompenzál a légzési láncon keresztül. Ez a mátrix pH-jának emelkedéséhez vezet. Az alkalinizáció K^+/H^+ -antiporterek aktiválódásával K^+ -felvételt eredményez, egy új kálium egyensúlyi helyzet kialakulásával. Az alkalinizáció a légzési lánc I-es komplexen fokozott szuperoxid gyökképződést vált ki.[195] Természetesen ehhez a lépéshez már oxigén jelenléte szükséges. Az eddigi folyamatok mind az iszkémia alatt játszódnak le, majd ezen utolsó lépés már a reperfüzió első másodperceiben történik.[188] A szuperoxid gyökök egy második $\text{PKC}\epsilon$ („ $\text{PKC}\epsilon 2$ ”) aktivációján keresztül vezetnek az MPTP csatornák nyitódásának gátlásához. A második $\text{PKC}\epsilon$ elképzelhető, hogy valamiképpen elkülönül az első $\text{PKC}\epsilon$ -tól (pl. a belső mitokondriális membrán különböző oldalain helyezkednek el). Másrészt egy pozitív feed-back mechanizmus részeként a reaktív oxigén gyökök aktiválják a $\text{PKC}\epsilon 1$ -et is, mely foszforiláció révén hozzájárul a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornák tartósan nyitott állapotához (mely egyfajta memória mechanizmusként játszhat szerepet az iszkémiás prekondicionálás mechanizmusában).[196]

A reaktív oxigén gyökök által aktivált $\text{PKC}\epsilon$ a direkt MPTP nyitódást gátló hatáson kívül egy másik mechanizmusban is részt vesz: foszforilálja és ezáltal inaktiválja a glikogén szintáz kináz- 3β -t ($\text{GSK-3}\beta$).[197] A $\text{GSK-3}\beta$ hatására a mitokondriális külső membránban elhelyezkedő VDAC és a hozzá kötődő hexokináz II kapcsolata gyengülne meg. Ez a kapcsolódás stabilizáló hatással bír a PTP nyitódására nézve.[198] A $\text{GSK-3}\beta$ emellett a p53 proapoptotikus faktort foszforilálva annak mitokondriumba való helyeződését és az MPTP csatornák nyitását segíti elő.[199] Ugyanakkor a foszforilált $\text{GSK-3}\beta$ az ANT és CypD interakció gátlásával is gátolja az MPTP csatornák formálódását.[200] Tehát a $\text{GSK-3}\beta$ foszforilációján konvergáló jelátviteli útvonalak három hatásmechanizmussal is vezetnek a mitokondriális belső membrán stabilizálásához, az MPTP csatornák megnyílásának gátlásához.[30]

Harmadik tényezőként szokás említeni a szintén még meglehetősen tisztázatlan mitokondriális mátrix duzzadás folyamatát. A mátrix helyhez kötött fehérjéi, makromolekula komplexei ozmotikus aktivitásuk révén vezetnek a mitokondriumok duzzadásához a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornák nyitódásakor. Biztosan egy szigorúan szabályozott egyensúlyi folyamatról van szó, szemben az MPTP csatornák nyitódásakor lejátszódó kontrollálatlan és az organellum széttöredezésével záródó duzzadással.[171] (Már egy

1965-ös tanulmány különbséget tett bizonyos nagy amplitúdójú és kis amplitúdójú duzzadása között a mitokondriumoknak.[201]) A mátrix térfogatának enyhe fokú növekedése az intermembrán tér volumenének csökkenésével a mitokondriális külső és belső membrán egymáshoz való közelebb kerülését eredményezi, mely feltételezhetően egymás közelébe hozza az energia-termelés folyamatainak szereplőit, ezáltal fejtve ki protektív hatást az iszkémián átesett sejtekben.[202-204]

2.3.4. Az adenosin szignalizációs útvonal

Az iszkémia során ATP defoszforilációjából szabadul fel adenosin, melynek kimosódását a sejtek extracelluláris teréből gátolja meg mechanikusan a reperfüzió kezdetén a megszakított áramlás.[14, 205] A G_i -fehérje kötött A_1 adenosin receptor ligandkötése a foszfolipáz C-t és D-t (PLC és PLD) aktiválja. A PLC a membrán inozitol-foszfolipidjeit hidrolizálja. A felszabaduló diacil-glicerol (DAG) aktiválja a PKC-t. A PLD pedig a foszfatidilkolint bontja kolinre és foszfatidsavra, melyet a foszfohidroláz alakít tovább DAG-ra.[188] Tehát az adenosin által beindított jelátviteli útvonal vélhetően teljesen kikerüli a mitokondriális K_{ATP} -csatornákat és a reaktív szabadgyököket, viszont ugyanoda, a PKC-hez jut, ahol minden útvonal konvergál. Érdekes módon ez is az adaptív mechanizmusok redundanciáját fokozza, mely a sejt védelmét szolgálja.[188] A PKC a szarkolemma A_{2B} típusú, alacsony affinitású adenosin-receptorait érzékenyíti adenosin iránt.[206] Ezen receptor ezt követő ligandkötése és aktivációja vezet a fentebb részletezett RISK jelátviteli útvonal aktivációjához, mely a foszforilációs kaszkádon keresztül a GSK-3 β foszforilációját és az MPTP csatornák nyitódásának gátlását eredményezi.[5, 188]

2.3.5. A SAFE (survivor activating factor enhancement) jelátviteli útvonal

Az előzőekkel párhuzamos, alternatív protektív mechanizmusként írták le a SAFE (survivor activating factor enhancement) jelátviteli útvonalat[207], melynek egyes részletei ismertek csak. A reperfüzió kapcsán indukálódó gyulladáshoz vezető folyamatokban

felszabaduló (egyres leírások szerint a szívizomzat rezidens masztocitái, makrofágok, sőt maguk a kardiomiociták által termelt[208-210]) TNF- α a szívizomsejtek felszínén receptoraihoz (TNFR1 és TNFR2) kötődve indítja el a szignalizációs folyamatsort.[208] A megfigyelések szerint koncentrációtól is függ a kiváltott válasz, a kis mennyiségű TNF- α kardioprotektív hatásával szemben nagyobb mennyiségben azonban – vélhetően a drasztikusabb szöveti gyulladási válasz miatt – a reperfüziós károsodást súlyosbító hatással lehet számolni.[208] Elsősorban a TNFR2-höz köthető a védelmi reakció.[211] Ligandjának kötődésekor a receptorhoz kapcsolódó két Janus-kináz (JAK) transzfoszforilálja egymást, majd foszforiláció révén aktiválják a STAT-3 proteint (signal transducer and activator of transcription 3).[188, 212] A STAT-3 fehérjék dimerekbe rendeződve transzlokálódnak a sejtmagba, és stressz-reszponzív gének expressziójában vesznek részt.[213] A JAK/STAT-3 transzkripciósi szabályozás számos, a sejt túlélésében fontos anti-apoptotikus, proliferációs és növekedési faktor átírásában játszhat szerepet (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Fas, cyclin D1, E1, p21, VEGF, Bad), bár feltehetően ezek hosszabb távú változások a sejtben, mintsem hogy valóban szerepet játszhatnának a poszt kondicionálás néhány perc alatt kialakuló hatásában.[208] Sokkal inkább valószínűsíthetőek rövidebb távú foszforilációs hatások, mint amilyen az opioidok által kiváltott kardioprotekció során a glikogén-szintáz kináz 3 β (GSK3 β) foszforilálása[214], és minden valószínűség szerint a szabályozásban szerepet játszik a poszt kondicionálás egyéb ismert mitokondriális szereplője, mint a protein kináz C, és a mitokondriális K_{ATP}-csatorna.[215, 216] Tehát végső soron ugyanazokon az effektorokon konvergál a RISK és a SAFE jelátviteli útvonal, mi több, az eddigi ismereteink alapján ezen útvonalak nem egymástól független, párhuzamosan kapcsolt rendszerek, hanem egymással több ponton, több irányú kölcsönhatásban kapcsolt mechanizmusok.[207, 208, 217]

2.3.6. A poszt kondicionálás időfaktora

A különböző állatkísérletes és humán vizsgálati modellekben különböző hosszúságú iszkémiás-reperfüziós ciklusok hatásosak. Kisebb állatokban 5-15 másodperces reperfüziós-reokklúziós epizódokból álló kondicionálási technika hatásos, nagyobb állatokban és emberben hosszabb, 30-60 másodperces periódusok használhatók.[218]

Jelen ismereteink alapján valószínűsíthető, hogy egy kisebb állat (és így kisebb szív) rövidebb ciklushosszat igényel. Ennek háttérében a szív méretével fordítottan arányos miokardiális metabolikus ráta állhat, illetve más faji különbségek (különböző időbeli viszonyai a triggereknek, mediátoroknak, és a kollaterális hálózat faji különbségei).[219, 220] A ciklusok száma kisebb szerepet játszik. Kin és munkatársai beszámoltak arról, hogy patkányokban 3 ciklus ugyanolyan hatást ért el az infarktus méretét tekintve, mint 6 ciklus.[221] Bár az optimális ciklusszám nem ismert, túl kevés ciklus ineffektív, túl sok ciklus pedig egy ponton túl vélhetően nem ad érdemben hozzá a protektív hatáshoz.[218]

A döntő kérdés sokkal inkább az, hogy időben kezdődjön meg a poszt kondicionálás, valóban a revaszkularizáció első perceiben. A késve kezdett poszt kondicionálás már nem képes csökkenteni az infarktus méretét.[186] (Vélhetően éppen ezért van jelentősége a ciklusok hosszának is. A túl hosszú első reperfüziós epizód az első reokklúzióig már épp elég időt jelent a reperfüziós károsodás komplettálódásához, amikor már nem képes kifejteni a poszt kondicionálás protektív hatását.) Ezen eredmények ismét alátámasztják, hogy a reperfüzió első néhány perce a döntő a miokardiális reperfüziós károsodás patogenezisében, valamint támogatják azon koncepciót is, hogy e kezdeti rövid, ámde annál inkább kritikus időszakra irányuló intervenciók eredményesen enyhíthetik a károsodást, mely csak később, a reperfüzió kezdete után manifesztálódna.

2.3.7. A poszt kondicionálás pH hipotézise

Egy szerv reperfüziójakor kb. 40 másodperc alatt visszaáll a normál szöveti pH.[222] A poszt kondicionálás során ezzel szemben az acidózis hosszabb ideig áll fenn, egyszerűen azért, hogy a reperfüzió ismételt meg-megszakításaival korlátozzuk a protonok, tejsav, ketonsavak kimosódását az iszkémizált szövetből. A savas pH gátolni képes az MPTP-k megnyílását, természetesen csak addig, amíg az acidózis fennáll.[223] Ezzel párhuzamosan a szövetek oxigén-ellátását már poszt kondicionálás mellett is kellő mértékben helyreállítjuk ahhoz, hogy a ROS-termelés megindulhasson.[224] A jelátviteli kaszkád iszkémia alatt egészen a mitokondriális K_{ATP} -csatornák megnyílásáig is eljuthat, de itt megakad oxigén hiányában. Ekkor az MPTP csatornák gátolva vannak az acidózis

miatt, mely feltehetően a kalcium ciklofillinhez való kapcsolódását teszi lehetetlenné.[188] A keringés újraindulásakor oxigén jelenlétében a redox szignalizáció folytatódhat és aktiválódik a protein kináz C ϵ , és a reokklúziók által fenntartott szöveti acidózis alatt lehetővé válik az MPTP csatornák nyitódásának megelőzése. Ezáltal a sejtek elkerülhetik a nekrozist.[225] Másrészt, a PKC ϵ fokozza az A_{2A}-receptorok szenzitivitását adenzinra (melynek szintje szintén az iszkémia alatt nőtt meg, és a kimosódását reperfüziókor a poszt kondicionálás késlelteti), az adenzin receptorok pedig az ismertett mechanizmus szerint protektív kinázokat aktiválnak, melyek valószínűleg a glikogén-szintáz-kináz-3 β -t (GSK-3 β) inaktíválják és ez végeredményben megakadályozza az MPTP-k formációját, és megnyílását a reperfüzió hátralevő részében, immáron véglegesen.[188, 197] Ezen folyamat végbemeneteléhez néhány percre van szükség. Ha viszont közben normalizálódik a pH, az MPTP csatornák megnyílnak, és nem fogja tudni ezt megakadályozni a fent említett eseménysor. Ezért fontos, hogy poszt kondicionálást a reperfüzió kezdetén, késedelem nélkül, illetve kellően rövid ciklushosszúsággal végezzük, hogy fennmaradjon ezen néhány percre a savas pH.

2.3.8. Klinikai alkalmazhatóság

A poszt kondicionálás nagy előnye az iszkémiás prekondicionálással összevetve, hogy elvileg könnyen alkalmazható egy szerv iszkémiájának végén a művileg létrehozott revaszkularizációkor az ellátó ér külső, vagy ballonkatéter segítségével történő belső ismételt elzárásával. Az első klinikai vizsgálat a poszt kondicionálás humán alkalmazhatóságáról 2005-ben került közlésre. Staat és munkatársai szívkatéteres műtőben vizsgálta a poszt kondicionálást ST-elevációs miokardiális infarktus PTCA (perkután transluminális koronária angioplasztika) során. Látványos és meggyőző eredményeik alapján a CK-enzimaktivitásban kifejezett infarktusméret szignifikánsan, 36 %-kal csökkenthető volt a módszer alkalmazásával.[183] A vizsgálat sikere nagyban köszönhető volt vélhetően a szerencsés betegbeválogatásnak: 6 órás időablakon belüli panaszokkal és EKG-n ST-elevációval érkező, életük első miokardiális infarktusát elszenvedett betegek kerültek beválogatásra, nagy szívizomterületet érintő bal elülső leszálló koszorúér ág (LAD: left anterior descending coronary artery) vagy a jobb

koszorúér teljes okklúziójával, akiknél teljes (TIMI \geq 2 flow, TIMI: thrombolysis in myocardial infarction) revaszkularizáció volt kivitelezhető.[183]

Ezt követően számos kisebb-nagyobb tanulmány számolt be a poszt-kondicionálás eredményeiről akut miokardiális infarktuszban, megerősítve a fentieket abban a tekintetben, hogy a módszer alkalmazásával csökkenthető a miokardiális károsodás kiterjedése, illetve funkcionális mértéke, enyhébb oxidatív károsodás mérhető, és csökken a betegek között kialakuló bal szívfél elégtelenség mértéke és előfordulási gyakorisága.[226-229] A klinikai vizsgálatok egy része (és köztük a 700 beteget felölelő POST tanulmány[230]) azonban nem találta eredményesnek a módszer alkalmazását, sőt felmerült esetleges káros hatása is.[228, 230-232]

Az ellentmondásos eredmények hátterében vélhetően számos vizsgálati hiba is megemlíthető, melyek torzították a tanulmányok eredményeit, mint a túl széles betegbeválogatás, az ateroszklerotikus erekben végzett beavatkozás kapcsán kialakuló ateroembolizáció. Ugyanakkor az is kétségbe vonja egy vizsgálat értékelhetőségét, ha a módszert nem megfelelő ciklusidőkkel alkalmazzák (emberi miokardiumban mintegy 40 másodperc alatt normalizálódik a szöveti pH iszkémia után[226]), vagy ha a manővert vagy már spontán, vagy gyógyszeres előkezelés hatására megnyílt érrendszeren, vagy technikai akadályok miatt késve kezdik (elvész a lehetőség pont a reperfüzió kezdetekor való beavatkozásra). A komorbiditások, az életkor, illetve a megelőző gyógyszeres terápia szerepe is szintén megkerülhetetlen valószínűleg. Az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy szigorúan megszabott feltételek mellett azonban eredményesen alkalmazható a módszer: rövid idejű (< 6 órás) panaszokkal jelentkező, élete első akut miokardiális infarktuszát elszenvedő betegekben, akiknél a PCI kapcsán igazolhatóan elzáródott LAD koszorúér okozta az ST-elevációs infarktust, az ellátott miokardium területnek nincsen kollaterális vérrellátása és a beavatkozást kellően rövid, 30 másodperces reokklúziós-reperfüziós ciklusidőkkel alkalmazzák, direkt stent beültetést követően, a stenttől proximálisan végrehajtott ballonos érelzárásokkal.[222, 228, 233, 234]

A komorbiditások szerepéről kiforrott vélemény még nincsen. Állatkísérletes adatok alapján vélhetően szerepe lehet a hiperkoleszterinémianak, mely gátolja a poszt-kondicionálás protektív mechanizmusait több ponton: a RISK jelátviteli útvonal gátlásán, az NO metabolizmus befolyásolásán, fokozott reaktív oxigén és peroxinitrit

gyökök képződésén, hősokk reakciók gátlásán keresztül.[234-236] Diabetesez betegekben szintén kisebb effektivitás várható poszt kondicionálás alkalmazásakor, ennek magyarázata feltehetően a JAK/STAT-3, ugyanakkor szintén PI3K/Akt útvonal és a GSK3 β foszforiláció befolyásolásához köthető.[237-239] A hagyományosan rizikófaktornak számító magasvérnyomás-betegség és bal kamra hipertrófia szerepéről ellentmondásos adatok szólnak[240, 241], szintén állatkísérletes eredmények alapján felmerül esetlegesen a poszt kondicionálással szembeni rezisztencia ezen komorbiditások mellett, melynek hátterében a GSK3 β és Akt csökkent foszforilációja volt mérhető.[242] Bár a klinikai vizsgálatok többnyire középkorú és idős betegeken vizsgálták a poszt kondicionálást, és az életkor érdemi hatását az eredményekre vonatkozóan nem igazolták, mégis állatkísérletes eredmények alapján az valószínűsíthető, hogy az életkor előrehaladtával, elsősorban a megváltozott oxidoreduktív folyamatok, a csökkent antioxidáns kapacitás miatt a poszt kondicionálás protektív hatása kevésbé érvényesül.[243, 244] A nem szerepéről teljesen ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre, egyértelmű szerepe vitatható.[234, 245, 246]

Meg kell említeni az elmúlt évek legújabb eredményeit az infarktuson átesett betegek kezelésében széles körűen alkalmazott trombocitaaggregáció-gátló P2Y₁₂ receptor inhibitorokkal (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor, cangrelor) kapcsolatban. A plakkruptúra-koronáriatrombózis kezelésére és az in-stent restenózis megelőzésére alkalmazott gyógyszerekről nemrégiben derült ki, hogy a trombusképződéstől és koszorúér keringési viszonyokra való hatástól teljesen független módon is kifejtnek kardioprotekciót, mégpedig a poszt kondicionálással közös intracelluláris jelátviteli útvonalak eddig még részleteiben nem tisztázott közreműködésével.[247-251] A pontos mechanizmus még nem ismert, azonban ezen szerekkel való előkezelés kapcsán a poszt kondicionálással összemérhető infarktusméret-csökkenés tapasztalható, mely hatás a poszt kondicionálással csak akkor additív, ha (vagy a gyógyszeres kezelés nem kellő telítő dózist, vagy nem optimális hosszúságú és számú poszt kondicionálás ciklusokat alkalmazva) nem maximalizált effektivitású kezeléseket egészítünk ki egymással.[188, 252] Elképzelhető tehát, hogy napjainkban, a trombocitaaggregáció-gátlás széles körben elterjedt, optimalizált dózisban való használata mellett a betegek nagy része már a gyógyszeres kezelés hatására kondicionált állapotban van, és ezért nem várható újabb nyereség a poszt kondicionálástól. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a

posztkondicionálást vizsgáló újabb tanulmányok azért nem voltak hatásosak, mert a betegek részesültek gyógyszeres kezelésben is, míg a korábbi vizsgálatok idejében még ez nem volt elterjedt gyakorlat. Staat és mtsai kísérletének utólagos elemzéséből kiderült, hogy azon betegek nyertek a legtöbbet a posztkondicionálásból, akiknél azt clopidogrel kezelés mellett, vagy anélkül alkalmazták.[253]

A módszer kipróbálásra került és pozitív eredményeket hozott CABG műtétek során, ahol a műtétet aortakirekesztésben, globális szív iszkémiában végzik. Alkalmazásával javult a szív szisztolés bal kamra funkciója és kevesebb aritmia előfordulására lehetett számítani a perioperatív időszakban.[254] Különösen ígéretes módszernek tűnik a posztkondicionálás gyermekek szívsebészeti beavatkozásai során, ahol a létrehozott aorta okklúziók során nem kell számítani esetleges ateroszklerotikus plakkok letöredezésére és disztális embolizációjára.[255]

2.4. Levosimendan, mint a K_{ATP}-csatornák agonistája

2.4.1. Szerkezet, farmakokinetika

A levosimendan, kémiai nevén (-)-(R)-[[4-(1,4,5,6-tetrahidro-4-metil-6-oxo-3-piridazinil)fenil]-hidrazono]propándinitril egy piridazinon-dinitril származék, molekulatömege 280,3 Da. Etanolban oldott formában, intravénás alkalmazás céljára kerül forgalomba, de újabban próbálkozások születtek orális alkalmazás tekintetében is.[256, 257]

A vérben 98 %-ban plazmafehérjékhez kötött formában kering.[258] Eredetileg bólus dózis + fenntartó 24 órás infúzióban javasolták alkalmazását.[259] Csúcshatása bólus beadása esetén 0,2-0,5 h múlva várható, bólus alkalmazása nélkül pedig az intravénás infúciónak 4 óra múlva a beadás kezdetéhez képest.[260, 261] Ezen idő rövidsége, és a bólus alkalmazásakor fellépő nagyobb szövődményráta miatt ma már nem javasolt bólus alkalmazása.

A levosimendan szérum felezési ideje kb. egy óra, mégis a hatásai napokon keresztül fennállnak, ugyanis egy átmeneti alakon keresztül (OR-1855) végül egy hosszú életidejű (kb. 80 órás felezési idő) metabolittá (OR-1896: (-)N-[4-(1,4,5,6-tetrahidro-4-metil-6-oxo-3-piridazinil)fenil]acetamid) acetilálódik a májban.[262]

2.4.2. Hatásmechanizmus

A levosimendan által előidézett pozitív inotrópia elsődlegesen a kalcium-függő kalcium szenzitizáló hatásának köszönhető.[263] (Kalcium-szenzitizáló pozitív inotróp szerek: olyan molekulák, melyek a kontraktilis erőt úgy képesek változtatni, hogy nem befolyásolják mindeközben a kalcium tranzienszt a sejtben.[264]) A levosimendan szelektív módon kötődik a troponin komplex C alegységének 84-es cisztein aminosavához, mégpedig csak akkor, amikor az éppen Ca²⁺-t köt, azaz épp aktiválva van a szívizom kereszt hídciklus során.[265] A levosimendan-troponin C kötődés stabilizálja ezt az aktivált formát, a troponin-tropomiozin komplex konformációja úgy változik meg, hogy lehetővé válik az aktin miozinkötő helyeinek és a miozin fejeknek a kölcsönhatása,

a keresztíid ciklus. [266] A troponin C aktiválásának előfeltétele a Ca^{2+} -kötődés. Így a levosimendan - más kalcium-érzékenyítő pozitív inotrop szerrel ellentétben - csak magas Ca^{2+} -koncentráció esetén, azaz csak szisztolében kötődik a troponinhoz, nem érinti viszont a relaxációt, nem rontva ezzel a diasztolés funkciót.[267] Más pozitív inotrop szerrel való összevetésben pedig elmondható, hogy mivel nem emeli a szívizomsejt intracelluláris kalcium-szintjét, ezért nem befolyásolja a szívizom oxigénigényét.[4]

Leírták továbbá, hogy a levosimendan a foszfodiészteráz enzimet, leginkább annak III-as izotípusát (PDE III) is gátolni képes, de ezt csak magasabb szérumkoncentrációk mellett éri el, így a klinikumban használt dózisok mellett ezen hatással nem kell számolni.[4, 262] Továbbá mivel a szer a PDE IV-es izoenzimet nem képes gátolni (ellentétben a non-szelektív PDE inhibitor milrinonnal és amrinonnal), ezért vélhetően a PDE IV enzim működése kompenzálni képes a másik izotípus működésének kiesését, így összességében a levosimendan esetében érdemi foszfodiészteráz-gátló hatás (intracelluláris cAMP-szint növekedés) nem érvényesül.[268]

A levosimendan harmadik hatásmechanizmusa, hogy agonistája a K_{ATP} -csatornáknak. Ezáltal a vaszkuláris simaizomsejtekben relaxációt, így vazodilatációt vált ki, csökkentve a szív elő- és utóterhelését egyaránt.[4] Döntően a kis rezisztencia ereken való vazodilatációval kell számolni[269, 270], de megfigyelték a hatást a keringés vénás oldalán[271], illetve a koszorúérrendszeren is[272, 273].

A vaszkuláris simaizomsejteken kívül igazolták, hogy a levosimendan *in vitro* izolált kardiomiociták szarkolemmális K_{ATP} -csatornáit is nyitni képes, mely felvetette a szer iszkémiás károsodásban játszott protektív szerepét.[274]

Ezen protektív, illetve a vazodilatátor hatás hátterében is az áll, hogy a csatornák megnyílásával (nyitási valószínűségének fokozásával) a K^{+} -ok kémiai gradiensüknek megfelelően az extracelluláris tér irányában lépik át a sejtmembránt, és a töltésvándorlás miatt a sejtmembrán két oldala közötti elektromos potenciálkülönbség tovább nő, a sejtek hiperpolarizálódnak.[275] Ez egyrészt a vaszkuláris simaizomsejtek csökkent excitabilitásához vezet, másrészt a feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} -csatornák nyitási valószínűségének csökkenése, illetve az elektrogén (így éppen a negatív membránpotenciál kiegyenlítésére törekvő) $3\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő antiporter (3Na^{+} , ezáltal három pozitív töltés sejtbe befelé való szállítása közben egy Ca^{2+} , és 2 pozitív töltés

hagyja el a sejtet) stimulálása által az intracelluláris Ca^{2+} -szint csökkenéséhez, a sejtek relaxációjához vezet.[270]

Kísérletes adatok szólnak amellet, hogy az iszkémiás-reperfúziós károsodások csökkentésének egy másik lehetséges mechanizmusa az, hogy a levosimendan nemcsak a szarkolemma K_{ATP} -csatornáinak, hanem a mitokondriális belső membrán ATP-függő K^{+} -csatornáinak (mito K_{ATP}) is agonistája.[276, 277] A csatorna nyitódásával a belső membrán depolarizálódik/hipopolarizálódik, ez a Ca^{2+} ionok mitokondriumba való áramlásának hajtóerejét csökkenti, mely enyhíti a mitokondriumok oxidatív károsodását, és protektív ezen organellek celluláris energiahomeosztázisban játszott funkcióját tekintve.[278, 279]

Még részleteiben pontosan nem ismert mechanizmussal, de felmerült a szer antiapoptotikus hatása is.[280] Sertés nagyállatmodellben kardioplégias oldattal létrehozott globális szív hideg iszkémiát követően alkalmazott levosimendan kezeléssel jelentősen kisebb mérvű apoptózis volt detektálható, mint a placebóval kezelt csoportban.[281]

2.4.3. Klinikai hatások, alkalmazhatóság a humán gyógyászatban

Elsősorban szívelégtelen betegekben nyert ismereteink alapján a levosimendan következő igazolt klinikai hatásaival lehet számolni.

Dózisfüggő módon növeli a perctérfogatot, a verővolument és csökkenti a pulmonális kapilláris éknyomást (PCWP: pulmonary capillary wedge pressure).[259, 282] A verővolument kivéve ezen paraméterek tekintetében hatása markánsabb a dobutaminnal való összevetésben (feltehetően a tachikardizáló hatással magyarázható a nagyobb elért perctérfogat).[259]

Szintén dózisfüggő mértékben csökkenti a teljes perifériás ellenállást (TPR: total peripheral resistance), ezáltal az artériás középnyomást.[259] Placebóval való összevetésben, a konvencionális 0,1-0,2 $\mu\text{g}/\text{ttkg}/\text{min}$ dózis mellett mintegy átlagosan 4 Hgmm szisztolés, 6 Hgmm diasztolés nyomáscsökkenéssel lehet számolni. Ezt a hatást azonban csak az infúzió adása közben lehet észlelni, a levosimendan adásának felfüggesztésekor a vérnyomás rendeződik. A szintén mérsékelt tachikardizáló hatás (a

szívfrekvencia 2-8 ütés/perccel nő egy 24 órás infúzió során) azonban még napokig fennmaradhat.[283]

Szívelégtelen betegekben csökken levosimendan alkalmazása mellett a plazma NT-proBNP szintje[259, 282, 284], javul a szisztolés funkció[285], és a diasztolés funkcióra vonatkozóan is kedvező hatást lehetett mérni (pulzatis Doppler echokardiográfiával mérhető mitrális beáramlási görbe E/A alapján).[284] A hosszú életidejű aktív metabolitnak köszönhetően a kedvező hemodinamikai hatások hosszú időn keresztül fennmaradnak (a PCWP-ben észlelt változás 7-9 napig, az emelkedettebb perctérfogat 12-13 napig, a csökkent NT-proBNP szint 12 napig).[261] Ezek alapján úgy tűnik, tolerancia sem alakul ki a szerre.[286] Fontos szempont, hogy szívelégtelen betegeknél β -blokkoló együttes adása mellett is lehet alkalmazni[287], és nem csökken a kiváltott hatás (szemben a β -agonista pozitív inotróp szerekekkel), illetve amiodarone-nal is biztonságos együttes alkalmazásról számoltak be.[288]

Az EKG-n enyhe QT-nyújtó hatással lehet számolni (15-20 ms), a PQ-intervallumának hosszára nincsen szignifikáns hatással a szer.[259] Egy tanulmány szerint a QRS komplexum szélességét viszont csökkenti.[289] Arról azonban nincsen egységes álláspont, hogy mi állhat ezen jelenségek hátterében magyarázatként.

A gyógyszer nemkívánatos mellékhatásaiként megemlítendő a hipotenzió (50 %-os gyakorisággal) és ezzel összefüggésben fejfájás, hányinger.[283] A fent említett tachikardizáló hatás mellett jelentkezhet pitvarfibrilláció (9 % gyakorisággal), kamrai extraszisztolék és kamrai tachikardia (akár 25 % gyakorisággal) is.[259, 283, 290]

2.4.4. Levosimendan alkalmazása iszkémiás szívbetegségben

A heveny szívelégtelenség témakörével részben átfedő, mégis pár aspektusában speciális alkalmazási területe a levosimendannak az iszkémiás szívbetegségben való felhasználás. Már 1994-ben Rump és mtsai. Langendorff szerint[291] izolált és perfundált nyúlszív modelljében szelektív koronária okklúzió által létrehozott regionális iszkémiában igazolta a levosimendan kedvező hatását.[292] Javult a szisztolés bal kamra funkció, a koronáriák keringése, és az iszkémiának kitett területen kialakuló infarktus kiterjedése csökkent. Az infarktust csökkentő hatás magyarázata homályos, ugyanis a szer kizárólag az iszkémia

alatt került alkalmazásra, melyet reperfüzió nem követett. A kollaterális keringésre gyakorolt, illetve az oxigén kínálat/kereslet arány alakulásában megnyilvánuló kedvező hatás merült fel leginkább magyarázatként. Figyelemre méltó észrevétele volt ezen tanulmánynak, hogy a pozitív inotrop hatáshoz mérten a koronáriaáramlás relatíve nagyobb mértékben nőtt levosimendan hatására foszfodiészteráz-gátlókkal (milrinon, amrinon) való összevetésben, illetve dózis-hatás összefüggések mérése során. Ezek alapján felmerült a levosimendan intracelluláris Ca^{2+} -szint csökkentő, vagy legalábbis ezt antagonizáló hatása, melyet ekkor még a feszültségfüggő szarkolemmális Ca^{2+} -csatornák gátlásával magyaráztak.

Később, Yokoshiki és munkatársainak kísérleteiben derült fény arra, hogy a levosimendan nem az L-típusú Ca^{2+} -csatornák ($I_{Ca(L)}$) agonistája, hanem a glibenclamid-érzékeny ATP-szenzitív K^+ -csatornák nyitási valószínűségét növeli, és közvetlen hatással nem bír a $I_{Ca(L)}$ csatornákra. Feszültség-rögzítéses patch-clamp mikroelektrofiziológiai módszerrel, patkány szívből izolált kamrai miociták, illetve patkány a. mesenterica superiorból izolált vaszkuláris simaizomsejtek sejtmembránjában is sikerült igazolni ezen hatást.[270, 274]

Ezt követően *in vivo* állatkísérletekben került demonstrálásra a levosimendan hatása koszorúér okklúzió majd reperfüzió modelljében.[272, 290, 293] Csökkent az infarktus kiterjedése, javult a subepikardiális és midmiokardiális kollaterális keringés, és K_{ATP} -csatorna antagonistá együttes alkalmazásával igazolható volt, hogy a hatás független a miofilamentumok Ca^{2+} -szenzitizációjától, hanem egyértelműen a K_{ATP} agonista hatásnak köszönhető.[272] Definitív végleges coronaria okklúzió okozta, gyógyult miokardiális infarktus kisállatkísérletes modelljében javította a szer az állatok túlélését.[293] Ugyanígy lezajlott miokardiális infarktus után károsodott pumpafunkciójú sertés állatmodellben a krónikus per os levosimendan kezelés csökkentette az infarktus méretét, és a bal kamra dilatáció mértéke is csökkent, jelezve talán a remodellációra való kedvező hatást.[294] Markou és munkatársai izolált kamrai miocitákon, szimulált iszkémia-reperfüzió okozta károsodás *in vitro* modelljében igazolták a levosimendan előkezelés (farmakológias prekondicionálás) hatásosságát iszkémiás-reperfüziós károsodás csökkentésében. A tanulmány rámutatott, hogy a levosimendan előkezelés protektív hatásában szerepet játszanak bizonyos mitogén aktivált protein kinázok

(MAPK), mint a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K)/Akt, az extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) 1/2, és a p38-MAPK által mediált jelátviteli útvonalak.

Az előzőekkel ellentmondásban Du Toit és mtsai. *in vivo* nagyállat szívinfarktus modelljében nem volt mérhető a levosimendan kezelés után érdemi javulás a pumpafunkció és az infarktus méretének tekintetében.[290] Talán ezen eredmények magyarázhatók a modell nem szerencsés megválasztásával: a bal koszorúér főtörzs okklúziójával kiváltott károsodás vélhetően túl drasztikus volt ahhoz, hogy érdemben javulást lehessen mérni egy farmakológias kezelés után.

Nem sokkal később humán klinikai vizsgálatok számoltak be a levosimendan kedvező hemodinamikai hatásairól akut koronária szindrómát követően sikeres perkután koronária intervención (PCI) átesett betegekben alkalmazva a szer. Minden koszorúéren kedvezőbb áramlás volt mérhető (az infarktussal összefüggésbe hozható koszorúéren is javult a coronaria flow reserve: CFR), javult a szív szisztolés funkciója (az ejekciós frakció nőtt), csökkent a hipokinetikus szegmentumok száma, és nem rontotta a szer a diasztolés funkciót.[295-297] A nagy multicentrikus, randomizált, kontrollált RUSLAN tanulmányban szignifikánsan kisebb 180 napos mortalitást mértek a levosimendannal való kezelés hatására szívelégtelenséggel szövődött akut miokardiális infarktuson átesett betegek körében.[298]

Más a helyzet sztenotikus koszorúér keringés mellett alkalmazott levosimendan kezelés esetén. A szer által okozott vazodilatáció meghaladja egy adott koszorúér által ellátott szívizomterület oxigénigénye által megszabott (egyebekben a normál autoregulációs viszonyok által is biztosított) vérellátási szükségletet.[299] Ezáltal egy adott miokardium régió vérellátása a mindenkori nyomásviszonyoktól fog függni, és nem a valós metabolikus igények által lesz szabályozva. Az egész szívet, annak minden intakt autoregulációjú koszorúerét érintő vazodilatáció az ateroszklerotikusan szűkült érrendszeren így steal-jelenség miatt relatív hipoperfúzióhoz vezet.[300] Az eleve károsodott vérellátású szívizomterület oxigénellátása tovább csökken, amit tovább ront feltehetően a szer tachikardizáló hatása, és összességében paradox módon a sztenotikus érrendszer által ellátott szívizomzat kontraktilis funkciója romlik, mely a szív globális szisztolés funkciójára is kihatással lehet.[301] Az ép vérellátású területekre gyakorolt pozitív inotróp hatás és a sztenotikus érellátású területeken érvényesülő kontraktilitásromlás eredőjeként a szív globális funkciója az egyes területek arányán

múlik. A határterületeken pedig az így fokozódó mechanikus feszülés fokozhatja az adott területen az apoptózist, a remodeláció folyamatát, és az aritmiakészséget.[290, 300]

Összefoglalva tehát három területre választhatjuk a miokardiális iszkémiában nyert ismereteinket a levosimendan hatásáról. Egyrészt elmondható, hogy heveny szívinfarktus után, sikeres revaszkularizációt követően a levosimendan hosszabb távon javítja a károsodott szívizomzat pumpafunkcióját, melynek háttérében a pozitív inotrop hatás, a revaszkularizált érterületek javuló perfúziója állhat, illetve felmerül a szer közvetlen antiiszkémiás hatása a mitokondriumok szintjén (bár ezirányban még humán vizsgálatok nem történtek).[272, 295, 296] Másodrészt a végleges koszorúérokklúzió okozta, nem revaszkularizált szívinfarktus eseteiben hosszabb távon szintén kedvező a levosimendan kezelés, melynek háttérében a remodeláció késleltetése, a kollaterális keringés javítása állhat, esetlegesen a szív globális pumpafunkciójának támogatása (mely értelemszerűen csak a nem károsodott területeken keresztül fejt ki hatását).[293, 294] Harmadrészt azonban a nem megoldott, és nem minden eret érintő koszorúér szűkületek esetén a szer alkalmazása veszélyekkel járhat, az érintett szívizom területen iszkémiát provokálhat a vazodilatáció és a tachikardizáló hatás kiváltotta steal-jelenség miatt, másrészt az érellátási területek határzónáin remodeláció és ritmuszavarok indukálásával hosszabb távon is ronthatja a betegség kimenetelét.[290, 300, 301] Hozzá kell tennünk, hogy a három eset közül az utóbbi két aspektusra vonatkozóan még hiányosak az ismereteink, egyelőre csak állatkísérletes eredmények állnak rendelkezésünkre.

2.4.5. Fázis II és III klinikai vizsgálatok

A 2000-es években sorra jelentek meg a levosimendan hatásait vizsgáló kisebb és nagyobb klinikai tanulmányok, melyek közül az alábbi nagy esetszámú, multicentrikus, prospektív, randomizált, kettős-vak kontrollált klinikai vizsgálatok eredményei határozzák meg leginkább a mai vélekedésünket a levosimendan szívelégtelenség kezelésében való alkalmazhatóságáról.

2000-ben rögtön két multicentrikus, de viszonylag kis esetszámú (146, illetve 151 betegen elvégzett) klinikai gyógyszervizsgálat került közlésre. Slawsky és munkatársai fázis II tanulmánya [285] volt az első, melyben a levosimendan súlyos (NYHA III/IV

funkcionális stádiumú) szívelégtelen betegen került alkalmazásra, és melynek során a szer kedvező hemodinamikai hatását sikerült igazolni.

Nieminen és munkatársainak „**dózymegállapító**” tanulmánya[259] hasonló eredményekkel szolgált, de iszkémiás eredetű szívelégtelen betegpopuláción. A vizsgálat során már dobutamin is szerepelt pozitív kontrollként a placebóval kezelt csoport mellett, és az eredmények a levosimendan dobutaminnal összevethető mértékű hemodinamikai hatásáról tanúskodtak. Ebben a tanulmányban került megállításra a későbbiekben is széles körben alkalmazott dózирования a levosimendannak: 6-24 µg/ttkg 10 perc alatt beadott intravénás bólusban, majd 0,05-0,2 µg/ttkg folyamatos intravénás infúzióban.

A 2002-ben közölt **RUSSLAN vizsgálat** [298] (Randomised stUdy on Safety and effectiveness of Levosimendan in patients with left ventricular failure due to an Acute myocardial infarct) nagy beteganyagban (504 beteg beválogatásával) vizsgálta a levosimendan hemodinamikai hatásait, placebóval való összevetésben, különböző dózisokban, egy speciális klinikai szituációban, mégpedig akut miokardiális infarktus kapcsán kialakult, a konvencionális terápia mellett inotrop támogatásra szoruló szimptomás bal szívfél elégtelenségben. A tanulmány fő megállapítása, hogy a szer hatására szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a 24 órás, és a 14, illetve 180 napos öszsmortalitás.

A szintén 2002-ben megjelent (203 beteg bevonásával, 11 európai országban, köztük Magyarországon lefolytatott) **LIDO vizsgálat** (Levosimendan Infusion versus DObutamine)[302] során a levosimendan hatását a dobutamin kezeléssel vetették össze, súlyos szívelégtelenségben szenvedő betegekben. Mind a 31 napos, mind a 180 napos mortalitás szignifikánsan alacsonyabb volt a levosimendannal kezelt betegek esetében.

A 2007-ben megjelent **SURVIVE tanulmány** (Survival of Patients With Acute Heart Failure in Need of Intravenous Inotropic Support)[303] alapvetően új eredményekről számolt be. A LIDO vizsgálat eredményei alapján megtervezett, kellően nagy statisztikai erejű, óriási beteganyagban (minden eddigénél jelentősen több, 1320 beteg bevonásával lefolytatott) vizsgálat elsődleges végpontja a levosimendan kezelés rövid és hosszabb távú mortalitásának megítélése volt a dobutamin kezeléssel való összevetésben. Az eredmények alapján elmondható volt, hogy a két kezelés között a 31 napos öszsmortalitást és a 180 napos kardiovaszkuláris mortalitást illetően nem adódott szignifikáns különbség.

Végül 2013-ban jelent meg a **REVIVE tanulmány** (Randomized Evaluation of Intravenous Levosimendan Efficacy).[283] A vizsgálat során a levosimendannal kezelt csoportban csökkent a betegek túlélése (az első 14 nap vonatkozásában szignifikáns mértékben!), a placebo kezelésben részesült csoporttal való összehasonlításban.

2.4.6. A mortalitás kérdése

A krónikus szívelégtelenség (mint ahogy tulajdonképpen minden idült megbetegedés) kezelésében alkalmazott eszközös vagy gyógyszeres terápia megítélésében a fentebb részletezett elsődleges terápiás végpontokon (a betegség által okozott kóreléttani jellemzők minél rövidebb idő alatti megváltoztatásán és az élettani paraméterek helyreállításán) túl egyre inkább fontos szempont a betegek hosszabb távú életminőségének javítása, és a túlélés meghosszabbítása.

Az állatkísérletekben igazolt sokoldalúan kedvező farmakodinámiás hatások ismerete és a kezdeti klinikai vizsgálatok felvillanyozó pozitív tapasztalatai után a SURVIVE és REVIVE I-II tanulmányok kijózanító eredményei alapvető változást hoztak a levosimendanról való ismereteinkben, melyek döntően meghatározzák a mai vélekedésünket a kardiológiai klinikai gyakorlatban a szerrel kapcsolatban. A SURVIVE vizsgálatban a standard pozitív inotróp kezelésnek számító dobutaminnal szemben nem volt tapasztalható érdemi javulás a mortalitásban, a REVIVE I-II tanulmányokban pedig már placebóval szemben alkalmazva is tapasztalható volt egy kedvezőtlenebb túlélés. Két ilyen súlyos eredmény mindenképpen óvatosságra int egy ilyen készítmény alkalmazásával kapcsolatban, és valójában megkérdőjelezi a szer létjogosultságát a rendelkezésre álló pozitív inotrop terápiás lehetőségeink között.

Természetesen szem előtt kell tartanunk, hogy egy igen rossz prognózisú betegcsoportról van szó, a fentebb említett tanulmányok is ilyen súlyos szívelégtelen betegek végzett vizsgálatokról számolnak be. A többi forgalomban lévő pozitív inotrop gyógyszerről (dopamin[304], dobutamin[305, 306], milrinon[307], vesnarinone[308], neziritid[309-311]) is bebizonyosodott, hogy bár rövid távon hatásos hemodinamikai választ váltanak ki, hosszabb távon azonban a mortalitást növelik, mégis bizonyos megfontolásokkal, speciális indikációval szerepelnek a ma érvényben lévő szakmai

irányelvekben. Így merült fel, hogy az indikációs kör leszűkítésével és bizonyos megszorításokkal, de mégis helyet kaphatna a levosimendan is a szívelégtelenség gyógyszeres terápiájában. A SURVIVE tanulmány post hoc alcsoportelemzése azt mutatta, hogy a levosimendan alkalmazása szignifikánsan kedvezőbb mortalitással járt a krónikus szívelégtelen betegek akut rosszabbodásakor, mely feltehetően az előzetes β -blokkoló szedésnek köszönhető, mely alcsoportban érhető módon a dobutamin β -agonista hatása kevésbé érvényesülhet.[287] Ugyanerről tanúskodik a LIDO tanulmány[302], illetve a SURVIVE vizsgálat egy későbbi, a finnországi beválogatásból származó betegekre kiterjedő alcsoportelemzése[312], melyek eredménye szerint β -blokkolót szedő betegeknél levosimendan kezeléstől szignifikánsan kedvezőbb hemodinamikai és mortalitási eredmények várhatók, mint dobutamin alkalmazásától.

Ugyanúgy felmerült annak lehetősége, hogy a kedvezőtlen mortalitási adatok esetlegesen annak köszönhetőek, hogy a betegbeválogatásnál nem voltak tekintettel a szívelégtelenség etiológiájára. Szintén a finn betegekre vonatkozó alcsoportelemzés számolt be arról, hogy az akut miokardiális infarktushoz köthető akut szívelégtelenségben alkalmazott kezelésnek kedvező hatása van a mortalitásra.[312] Ez egybecseng számos más tanulmánnyal[295-297], illetve a RUSSLAN vizsgálat eredményeivel[298], amelyekben szintén a szer iszkémiás szívbetegek körében való alkalmazása kapcsán voltak tapasztalható kedvező eredmények.

A SURVIVE tanulmánnyal szemben támasztható kifogásként említhető továbbá, hogy a dobutamin dozírozása sokkal szélesebb határok között, a klinikus megítélése alapján az adott beteg igényeinek megfelelően történhetett, míg a levosimendan kezelés során szigorúan az előírt dózissal kellett dolgozni.

A REVIVE tanulmányok megfigyelése szerint pedig a levosimendannal kezelt csoportban a magasabb mortalitás abban az alcsoportban jelentkezett, amely betegeknél már a szer alkalmazása előtt hipotenzio volt észlelhető (< 100 Hgmm szisztolés és < 60 Hgmm diasztolés vérnyomás), mely betegek kiszűrésével a fennmaradó betegek csoportjában nem volt tapasztalható emelkedett halálozási rizikó a placebo kezeléssel való összevetésben.[283]

Megemlítendő továbbá az a számos metaanalízis, melyek az irodalomban fellelhető rengeteg kisebb és nagyobb klinikai vizsgálat beteganyagát dolgozzák fel, és melyek kivétel nélkül a levosimendan túlélésre gyakorolt kedvező hatásáról tesznek

tanúságot. Ezek közül kiemelhető Landoni és munkatársainak 2012-es leginkább átfogó metaanalízise[313], mely 45 klinikai vizsgálat által feldolgozott 5480 beteg adatainak elemzésével állapítja meg, hogy levosimendan hatására szignifikáns mértékben csökkent a mortalitás, mind a teljes vizsgálati populációban (17,4 % vs. 23,3 %), mind csak a szívműtéten átesett betegek esetében (5,8 % vs. 12,9 %), mind kardiológiai betegek esetében (20,0 % vs. 25,6 %), mind placebóval (14,7 % vs. 18,7 %), mind dobutamin kezeléssel (15,0 % vs. 27,7 %) való összevetésben.

Természetesen nagyon nehéz, pedig elengedhetetlen lenne kiszűrni a nagy metaanalízisek során a vizsgálatok majdnem mindig előforduló (egyres vizsgálati hiányosságokból, szelektív betegbeválogatásból, hiányos adatgyűjtésből, nem következetesen megvalósított kontrollálásból, anyagi érdekekből, a vizsgáló változó szakmai hozzáállásából fakadó) torzításokat.[314] Remélhetőleg a fenti szempontoknak is megfelelő, hitelesebb adatokat fognak szolgáltatni a jelenleg is folyamatban lévő újabb klinikai vizsgálatok (LICORN, LEVO-CTS, LEVO-HSR, LION-HEART, LAICA, ELEVATE, LeoPARDS) a levosimendan hatásáról.[315]

3. Célkitűzések

Kísérleteink során az infrarenális aortakirekesztésben végzett rekonstrukciós érsebészeti beavatkozások modellezése volt a célunk. Jelen dolgozatban nem részletezett egyéb kísérletsorozataink([316-319]) eredményeinek elemzésével is egy olyan rágcsló modellt kerestünk, melyben az általunk alkalmazott módszerek segítségével detektálható mértékű, mégis reverzibilis, alsó végtagi iszkémiás-reperfúziós izomkárosodásra, mikrocirkulációs változásokra, és szisztémás keringésdinamikai kórfolyamatok kibontakozására számíthattunk, ugyanakkor szintén az alkalmazott módszerekkel detektálható mértékű vesefunkciós változások is bekövetkeznek a műtétek klinikumból ismert szövődményeiként. A megalkotott állatkísérletes modell célja tehát az alsó végtagi, hosszabb idejű és nagyobb tömegű végtagi vázizomzatot érintő (tehát nem feltétlen teljes aortaokklúzióval létrehozott, de fontos szempontként a vese artériákat közvetlenül nem érintő) érkirekesztésben végzett érsebészeti műtétek lokális (iszkémiás rabdomiolízisben megnyilvánuló) és távoli szervi (vesekárosodásban manifesztálódó) szövődményeinek vizsgálata volt. A modellben került alkalmazásra a bevezetésben részletesen bemutatott (iszkémiás) poszt kondicionálás sebésztechnikai módszere, melynek hatását az irodalomban először elsősorban a veseszövődmények vonatkozásában vizsgáltuk (I. kísérlet).[320] Ezt követően a poszt kondicionálás hatásmechanizmusában az irodalmi adatok tanúsága szerint központi szerepet játszó mitokondriális K_{ATP} -csatornák agonistájaként ismert levosimendan, mint farmakológias kezelés került vizsgálatra ugyanazon modellben (II. kísérlet). Kísérletünk szintén az irodalomban először számolt be a levosimendan hatásairól alsó végtagi rekonstrukciós érsebészeti műtét modelljében, ugyancsak a veseszövődmények vonatkozásában.[321]

A kísérletek során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Patkány infrarenális hasi aorta okklúzióval létrehozott bilaterális 3 órás végtagiszkémia után alkalmazott poszt kondicionálással befolyásolható-e a végtagi izomrostok károsodása, szövettani, laboratóriumi vizsgálatok, illetve izomrost viabilitás meghatározások alapján?

2. A vesefunkció laboratóriumi és morfológiai markerei alapján milyen fokú vesekárosodás alakul ki a bemutatásra kerülő modellben, ennek milyen az időbeli lefolyása, és mindez hogyan befolyásolható posztkondicionálás alkalmazásával?
3. A felállított modellben kibontakozó vesekárosodás milyen mechanizmussal alakul ki, és ezen mechanizmusok vonatkozásában milyen hatás érhető el posztkondicionálás alkalmazásával?
4. Hogyan változik a modellben az artériás középnyomás és szívfrekvencia, és a számított hemodinamikai paraméterek alapján milyen hatás érhető el a posztkondicionálás alkalmazása után?
5. A posztkondicionálás módszerével hogyan befolyásolható az alsó végtagi izomzatban mérhető mikrocirkuláció, illetve milyen hatással bírhat a módszer a vesekéreg mikrokeringésének vonatkozásában?
6. Milyen változások észlelhetők a szérum TNF- α szintekben a műtéti modellben illetve a posztkondicionálás alkalmazásának hatására, és ebből levonhatók-e következtetések a posztoperatív szisztémás gyulladáshoz való válaszreakcióra vonatkozóan?
7. Az ugyanazon műtéti modellben felhasználásra kerülő intravénás levosimendan infúzió hatására tapasztalható-e a végtagi vázizomrostok károsodásának vonatkozásában bármilyen protektív hatás?
8. Levosimendan alkalmazásával a bemutatásra kerülő modellben milyen hatás érhető el a kialakuló vesekárosodás tekintetében?
9. Milyen hatással bír a szer alkalmazása a szisztémás hemodinamikai mutatókra?
10. Hogyan alakul a levosimendan infúzió mellett a végtagizomzat mikrokeringése, és változik-e a vesekéreg vérellátása a reperfüzió első 4 órája során?
11. Történik-e változás a levosimendan alkalmazásával a korai posztoperatív időszakban észlelhető TNF- α citokin felszabadulásának tekintetében?

4. Módszerek

4.1. Kutatásetikai háttér

Kísérleteinket a Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottság által kiadott 22.1/2409/3/2011. számú engedély alapján végeztük, az 1998. évi XXVIII. sz. állatvédelmi törvény, valamint a 243/1998 (XII. 31.) Kormányrendelet szerint támasztott követelményeknek megfelelően, egyetértésben a nemzetközi elvárásokkal is (US National Institute of Health guidelines, Publication No. 85–23, revised 1996; MD, USA).

4.2. Állatok

Kísérleteinkhez 250-350 g súlyú, spf (meghatározott kórokozóktól mentes), hím Wistar patkányokat használtunk (Charles River Magyarország Kft, Isaszeg). Az állatok az operációt megelőzően száraz tápot és vizet kaptak ad libitum, a műtét előtti 12 órában csak vizet biztosítottunk számukra. Tartásuk a napszaki változásokat követő mesterséges világítás mellett, 22-24 °C-os hőmérsékleten történt. A műtéteket mindig azonos időben végeztük, hogy a cirkadián ritmus esetleges hatásai minden állatban egyformán érvényesüljenek.

4.3. Anesztézia

A műtéteket intravénás narkózisban végeztük. Az altatás indukciója ketamin (75 mg/ttkg, Calypsol®, Richter Gedeon, Budapest) és xylazin (7,5 mg/ttkg, Xylasin®, Produlab Pharma, Raamsdonksveer, Hollandia) intraperitoneális injekcióval történt, fenntartásnak ugyanezen kombináció került alkalmazásra (25 mg/ttkg/1 ml/h ketamin és 2,5 mg/ttkg/1 ml/h xylazin) a jobb vena jugularis internába helyezett kanülön keresztül, infúziós pumpa segítségével. Műtét alatti parenterális folyadék- és elektrolitpótlás ugyanezen kanülön keresztül történt 3 ml/ttkg/h dózisban.

4.4. Kísérleti elrendezés, műtéttechnika

A műtét előkészítése és első lépései a két kísérlet során azonos módon történtek, a közös módszer kerül az alábbiakban bemutatásra.

Narkózisban a jobb vena jugularis interna, és arteria carotis interna kiproparálása után az erekbe polietilén kanülöket (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) vezetünk. Az artériás kanülon keresztül invazív artériás nyomásmérés történt. A vénás kanült az általános anesztézia fenntartására, intravénás folyadék- és elektrolitpótlásra, Na-Heparin adagolására, továbbá a II. kísérletben levosimendan, illetve glukóz infúzió intravénás alkalmazására használtuk.

Középső medián laparotómia után a peritoneum hátsó lemezének megnyitásával kiproparáltuk a hasi aortát az infrarenális szakaszon. Ezt követően az állatok 60 IU/ttkg Na-Heparint kaptak intravénásan, bólusban.

A végtagi keringési viszonyokat a bal oldali musculus biceps femoris mikrocirkulációjának változásain keresztül monitorizáltuk, lézer Doppler áramlásmérővel (LDF: laser Doppler flowmeter). 2 cm hosszú bőrmetszést ejtettünk a lábszár külső oldalán, a végtag hossz tengelyével párhuzamosan, majd ez alatt a fascia crurison ejtett hasonló metszéssel feltártuk az izom laterális felszínét. Az áramlásmérő berendezés mérőfejét az izom ezen adott pontján rögzítettük minden állatban. A mérőberendezés egy másik regisztráló fejét a vese cortex mikrokeringésének detektálására a bal vese egy adott felszíni pontján rögzítettük szintén minden állatban. Ezt követően 5 perc alapáramlást mértünk.

Ezek után az aortára, közvetlenül a bifurkáció felett atraumatikus mikroklipet helyeztünk fel, mellyel 180 perces bilaterális iszkémiát hoztunk létre mindkét alsó végtagban. Az iszkémia alatt az explorált hasüreget nedves lappal fedtük le.

4.4.1. I. kísérlet: poszt kondicionálás vizsgálata alsó végtagi iszkémia-reperfúzió modelljében

Első kísérletünkben 180 perc iszkémia után a poszt kondicionált csoportban a mikroklip (Aesculap YASARGIL FT260T; B.Braun AG, Melsungen, Németország) ismételt

kinyitásával és bezárásával posztkondicionálást végeztünk, 2 percen keresztül, 6 ciklusban, ciklusonként 10 másodperc reperfúzióval, 10 másodperc reokklúzióval. Ezt követően eltávolítottuk a mikroklipet, és zártuk a hasüreget.

Az állatok egy csoportjánál a narkózis és a hemodinamikai monitorozás fenntartásával 4 óra reperfúziós időszak következett, mintavételre a reperfúzió 4. órájának végén került sor. Ezen állatoknál a reperfúzió utolsó 3 órája alatt (tehát az első óra reperfúzió kihagyásával a 2. órától a kísérlet végéig) az állatok spontán ürült vizeletét felfogtuk, majd ennek mennyiségét a termináláskor hólyagpunkcióval egészítettük ki.

Az állatok további csoportjainál a 3 óra iszkémia után, a hasfal kétrétegű, felszívódó varratsorral való egyesítését követően a narkózist felfüggesztettük, a nyaki vénás kanült eltávolítottuk, a vénát lekötöttük, a nyaki vágást szintén szuturával zártuk. 24 óra, illetve 72 óra reperfúziós időszak következett az állatok konvencionális tartása mellett. Majd újabb anesztézia indukciót (lásd fentebb) követően történt a kísérlet terminálása és mintavétel. Szövetteni vizsgálat céljából a jobb vesét és a jobb m. rectus femorist távolítottuk el.

Az áloperált csoportban nem került felhelyezésre mikroklip, minden más tekintetben, és az időbeli viszonyokat is figyelembe véve pontosan úgy jártunk el, mint a másik két csoportban.

4.4.2. II. kísérlet: Levosimendan kezelés alkalmazása alsó végtagi iszkémia-reperfúzió modelljében

Ebben a kísérletben a műtét bevezető lépései a fentieknek megfelelően történt a mikroklip felhelyezéséig. 3 órás bilaterális alsó végtagi iszkémia került bevezetésre. A levosimendannal kezelt csoportban a farmakont (Simdax®, Orion Pharma Corporation, Espoo, Finnország) 5 g/100 ml glükóz infúzióban oldva, a kísérlet idején való klinikai ajánlások szerint[259] egy kezdeti, 10 perc alatt beadott telítő („bólus”) dózist (12 µg/ttkg) követően az iszkémia teljes ideje alatt (3 óra) és azt követően további 3 órán át folyamatosan adagoltuk (0,2 µg/ttkg/min, 0,48 ml/ttkg/h, 25 µg/ml hígításban) intravénásan, perfúzor segítségével. Az áloperált (Sham_{LS}) és a kontroll (IR_{LS})

csoportokban 5 g/100 ml glükóz infúziót kaptak a levosimendan adagolásánál számolt mennyiségben (0,48 ml/ttkg/h).

Alcsoporttól függően a reperfúzió 4., illetve 24. órájának végén került a kísérlet terminálásra (a fentebb részletezett módon). Mintavétel szintén az I. kísérletben történteknek teljesen megfelelő módon zajlott.

Az áloperált csoportban itt sem került felhelyezésre mikroklip, a kísérlet minden más vonatkozásában ugyanaz történt az állatokkal, mint az IR_{LS} csoportban.

4.4.3. Csoportbeosztás - I. és II. kísérlet (1. táblázat)

1. táblázat: Csoportbeosztás.

A kísérleti állatok csoportbeosztása és a csoportok jelölése az I. és II. kísérletben.

csoport	operáció	levosimendan	poszt kondicionálás	reperfúzió időtartama	n
sham _{PostC4}	laparotómia	-	-	-	5
sham _{PostC24}	laparotómia	-	-	-	5
sham _{PostC72}	laparotómia	-	-	-	5
IR _{PostC4}	hasi aorta mikroklip	-	-	4 h	8
IR _{PostC24}	hasi aorta mikroklip	-	-	24 h	8
IR _{PostC72}	hasi aorta mikroklip	-	-	72 h	8
PostC ₄	hasi aorta mikroklip	-	+	4 h	8
PostC ₂₄	hasi aorta mikroklip	-	+	24 h	8
PostC ₇₂	hasi aorta mikroklip	-	+	72 h	8
sham _{LS4}	laparotómia	-	-	-	6
sham _{LS24}	laparotómia	-	-	-	6
IR _{LS4}	hasi aorta mikroklip	-	-	4 h	8
IR _{LS24}	hasi aorta mikroklip	-	-	24 h	8
LS ₄	hasi aorta mikroklip	+	-	4 h	8
LS ₂₄	hasi aorta mikroklip	+	-	24 h	8

4.5. Módszerek

A két kísérletben egyaránt felhasznált módszerek külön kísérleti megjelölés nélkül szerepelnek az alábbiakban. Egyes módszerek csak egyik vagy másik kísérletben kerültek alkalmazásra, ez külön kerül mindig megemlítésre.

4.5.1. Hemodinamikai monitorozás

Folyamatos invazív nyomásmérés (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) történt a jobb a. carotis internába vezetett kanülön keresztül. Az aktuális vérnyomásértékeket Dasy Lab V9.00.02. program (National Instruments Corporation, Austin, TX, USA) 200/s gyakorisággal regisztrálta, melyből 5 másodpercenként HR (szívfrekvencia), illetve szisztolés (SBP), diasztolés (DBP) vérnyomást és artériás középnyomást (mean arterial pressure: MAP) számított és rögzített. A mért paramétereket matematikai transzformációknak vetettük alá c++ (ISO/IEC14882 standard) programozási nyelven, Code::Blocks (10.05 rev6283m Code::Blocks Team, USA) szövegszerkesztőben írt forráskóddal, melyet MinGW (2012., mingw.org) környezetben fordítottunk. A mérést végző nyomásmérő működés közben a patkány vérnyomásától idegen adatokat rögzíthet esetleges mérési hiba miatt, ezért az adatok közül néhányat nem fogadtunk el, a helyüket a legutolsó elfogadott adattal töltöttük ki. Tekintve, hogy az adatokat felvevő műszer fizikai működési elve az, hogy a mérőfejben lévő nyomást érzékeli, ezért az adatsorok közös eredetre tekintenek vissza. Erre való tekintettel a hibás adatok kizárásakor nem pusztán a hibás adatot vetettük el, hanem az adott pillanathoz tartozó összes többi információt is. Az adatok elfogadhatóságának kritériumait az egyes állatok jellegének megfelelően vettük fel. A kritériumok a következők voltak: az élettaninak megfelelő, legnagyobb és legkisebb megengedett szisztolés vérnyomás, diasztolés vérnyomás, szívfrekvencia. A legnagyobb és legkisebb elfogadható értékeken kívül az állatok vérnyomásának hirtelen, nagymértékű változásait is külső tényezőkre vezettük vissza (pl. időszakosan a műszer átmosásra került), ezért az előbbi adatok 5 másodpercen belüli változásának százalékos mértékét is korlátoztuk. Ha egy állat mérési adatai huzamosabb ideig a százalékos megváltozásra vonatkozó kritériumoknak nem megfelelő intervallumokban voltak, akkor a százalékos megváltozás mértékére vonatkozó elfogadhatósági intervallumot az időváltozó szerinti exponenciális függvény szerint növeltük, ahol az exponenciális függvény kitevőjében az időt egy-egy konstanssal szoroztuk meg az alsó és a felső küszöbérték megállapításához, ezt a konstanszt az állatok jellege alapján külön-külön határoztuk meg a patkányokhoz.

Miután a fenti módokon néhány adatot a program korábbi mérési adatokkal pótol, a görbét a jobb érzékelhetőség kedvéért „kisimítottuk” a konvolúció nevű matematikai

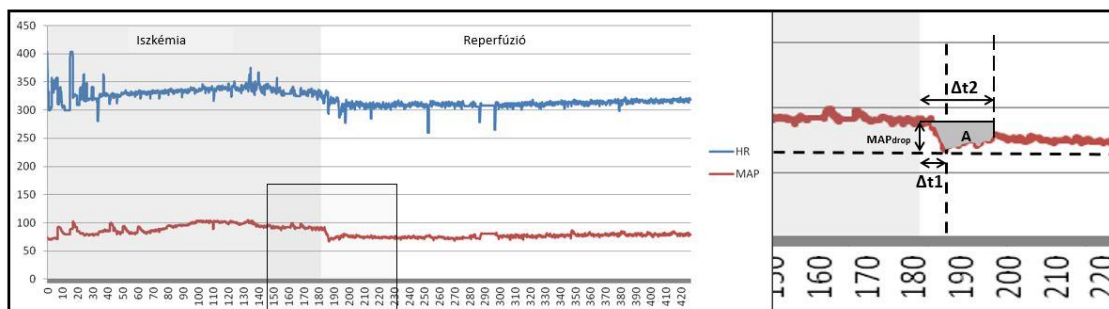
módszerrel. Felvettünk egy segédgörbét, amely a -1024-től 1024-ig terjedő egész számokhoz a négyzetük ellentettjének valamilyen alapú exponenciális függvényét rendel. Meghatároztuk a segédgörbe 2049 adatának az összegét, és az összeggel elosztottuk a segédgörbe számait, hogy a számok összege 1 lehessen. A korábbi eljárás által visszaadott adatokat átlagoltuk a segédgörbe szerint, vagyis a megjelenítésre kerülő adat az öt megelőző és öt követő legfeljebb $1024 \cdot 5$ másodperc távolságban levő értékek átlaga a segédgörbében meghatározott súlyok szerint. Ha valamely átlagoláshoz szükséges adat a mérési intervallumon kívülre hivatkozott, akkor a hozzá legközelebbi tényleges mérési adatot vettük az átlagolásba. A segédgörbéhez használt exponenciális függvény alapját az egyes patkányok jellege szerint külön-külön határoztuk meg.

A vérnyomás, illetve szívfrekvencia adatok könnyebb kezelése végett, az egyes állatok mért adatsorainak kézzelfoghatóbb elemzése céljából a következő paraméterek kerültek kiszámításra Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) program segítségével (1. ábra):

(a) A humán orvosi gyakorlatban alkalmazott „shock-index” mintájára minden mérési pontban a szívfrekvencia és a szisztolés vérnyomás hányadosa kerültek rögzítésre, majd ezen hányadosoknak lett véve a számtani átlaga az iszkémia 3 órás időtartama, illetve a reperfúzió 4 órás időtartama alatt. Végül a reperfúzió alatti átlagot elosztva az adott állat iszkémia alatti átlagával az adott állat reperfúzió alatti keringési kompenzációs mechanizmusát, a kompenzáció effektivitását jellemző arányszámot kaptunk. Tehát tulajdonképpen időpillanatonként lett kiszámolva minden állatnál a „shock-index”, és ezen indexszám lett átlagolva az iszkémia, illetve a reperfúzió teljes időtartamára, és mivel a revaszkularizáció során bekövetkező keringésdinamikai változásra voltunk kíváncsiak, ezért a reperfúzió és az iszkémia alatt mért indexek hányadosával fejeztük ki ezt a változást. Az arányszámok állatcsoportonként kerültek átlagolásra, megadva a szórás mértékét.

(b) A reperfúzió kezdetekor általánosságban tapasztalható volt az állatoknál a vérnyomás hirtelen csökkenése, majd egy bizonyos mértékű vérnyomásesést követően megfigyeléseink szerint ismételten emelkedett, majd egy platófázist ért el a vérnyomás. Ezen vérnyomásesés mértéke több módon került megállapításra. (Lásd (c), ill. (d) pontokat is.) Elsőként minden állatnál a reperfúzió első 20 percében mérhető legalacsonyabb szisztolés vérnyomás időpontja került megállapításra, majd számszerű

adatként megadva az, hogy ezen pont a reperfúzió kezdete után hány másodpercre helyezkedik el az időtengelyen, illetve, hogy ezen legalacsonyabb vérnyomásérték mekkora az iszkémia utolsó mért értékének százalékában megadva, azaz, hogy milyen mértékű a vérnyomásesés. Az állatonként mért paraméterek jelen esetben is csoportonként lettek átlagolva.



1. ábra: Számított MAP és HR értékek a kísérlet 7 órás időtartama során.

Kalkulált paraméterek: Δt_1 : iszkémia végétől a reperfúzió során mért legnagyobb vérnyomásesés pillanatáig eltelt idő (lásd (b) pont), MAP_{drop} : a legnagyobb vérnyomásesés mértéke (lásd (b) pont), Δt_2 : a reperfúzió kezdetétől a vérnyomásingás végéig, a platófázis kezdetéig eltelt idő (lásd (c) pont), A: a reperfúzió kezdeti vérnyomásingás szakaszának „görbe feletti” területe.

(c) Kiválasztásra került a következőképpen minden állatnál az az időpont, amikor a vérnyomás szisztolés értéke eléri a platófázist: Ha a platófázis meredeksége nulla, akkor tulajdonképpen a vérnyomásgörbe emelkedő szárának meredeksége tart a nullához. Ezt a modellt követve minden ponthoz hozzá lett rendelve az öt megelőző, illetve az öt követő 1-1 percnyi időintervallum vérnyomásértékeinek az átlaga, illetve az Excel program „HA” logikai függvényének használatával az az időpont lett megállapítva, ahol ez az átlag eléri a reperfúzió teljes időtartamára számított átlagos vérnyomásértéket.

4.5.2. Kórszövettan

Az összes állatból – csoportbeosztástól függetlenül – azonos anatómiai helyről vettünk szövetmintákat: a jobb vese, illetve a jobb m. biceps femoris került eltávolításra. A

mintákat 24 órán keresztül 4 %-os formalinban fixáltuk, majd paraffinba kerültek beágyazásra. 3-5 µm vastag metszeteket készítettünk, melyeket hematoxin-eozin (HE) festést követően fénymikroszkóppal elemeztünk. A vizsgáló patológus a minták jelzését és a csoportbeosztást nem ismerte. Kvantitatív kiértékelés nem történt, kvalitatív jelleggel a metszetek vizsgálatánál a következő szempontokat vettük figyelembe: izomszövetnél az IR károsodás, izomelhalás, nekrozis fokát értékeltük. Szempontok: (1) harántcsíkolt megőrzöttsága, (2) magfestés megőrzöttsága, (3) intracelluláris vakuolizáció, (4) rosthatarok hullámossága, elmosódottsága (5) kontraktilis fehérjék összecsapódása, (6) citoplazma festődésének homogenitása, színének mélysége, (7) gyulladáshos sejtes beszűrtég jelenléte. A vese szövetteni metszeteinél a tubuláris és az intersticiális károsodás jellemzőit kerestük az alábbi szempontok alapján: (1) glomerulusok állapota, (2) a tubulussejtek duzzadtsága, hidropikus degenerációja, intracelluláris vakuolizáltsága, (3) csapadék a tubuluslumenben, (4) felszívódott csapadék a hámsejtekben, (5) levált hámsejtek, (6) erek tágassága (pangás).

4.5.3. Izomrost életképesség vizsgálat

Az izoméletképesség (viabilitás) meghatározására NADH-tetrazolium reduktáz (NADH-TR) enzimhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. A folyamat lényege, hogy a mitokondriumokban jelen lévő NADH-dehidrogenáz enzimkomplex katalizálta reakcióban a NADH molekuláról egy H⁺ ion kerül nitroblue tetrazoliumra (NBT), így kék színű formazán keletkezik. A kék színű reakciótermék könnyen detektálható és mennyisége arányos a funkcionáló mitokondriumok számával és a bennük működő enzimkomplex aktivitásával. Emiatt izomszövetben a vizsgálat alkalmazható a rostok károsodásának meghatározására.

Az izomszövetből 5 µm vastag fagyasztott metszeteket készítettünk, melyek a forgalmazó (Sigma-Aldrich Inc., München, Németország) által biztosított NBT és NADH 0,05 M-os TRIS pufferes (pH 7,6) oldatában, fénymentes körülmények között 37 °C-on 30 percig kerültek inkubálásra. Desztillált vizes mosást követően, a reakció során fel nem használt NBT reagenst acetone-oldat (30, 60, 90 %) felszálló, majd leszálló koncentrációiban távolítottuk el a metszetekből, majd vízbázisú fedés következett.

A reakció kvalitatív kiértékelése Leica Qwin Pro morfolometriás szoftver (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) segítségével történt, mely egy adott szintartomány terület-nagyságának meghatározására képes. A szintartomány pontos beállítását egészséges állatok metszetei alapján a szoftvert professzionálisan használó patológus végezte (RGB: 150-105; 175-0; 0-66). A festődött terület nagyságának és a szövetrészlet teljes területének a hányadosa jól korrelál a reakcióval pozitívnak ábrázolódó mitokondriumok számával és ezen keresztül a szöveti életképességgel. Emellett a hányados kiküszöböli az egyes állatoknál jelen lévő egyéni különbségeket, így a kapott eredmények összehasonlíthatóvá váltak. Minden állat metszetéből véletlenszerűen 10 különböző látóteret fényképeztünk le és ezeken kerültek meghatározásra a fentebb említett módon a terület-hányadosok. Ezt követően a kapott értékeket állatonként, majd csoportonként átlagoltuk és egészséges állatok metszeteiből megállapított referencia érték százalékos arányában fejeztük ki.[322] A kapott százalékos arány utal a szöveti viabilitásra.

4.5.4. Laboratóriumi vizsgálatok

A jobb kamra punkciójával nyert vért 10 percig szobahőmérsékleten 3000 rpm (revolutions per minute, 1/min) fordulatszámom centrifugáltuk. A hemolízis- és sejtmentes felülúszót folyékony nitrogénben tároltuk -80 °C-on a további vizsgálatig. Az állatoktól nyert vér- és vizeletmintákat automatizált analizátorral (Beckman Coulter AU480/2011, Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA) vizsgáltuk.

A szérumban kreatin-kináz (CK), aszpartát-aminotranszferáz (ASAT), laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitások, és Na^+ , kreatinin és karbamid koncentrációk kerültek meghatározásra, vizeletmintákból pedig Na^+ és kreatinin koncentrációk. Meghatározásra került a szérumban karbamid/kreatinin hányados. A Renal Failure Indexet (RFI) a kapott laboratóriumi paraméterekből számoltuk ki az alábbi képlet segítségével:

$$\text{RFI} = U_{\text{Na}} * P_{\text{kreat}} / U_{\text{kreat}}$$

ahol U_{Na} : vizelet Na^+ koncentrációja; U_{kreat} : vizelet kreatinin koncentrációja; P_{kreat} : szérumban kreatinin koncentrációja.

Emellett a frakcionált Na⁺ exkréción (FENa) is kiszámításra került a következő képlet alapján:

$$\text{FENa} = \text{Clearance}_{\text{Na}} / \text{Clearance}_{\text{kreat}} * 100 = U_{\text{Na}} * P_{\text{kreat}} * 100 / (U_{\text{kreat}} * P_{\text{Na}})$$

Tubuláris károsodás esetén csökken a Na⁺ visszaszívódása a vesében, így megnő a vizelet Na⁺ koncentrációja. Ennek hatására a fentebbi képletben szereplő tört számlálója és ezzel az arányszámok értéke is megnő. Ezekon túl minden állatban meghatároztuk a szérumban karbamid/kreatinin hányadost is (mindkét koncentrációt mmol/L-ben megadva). A kreatinin és a karbamid is szabadon filtrálódik a vesében, azonban a karbamid jelentős része visszaszívódik. Emiatt tubuláris károsodás esetén csökken a karbamid visszaszívódása és ezzel a kreatininhez viszonyított szérumban koncentrációja, így csökken a karbamid/kreatinin hányados is.

Ezen számított paraméterek a vesekárosodás diagnosztikájában használatosak: prerenális károsodásra utal, ha RFI < 1 mM; FENa < 1 % és karbamid/kreatinin > 60; renális (tubuláris) eredetű a károsodás, ha RFI > 1 mM; FENa > 1 % és karbamid/kreatinin: 20-50. [323-330]

4.5.5. TNF- α mérések

A TNF- α citokin korai gyulladási marker, szintjét ezért mindkét kísérletben a korai reperfüziós időszakban határoztuk meg (a 4 órás reperfüzió után átesett állatcsoportokban). A szérumban TNF- α szintet szendvics ELISA módszerrel mértük a reperfüzió 4. órájában a kereskedelmi forgalomban elérhető kit segítségével (TNF- α immunoassay kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A mérésnél a gyártó által javasolt eljárást alkalmaztuk, kalibrációs görbét rekombináns egér TNF- α hígítási sorával készítettünk. Minden mérést kétszer végeztünk. A TNF- α ellenes antitesttel bevont ELISA lemezt 100 μ L szérumban mintával szobahőmérsékleten 2 órát inkubáltuk. Ismételt mosást követően a lemezt poliklonális anti-TNF- α -tormaperoxidáz konjugátummal 2 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mosási lépés után hidrogén-peroxid és tetrametilbenzidin segítségével színreakciót idéztünk elő. A színváltozást 20 perc múlva leállítottuk kénsav hozzáadásával. Az abszorbanciát 450 nm-en mértük. Az abszorbancia értékekből a rekombináns TNF- α standard segítségével készített kalibrációs görbe alapján számítottuk ki a szérumban TNF- α koncentrációkat.

4.5.6. Alsó végtagi izomzat és vesekéreg mikrocirkuláció becslése

Lézer Doppler áramlásmérő (kétsatornás eszköz; $\lambda = 632,8$ nm; monokromatikus; 2 mW HeliumNeon Laser DRT4 device, DP1T surface probe, Moor Instruments Ltd, London, Egyesült Királyság) került felhelyezésre a bal oldali m. biceps femoris és a bal vese elülső felszínére, minden állatban identikus pontokra, minden olyan állatcsoportban, melynél 4 óra reperfüzió volt tervezett, narkózisban.

Az eszköz által mért flux egy 1 mm^3 -es szövetkocka áramlási viszonyait írja le, mely függ az átáramló vörösvértestek mennyiségétől és sebességétől.[331, 332] A 0,5 cm átmérőjű mérőfejet minden állatban a m. biceps femoris, illetve a vese felszínének egy meghatározott pontjára helyeztük, így a kapott értékek egymással összehasonlíthatóak. Méréseink eredménye a hőmérsékletre, a vörösvértest koncentrációra és szövetvastagságra korrigált flux. A regisztrátumból minden 6. másodperchez tartozó érték került rögzítésre és feldolgozásra. 5 perc alapáramlásmérés után történt az alsó végtagok kirekesztése a keringésből, a regisztrálás folyamatosan történt a 3 órás iszkémia és a 4 órás reperfüzió időtartama alatt. Két paraméter került kiszámításra korábbi kísérleteink során standardizált módszerek alapján: „reperfüziós terület” (RA: reperfusion area, a reperfüzió teljes időtartama alatt a görbék integrálja, mely arányos az átáramlott vérmennyiséggel), és a „plató maximum” (PM, a görbe utolsó, a reperfüzió végső 10 percében regisztrált, kb. egyensúlyi helyzetet jelölő részében mért értékek számtani átlaga).[333] Az egyes állatok és állatcsoportok mért értékeinek pontos összehasonlíthatósága céljából minden mért fluxus érték az adott állat 5 perces baseline (alapáramlás) értékeinek számtani átlagának %-ában lett megadva.

4.5.7. Sav-bázis vizsgálatok

Az I. kísérletben bázis-többlet vizsgálatok céljából 10 állatnál történt a fenti műtéti leírás szerint 180 perc bilaterális alsó végtagi iszkémia, a 10-ből 5 állatnál posztkonkondicionálással. A reperfüzió kezdeti, rendre 0. (iszkémia utolsó pillanata), 1., 2., 3. és negyedik percében a bal a. carotis communisből artériás vérmintát vettünk. Artériás

vérgáz analízis történt Radiometer ABL80 (Radiometer Medical ApS Åkandevvej 21 DK-2700, Brønshøj, Denmark) Astrup gépen. A kapott paramétereiből a BE (base excess, bázistöbblet) értékeket használtuk. A könnyebb grafikus ábrázolás, illetve az egyes állatok individuális sav-bázis háztartás paramétereinek összehasonlíthatósága céljából az alábbi számítást végeztük: egy ún. relatív base excess (RBE) számított értéket vezettünk be, mely az egyes időpontokban mért BE és a revaszkularizáció előtt közvetlenül mért (0. időpillanat) BE (negatív értékek) hányadosa (pozitív szám). A paraméter így az egyes állatok pufferbázis státuszában mérhető relatív változásokat jelzi.

4.5.8. Anti-mioglobin immunhisztokémia

Az I. kísérletben a vese minták 4 %-os formalinban voltak fixálva 24 órán keresztül, majd foszfát pufferben kerültek átmosásra. Az endogén peroxidáz aktivitás blokkolás 3 %-os hidrogén-peroxidban történt. 10 mmol/l töménységű, pH 6.0 citrát pufferben történt az antigének előhívása. Az aspecifikus kötődések gátlásának céljára szarvasmarha szérum albuminban lettek a minták áztatva. Az így előkészített metszetek 12 órán keresztül 4 °C-on voltak inkubálva poliklonális anti-humán anti-mioglobin nyúl antitestekkel (1:50-es hígítás, Diagnostic BioSystems Inc, Pleasanton, CA, USA), majd a hibridizáció 1 órán át peroxidáz-konjugált másodlagos antitestekkel zajlott (EnVision®, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánia). Az antigén-antitest kötődés vizualizációjára 3-diaminobenzidint alkalmaztunk.

4.5.9. Heat shock protein 72 (HSP72) meghatározás

Az I. kísérletben a 4 órás reperfüzió után átesett állatcsoportokban vett jobb vese szövetmintákat szonikátor (Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA) segítségével homogenizáltuk a következő összetételű puffer médiumban: 10 mmol/l 4-(2-hidroxi-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES) pH=7,9, 1,5 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l KCl, 1 mmol/l dithiothreitol (DTT), 1 mmol/l fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 4 mmol/l benzamidin, 100 U/ml aprotinin. Az utóbbi reagens beszerzése a Richter Gedeon Nyrt.-

tól (Budapest), az előző reagenseké pedig a Sigma-Aldrich Inc.-től (St. Louis, MO, USA) történt. HSP72 meghatározást Western blot technikával végeztünk[334], nyúl anti-HSP72 antitestekkel (1:10.000) való inkubációt (1 h, szobahőmérséklet), majd tormaperoxidáz-kötött kecske anti-nyúl másodlagos antitestekkel (1:10.000, 1 h; Dako A/S, Glostrup, Dánia) való hibridizáció alkalmazásával.[335] A jelölt csíkokat felerősített kemilumineszcenciás módszerrel vizsgáltuk, ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) használatával. A fehérjetartalom kontrolljaként a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) konstans expresszáldó gén expresszióját is vizsgáltuk egyazon membránon. A GAPDH kimutatása egér anti-GAPDH antitest (1:10.000 hígítás, 1 h; Biodesign International, Saco, ME, USA) tormaperoxidázzal kötött kecske anti-egér szekunder antitest (1:10.000 hígítás, 1 h; Dako A/S, Glostrup, Dánia) segítségével történt.

4.5.10. Lipidperoxidáció

Az I. kísérletben a 4 órás reperfúziós csoportokban a jobb veséből vett minták kerültek homogénizálásra. A szövetnedves vesehomogenizátumok lipidtartalmát izo-oktánnal (1 g / 5 ml) extraháltuk, majd 20 óra elteltével a levegőtől elzárt szobahőmérsékletű minták diénkonjugátum-tartalmát 232 nm-en Lumat LB 9051 spektrofotométerrel (Lumat, Berthold, Windbad, Németország) az AOAC (Association of Official Agricultural Chemists, AOAC Official Methods of Analysis 1984; 28054 B. 14th edition, Arlington, USA) útmutatása szerint határoztuk meg. A dién konjugátumok reprezentálják a lipidperoxidáció folyamatainak első lépését, így a vese oxidatív károsodásának indikátorai.

4.5.11. Statisztikai feldolgozás

Az adatok kiértékelése IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) szoftverrel történt. Az eredményeknél feltüntetett értékek átlag \pm standard deviáció (SD) formában vannak kifejezve. Állatcsoportonként az adatok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. A minták homogenitását Levene teszttel

értékeltek. A varianciák homogenitása esetén egyutas varianciaanalízist (ANOVA, analysis of variance) és Scheffe post hoc tesztet alkalmaztunk, a varianciák heterogenitása esetén Brown-Forsythe tesztet Games-Howell post hoc analízissel. A relatív bázistöbbslet (RBE) mérések eredményeinek statisztikus feldolgozása egy utas, ismétléses (repeated measures) ANOVA próbával történt. A grafikus megjelenítéshez a Microsoft Excel 2016 programot használtuk. Az LDF regisztrátumok ábrázolása GraphPad (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) alkalmazásával történt. Az átlagértékek közötti különbséget $p < 0,05$ konfidenciaszint mellett tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5. Eredmények

5.1. I. kísérlet [320]

5.1.1. Hemodinamikai monitorozás

(a) Míg az IR_{PostC4} csoportban a reperfúzió alatt magasabb „shock-index” volt mérhető, mint az iszkémia alatt (az arányszám 1-nél nagyobb), addig a PostC₄ csoportban az index alacsonyabb volt ($1,040 \pm 0,22$ vs. $0,814 \pm 0,19$). A különbség statisztikailag szignifikáns. ($p=0,044$)

(b) A posztkondicionált csoportban a legnagyobb vérnyomásesés pontja később következik be, mint a kontroll csoportban ($9,41 \pm 7,05$ min a PostC₄ csoportban vs. $7,87 \pm 5,06$ min a reperfúzió kezdete után az IR_{PostC4} csoportban), továbbá ez a vérnyomásesés kisebb mértékű, mint a kontroll csoportban (PostC₄: $11,58 \pm 6,04$ %, IR_{PostC4}: $17,11 \pm 3,59$ % az iszkémia utolsó mért időpontjában tapasztalt SBP értékhez képest). A két csoport közötti különbség a vérnyomásesés százalékos mértékére vonatkozólag statisztikailag szignifikáns ($p=0,038$).

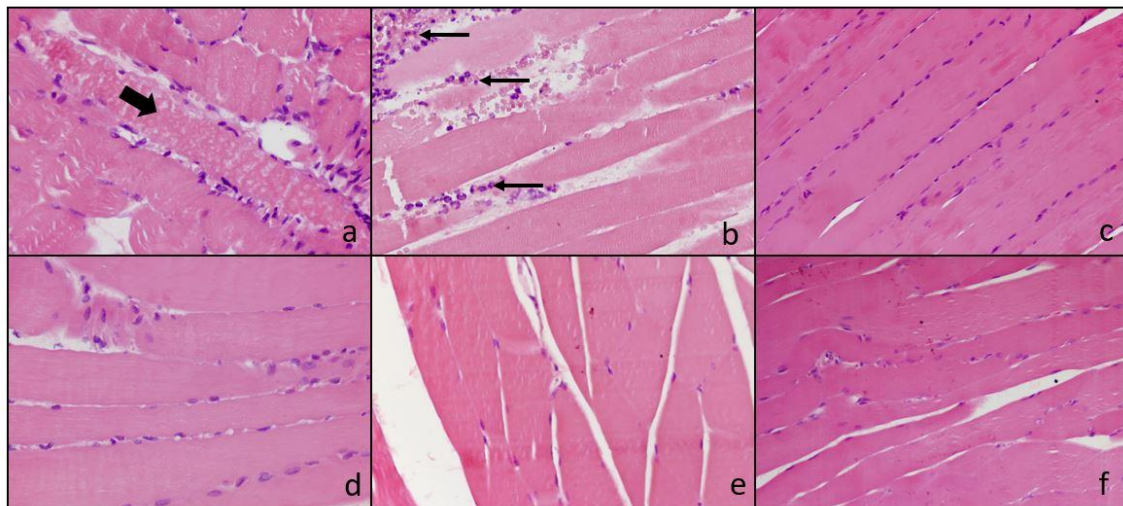
(c) Tendenciaszerű különbség figyelhető meg a két csoport között a vérnyomás emelkedési sebessége tekintetében: az IR_{PostC4} csoport állatainál a SBP átlagosan $22,92 \pm 20,42$ min alatt ért vissza a platófázisba, a PostC₄ csoportnál pedig $13,90 \pm 12,93$ min alatt. A magas szórás miatt a különbség statisztikailag nem szignifikáns.

5.1.2. M. rectus femoris szövettan

A HE festett metszeteken – kvalitatív értékelés során - az egyes csoportok között csupán minimális különbségeket észleltünk. A 4 órás állatokban – csoporttól függetlenül – a harántcsíkolat és magfestés többnyire megtartott volt, szöveti ödéma nem volt észlelhető. Esetenként az izomrostokban minimális vakuolizáltságot láttunk mind az IR_{PostC4}, mind a PostC₄ csoportokban. Ezen kívül néhány IR_{PostC4} állatnál a rabdomiolízis korai stádiumára

jellemző morfológiai képet találtunk hullámossá vált rosthatárral, kezdődő intracelluláris dezorganizációval. Összességében azonban nem beszélhetünk érdemleges elváltozásokról az áloperált állatok metszeteihez képest.

24 óra elteltével, az áloperált állatok ép szövettani képével szemben, az IR_{PostC24} csoportban leukocitás infiltráció volt látható. A harántcsíkolat helyenként eltűnt, ám a magfestés ebben a vizsgált időpontban is többnyire megtartott volt. Irreverzibilis patológiai elváltozást nem találtunk. A PostC₂₄ csoportokra az ödémán kívül más elváltozás nem volt jellemző. 72 óra elteltével regresszió volt észlelhető minden kórjelző eltérésben, ekkor gyulladással járó sejtes infiltráció már nem volt jelen egyik csoportban sem. Érdemi különbség a három alcsoport között nem ábrázolódott. (2. ábra)



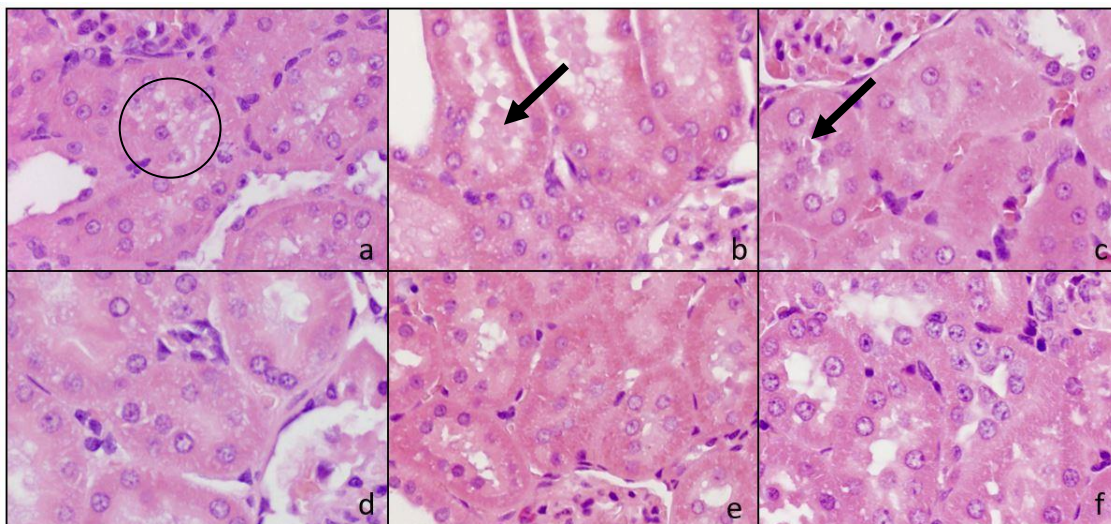
2. ábra: I. kísérlet, m. rectus femoris szövettani képek (HE festés, 60x nagyítás):

a) IR_{PostC4} csoport, nyíl: rhabdomyolízis, b) IR_{PostC24} csoport, nyilak: gyulladással járó sejtes beszűrtség, c) IR_{PostC72} csoport, d) PostC₄ csoport, e) PostC₂₄ csoport, f) PostC₇₂ csoport.

5.1.3. Vese szövettan

A IR_{PostC4} állatok szövettani metszetei közepes fokú akut tubuláris nekrosis képét mutatták. A tubulusok lumenét hialincilinderek töltötték ki. A tubulussejtek duzzadtak voltak, bennük finom vakuolizáltságot, hidropikus degenerációt észleltünk. Ugyanakkor súlyosabb károsodás jeleit (sejtelhalás, sejtleválás a bazális membránról) nem láttunk. Ehhez képest a PostC₄ csoportban kedvezőbb szöveti kép ábrázolódott: bár itt is sok a

hialincilinder, de nem zárják el teljesen a lument és kevesebb sejtben találtunk hidropikus degenerációra utaló jeleket. A 24 és 72 órás alcsoportokban a szövetkárosodás jelei kevésbé mutatkoztak, a 4 órás metszetekhez képest javuló tendencia volt megfigyelhető, érdemi különbség nélkül a poszt kondicionált és a kezeletlen kontroll állatok között. (3. ábra)



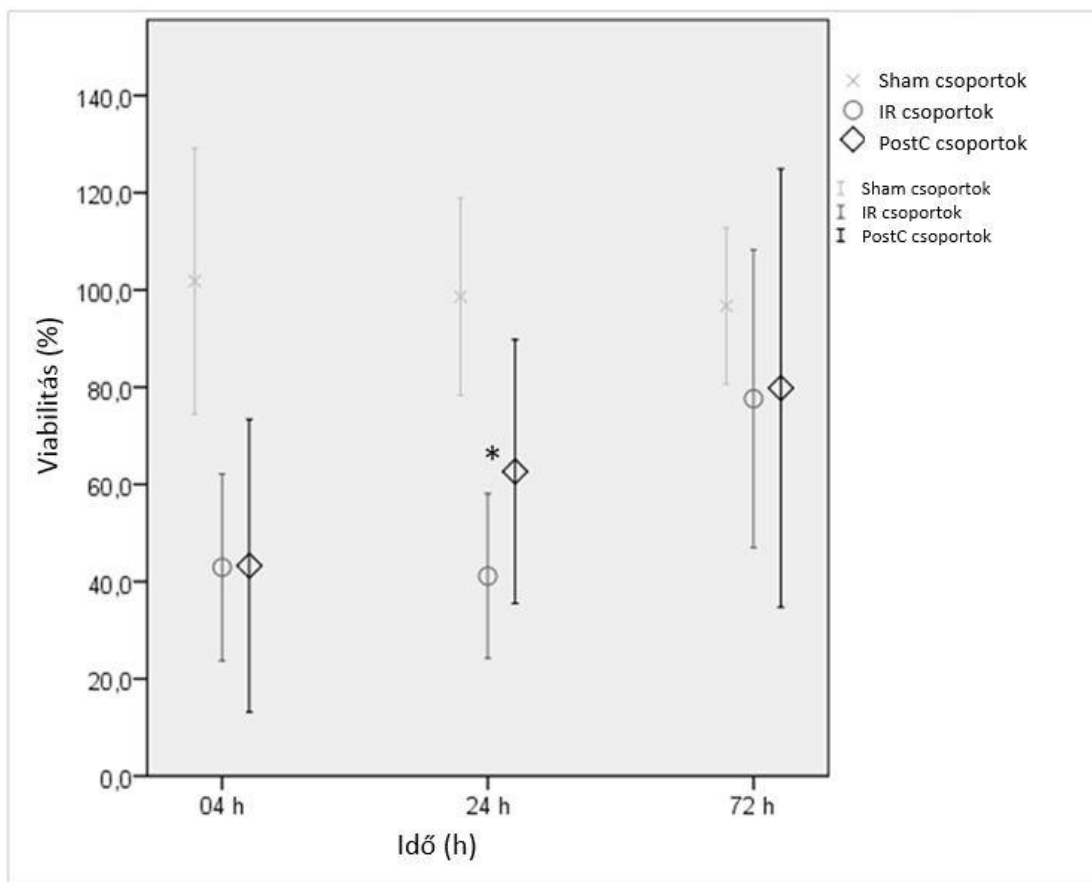
3. ábra: I. kísérlet, veseszöveti képek (HE festés, 100x nagyítás):

a) IR_{PostC4} csoport, b) IR_{PostC24} csoport, c) IR_{PostC72} csoport, d) PostC₄ csoport, e) PostC₂₄ csoport, f) PostC₇₂ csoport. Nyilak: intraluminális precipitátum. Kör: hidropikus degeneráció.

5.1.4. Izomrost életképesség vizsgálata

Az IR_{PostC4} és IR_{PostC24} csoportokban az egészséges állatokban mért értékekhez képest jelentősen kisebb mértékű viabilitást észleltünk (4 h: $42,93 \pm 19,20\%$; 24 h: $41,15 \pm 16,95\%$). Ezzel összehasonlítva a poszt kondicionált csoportok esetében a 24 órás alcsoportban szignifikánsan magasabb életképességet detektáltunk (4 h: $43,27 \pm 30,14\%$; 24 h: $62,65 \pm 27,13\%$, IR_{PostC24} vs. PostC₂₄ $p < 0,05$). Tehát míg az IR_{PostC24} csoportban továbbra is a 4 óra reperfúzió után mért értékekkel összevethető fokú (károsodott) izoméletképesség volt detektálható, a poszt kondicionálásban is részesült állatok esetében ebben az időpontban már javuló izoméletképesség mutatkozott. 72 óra után mindkét csoportban javulás volt mérhető (tehát a poszt kondicionált állatokban további javulás), ekkor már

szignifikáns különbség nem adódott a posztkoncionált és a kezeletlen IR_{PostC72} csoport között (IR_{PostC72}: 77,64 ± 30,64; PostC₇₂: 79,82 ± 45,11). (4. ábra)



4. ábra: I. kísérlet: m. rectus femoris izomrost viabilitás meghatározás:

Szignifikánsan (*, p<0,05) kevésbé csökkent izoméletképesség az PostC₂₄ csoportban 24 órával a reperfúzió kezdete után, összehasonlítva az IR_{PostC24} csoporttal.

5.1.5. Laborvizsgálatok – izomsérülés

Az emelkedett szérum kreatin-kináz, aszpartát-aminotranszferáz és laktát-dehidrogenáz enzimszintek manifeszt rhabdmiolízisre utaltak már a reperfúzió 4. órájában mind az IR_{PostC4}, mind a PostC₄ csoportban. A 3. posztoperatív nap végére ezen nekroenzim aktivitások visszatértek a referencia tartományba. Egyik mért időpontban sem volt tapasztalható szignifikáns különbség a PostC és az IR_{PostC} csoportok között. (2. táblázat)

2. táblázat: I. kísérlet, szérum kreatin-kináz, aszpartát-aminotranszferáz, laktát-dehidrogenáz laboratóriumi mérések.

Szignifikáns különbség egyik esetben sem adódott az IR_{PostC} és a megfelelő PostC alcsoporthoz között. A 4 órás reperfúziós csoportban az áloperált állatokban mért értékekhez viszonyítva szignifikánsan emelkedett szérum enzimaktivitások mérhetők az IR_{PostC4} és (az ASAT-ot leszámítva) a PostC₄ csoportban is (*: p < 0,05 a megfelelő sham csoporttal való összevetésben)

	kreatin-kináz			aszpartát-aminotranszferáz			laktát-dehidrogenáz		
	Sham	IR	PostC	Sham	IR	PostC	Sham	IR	PostC
4 h	257.0 ±56.3	875.2± 206.5*	921.0± 329.5*	162.0 ±27.5	249.3 ±78.4*	167.0 ±81.9	256.7 ±64.5	1075.0± 144.3*	917.6± 217.8*
24 h	318.5 ±29.0	340.3 ±232.3	285.7 ±116.8	104.5 ±51.6	186.6 ±139.2	239.3 ±155.2	287.0 ±21.2	439.8 ±209.2	423.7 ±180.2
72 h	197.0 ±24.0	328.3 ±138.8	390.4 ±95.7	56.3 ±6.7	93.8± 84.0	90.5 ±90.4	217.0 ±127.3	284.9 ±186.6	284.9 ±106.0

5.1.6. Laborvizsgálatok – vesekárosodás

Az IR_{PostC} csoport 4 órás alcsoporthoz emelkedett szérum kreatininkoncentrációt mértünk az áloperált csoport megegyező alcsoporthoz tartozó állataihoz képest. A PostC₄ csoportban szintén emelkedett szérumszint mutatkozott, azonban ez szignifikánsan alacsonyabb (kevésbé emelkedett) volt, mint az IR_{PostC4} csoport esetében. A 24 és 72 órás mérési pontnál minden vizsgált csoportban alacsonyabb kreatininszinteket detektáltunk – itt nem volt szignifikáns különbség az egyes csoportok között.

A kialakuló vesekárosodás mechanizmusának pontosabb megítélése céljából klinikai laboratóriumi paraméterek kerültek kiszámításra. A 4 óra reperfúzió végére a szérum karbamid / kreatinin hányados és a frakcionált nátrium exkréció is tubuláris típusú vesekárosodást jeleztek, de csak az IR_{PostC4} csoportban, míg ezen paraméterek a PostC₄ csoportban nem utaltak vesekárosodásra a hagyományos beosztás szerint.

Az ún. „Renal Failure Index” számításával továbbra is fennálló veseelégtelenséget lehetett kimutatni az IR_{PostC24} és IR_{PostC72} csoportban, minden időpontban szignifikánsan alacsonyabb értékeket számoltunk a poszt-kondicionált állatokban. (3. táblázat)

3. táblázat: I. kísérlet, laboratóriumi mérések:

†: $p < 0,05$ vs. a megfelelő IR csoport; ‡: $p < 0,001$ vs. a megfelelő IR csoport

		4 h	24 h	72 h
Szérum kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]	Sham	67,35 \pm 16,27	20,40 \pm 7,50	20,35 \pm 4,74
	IR	219,09 \pm 81,92	39,22 \pm 3,32	38,07 \pm 2,07
	PostC	96,25 \pm 28,07 ‡	26,43 \pm 6,88 †	31,10 \pm 6,79
Szérum karbamid [mmol/l]	Sham	6,31 \pm 0,71	5,36 \pm 0,49	5,09 \pm 0,13
	IR	8,03 \pm 0,90	6,15 \pm 0,29	6,30 \pm 0,64
	PostC	6,38 \pm 0,50 †	5,55 \pm 0,07	5,32 \pm 0,29 †
Szérum karbamid / kreatinin hányados	Sham	97,54 \pm 32,77	276,79 \pm 77,78	253,51 \pm 60,76
	IR	39,90 \pm 14,65	159,06 \pm 25,14	134,50 \pm 32,96
	PostC	68,37 \pm 24,51 †	258,40 \pm 53,02 †	199,69 \pm 39,40
FENa (frakcionált nátrium exkréció) [%]	Sham	0,24 \pm 0,26	0,34 \pm 0,09	0,87 \pm 0,12
	IR	2,19 \pm 1,31	0,94 \pm 0,29	0,98 \pm 0,25
	PostC	0,75 \pm 0,50	0,50 \pm 0,22	0,26 \pm 0,16 †
RFI (renal failure index) [mmol/l]	Sham	0,42 \pm 0,37	0,49 \pm 0,12	0,77 \pm 0,56
	IR	2,37 \pm 1,43	1,53 \pm 0,45	1,51 \pm 0,36
	PostC	0,92 \pm 0,32	0,77 \pm 0,34 †	0,43 \pm 0,28 †

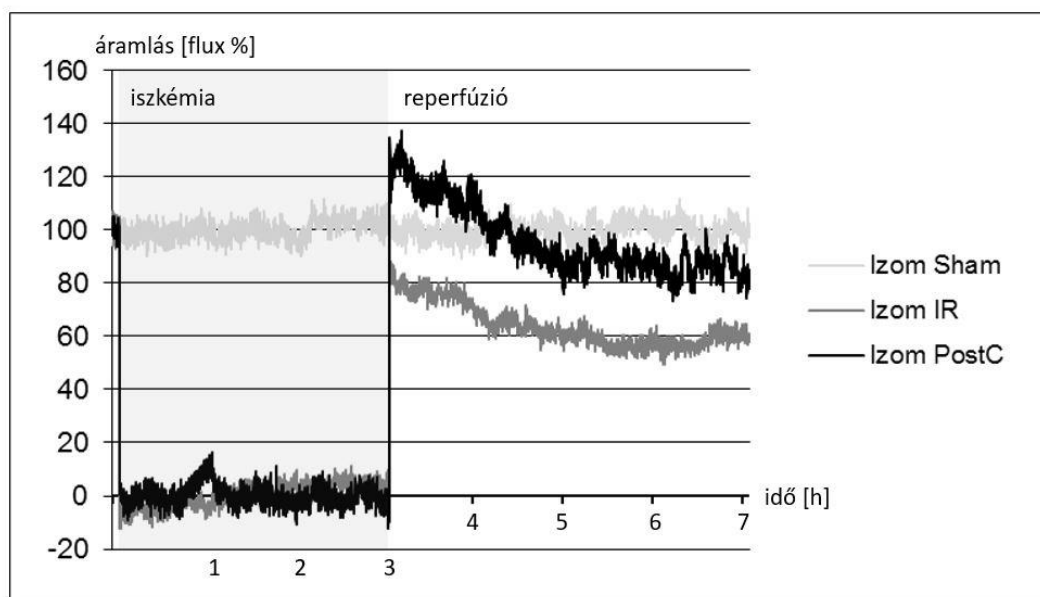
5.1.7. TNF- α meghatározás

A 4 órás áloperált csoportban mért értékhez ($6,615 \pm 1,423$ ng/ml) képest szignifikánsan emelkedettek voltak a TNF- α -szintek mind az IR_{PostC4} ($44,904 \pm 8,693$ ng/ml), mind a PostC₄ ($22,906 \pm 4,909$ ng/ml) csoportban. Az IR_{PostC4} csoporthoz viszonyítva a PostC₄ csoportban a TNF- α -szint alacsonyabb volt, mely különbség statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$).

5.1.8. Alsó végtagi mikrocirkuláció

Az alsó végtagi izomszövet lézer Doppler áramlásmérés regisztrátumain szembetűnő különbségek figyelhetők meg az IR_{PostC4} és a PostC₄ csoportok között. Az IR_{PostC4} állatok mikrokeringése jelentősen károsodik és a kirekesztés felhelyezése előtt mérthez képest jóval alacsonyabb szinten stabilizálódik. Így tehát az izomzat hipoperfúziója alakul ki. A kezelt (PostC₄) csoportban a vérkeringés újraindulását követő átmeneti hiperémia után az iszkémiás periódust megelőző időszakhoz hasonló adatok mérhetők. A számolt paraméterek közül a reperfúziós időszakra vonatkozó görbe alatti terület (reperfúziós terület, RA) alátámasztotta ezt a megfigyelést: a PostC₄ állatokban szignifikánsan magasabb az átlagos RA érték, mint az IR_{PostC4} csoportban. (RA: PostC₄: $96,15 \pm 17,48$

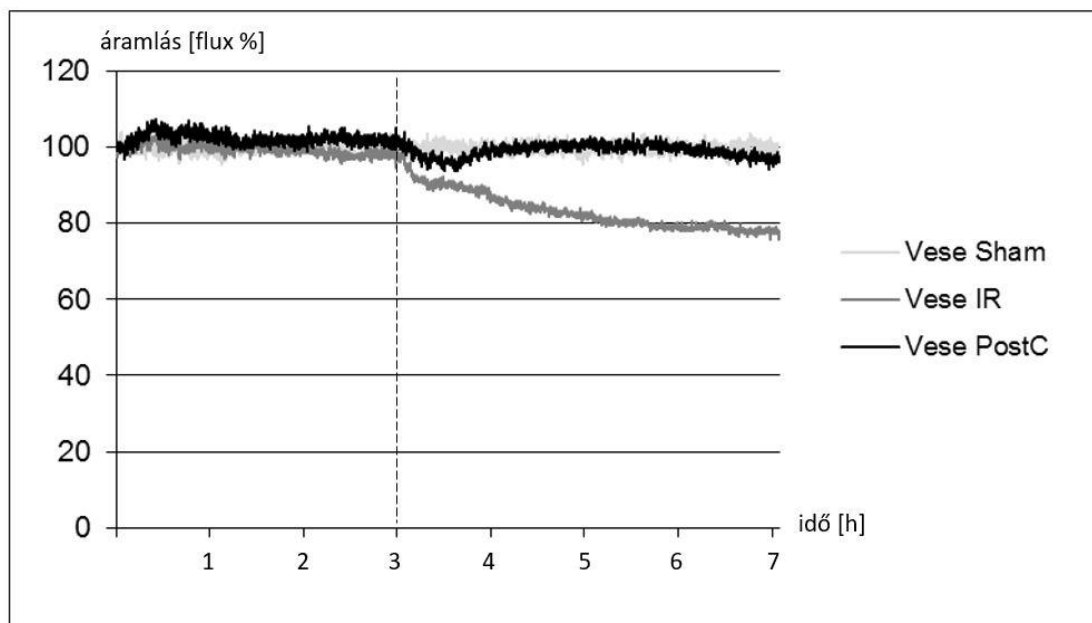
% vs. IR_{PostC4}: $63,99 \pm 15,73$ %, $p = 0,038$, PM: PostC₄: $82,87 \pm 23,19$ % vs. IR_{PostC4}: $60,85 \pm 15,33$ %, $p = 0,194$). (5. ábra)



5. ábra: I. kísérlet, jobb m. rectus femoris mikrocirkuláció lézer Doppler áramlásmérővel.

5.1.9. Vesekéreg mikrocirkuláció

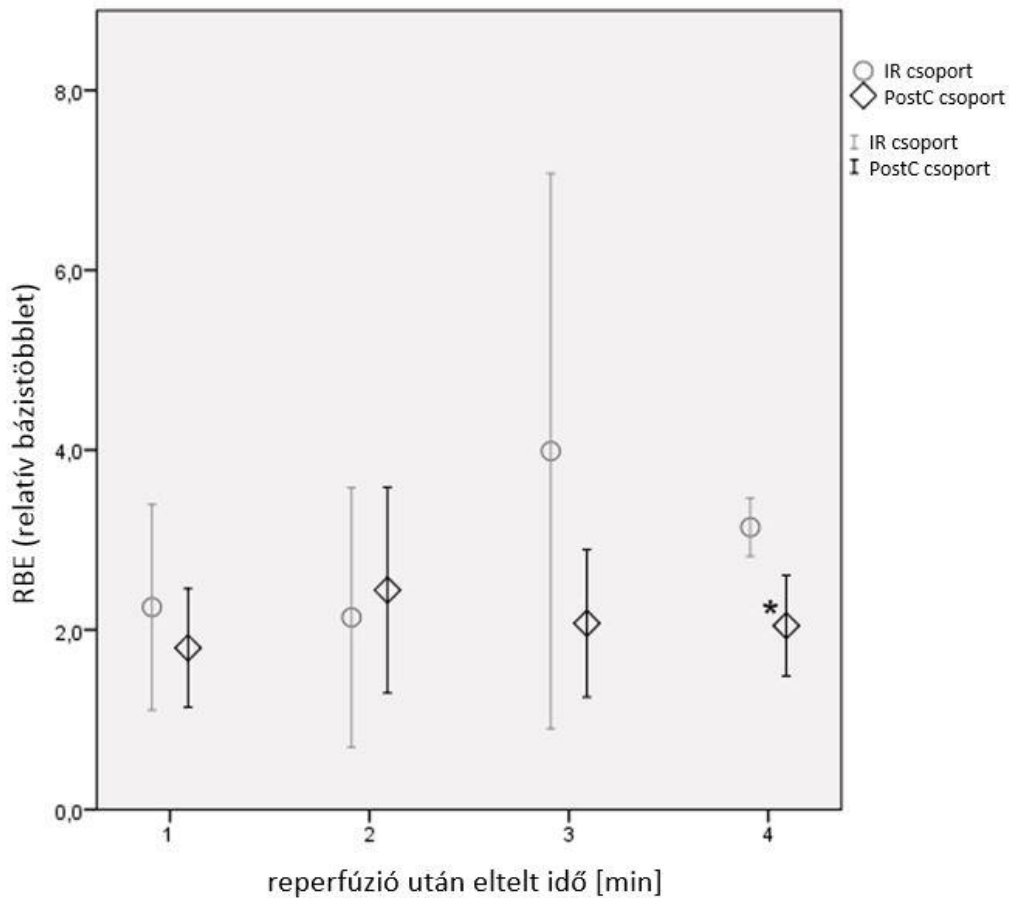
A vesekéreg esetében az alsó végtagi kirekesztés időtartama alatt egyik csoportban sem változott jelentősen a perfúzió (infrarenális kirekesztés történt!). A reperfúzió kezdetétől fogva azonban az IR_{PostC4} csoportban lassú csökkenés volt detektálható, mely a mérés végéig (4 órával a reperfúzió kezdete után) folytatódott. Ezzel szemben a PostC₄ csoportokban a mikrocirkuláció az áloperált állatokhoz hasonló szinten maradt, a különbség a IR_{PostC4} csoportban számolt értékekhez képest statisztikailag szignifikáns. (RA: PostC₄: $99,01 \pm 2,76$ % vs. IR_{PostC4}: $82,31 \pm 12,23$ %, $p = 0,024$, PM: PostC₄: $96,81 \pm 6,14$ % vs. IR_{PostC4}: $77,21 \pm 14,81$ %, $p = 0,037$). (6. ábra)



6. ábra: I. kísérlet, jobb vese felszín mikrocirkuláció lézer Doppler áramlásmérővel

5.1.10. Sav-bázis háztartás

A relatív base excess (RBE) a reperfúzió 1., 2., 3. és 4. percében vett vérminta BE értéke és a revaszkularizáció előtt közvetlenül mért (0. időpillanat) BE (negatív értékek) hányadosa. Mint két negatív számnak a hányadosa, a nagyobb pozitív hányados a szisztémás keringésben megjelenő nagyobb acidotikus terhelésre utal. A 4. percben szignifikáns különbség mutatkozott a PostC₄ és IR_{PostC₄} csoport között, a PostC₄ csoportban alacsonyabb hányados adódott. (1. perc: PostC₄: $1,80 \pm 0,66$ vs. IR_{PostC₄}: $3,19 \pm 0,27$, 2. perc: PostC₄: $2,44 \pm 1,14$ vs. IR_{PostC₄}: $3,38 \pm 0,17$, 3. perc: PostC₄: $2,07 \pm 0,82$ vs. IR_{PostC₄}: $5,32 \pm 2,91$, 4. perc: PostC₄: $2,05 \pm 0,56$ vs. IR_{PostC₄}: $3,28 \pm 0,32$, $p=0,037$.) (7. ábra)



7. ábra: I. kísérlet, relatív base excess

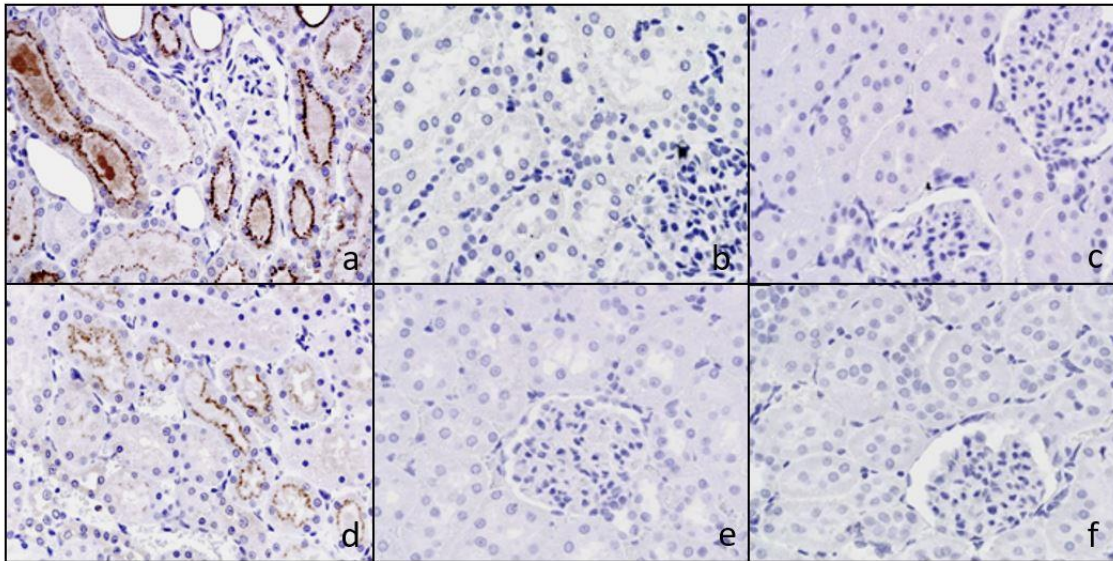
(a. carotis vérmintákból a reperfúzió után percenként mért bázistöbblet és a reperfúziókor mért bázistöbblet hányadosa). *: $p < 0,05$.

5.1.11. Anti-mioglobin immunhisztokémia

A reperfúzió kezdete után 4 órával vett veseszöveti mintákon mioglobin epitópok voltak detektálhatók a tubulusok lumenében, illetve a proximális kanyarulat csatornák tubuláris epitél sejtjeinek apikális vakuoláris képleteiben (melyek vélhetően megfeleltethetők a mioglobin molekulákat endocitózissal felvevő és lebontó lizoszómáknak). A metszeteken láthatóan kisebb fokú mioglobin jelenlét volt detektálható a PostC4 csoportban a poszt-kondicionálásban nem részesült IR_{PostC4} csoporttal való összevetésben: kevesebb tubuluslument kitöltő mioglobin precipitátum

ábrázolódott, és sokkal kisebb volt a mioglobint tartalmazó intracelluláris vakuólumok denzitása (kvalitatív vizsgálat).

A 24, illetve 72 óra reperfüziós időszakon átesett állatcsoportokban egyik veseszöveti metszeten sem volt detektálható mioglobin-pozitivitás. Sem a tubuláris csapadékban, sem intracellulárisan nem adott pozitív reakciót az immunhisztokémia, vélhetően a mioglobin-epitópok ekkorra már átalakult, lebomlott szerkezetének köszönhetően. (8. ábra)



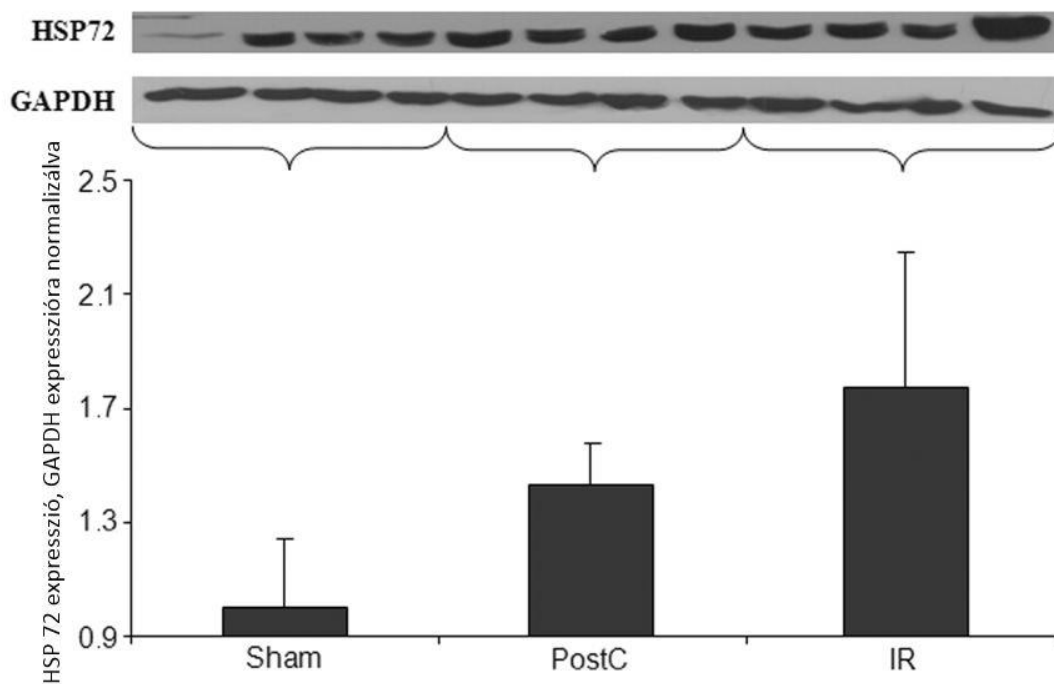
8. ábra: I. kísérlet: Mioglobin immunhisztokémia

Gill-féle hematoxinin háttérfestés, anti-mioglobin immunhisztokémia, 60x nagyítás. a) IR_{PostC4} csoport, barna szín: pozitív anti-mioglobin immun reakció, b) IR_{PostC24} csoport, c) IR_{PostC72} csoport, d) PostC₄ csoport, barna szín: pozitív anti-mioglobin immun reakció, e) PostC₂₄ csoport, f) PostC₇₂ csoport.

5.1.12. Heat shock protein 72 (HSP72) meghatározás

Az összes HSP72 mérés a konstansan kifejeződő GAPDH gén expressziójára lett normalizálva és standardizálva, mégpedig úgy, hogy a mért lumineszcencia értékek az adott állat vesehomogenizátumában mért gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz szöveti szintjével elosztva, egy hányadosként kerültek megadásra. Bár tendenciaszerűen látható volt a vese HSP72 expressziójának magasabb szintje mind az IR_{PostC4} ($1,78 \pm 0,45$), mind a PostC₄ ($1,41 \pm 0,13$) csoportban az áloperált csoportban mért szinttel ($0,98 \pm 0,23$)

összehasonlítva, de szignifikáns különbség nem adódott egyik csoport között sem. (9. ábra)



9. ábra: I. kísérlet: Vese hőszokk protein 72 (HSP72) expresszió.

A kép felső részén reprezentatív Western-blot csíkok. A vese HSP72 expresszió a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) expressziójára normalizálva van megadva. Szignifikáns különbség nincsen a PostC₄ és az IR_{PostC4} csoport között.

5.1.13. Lipidperoxidáció

A homogenizált vesemintákból spektrofotométerrel meghatározott diénkonjugátumok mind a PostC₄, mind az IR_{PostC4} csoportban emelkedett szintje volt mérhető az áloperált csoporthoz képest. Az IR_{PostC4} csoportban a PostC₄ csoporthoz képest szignifikánsan magasabb érték mutatkozott (Sham_{PostC4}: 0,12 ± 0,01 U/ml, IR_{PostC4}: 0,17 ± 0,04 U/ml, PostC₄: 0,14 ± 0,01 U/ml, p=0,032).

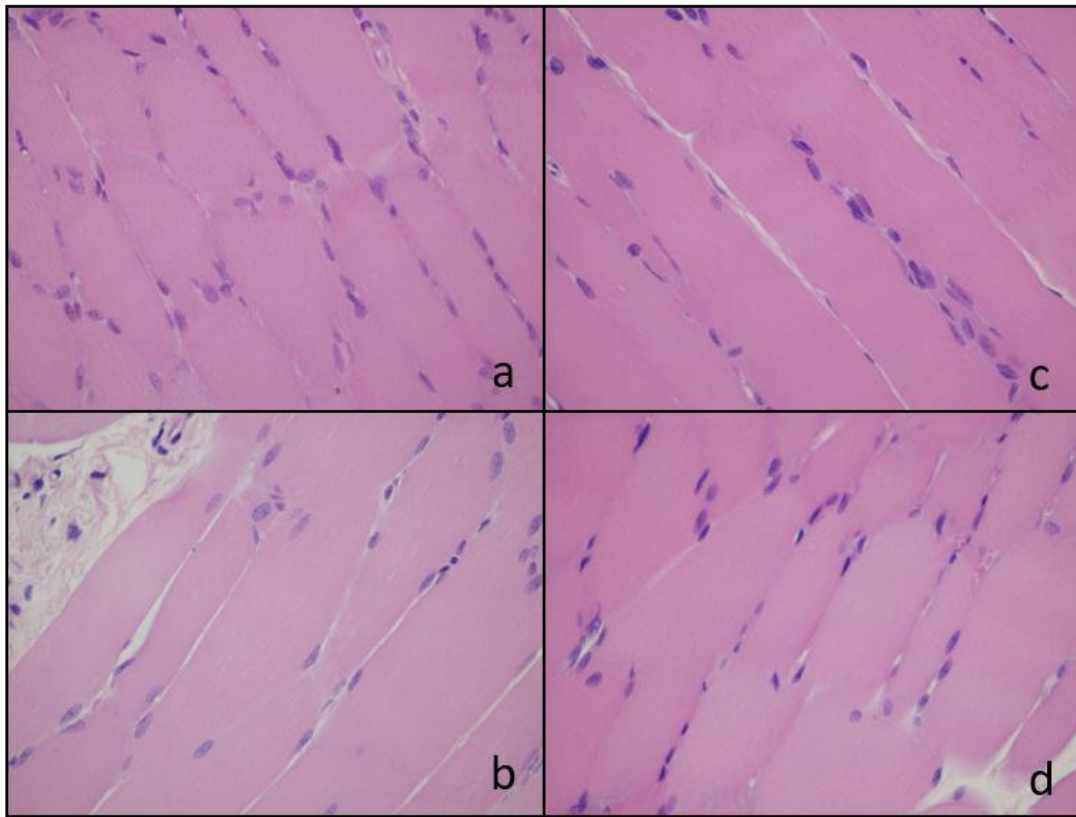
5.2. II. kísérlet [321]

5.2.1. Hemodinamikai monitorozás

- a. A számított „shock index” a reperfúzió időtartamára vonatkozóan magasabb volt, mint az iszkémia időtartama alatt (hányados > 1) mind az IR_{LS4} , mind a LS_4 csoportban, a két csoport között statisztikailag szignifikáns különbség nélkül. ($1,09 \pm 0,25$ vs. $1,07 \pm 0,30$, $p > 0,05$).
- b. A reperfúzió elején tapasztalható vérnyomásesés tekintetében a legalacsonyabb szisztolés vérnyomás a reperfúzió első 20 perce alatt a levosimendannal kezelt csoportban $6,00 \pm 2,86$ perc után volt mérhető, míg a IR_{LS4} csoportban $7,37 \pm 4,97$ perccel az aortakirekesztés felengedését követően. A két csoport között azonban szignifikáns különbség nem volt mérhető.
- c. Ez a vérnyomásesés bár nagyobb mértékű volt az IR_{LS4} csoportban (az iszkémia utolsó mért szisztolés vérnyomás értékének $16,61 \pm 3,61$ %-a), mint a levosimendannal kezelt csoportban ($8,56 \pm 8,22$ %), de az adatok nagy standard deviációja miatt a különbség a két csoport között nem volt statisztikailag szignifikáns.
- d. A vérnyomás kezdeti esését követően a görbék a plató fázist kb. hasonló idő után érték el mindkét csoportban (IR_{LS4} : $17,53 \pm 11,23$ min és LS_4 : $17,42 \pm 19,83$ min a revaszkularizáció után), érdemi különbség nélkül ($p > 0,05$).

5.2.2. Kórszövetten

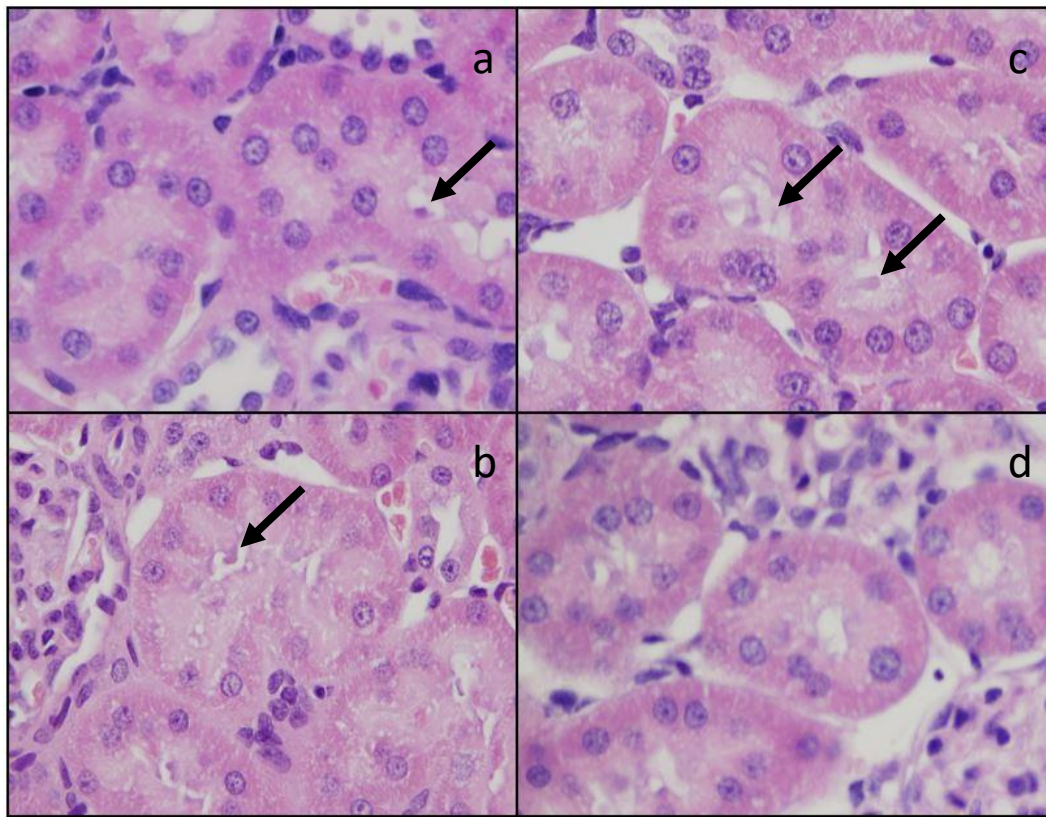
A HE festett m. tibialis anterior mintákból készült metszetek fénymikroszkópos felvételein nem volt detektálható definitív izomkárosodás egyik csoportban sem, egyik vizsgált időpontban sem. (10. ábra)



10. ábra: II. kísérlet, m. rectus femoris szövettani képek

HE festés, 60x nagyítás. a) IR_{LS4} csoport, b) IR_{LS24} csoport, c) LS_4 csoport, d) LS_{24} csoport.

A veseszövettani metszeteken akut tubuláris károsodás jelei voltak láthatók az IR_{LS4} csoport állatainál, vakuolizált tubuláris sejtekkel, hialin-cilinder precipitátumokkal a tubuláris lumenben. A 24 órás reperfüzió átesett állatoknál (IR_{LS24} csoport) enyhén kisebb mértékű károsodás volt látható. A levosimendannal kezelt állatok csoportjaiban (LS_4 és LS_{24}) a károsodás mindkét időpontban kisebb mértékű volt (non-kvantitatív kiértékelés). (11. ábra)

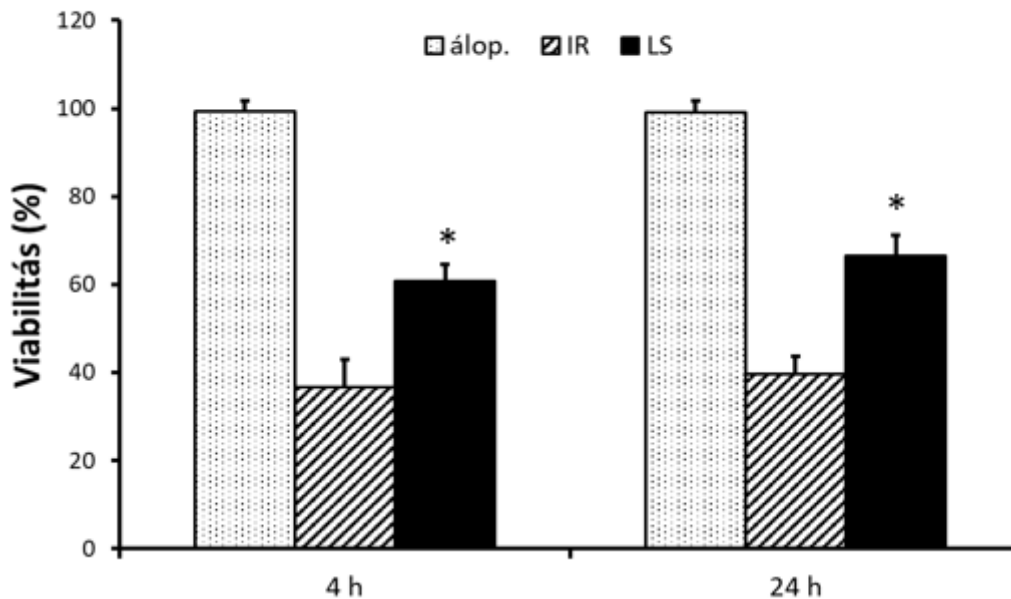


11. ábra: II. kísérlet, veseszöveti metszetek

HE festés, 100x nagyítás. a) IR_{LS4} csoport, b) IR_{LS24} csoport, c) LS_4 csoport, d) LS_{24} csoport. Nyilak: intraluminális precipitátum.

5.2.3. Izom életképesség vizsgálata

4 órás reperfüziót követően egy jelentősen csökkent viabilitás volt mérhető az IR_{LS4} csoportban, és a mért értékek nem tanúsítottak érdemi javulást még 24 órát követően sem (IR_{LS24} csoport). Levosimendan kezelés hatására (LS_4 csoport) egy szignifikánsan kevésbé csökkent izoméletképesség volt mérhető. A 24 órás reperfüzió átesett csoportoknál a levosimendannal kezelt csoportban közel megtartott, szignifikánsan kevésbé csökkent életképesség volt mérhető az IR_{LS24} csoporttal való összevetésben, bár a mért értékek nem érték el az áloperált állatokban tapasztalt szintet (4 h után: $sham_{LS4}$: $99,2 \pm 2,6$ %, IR_{LS4} : $36,6 \pm 6,5$ %, LS_4 : $60,7 \pm 3,9$ %, $p < 0,05$; 24 h után: $sham_{LS24}$: $99,1 \pm 2,7$ %, IR_{LS24} : $39,7 \pm 4,1$ %, LS_{24} : $66,6 \pm 4,7$ %, $p < 0,05$). (12. ábra)



12. ábra: II. kísérlet: m. rectus femoris izomrost viabilitás meghatározás: Szignifikánsan (*) kevésbé csökkent izoméletképesség az LS₂₄ csoportban 24 órával a reperfüzió kezdete után, összehasonlítva az IR_{LS24} csoporttal.

5.2.4. Laboratóriumi vizsgálatok

A 4 órás reperfüziós időszak végére egyértelmű vesefunkciós károsodás volt kimutatható az IR_{LS4} csoportban: az emelkedett szérumban kreatinin szint a sham csoporttal való összevetésben szignifikánsan beszűkült vesefunkciót igazolt. Az IR_{LS4} és LS₄ összevetésében szignifikánsan kisebb mértékű károsodás volt mérhető a levosimendan kezelés hatására.

A számított klinikai vesefunkciós paraméterek (a frakcionált nátrium exkréció és a szérumban karbamid/kreatinin hányados) tubuláris károsodásra utaltak az IR_{LS4} csoportban (szérumban karbamid/kreatinin: $62,60 \pm 14,50$, FENa: $2,01 \pm 0,54$ %), míg a LS₄ csoportban számított paraméterek a hagyományos beosztás szerint nem jeleztek vesekárosodást (szérumban karbamid/kreatinin: $101,84 \pm 13,11$, FENa: $1,20 \pm 0,23$ %). A különbség a két csoport között statisztikailag szignifikáns. A „renal failure index” számított paraméter továbbra is fennálló veseelégtelenségről tanúskodik 24 órával a reperfüzió kezdetét

követően, a levosimendannal kezelt csoportban szignifikánsan alacsonyabb érték adódott. (4. táblázat)

4. táblázat: Vesefunkciós laboratóriumi mérések a II. kísérletben:

†: $p < 0,05$ vs. a megfelelő IR csoport; ‡: $p < 0,001$ vs. a megfelelő IR csoport

		4 h		24 h	
		Sham	IR	Sham	IR
Szérum kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]	Sham	30,91 \pm 4,45		29,68 \pm 8,78	
	IR	97,85 \pm 25,02		59,04 \pm 10,67	
	LS	54,03 \pm 5,51 ‡		49,29 \pm 4,85 †	
Szérum karbamid [mmol/l]	Sham	4,46 \pm 0,67		4,97 \pm 0,60	
	IR	5,91 \pm 1,22		6,46 \pm 0,89	
	LS	5,52 \pm 1,00		5,84 \pm 0,40	
Szérum karbamid / kreatinin hányados	Sham	148,03 \pm 34,80		183,49 \pm 69,42	
	IR	62,60 \pm 14,50		112,82 \pm 25,92	
	LS	101,84 \pm 13,11 ‡		119,57 \pm 15,41	
FENa (frakcionált nátrium exkréció) [%]	Sham	0,58 \pm 0,103		0,59 \pm 0,17	
	IR	2,01 \pm 0,54		1,77 \pm 0,30	
	LS	1,20 \pm 0,23 ‡		1,19 \pm 0,19 ‡	
RFI (renal failure index) [mmol/l]	Sham	0,80 \pm 0,08		0,80 \pm 0,24	
	IR	2,62 \pm 0,39		2,33 \pm 0,20	
	LS	1,66 \pm 0,17 †		1,61 \pm 0,16 ‡	

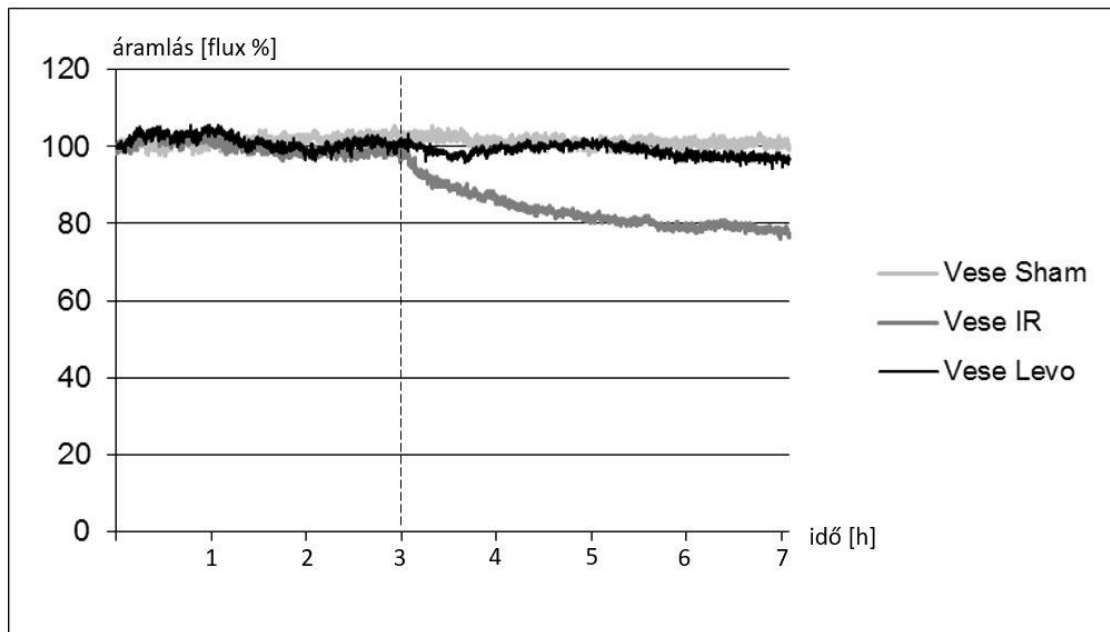
5.2.5. Szérum TNF- α mérések

Az IR_{LS4} csoportban és az LS₄ csoportban szignifikáns szérum TNF- α koncentráció emelkedés volt mérhető az áloperált csoporthoz képest. A levosimendannal kezelt csoportban szignifikánsan alacsonyabb TNF- α szintet mértünk (Sham_{LS4}: 4,96 \pm 0,72 ng/mL, IR_{LS4}: 36,79 \pm 7,78 ng/mL, LS₄: 14,51 \pm 2,30 ng/mL, $p < 0,001$ IR_{LS4} és LS₄ között).

5.2.6. Alsó végtagi izomzat és vesekéreg mikrocirkuláció becslése

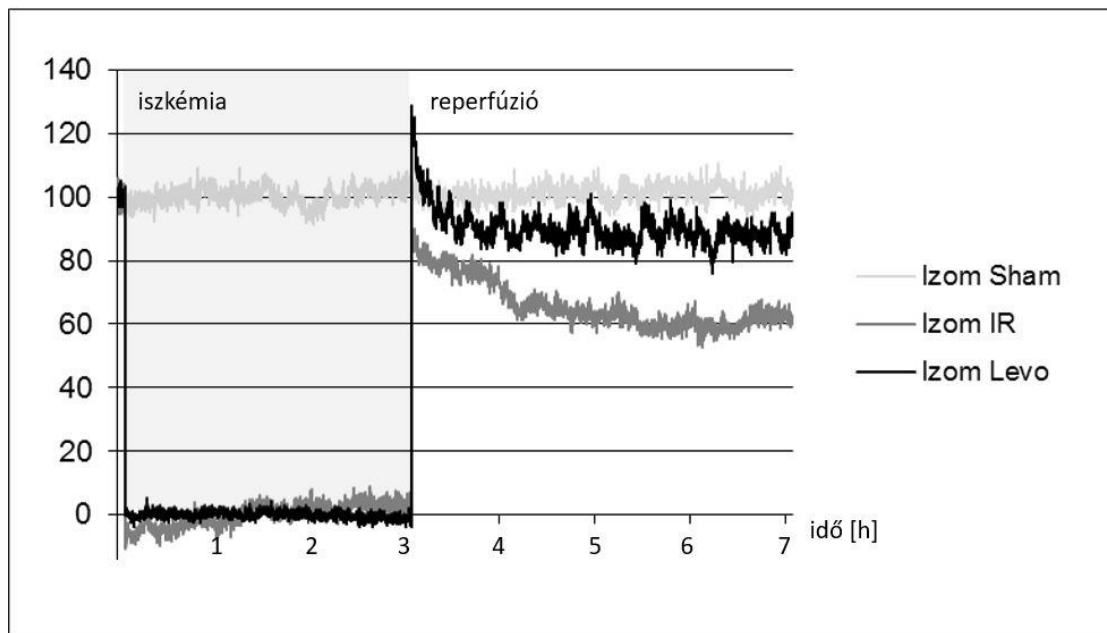
Az áloperált csoportban a kísérlet teljes időtartama alatt (tehát a 7 órás regisztrálási időtartam alatt mindvégig) stabil flow volt mérhető lézer Doppler áramlásmérővel, mind a vese felszínén, mind a m. biceps femorison. Az IR_{LS4} és LS₄ csoportokban a vese kéreg mikrocirkulációja az alapáramlás szintjén maradt a 3 óra végtagiszkémia időtartama alatt. A végtagok revaszkularizációja után a mért áramlás értékek fokozatos csökkenést mutattak a IR_{LS4} csoportban, míg a levosimendannal kezelt állatoknál az áramlás az iszkémia alatt mérhetőnek megfelelő szinten maradt, így a 4 óra végtagi reperfüziós időszak végére szignifikáns különbség volt mérhető a két csoport között a kalkulált plató maximum és reperfüziós terület paraméterek alapján (PM: IR_{LS}: 78,02 \pm 12,63 % vs. LS₄:

96,90±4,67 %, p=0,009; RA: IR_{LS4}: 82,91±9,75% vs. LS₄: 98,84±1,85%, p=0,004). (13. ábra)



13. ábra: II. kísérlet, jobb vese felszín mikrocirkuláció lézer Doppler áramlásmérővel

A végtagi izomzat mikrocirkulációja (a bal m. biceps femoris felszínén végzett mérések alapján) a hasi aorta okklúziójakor leesett mind a IR_{LS4} és a LS₄ csoportban közel 0 szintre. Az érkirekesztés megszűntetésekor a mért áramlás értékek a levosimendannal kezelt állatoknál átmenetileg visszatértek a 100 %-nak megfelelő alapáramlás szintjére, míg a IR_{LS4} csoportban csak kb. 80 %-os áramlás volt mérhető. Később az áramlás tovább csökkent, és a 4 órás reperfúziós időtartam végére egy alacsonyabb szintre állt be mindkét csoportban, azonban jelentős és szignifikáns különbséggel a két csoport között: a levosimendannal kezelt csoportban szignifikánsan kisebb mértékben károsodott mikrocirkuláció volt tapasztalható minden számított paraméter alapján. (PM: IR_{LS4}: 62,87±14,58 % vs. LS₄: 89,25±6,70 %, p=0,004; RA: IR_{LS4}: 66,01±14,92 % vs. LS₄: 90,26±6,55 %, p=0,006). (14. ábra)



14. ábra: II. kísérlet, jobb m. rectus femoris mikrocirkuláció lézer Doppler áramlásmérővel

6. Megbeszélés

Az iszkémiás-reperfúziós károsodás patofiziológiája, az ezzel járó kórképek kórmechanizmusának megismerése, kezelésük vagy megelőzésük kutatása az elmúlt fél évszázad tudományos érdeklődésének homlokterében állt. A felhalmozódott gazdag ismeretanyagunk ellenére a téma változatlan aktualitása és jelentősége elvitathatatlan. Az Egészségügyi Világszervezet legfrissebb rendelkezésre álló kimutatása szerint 2012-ben az egész világra vonatkoztatva a két vezető halálok az iszkémiás szívbetege (7,4 millió fő/év) és a stroke (6,7 millió fő/év) volt.[336] Az Egyesült Államok lakosságára vonatkozó legfrissebb, 2014-es kimutatás adatai szerint férfiak és nők esetében általánosságban a szívbetegek jelentik a vezető halálokat, a stroke nők esetében a 4., férfiak esetében az 5. leggyakoribb halálozási etiológia.[337, 338]

Általánosságban minden iszkémiás kórállapotban, a hipoxia okozta károsodás kórfolyamatának megszakításában az oxigénellátás helyreállítása, a mielőbbi revaszkularizáció jelentősége nem kérdéses. Az esetek döntő többségében ezekbe a kórfolyamokba terápiás szinten beavatkozni már nincs is a klinikusnak lehetősége. A vérrellátás rendezésével kibontakozó újabb ártalom, a paradox módon az iszkémiás sejtszintű patomechanizmusokat tovább súlyosbító reperfúziós károsodás részleteinek megismerésének és az ezekre irányuló terápiás lehetőségek kidolgozásának három szempont adhat értelmet. Egyrészt értelemszerűen a véráramlás megindulásával kifejtett kezelési eljárások helyben, az iszkémiát elszenvedett sejtek és szövetek szintjén fejthetnek ki esetleges kedvező hatást. Másodsorban ezzel párhuzamosan a lokális történések következményeként kibontakozó távoli szervi ártalmak és szervezet szintű szisztémás kóresemények válhatnak megelőzhetővé vagy mérsékelhetővé. Harmadik szempont pedig a főként iszkémiás stroke és akut miokardiális infarktusban megfigyelt és nagy jelentőségű jelenségként az iszkémiás szövetek határterületén (stroke-ban szokásos szóhasználat a penumbra, szívben pedig az „area-at-risk”, azaz a veszélynek kitett terület) túlélésének kérdése. Ezen területek egy bizonyos mértékben kollaterálisok által biztosított oxigénellátás által iszkémiás károsodást nem szenvednek el, a revaszkularizációkor bennük mégis a reperfúziós ártalom kapcsán egy késői sejthalál, apoptózis bontakozik ki.[26] Ezen harmadik terület jelenleg is intenzív kutatások tárgyát

képezi és eddigi tudásunk alapján végtagi vázizomzat iszkémiája vonatkozásában még nem ismert ezen jelenség.

Az elmúlt évtizedben, a módszer 2003-as első leírása óta rengeteg állatkísérletes, *in vitro* modellben és humán klinikai vizsgálatban tanulmányozták behatóan a poszt kondicionálást (iszkémiás poszt kondicionálást), és mára általánosan elfogadható vélekedés, hogy alkalmazása egy eredményes preventív technika a heveny miokardiális iszkémiás-reperfúziós károsodások csökkentésére.[339] Egyéb szervek vonatkozásában is szép számmal jelentek meg tanulmányok, és az első irodalmi adatok alapján vese[177], központi idegrendszer[179], máj[178], tüdő[180] és vékonybél[181] tekintetében is a módszer alkalmazásával csökkenthetőnek bizonyult ezen szervek IR-károsodása.

Érdekes módon a poszt kondicionálás végtagi IR-károsodásra való hatásának vizsgálatára először egy humán vizsgálati modellben került sor (2005-ös tanulmány).[340] Poszt kondicionálással enyhíthető volt az endoteliális IR-károsodást jelző áramlásfüggő vazodilatáció csökkenése felső végtagi iszkémiát követően az a. brachialisban. 2006-ban közöltek először a módszer eredményes alkalmazásával kapcsolatban végtagi vázizomzat IR-károsodásának csökkentéséről.[341] Nem sokkal később (2008.) egy pécsi kutatócsoport egy órás végtagi kirekesztés patkánymodelljében a módszer alkalmazásával nemcsak a végtagi vázizomzat károsodásának csökkenését igazolta, hanem a szisztémás gyulladással válaszreakcióra és oxidoreduktív stresszre való kedvező hatásokról is beszámoltak.[342] Kísérletsorozatunk első eredményeivel egy időben, McAllister és munkatársai 2008-ban tették közre eredményeiket arról, hogy a módszer végtagi IR-károsodásokat csökkentő hatásában szerepet játszanak a mitokondriális MPTP csatornák.[3] Munkacsoportunknak 2009-ben jelent meg az első közleménye előzetes eredményeinkről a poszt kondicionálás patkány bilaterális alsó végtagi iszkémia modelljében való alkalmazásáról.[343] Az ezt követő években számos tanulmány jelent meg a poszt kondicionálás szkeletális harántcsíktal izomzat iszkémiás-reperfúziós károsodását csökkentő hatásáról, különböző kisállat modellekben.[344-352] A protektív mechanizmus hátterében igazolva lett ebben a modellben is az oxidoreduktív stressz és az antioxidáns védelmi mechanizmusok szerepe[346, 351], proapoptotikus útvonalak gátlása[349], az MPTP csatornák nyitódásának gátlása, mint a poszt kondicionálás végső effektor mechanizmusa.[347, 353] Park és munkatársai a vázizomzat funkcionális károsodásának vonatkozásában is eredményesnek találták a

posztkondicionálás alkalmazását.[345] Naparus és munkatársainak egy 2012-es tanulmánya volt az első, mely (bár nem *in vivo*, hanem *in vitro* izolált miocitákon végzett kísérlet során) humán vázizomzat IR-károsodásán vizsgálódva találta eredményesnek a módszer alkalmazását.[353] Az iszkémiás prekondicionálással összevethető mértékben, és nem additív módon találták effektívnek a módszert.[354] Tanulságos eredményként megemlítendő Mansour és munkatársainak vizsgálata, melyek során posztkondicionálás alkalmazásával nemhogy protektív hatást nem tapasztaltak, hanem a károsodás súlyosbodását valószínűsítették a kifejezettebb oxidoreduktív és lokális gyulladási folyamatok igazolásával.[355]

Ezen korábbi tanulmányokról mind elmondható, hogy a posztkondicionálás lokális IR-károsodásokra, az iszkémiás rhabdmiolízisre gyakorolt hatásáról, illetve az ezt kísérő gyulladási jelenségekről számoltak be. Az új koncepció és ötlet a dolgozatom alapjául szolgáló kísérleteinkben az volt, hogy nemcsak, és nem elsősorban a helyben kialakuló protektív hatását vizsgáltuk a posztkondicionálásnak, hanem sokkal inkább arra helyeztük a hangsúlyt, hogy megfigyeljük, hogy a módszer alkalmazása milyen hatást fejt ki egyéb, távoli, nem iszkémiásan károsodott szervek, illetve szervi diszfunkciók (elsősorban a veseelégtelenség) vonatkozásában, és milyen változások mérhetők a szisztémás hemodinamikai viszonyokban és sav-bázis háztartásban. A végtagi IR-károsodások ezen nem végtagi szövődményei klinikailag is nagyobb jelentőséggel bírnak, és így gyakorlatiasabb távlatokba helyezhetők a végtagon, iszkémiás modellben alkalmazott experimentális terápiás próbálkozások.

Előkísérleteink, illetve a fentebb részletezett tanulmányok alapján egy 3 órás alsó végtagi iszkémiás modellt állítottunk fel, mely egy viszonylagosan hosszabb kirekesztéssel járó hasi aorta rekonstrukciós érműtétet modellez, és ezáltal egy nagyobb (és klinikailag releváns méretű) végtagi iszkémiás károsodást reprezentál, melyben nagyobb valószínűséggel és nagyobb mértékű posztoperatív szövődményekre számíhattunk.[356]

Az első nem várt megfigyelésünk a modellünkben az volt, hogy a vázizomkárosodás tekintetében (és az azt kimutató, rendelkezésünkre álló módszerek tükrében) nem találtuk eredményesnek a módszer alkalmazását, annak ellenére, hogy irodalmi adatok a módszer protektív hatásáról számoltak be.[3, 346] Egyedül a 24 órás reperfüziós csoportban tapasztaltunk HE festett szövettani metszeteken gyulladási sejtes

infiltrációt (non-kvantitatív analízis), illetve az enzimhisztokémiai izomrost viabilitás meghatározás alapján a poszt kondicionálásban részesült állatokban kisebb fokú mitokondriális iszkémiás károsodás, vagy egy gyorsabb/effektívebb mitokondriális regeneráció volt detektálható. (Itt utalok a számos pozitív eredményt hozó vizsgálat mellett Mansour és munkatársainak fentebb idézett tanulmányára, akik szintén nem találták a poszt kondicionálás módszerét eredményesnek patkány végtagiszkémia modelljében az izomzat IR-károsodására vonatkozóan, sőt, ők kifejezettebb károsodást valószínűsítettek a fokozott lokális szabadgyöktermelés igazolásával.[355] Kísérletük kritikájaként említhető meg, hogy talán túl hosszú ciklusidőkkel és ehhez mérten túl sok ciklussal dolgoztak: 30 másodperc reperfúzió váltakozott 30 másodperc reokklúzióval 4 ciklusban. Így lehetséges, hogy a kezdeti 30 másodperc reperfúzió már elég volt ahhoz, hogy a reperfúziós károsodások kifejlődhessenek, az addicionális reokklúziók pedig ezt követően csak az iszkémiás károsodást súlyosbították.)

A másik meglepő eredménye az I. kísérletünknek, hogy a fentiekkel némileg ellentmondásban a végtagi iszkémiás rhabdomyolízis következményének tartott vesekárosodás tekintetében azonban szignifikáns különbséget mértünk a poszt kondicionálásban részesült és nem részesült csoportok között már a reperfúzió 4. órájában. A vesediszfunkció progresszióját, időbeli alakulását a “renal failure index” számolt paraméterrel követve pedig az volt látható, hogy az 1. és 3. posztoperatív napokon egy enyhe regresszió, de továbbra is fennálló veseelégtelenség igazolható jelen kísérleti modellben, és a poszt kondicionálásban részesült állatokban minden időpontban szignifikánsan enyhébb fokú vesekárosodás volt megállapítható.

Annak a magyarázata, hogy nem találtuk a poszt kondicionálást eredményesnek a korai vázizomrost IR-károsodások mérséklésére, talán kereshető a kísérletes modell jellemzőiben, melyet használtunk. Munkacsoportunk egy másik kísérletében igazoltuk, hogy patkányban jelentős kollaterális hálózat lehet jelen a végtagi keringés és az infrarenalis aorta között.[357] Bár ennek pontos mértéke és jelentősége nem került tisztázásra, egy ilyen addicionális vérellátás jelentősen befolyásolhatja az IR-károsodások során lejátszódó oxidoreduktív folyamatokat és árnyékot vethet a poszt kondicionálás hatására.[252] Talán egy másik modell (a teljes vértelenséget biztosító végtagi tourniquet[358]) alkalmazásával más eredményre jutottunk volna kísérleteinkben.

Mindenesetre vizsgálataink figyelemre méltó eredménye, hogy a végtagi vázizomzat vonatkozásában nem bizonyult eredményesnek a posztkondicionálás, mégis ezen károsodás következményének tartott veseelégtelenségre nézve viszont szignifikáns és jelentős protektív hatást tudunk elérni alkalmazásával. Ez mindenképpen a direkt ok-okozati összefüggésen kívül egyéb mechanizmusokat sejtet a jelenség hátterében.

Az iszkémiás rhabdmiolízis “renális” (parenchimás) típusú akut vesekárosodáshoz vezet, mely jelenség kialakulásában központi szerepet játszik a mioglobin.[359] A sérült izomrostokból nagy mennyiségben kerül a szisztémás keringésbe, és mivel mérete (16,7 kDa) lehetővé teszi, filtrálódik a glomerulusokban és a tubulusfolyadékba kerülve hármassal károsítja a tubulussejteket. A tubulusfolyadékban a lumenális sejtmembrán glikoprotein komponenseihez kihorgonyozott Tamm-Horsfall fehérjékhez kötődve a mioglobin tubuláris obstrukciót okozhat.[67] A tubulussejtek energiaigényes endocitózissal veszik fel a filtrálódott mioglobin molekulákat (mely energiafogyasztás már önmagában egy ponton túl káros a sejtekre nézve), és a sejteken belül a protein komplexek lebontásával és a hem komponensek szabadrá válásával redox folyamatok, lipid peroxidáció zajlik le, melynek vazóaktív termékei kiegészülve a mioglobin nitrogén-monoxid kötő tulajdonságával károsítja a vesekéreg mikrokeringését is.[360-363] A tubulussejtek elhalásával, funkciócsökkenésével a tubulusfolyadékból nem kerülnek visszaszívásra a normálisan reabszorbeálódó vegyületek, ionok (különösen a Na^+ a fontos), így ezek a distalis tubulusokba nagyobb mennyiségben kerülnek, mely a tubuloglomeruláris feedback révén a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) csökkenését okozva, tovább rontja a vesefunkciót.

A mioglobintoxicitást két módszer alkalmazásával vizsgáltuk jelen kísérleti elrendezésben, és ezek egybehangozón a posztkondicionálás hatására egyértelműen a mioglobinhoz köthető vesekárosodás kisebb mértékéről tanúskodnak. Anti-mioglobin immunhisztokémia során enyhébb fokú mioglobin-jelenlét ábrázolódott a PostC₄ csoportban az IR_{PostC₄} csoporttal való összehasonlításban, melyeket megerősítettek a diénkonjugátum mérések: a PostC₄ csoportban kisebb fokú lipidperoxidáció mutatkozott a vesében.

Az intraluminális precipitáció és minden mioglobin-mediált toxikus károsodás kifejezettebb acidotikus vizelet pH mellett.[74, 364] Az I. kísérletünkben posztkondicionálás hatására a reperfüzió kezdeti perceiben mért kisebb “relatív base

excess” paraméterek kisebb fokú acidotikus anyagcsere terhelésre utalnak a szisztémás keringésben, mely vélhetően a tubulusfolyadék pH-jára is kihatással bírhat. A kisebb fokú mioglobin bemosódás és kisebb fokú szisztémás acidózis együttesen alacsonyabb szintű tubuláris károsodáshoz vezethet a vesében.

A mioglobinhoz köthető akut tubuláris károsodás mellett azonban jelen kísérleti modellünkben minden bizonnyal az azotémia “prerenális” komponensével is számolnunk kell.[365] Egy dilatált mikrovaszkulaturával rendelkező, keringési autoregulációjában sérült, nagy kiterjedésű végtagi izomszövet iszkémia utáni revaszkularizációja súlyos hemodinamikai változásokhoz vezet. A hirtelen vérnyomásesés neuroendokrin stresszválaszt indukál, keringési redisztribúció zajlik le, és ezt tetézi a károsodott izomrostokba és izomrostok közé kiáramló folyadék, a folyadékterek átrendeződése, mely egy relatív hipovolémiás komponenssel egészíti ki az akár shockig súlyosbódó hemodinamikai változásokat.[356] A vese vérellátásának a rapid csökkenése és a prerenális azotémia egy reflexes válasz a szervezet részéről ebben a kórállapotban.[366]

Ennek feltérképezése céljából folyamatos invazív artériás vérnyomásmérés történt az állatokban, a szisztémás hemodinamikai változások paramétereinek részletes vizsgálatával. Az eredmények alapján egy jobban kompenzált keringésdinamika mutatkozott a PostC₄ csoportban az IR_{PostC₄} csoporthoz képest. Ezzel parallel módon a vesekéreg mikrocirkulációs mérései szignifikánsan kisebb fokú károsodást igazoltak a poszt kondicionálás hatására.

A hősokk fehérjék (HSP) szerepet játszhatnak az IR-károsodás elleni védelemben.[367] HSP72 magasabb szöveti koncentrációja mérhető a végtagi IR-károsodásokat követően távoli szervekben, köztük a vesében is.[368] Eredményeink ezzel egybehangzóan szintén emelkedett HSP72 szintet igazoltak a vesemintákban, de szignifikáns különbség nem adódott a poszt kondicionálás hatására. Így az alsó végtagi kondicionálási eljárások korai veseprotektív hatása vélhetően független a HSP72 expresszióban észlelhető változásoktól.

Összességében a laborvizsgálatok leletei, a kalkulált vesefunkciós paraméterek alapján a kísérleti modellünkben kialakuló veseelégtelenség elsődlegesen tubuláris típusúnak vélemezhető a reperfüziót követő kezdeti időszakban az IR_{PostC₄} csoportban, míg ezek a számított értékek a PostC₄ csoportban közelebb állnak a normál tartományhoz. Egy és három nappal a revaszkularizáció után a paraméterek sokkal

markánsabb “renális típusú” vesekárosodást jeleznek mindkét iszkémián átesett csoportban, de a különbség a vesekárosodás fokában továbbra is szignifikáns a poszt-kondicionált és a nem-kondicionált állatok között. Véleményünk szerint a döntően tubuláris típusú heveny veseelégtelenség jelen kísérleti modellben nem zárja ki egy kisebb fokú prerenális károsodás lehetőségét is a kialakuló kórállapotban. Ezt támasztják alá a szisztémás és a vesekéreg keringésdinamikai vizsgálataink. Bár nem differenciálható el egymástól a két különböző mechanizmus, a számított paraméterek alapján az valószínűsíthető, hogy a döntő különbség poszt-kondicionálás hatására a tubuláris károsodásban lehet, és ezt kíséri a prerenális komponensre való kedvező hatás.

Nehezebben helyezhetők el a fenti gondolatmenetben az alsó végtagi mikrocirkulációs mérések eredményei. A poszt-kondicionálás egyedüli lokálisan kialakuló pozitív hatásaként az akut szakban, a vázizomzat mikrokeringése szignifikánsan kisebb mértékben mutatkozott károsodottnak a kezelésben nem részesült, de iszkémián átesett csoporttal való összevetésben. Ennek magyarázata vélhetően inkább a gyulladásos folyamatokban, az endoteliális károsodásban kereshető. Kísérleti elrendezésünkben nem került vizsgálatra a pontos mechanizmus, de jelen ismereteink alapján az iszkémiás izomzatban kialakuló mikrocirkulációs változásoknak alapvetően két komponense van. Az egyik a nitrogén-monoxid (NO) által mediált kontrollálatlan vazodilatáció, másrészt a gyulladásos folyamatok által generált “no-reflow” jelenség, melyek arányától függő mértékben, de összességében az iszkémián átesett szövetekben egy csökkent mikrocirkuláció mérhető, mely akár teljes obstrukcióig is fokozódhat (MVO: microvascular obstruction).[219] Ebben szerepet játszik az adott terület szöveteit vérrel ellátó arteriolák csökkent relaxációs képessége[369], a kapilláris keringés külső kompressziója a mioцитák és endotelsejtek duzzadása miatt[370], apró mikrotrombusok képződése[371], vagy ateroszklerotikus plakkokból származó disztális mikroembolizáció[372], illetve a helyi gyulladásos folyamatokban fehérvérsejtek adhéziója.[219] A revaszkularizációkor meginduló vérkeringéssel a vér alakos elemei, fehérvérsejtek és trombociták is jutnak a korábban iszkémián átesett területekre, melyek kapcsolatba lépve a megváltozott szerkezetű posztkapilláris venulák endotéliumával egy gyulladásos folyamatot indítanak el. Az endotel sejteken már iszkémia alatt nagyobb mértékben expresszáldott adhéziós molekulák (P-szelektin, ICAM-1, VCAM-1) a leukociták kitapadását, aktivációját és az érfalon való transzmigrációját okozzák.[26] A

sérült endotelstrukturákon aktiválódó komplement rendszer szintén a leukocyták aktivációjában és a gyulladással válasz amplifikációjában vesz részt.[373, 374] A neutrofil granulocitákban lokalizálódó, különböző stimulusokra aktiválódó NAD(P)H-oxidáz szuperoxid-gyököket termel, mely további reakciók során különböző reaktív oxigén gyökök felszabadulását okozza. A reaktív gyökök az endotelsejtekben további károsodást okozva gyulladással mediátorok felszabadulásához, újabb adhéziós molekulák expressziójához és újabb leukocita-toborzáshoz és -aktivációhoz vezet.[374] Összességében az valószínűsíthető, hogy a gyulladással folyamat az IR-ban lezajlott szöveti károsodásra kibontakozó helyi válaszreakció, így mértéke inkább a károsodás fokától függ, és időbeli karakterisztikáját is ez szabja meg, mégpedig, hogy időben később alakul ki, mint az elsődleges IRI.[20]

Az I. kísérletünk eredményei új hipotéziseket vetnek fel az iszkémiás poszt-kondicionálás lehetséges hatásmechanizmusát illetően. A tény, hogy a végtagi vázizomzat IR-károsodására vonatkozóan a módszer nem bizonyult effektívnek, de a következményes veseelégtelenségre nézve protektív hatású volt a módszer, megerősítheti ezen új gondolatmenetet. A poszt-kondicionálás alkalmazásával, vélhetően egyszerűen a módszer mechanikus keringésmoduláló hatásának köszönhető módon, a végtagból a toxikus és acidotikus anyagcseretermékeknek, továbbá a mioglobinnak, mint a mionefropátiás metabolikus szindróma központi szereplőjének a bemosódása a keringésbe fokozatos, időben elnyújtottabb, így egyszerre kisebb károsító hatás érvényesül a vese tubulusejteken. Ezzel párhuzamosan, szintén a módszer mechanikai hatásaként a szisztémás keringésdinamikai változások is kisebb fokúak, mely megnyilvánul a lokális mikrocirkuláció szintjén is.

A Murry és munkatársai által 1986-ban leírt iszkémiás pre-kondicionálás[174] nyilvánvalóan kevés klinikai relevanciával bír, hiszen egy iszkémiás inzultust megelőzően, azt előre látva, tervezetten lehet csak alkalmazásával protektív hatásra számítani. Ez kizárja a módszer alkalmazását akut iszkémiás-reperfúziós kórképekben. Esetlegesen tervezett keringésmegszakítással, vértelenséggel járó beavatkozások (pl. kardioplégiában végzett szív-műtétek, szervtranszplantációk, vértelenségben végzett onkosebészeti parenchimás szervrezekciók) alkalmával jöhet szóba a módszer alkalmazása. A pre-kondicionálás „feltalálásának” fő hozadéka sokkal inkább az volt, hogy egy addig ismeretlen endogén adaptív mechanizmusra derült fény, illetve, hogy

ezen mechanizmusok felderítésére irányuló intenzív kutatások során az elmúlt 30 évben az iszkémia-reperfúzió kórfolyamatait is jobban megismerhettük. Az elsőként 2003-ban Vinten-Johansen és munkatársai által leírt poszt kondicionálás[2] ötletének első tudományos hozadéka az volt, hogy végleg bizonyítást nyert a reperfúziós károsodás léte[5], továbbá a módszer hátterének kutatása szintén számos ponton gazdagította ismereteinket ezen károsodás patomechanizmusának részleteit illetően.

Ezen módszer egyértelműen áthidalja a prekondicionálás alkalmazhatóságának problematikáját, ugyanis az iszkémiás kórképekben épp a revaszkularizációkor ad lehetőséget a kimenetel, a károsodás mértékének befolyásolására. Az iszkémia-reperfúzió sejt szintű folyamatainak és ezek kondicionálási technikákkal való befolyásolási lehetőségének megismerése vezetett a farmakológias kondicionálás gondolatának megfogalmazásához. Egy gyógyszeres terápia nagy előnye, hogy alkalmazásával kiküszöbölhető minden, az invazív beavatkozással járó szövődmenylehetőség, illetve technikai akadály.

Bármely beavatkozás, melyet a reperfúzióval egy időben vagy az előtt közvetlenül eszközölünk, hatással lehet a reperfúziós károsodás eseményeire. Farmakológias poszt kondicionálásnak nevezhető minden olyan gyógyszeres terápia, mely az (iszkémiás) poszt kondicionálást imitálja olyan módon, hogy az iszkémiás-reperfúziós károsodás ismert sejtszintű szignáltranszdukciós folyamataiba avatkozik be közvetlenül; és egy iszkémiának kitett szerv revaszkularizációjakor, vagy azt közvetlenül megelőzően kerül alkalmazásra.[205]

Annak ellenére nevezzük ezen módszereket farmakológias kondicionálásnak, hogy eredeti meghatározás alapján a kondicionálás valójában egy károsító hatás (lásd iszkémia-reperfúzió), mely egy kisebb mértékben alkalmazva protektív, míg nagyobb méretben ugyanaz a károsító hatás ártalmas az adott szerve nézve.[5]

A levosimendan egy pozitív inotróp szer és vazodilatátor, melyet súlyos dekompenzált szívelégtelenség kezelésére fejlesztettek ki.[4] A kezdeti lelkesedés ellenére, mellyel bő 20 évvel ezelőtt fogadták a kardiológiában ezt a szert, melynek többszörös kedvező hatásmechanizmusa[375] mellett kevés mellékhatása[298], jó tolerálhatósága, biztonságossága[302] és kedvező farmakokinetikai tulajdonságai[376] voltak ismertek, 2007-ben egy nagy prospektív, randomizált, multicentrikus, kettős vak kontrolllos klinikai vizsgálat (SURVIVE tanulmány[303]) nem igazolta a szer

szuperioritását a standard kezelésnek számító dobutaminnal szemben. Ezt követően a 2013-ban megjelent REVIVE II vizsgálat[283] már placebóval való összevetésben is a levosimendan kezelés mellett jelentkező kedvezőtlenebb mortalitásról számolt be. Ez a két klinikai vizsgálat meglehetősen kedvét szegte a szerrel foglalkozó kutatásoknak, és ha elfogadjuk evidenciának ezen tanulmányok eredményeit, akkor az komolyan megkérdőjelezi a szer szélesebb körben való alkalmazhatóságának racionalitását a szívelégtelen betegek gyógyításában.

Állatkísérletes bizonyítékok és humán vizsgálatokban igazolt eredmények alapján a levosimendan pozitív inotrop hatást fejt ki, érzékenyítve a miokardiumot Ca^{2+} iránt azáltal, hogy kötődik a Ca^{2+} -ot kötött troponin C-hez és ezáltal stabilizálja azt.[377] Mindezt – ellentétben egyéb pozitív inotróp szerrel - kalcium koncentrációtól függő mértékben teszi (ezáltal nem károsítja a relaxáció folyamatát[266]), és nem változtatja az intracelluláris kalcium-koncentrációt (így nem növeli a sejt oxigén-igényét[299], és nem befolyásolja kedvezőtlenül az aritmia hajlamot[378]). Emellett a levosimendan egy úgynevezett KCO (potassium channel opener), vaszkuláris simaizomsejtek szarkolemmájában található ATP-szenzitív K^{+} - (K_{ATP}) csatornák nyitásával vazorelaxációt vált ki a kis rezisztencia ereken[379] és a keringés vénás oldalán is[380], csökkentve ezáltal a kardiális afterloadot és preloadot.[381] Nagy konduktancia ereken egyéb típusú (feszültségfüggő[382] és Ca^{2+} -dependens[269]) kálium csatornáknak is valószínűsíthetően agonistája, melyek klinikai relevanciáját még nem ismerjük. Ezek mellett a levosimendan mitokondriális K_{ATP} (mito K_{ATP}) csatornáknak is agonistája[383], és a mitokondriális reverz módú nátrium-kalcium kicserélő iontranszport gátlója[384], melyek alapján felmerül protektív hatása miokardiális iszkémiában.[385] Legújabb kísérleti eredmények alapján felmerült a levosimendan néhány egyéb hatása, mint immunmoduláns, anti-inflammatórikus[386], trombocitaaggregáció-gátló[387] és anti-apoptotikus hatása[388], melyek pontos mechanizmusáról alig vannak ismereteink, de bizonyára ezek is hozzájárulhatnak a kardioprotektív és kedvező hemodinamikai effektushoz.

Dolgozatom központi szereplője a mito K_{ATP} -csatorna, melyről ismert, hogy döntő mediátor tényező az iszkémiás kondicionálási eljárásokban. Az iszkémiás prekondicionálás rövid iszkémiás ciklusa során, illetve az (iszkémiás) poszt kondicionálásban a hosszú idejű vértelenség állapotában számos párhuzamos

szignalizációs útvonal aktiválódik és ezek többsége a mitokondriumokon konvergál és nyitja a mitoK_{ATP}-csatornákat, ezáltal csökkentve a mitokondriális belső membránmembránpotenciálját.[188] A vértelenség megszűntetésekor hirtelen újra oxigént vesznek fel a sejtek és ez a nyitott mitoK_{ATP}-csatornák mellett mitokondriális légzési lánc I-es és III-as komplexen keresztül reaktív oxigéngyökök termeléséhez vezet.[196] Ezen reaktív szabadgyökök fontos kulcsfaktorok a szignalizáció folytatásában[191], feltehetően a szabadgyökök által aktiválódó protein kináz C ϵ közvetítésével vezetnek a reperfüziós károsodásban döntő tényezőnek számító mitokondriális MPTP óriáscsatornák formálódásának és nyitódásának gátlásához.[185] Iszkémiás prekonkondicionálás során a rövid iszkémiás ciklusok triggerelik azokat a szubcelluláris jelátviteli folyamatokat, melyek a mitoK_{ATP}-csatornák nyitódásához vezetnek, és a következő hosszabb idejű iszkémia után a reperfüziós károsodások kivédését szolgálják. Iszkémiás posztkonkondicionálás során pedig a hosszabb iszkémia alatt aktiválódnak ugyanezen jelátviteli útvonalak, nyílnak a mitoK_{ATP}-csatornák, majd a szaggatott reperfüzió megindulásakor a szabadgyöktermeléssel folytatódik a jelátvitel, a keringés ciklikus megszakításaival pedig a szöveti pH acidotikus tartományban marad és tartja zárva az MPTP csatornákat mindaddig, amíg ezek a jelátviteli protektív folyamatok elérik az MPTP csatornák nyitódásának végleges gátlását (a posztkonkondicionálás pH hipotézise).[5]

II. kísérletünk kérdésfelvetése éppen abból adódik, hogy a posztkonkondicionálás protektív szubcelluláris folyamataiban és a levosimendan ismert farmakológiai hatásmechanizmusában közös tényező a mitoK_{ATP}-csatornák nyitódása. Ráadásul az I. kísérletben vázolt experimentális modell egy olyan akut kritikus végtagsziskémiát állít elénk, ahol a revaszkularizációkor súlyos fokú iszkémiás-reperfüziós izomrost károsodások zajlanak le, jelentős keringésdinamikai változások történnek és következményesen komoly távoli szervi szövődményekre, szervi károsodásokra, gyulladáshoz vezető válaszreakcióra lehet számítani.[389] Hipotézisünk szerint a modellezett klinikai szituációban a levosimendan éppen a fentebb vázolt többszörös hatásmechanizmusnak köszönhetően pozitív hatást fejthet ki a kimenetel szempontjából.

II. kísérletünkben a levosimendan alkalmazása protektív hatásának bizonyult az alsó végtagi IR-károsodásokra nézve, melyről az izoméletképesség meghatározása (szignifikáns különbség mindkét vizsgált időpontban) és a végtagi mikrocirkuláció kedvező alakulása is tanúskodik. Bár kísérletünk inkább leíró jellegű, mintsem a pontos

mechanizmus bizonyítást nyert volna eredményeink alapján, mégis az irodalmi adatokkal összevetve az valószínűsíthető, hogy az iszkémiás-reperfúziós izomkárosodásokban a levosimendan mitokondriális integritásra való kedvező hatásával, a mitoK_{ATP}-csatornák nyitódásával magyarázhatók az eredmények, mely a fentebb részletezettek szerint az MPTP csatornák nyitódásának gátlásában játszik szerepet.[5, 185, 390]

A végtagi mikrocirkuláció a 4 órás regisztrált reperfúziós időszak végére szignifikánsan magasabb szinten stabilizálódott a levosimendan kezelésben részesült állatcsoportban, mely hatás háttérében nem megkerülhető valószínűleg a levosimendan ismert vazodilatációt okozó hatásmechanizmusa, de szintén felmerül másrészt a kedvező hatás az (izomrost és endoteliális sejtek) IR-károsodására vonatkozóan.

Vizsgálódásainkban a II. kísérletben is a végtagi iszkémia-reperfúzió távoli szervi szövődményeként kialakuló vesekárosodás tanulmányozására összpontosítottunk, ahogy a végtagi károsodásokat befolyásoló terápiás lehetőségek klinikai értékét is leginkább a kórkép kimenetelét meghatározó szisztémás szintű szövődményekre való hatás adhatja.

Kísérletünkben a levosimendan kezelésben részesült állatcsoportban enyhébb szöveti változásokat tapasztaltunk a kezelt állatok szövettani metszetein, melyet laborvizsgálatok által igazolt enyhébb fokú funkcionális károsodás (kisebb mértékben emelkedett szérum kreatinin koncentráció) kísért. Ez a nefroprotektív hatás 24 órával a revaszkularizáció után is detektálható volt. A kalkulált klinikai vesefunkciós paraméterek (frakcionált nátrium exkréció és szérum karbamid/kreatinin hányados) elsődlegesen “renális” típusú, tubuláris károsodást igazoltak az IR_{LS4} csoportban. A levosimendannal kezelt és nem kezelt csoportok közötti szignifikáns különbségek itt is azt sugallják, hogy a levosimendan kezelés hatására az akut tubuláris károsodás mértéke csökkent, és ennek háttérében itt is a skeletális izomkárosodásra és következményes nefrotoxicitásra való protektív hatást kell keresnünk. Nyilvánvalóan azonban ebben a kísérletben is felmerül egy prerenális károsodásnak az addicionális szerepe, annak ellenére, hogy itt is egyértelmű a kapcsolat a végtagi rhabdomyolízis és az akut vesekárosodás között.

Az infrarenális aorta mikroklippel való leszorítását követően emelkedett artériás vérnyomás volt mérhető az iszkémiás időtartam végéig. A reperfúzió kezdetekor a vérnyomás hirtelen csökkenését észleltük mind a levosimendannal kezelt, mind az IR_{LS4} csoportban. A levosimendanról ismert, hogy valószínűleg a pozitív inotróp hatásának köszönhető módon javítja a perioperatív szív pumpafunkciót[391] és kedvező hatást fejt

ki kardiogén[392] és szeptikus shockban.[393] Jelen kísérleti elrendezésben azonban semmilyen érdemi különbség nem volt észlelhető a reperfüziós időszak keringésmegingása vonatkozásában a kezelt és nem kezelt csoportok között a számított szisztémás keringési paraméterek alapján. Bár ennek sem történt meg pontosabb meghatározása kísérletünkben, de vélhetően a pozitív inotróp hatás és a kiváltott vazodilatáció egymást kiegyensúlyozó hatása érvényesül egy károsodott keringésdinamikai szabályozás kísérleti modelljében.

A szisztémás változásokkal szemben a vesekéreg mikrocirkuláció szintjén azonban jelentős pozitív hatást tapasztaltunk a szer alkalmazásával. Lézer Doppler áramlásmérővel a II. kísérletben is szignifikánsan kisebb mértékben károsodott vesekéreg mikrocirkuláció volt detektálható a kezelt csoportban, összehasonlítva az IR_{LS4} csoportban tapasztalható jelentős mértékű mikrocirkuláció csökkenéssel. Ez a csökkenés a vese mikrokeringésében köszönhető feltehetően a végtagi iszkémia-reperfüzió során tapasztalható keringési redisztribúció szisztémás hatásainak, a kompenzatórikus renális vazokonstrikciónak, de egyúttal a fentebb részletezett módon a sérült izomrostokból felszabaduló mioglobinnal szembe fordított nefrotoxikus hatásának is.[60] A levosimendan vese mikrokeringésre való hatása itt is vélhetően több komponensű mechanizmus. Egyrészt a levosimendan a vaszkuláris simaizomsejtek szarkolemmális K_{ATP} -csatornáinak agonistájaként a preglomeruláris ereken vált ki vazodilatációt.[393, 394] Ehhez járul a szer pozitív inotróp hatása által támogatott szisztémás vérkeringés, illetve a szív jobb kamráján kifejtett pozitív inotrópia hatására csökken a centrális vénás nyomás, így a vesevénák nyomása is.[395] A preglomeruláris vazodilatáció kiegészülve a csökkent jobb szívfél nyomásokkal a vesevéráramlás javulásához vezet, és egy javuló glomeruláris filtrációs rátához. A vazodilatáció mellett a levosimendanról leírták, hogy az angiotenzin II mediált mezangiális sejt kontrakciót is csökkenti és így a glomerulusok effektív filtráló felülete is nő, tovább javítva a GFR-t.[396]

Kísérleteink eredményeinek magyarázata kapcsán meg kell említeni a gyulladással szembe fordított választási reakciót. Mind a poszt-kondicionálás, mind a levosimendan kezelés hatására nagy mértékben, és szignifikánsan kisebb fokú TNF- α felszabadulás volt mérhető kísérleteinkben. Iszkémiás-reperfüziós kórállapotokban a kibontakozó szöveti gyulladással szembe fordított választásban ismert megfigyelés a TNF- α szint emelkedése.[397] Ennek forrásai egyrészt a szöveti makrofágok[398], a károsodás helyére eljutó keringő

granulociták, illetve maguk a sérült kardiomiociták.[208, 210] Miokardiális iszkémia-reperfúzió kapcsán a felszabaduló citokinnek szerepe van a miociták kontraktilis károsodásában[210, 399], és hosszabb távon a miokardium remodellingjében és a kialakuló szívelégtelenségben.[209] Akut gyulladáshoz citokin szintje korán, néhány órán belül emelkedik a károsodás hatására, majd mérhető szérumkoncentrációja hamar lecsökken, és kb. 24 óra múlva visszatér a kontroll szintre.[400] Megfigyelték a TNF- α -szint újabb emelkedését és egy második csúcsát kb. a 8. napon a kardiomiocitákat károsító hatás után.[400, 401] Ennek magyarázata már feltehetően nem az iszkémia-reperfúzió közvetlen hatásában, hanem a miokardium késői funkcionális károsodásában, a kialakuló szívelégtelenségben kereshető.[210] Vélhetően a hemodinamikai változások által kiváltott falfeszülés sejtek szintjén érvényesülő mechanikai hatása szerepel triggerként a TNF- α fokozott expressziójában.[402] Mindenesetre jelen kísérletes elrendezésünkben az akut változásokat követték ezen korai gyulladáshoz marker szintjében és ez magyarázza, hogy csak a 4 órás reperfúziós csoportban kerültek mérésre ezen citokin szintek.

A fentiekkel ellentmondásban azonban számos kísérletes eredmény támasztotta alá, hogy a TNF- α hatását neutralizáló próbálkozások (TNF- α -ellenes antitestekkel, vagy a TNF- α és/vagy sejt felszíni receptorának génmódosítás által létrehozott inaktivációjával) az iszkémiás-reperfúziós károsodásokat nemhogy nem csökkentik, hanem még fokozhatják is.[403-405] A jelenség magyarázata egyrészt a különböző TNF- α receptorokban, illetve kvantitatív különbségekben kereshetők. A TNFR1 citotoxikus, proapoptotikus hatások közvetítéséért felelős, a TNFR2 receptor ligand-kötése pedig protektív stimulusként szerepet játszik a prekondicionálás és a posztkondicionálás védelmi mechanizmusaiban is.[208, 406, 407] Másrészt a felszabaduló TNF- α szintje is meghatározó lehet a kimenetel szempontjából: kis koncentrációkban protektív tényező (a posztkondicionálásban is szerepet játszó SAFE jelátviteli útvonal beindításával), nagyobb mennyiségben azonban a károsodást növelő hatással bír (a lokális gyulladás, szöveti destrukció fokozásával).[208, 216] Humán vizsgálatok megfigyelései szerint bár a szívelégtelenség súlyosságával korrelál a plazma TNF- α -szint, mégis ez a szint nem olyan markánsan emelkedett, mint az az állatkísérletek során mérhető. Ezen ismeretek alapján leginkább az merül fel, hogy a TNF- α sokkal inkább a kórfolyamatok markere, semmit valódi oki tényezője.[208, 408, 409]

A fentiekkel egybehangzóan kísérleteink során az iszkémia-reperfúziós kontroll csoportban a revaszkularizációt követő 4. órában magasan emelkedett szérumban TNF- α szint volt mérhető. A kezelt csoportokban, mind a posztkondicionált, mind a levosimendan kezelésben részesült állatoknál tapasztalt szignifikánsan alacsonyabb TNF- α szint vélhetően a kezelési módszerek protektív hatásának következményeként értékelendő, és ehhez adódhat hozzá a TNF- α , mint gyulladáscitokin által mediált következményes gyulladáscsökkentő folyamatokra való hatás kisebb mértéke is.

Kísérleteink nyilvánvalóan nem adnak választ arra a kérdésre, hogy mi a TNF- α forrása jelen kísérletes elrendezésben, így az sem értelmezhető, hogy pontosan milyen szerepet játszik a citokin a vázolt protektív mechanizmusokban? Kin és mtsai feltételezése szerint a posztkondicionálás hatására kisebb mennyiségben termelődnek a sejtekben reaktív szabadgyökök. Mivel ezek hatására szabadul fel a kardiomiocitákból a TNF- α (mely aztán a későbbi károsító folyamatokban játszik szerepet), a csökkent felszabadulás eredményeként alakul ki a posztkondicionálás protektív hatása ezen a vonalon.[410] Ugyanígy elképzelhető azonban, hogy a posztkondicionálás hatására kialakuló kisebb szintű szöveti károsodás kisebb mértékű lokális gyulladást vált ki, és a szérumban TNF- α szint mértéke a gyulladáscsökkentő sejtek aktivitásának jelzője.

Mindenesetre egyes irodalmi adatok felvetik a TNF- α heveny veseelégtelenségben még nem teljesen tisztázott mechanizmus révén játszott szerepét. Akut szisztémás gyulladáscsökkentő változások (és így a TNF- α) az akut renális diszfunkcióban oki tényezőként szerepelhetnek.[78, 411]. Egyes adatok szerint a levosimendannak direkt anti-inflammatorikus hatása is ismert[375], ezen két folyamat között ok-okozati kapcsolat keresése érdekes felvetés, de ez még további vizsgálatokat indokol.

Dolgozatomban két olyan eljárás került bemutatásra és egy újabb kísérleti elrendezésben vizsgálatra, melyek klinikai megítélése napjainkban meglehetősen ellentmondásos.

Az iszkémiás posztkondicionálás eredményességéhez a különböző szervek IR-károsodásának mérséklésében a legkülönbözőbb kísérletes állatmodellekben nem férhet kétség. Mégis humán betegpopulációban, klinikai vizsgálatok során ellentmondásos módon összességében nem rajzolódott ki egyértelmű kedvező hatás. Staat és munkatársainak első, 2005-ös tanulmánya[183] óta az azóta eltelt több, mint 10 évben számos alkalommal vizsgálták intervenciós kardiológiai beavatkozások során a módszer

alkalmazását, az eredmények alapján mégsem tudott a módszer bekerülni a mindennapi kardiológiai gyakorlatba.[230, 231, 412, 413] Az Európai Kardiológiai Társaság legfrissebb szakmai irányelvei (a 2012-es, ST-elevációs akut miokardiális infarktus ellátásáról, illetve a 2014-es miokardiális revaszkularizációs eljárásokról szóló) nem foglalnak állást a kérdésben, és további klinikai vizsgálatokat javasolnak.[414, 415] Az eddigi eredmények alapján a posztkondicionálás eredménye igazán ott várható, ahol nagy kiterjedésű, kollaterális keringéssel nem rendelkező szívizomterület elhalása történik (ilyen lehet a LAD koszorúér ág okklúziója által okozott mellső fal heveny szívinfarktus).[183, 252] Fontos a teljes érokklúzió a revaszkularizáció kezdetekor, a (ballonos predilatáció nélküli) direkt stent implantációt követően a posztkondicionálás azonnali megkezdése, és kellően rövid (30 másodperc reperfúziókból és 30 másodperc reokklúziókból álló) ciklusok megfelelő ideig való alkalmazása (az optimális ciklusszám még nem ismert).[233, 252] Biztosan tekintettel kell lenni a komorbiditásokra, hiszen épp a kardiovaszkuláris rizikófaktorként ismert hiperkoleszterinemiáról, diabéteszről, magasvérnyomás-betegségről és az előrehaladott életkorról az eddigi ismereteink alapján valószínűsíthető, hogy mind csökkentik a posztkondicionálás eredményességét.[244, 246] Nagyon érdekes kérdéseket vetnek fel továbbá a közelmúlt legújabb eredményei, mely szerint az akut miokardiális szívinfarktus ma már standard terápiájának részeként számontartott P2Y₁₂ antagonisták és statinok a trombocitaaggregáció-gátló, illetve koleszterinszint-csökkentő hatástól függetlenül fejtenek ki kardioprotekciót, mégpedig a posztkondicionálással közös subcelluláris mechanizmusok révén.[188, 252] Elképzelhető, hogy betegeink a jól megválasztott és kellő időben elkezdett gyógyszeres terápia mellett már nem profitálnak további eszközös vagy gyógyszeres kondicionáló módszerek alkalmazásából, bár ennek pontos mechanizmusa, az egyes módszerek hatásának optimalizálása, esetleges additív hatások kérdése további vizsgálatokat tesz feltétlen szükségessé.

Egyéb szervek vonatkozásában az irodalomban nem találtunk közleményeket, így kísérletünk problémafelvetése lehetséges, hogy érdekes eredményeket és átütő változásokat hozna a klinikai gondolkodásban, ha humán vizsgálatok során is kipróbálásra kerülhetne alsó végtagi revaszkularizációk, rekonstrukciós érsebészeti beavatkozások során. Természetesen ez további, randomizált, prospektív klinikai vizsgálatokat tesz szükségessé a jövőben. Mindenesetre az az érsebészeti gyakorlat,

miszerint egy alsó végtagi artériás rekonstrukciós érműtét során a keringés felengedése sokszor elsőként az anasztomózisok ellenőrzésére történik, majd gyakran ismételt kirekesztés válik szükségessé korrekciók céljából, egy kimondatlan iszkémiás posztkonficionálás. Hasonlóképpen megfigyelt jelenség, hogy a drasztikus keringési redistribúció a reperfüziókor olyan mérvű keringésdinamikai változásokhoz vezet, hogy az érintett ütőér ismételt leszorítására van kényszerülve a sebész átmenetileg, mely érdekes, és tudományosan nem vizsgált módon előbb-utóbb a beteg kielégítő keringési adaptációjához vezet a műtét végére. Ezeket az eljárásokat nevezhetjük posztkonficionálásnak, és kísérleteink tükrében komoly védelmi válaszmechanizmusokat indukálhatnak lokális és távoli szervi szinteken egyaránt, illetve klinikai vizsgálatokat követően javasolható lesz esetlegesen rutinszerű alkalmazásuk megfelelően válogatott betegpopuláción.

A kísérletünk során alkalmazott levosimendan klinikai értékelése napjainkban szintén meglehetősen ellentmondásos. A kezdeti klinikai vizsgálatok pozitív tapasztalatai után sokáig váratott magára a REVIVE II tanulmány meglehetősen kínos eredményeinek közzététele 2013-ban.[416, 417] Ez a vizsgálat érthető módon megrendítette a bizalmat a szerben és komoly kérdéseket vetett fel a szer egyáltalában való további használatával kapcsolatban, legalábbis az elsődleges indikációnak számító dekompenzált szívelégtelenség terápiájaként. Mindenesetre a tényként ismert farmakodinamikai hatások a szer komoly előnyeit vetítették elő a szívelégtelenségben használt egyéb készítményekkel szemben. A hagyományos, mind a mai napig klinikai használatban lévő pozitív inotróp készítményeink közös vonása, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -szintet növelik („kalcium-mobilizálók”), azonban ez minden esetben a szívizomzat kontrakciójának növelése mellett számos nem kívánatos következménnyel is jár.[418] Ilyen a szívizomsejt oxigénigényének növekedése, mely egyrészt a relaxáció fázisában fokozott ATP-fogyasztással járó Ca^{2+} -szint csökkentő mechanizmusoknak, másrészt a pozitív inotrop hatással párhuzamosan jelentkező pozitív kronotrop hatásnak köszönhető (azon pozitív inotrop szerek esetében, melyek az intracelluláris cAMP-szint emelésén keresztül hatnak). Az intracelluláris Ca^{2+} -többlet extraszisztolékhoz, illetve kamrai ritmuszavarokhoz vezethet, ronthatja a relaxáció folyamatát, fokozza a kamraizomzat falfeszülését, gyorsíthatja a miokardium remodellinget, apoptózishoz vezethet.[264] Emellett a ciklikus AMP-szint emelésén keresztül ható szerek a protein kináz A

aktivitásának növelésével egyúttal a troponin I foszforilációját is elősegítik, mely calcium deszenzitizációhoz vezet, így rontva a kontrakció effektivitását.[419]

Napjainban a kijózanító SURVIVE és REVIVE II klinikai vizsgálatok utáni időszakban ezen két tanulmány felülvizsgálatában, a kedvezőtlen eredmények magyarázatának megtalálásában, újabb/pontosabb indikációk megfogalmazásában merül ki napjaink tudományos aktivitása a levosimendannal kapcsolatban.

Számos okot lehet sorolni, melyek alapján esetlegesen kétségbe vonható a fentebb említett tanulmányok hitelessége, illetve legalábbis olyan szempontok, melyek gondosabb szem előtt tartásával a tanulmányok talán más eredménnyel szolgáltak volna. Ilyen pl. a SURVIVE tanulmány azon vonása, hogy az akut szívelégtelen betegek randomizálása viszonylag későn történt a vizsgálatba, a kórházi kezelés megkezdéséhez viszonyítva napokkal később, a kezelés átlagosan 81. órájában. Ahogy a tanulmány finnországi részadatainak utólagos elemzéséből kiderült, a csúszás a kezelés elkezdésében más eredményekkel jár, a korábban (átlagosan 41. órában) elkezdett kezelés esetén a levosimendannal kezelt csoportban szignifikánsan kedvezőbb 180 napos mortalitás mutatkozott, mint a dobutaminnal kezelt csoportban.[312] Az is kifogásként támasztható a SURVIVE tanulmánnyal szemben, hogy a dobutamin dozírozása sokkal szélesebb határok között, a klinikus megítélése alapján az adott beteg igényeinek megfelelően történhetett, míg a levosimendan kezelés során szigorúan az előírt dózissal kellett dolgozni.

Felmerül a kérdés, hogy ezen tanulmányok során vajon a megfelelő betegpopulációnak lett-e adva a szer, és vajon ki a megfelelő betegpopuláció?[420] Esetlegesen az indikációs kör leszűkítésével és bizonyos megszorításokkal, de mégis helyet kaphatna a levosimendan is a szívelégtelenség gyógyszeres terápiájában. A SURVIVE tanulmány post hoc alcsoportelemzései azt mutatták, hogy a levosimendan alkalmazása szignifikánsan kedvezőbb mortalitással járt a krónikus szívelégtelen betegek akut rosszabbodásakor, mint más betegcsoportban. Ennek hátterében az előzetes β -blokkoló szedés szerepe merül fel, érthető módon ebben a betegcsoportban előnyösebb a levosimendan alkalmazása a β -agonista szerekkel szemben.[287, 302, 312]

A szívelégtelenség etiológiája is befolyással bír vélhetően a kimenetelre. Szintén a finn betegek vonatkozó alcsoportelemzés számolt be arról, hogy az akut miokardiális infarktushoz köthető akut szívelégtelenségben alkalmazott kezelésnek kedvező hatása

van a mortalitásra.[312] Számos más tanulmány is alátámasztja ezt, hogy a szer iszkémiás szívbetegek körében való alkalmazása kapcsán tapasztalhatók kedvező eredmények.[295-298]

Másrészt a mellékhatásprofil ismerete ellenére, sőt épp emiatt javasolható lehet a szer alkalmazása úgy, hogy egyúttal felkészülünk a kellemetlen mellékhatások kezelésére. Így a levosimendan kedvezőtlen szisztémás mellékhatásának, a hipotonizáló hatásnak elkerülése végett egyesek javasolják a levosimendan nem szisztémás, hanem szelektív alkalmazását, így pl. direkt intrakoronáriás adagolását.[281, 421, 422] Ez a szív pumpafunkciójára és a koszorúérkeringésre gyakorolt hatások tekintetében hasonló eredménnyel járt, mint a szisztémás intravénás alkalmazás. Persze a szelektív adagolás nem jelenti azt, hogy a szer nem kerül a keringésbe, de így kisebb dózis elegendő belőle, ami valóban kiküszöbölheti a nemkívánatos mellékhatások egy részét.[422] Ugyanakkor kiegészíthető a levosimendan kezelés vazopresszor aminok egyidejű alkalmazásával, így a hipotonizáló hatás kiiktatásával tapasztalni lehet a szer egyéb kedvező keringésdinamikai effektusait.[423] (A REVIVE tanulmányban a levosimendannal kezelt csoportban épp azon betegeknél volt mérhető magasabb mortalitás, akikben már a szer alkalmazása előtt is hipotenzió volt tapasztalható, ezen betegek kiszűrésével nem volt már emelkedett halálozási rizikó a placebo kezeléssel való összevetésben az utólagos adatelemzés során.[283]) Felmerül esetlegesen a levosimendan nemkívánatos mellékhatásaként ismert tahiarritmiák, rosszindulatú kamrai ritmuszavarok jelentkezésének a kivédése antiarritmiás kezelés egyidejű alkalmazásával. Drakos és mtsai. randomizált kontrollált vizsgálatával amiodaron kezelés mellett szignifikánsan alacsonyabb mortalitást mértek a levosimendannal kezelt betegek között.[288]

Összefoglalásképpen tehát kísérleteink során egy patkány modellt hoztunk létre, melyben egy jelentős mértékű kétoldali alsó végtagi iszkémiás-reperfúziós károsodás lép fel annak távoli szervi és szisztémás következményeivel, reprezentálva az artériás rekonstrukciós érsebészeti beavatkozások során kialakuló legfontosabb szövődeményeket.[389]

Az iszkémiás poszt kondicionálás alkalmazásával szignifikánsan kisebb fokú vesediszfunkció volt mérhető a modellben, és ez a vese protekció döntően függetlennek tűnt a végtagi izomkárosodások mértékétől, melyekre - legalábbis a korai poszt-reperfúziós időszakban - érdemi hatását nem mérhettük a poszt kondicionálásnak.

Kísérletünk magyarázataként számos aspektusát vizsgáltuk meg a kialakuló veseelégtelenségnek. Eredményeink alapján egy döntően parenchimas típusú veseelégtelenség merül fel a kórkép mechanizmusaként, melyben központi tényező a mioglobin többszörös toxikus hatása a tubulussejtekre nézve, és ezt tetézi a szisztémás keringés acidotikus terhelése a végtagi rhabdomyolízis után. Posztkondicionálással, vélhetően egyszerűen a módszer mechanikus sajátosságai folytán, csökkenthető volt a mioglobin kimosódása a keringésbe és a vesén érvényesülő károsító hatása, illetve ehhez társul egy időben elhúzódóbb és ezáltal kisebb fokú, jobban kompenzált acidózis. A kórállapot multifaktoriális patomechanizmusa prerenális komponensként valószínűsítette a posztkondicionálás vesemikrocirkulációra és a szisztémás vérnyomásra gyakorolt kedvező hatását. Tanulmányunk a posztkondicionálás eddig nem leírt új aspektusaként vetette fel a módszer alkalmazásának iszkémia-reperfúziós sejt szintű folyamatoktól független hatásait, mint a hemodinamikai stabilitás és a sérült izomrostokból a keringésbe kerülő toxikus anyagok fokozatos felszabadulása, melyek végeredményben egy jelentős mértékű veseprótektív hatással bírhatnak érsebészeti beavatkozások során.

E mellé tettük kísérletünket, melyben a posztkondicionálással rokon módon, a mitokondriális K_{ATP} -csatornák szintjén (is) ható levosimendant vizsgáltuk ugyanabban a kísérleti modellben. A szer alkalmazása eredményes volt az izomkárosodás mértékének csökkentésében is, és szintén protektív hatású volt a vesekárosodás vonatkozásában. Magyarázatként itt is multifaktoriális mechanizmus lehetősége merült fel. Egyrészt vélhetően az ismert mitokondriális protekció, mely a $mitoK_{ATP}$ -csatornák nyitódásával enyhíti a végtagi szövetek IR-károsodását, és ez a mioglobinuriás akut tubuláris nekrozis kisebb mértékét vonja maga után. Másrészt a vesefunkcióra gyakorolt kedvező hatások köszönhetőek a szer pozitív inotróp és keringésdinamikai effektusainak is, melyek megnyilvánulnak a vese makro- és mikrocirkuláció szintjén egyaránt. Ezeket egészíti ki a szer egy lehetséges anti-inflammatórikus hatása, melyre vonatkozóan is szolgálnak új adatokkal kísérleteink.

Bár mindkét terápiás lehetőség alkalmazhatósága kérdésessé vált az elmúlt évek klinikai vizsgálata alapján az iszkémiás szívbetegségek vonatkozásában, de egy új indikációban, és a hatásmechanizmus jelen kísérleteink során vázolt, eddig még nem ismert aspektusai alapján felmerül a módszerek alkalmazhatóságának javasolhatósága

érsebészeti beavatkozások során. Nyilván nem megkerülhető kérdéseket vet fel a témakör a külső befolyásoló tényezők, így az artériás obliteratív érbetegségben szenvedő betegeknél gyakori komorbiditások szerepéről[424, 425], melyek nyilvánvalóan további kísérletes vizsgálatokat tesznek szükségessé a jövőben. Mindenesetre a posztkondicionálás egyszerű technikai megvalósíthatósága, és a végtagi IR-károsodásoktól legalábbis részben független mechanikus vonatkozásai jogosan vetik fel a módszer klinikai gyakorlatba való átvittethetőségének a lehetőségét. Elvonatkoztatva a posztkondicionálás és a levosimendan klinikai kardiológiában való kétes megítélésétől, a két módszer jelen kísérletben, egy más klinikai szituáció modelljében megtapasztalt egyértelmű kedvező hatásai remélhetően a jövőben újabb lehetőségeket adnak az érsebészek kezébe a műtétek súlyos veseszövődményeinek megelőzésére.

7. Következtetések

1. A felállított 3 órás bilaterális végtagiszkémia patkánymodelljében posztkondicionálás alkalmazásával számottevő eredmény nem mutatkozott a végtagi izomrostok iszkémiás-reperfúziós károsodása tekintetében a kezelés hatására, a hagyományos HE kórszövettani képek, illetve szérum CK, LDH és ASAT aktivitások meghatározása alapján. Izomrost viabilitás fentebb részletezett módszerének segítségével azonban igazolható volt a technika alkalmazásának hatása: 24 órával a reperfúzió kezdete után szignifikánsan kisebb fokú károsodás volt igazolható a posztkondicionált állatok izomrostjain.
2. Már négy órával a revaszkularizáció után a heveny vesekárosodás morfológiai és laboratóriumi jellemzői voltak észlelhetők a kísérleti modellünkben. A 24 órás reperfúziós csoportban az első nap végére a veseelégtelenség további progressziója volt kimutatható, majd 72 órával a végtagiszkémia után tapasztaltunk regressziót. A posztkondicionálásban részesült állatcsoportokban enyhébb fokú vesekárosodás igazolódott.
3. Jelen kísérleti modellben a korai posztoperatív időszakban döntően egy parenchimás típusú veseelégtelenség, tubuláris károsodás volt véleményezhető, mely mellett az akut keringésdinamikai hatások alapján egy prerenális komponens is valószínűsíthető. Posztkondicionálás alkalmazásával a mioglobinnel indukált tubulussejtkárosodás mérsékelhető, mely hatásnak hátterében a módszer mechanikus tulajdonságai játszanak szerepet: a sérült izomrostokból a mioglobin és egyéb acidotikus anyagcseretermék szisztémás keringésbe való bemosódása késleltetett, így enyhébb mértékű.
4. Modellünkben a 3 órás végtagiszkémiát követően az artériás középnyomás hirtelen csökkenése észlelhető, a szívfrekvencia vélhetően kompenzatórikus emelkedése mellett. A 4 órás reperfúzió időtartama alatt a vérnyomás a kezdeti csökkenés után fokozatosan emelkedik, majd stabilizálódik. A reperfúzió kezdetén mutatkozó keringésmegingás a posztkondicionált állatcsoportban enyhébb mértékű volt, és a reperfúzió alatt mérhető alacsonyabb shock-index alapján kedvező keringésdinamikai alkalmazkodás érhető el a módszer alkalmazásával.

5. A posztkondicionálásban is részesült állatcsoportban a négy órás reperfúzió lézer Doppler áramlásmérővel regisztrált időtartama alatt szignifikánsan kisebb mértékben károsodott alsó végtagi izomszöveti mikrocirkuláció volt igazolható. A vesekéreg mikrokeringését követve ugyanazon módszerrel pedig a posztkondicionált csoportban az áloperált állatokban mérteknek megfeleltethető áramlási viszonyok ábrázolódtak. Ezzel szemben a non-kondicionált IR_{PostC4} csoportban egy fokozatosan csökkenő vesekéreg keringésre utaló jel volt detektálható a 4 órás végtagi (infrarenális kirekesztés felengedését követő!) reperfúzió időtartama alatt.
6. A reperfúziót követő 4. óra végén az áloperált állatokhoz képest jelentősen emelkedett szérum TNF- α -szint volt mérhető, jelezve az iszkémia hatására kialakuló heveny gyulladással válaszreakciót. A posztkondicionálásban részesült állatokban jelentősen és szignifikánsan kisebb mértékben volt emelkedett a gyulladással citokin szérumszintje.
7. Ugyanazon műtéti modellben alkalmazott levosimendan hatására már a 4 órás reperfúziós csoportban is enyhébb fokú károsodás mutatkozott az izoméletképesség meghatározás és a végtagi mikrocirkulációs mérések alapján. A lokális iszkémiás-reperfúziós izomkárosodások tekintetében tapasztalt kedvező eredmények valószínűsíthetően a levosimendan mitokondriális integritásra való kedvező hatásával, a mitoK_{ATP}-csatornák nyitódásával magyarázhatók.
8. Levosimendan kezelés hatására kisebb fokú heveny vesekárosodás volt igazolható, a különbség a kezelt és a kezeletlen csoportok között 24 órával a reperfúzió kezdete után is mérhető volt.
9. A II. kísérletben a levosimendan hatására semmilyen változást nem sikerült igazolni a szisztémás keringés számolt jellemzői tekintetében, a kezelésben nem részesült, de ugyanolyan végtagi IR-károsodáson átesett állatokkal összehasonlítva.
10. Lézer Doppler áramlásmérővel regisztrálva az infrarenális végtagiszkémia megszüntetését követően, a vesekéreg mikrokeringésében a levosimendan kezelés hatására nem tapasztalható károsodás, ellentétben a kezelésben nem részesült IR_{LS4} állatcsoporttal.

11. Levosimendan hatására a 3 órás végtagszkémiát és 4 órás reperfúziót követően tapasztalható szérumban TNF- α -szint emelkedés jelentősen kisebb mértékben észlelhető.

8. Eredmények

- I/ Az infrarenális aorta-kirekesztéssel járó érsebészeti beavatkozások patkány modelljében a 3 órás iszkémia és 4 órás reperfüzió által előidézett mérsékelt végtagi vázizom károsodást a vesefunkció számottevő romlása kíséri, amelynek hátterében az izomszövetből kiszabaduló mioglobin tubulus-károsító hatása, lipid peroxidáció, valamint szisztémás acidózis, gyulladáscitokin-felszabadulás és csökkent szöveti perfúzió, illetve részben szisztémás keringési hatás igazolható.
- II/ Az iszkémiás posztkondicionálás a vázizom-károsodástól függetlenül is csökkenti a vesekárosodás mértékét, és így inkább a módszer mechanikai hatásának, a mioglobin és egyes káros anyagcseretermékek frakcionált és késleltetett keringésbe való bemosódásának tulajdonítható, kisebb részben a vese mikrocirkuláció javításának és a szisztémás keringési változások mérséklésének tudható be.
- III/ Az iszkémiás posztkondicionálás vázizom-viabilitást javító, mitokondrium működőképességéhez köthető és valószínűleg a mitoK_{ATP} csatornákon érvényesülő hatása a reperfüzió korai fázisában nem, csak 24 óra után igazolható.
- IV/ A levosimendan szisztémás, iszkémia-reperfüzió alatti folyamatos adása ugyanebben a modellben az iszkémiás posztkondicionáláséhoz hasonló mértékű védelmet biztosít a vesefunkció-károsodás ellen.
- V/ A levosimendan vesét érintő protektív hatásában az iszkémia-reperfüzió által károsított vázizom strukturális és funkcionális védelme, viabilitási és mikrocirkulációs paramétereinek javítása játszik fontos szerepet. Ennek hátterében a mitokondrium működőképesség jobb megőrzése és a gyulladáscitokin reakció mérséklése áll, melyek mellett az eredményességhez hozzájárulhatnak a szer kardiovaszkuláris hatásai is.

9. Összefoglalás

Az infrarenális hasi aortán végzett és az alsó végtagi artériás rekonstrukciós érsebészeti beavatkozások egyik legsúlyosabb szövődménye az akut veseelégtelenség. Hátterében az alsó végtagi izomszövetet érintő iszkémiás-reperfúziós károsodás áll, következményes szisztémás metabolikus és keringésdinamikai változásokkal. Kísérleteink célja a poszt kondicionálás módszerének és a levosimendan kezelésnek a vizsgálata volt, melyekben közös, hogy az iszkémia-reperfúzióban központi effektor mitokondriális ATP-függő kálium-csatornák nyitódását serkentik.

Módszerek: Wistar patkányokon hoztunk létre 180 perces kétoldali alsó végtagi iszkémiát. Poszt kondicionálás a reperfúzió kezdetén történt 10 s reperfúziós és 10 s reokklúziós epizódokkal. Levosimendant intravénásan adagoltuk 6 órán keresztül (iszkémia 3 órás időtartama, reperfúzió első 3 órája alatt). A mért adatokat áloperált, illetve ugyanolyan iszkémiás-reperfúziós károsodáson átesett, de kezelésben nem részesülő állatcsoportok mért értékeivel hasonlítottuk össze.

Eredmények: Végtagi izomrost viabilitás meghatározással a poszt kondicionálás hatására csak 24 óra reperfúziót követően mutatkozott szignifikánsan kisebb fokú izomkárosodás, levosimendan alkalmazásával 4 és 24 órával a reperfúzió kezdete után magasabb fokú izomrostviabilitás volt detektálható. Mindkét módszer hatására kisebb fokú veseelégtelenség volt igazolható minden mérési időpontban. Poszt kondicionálás alkalmazása mellett kisebb fokú mioglobinn-indukált tubuláris károsodás volt igazolható immunhisztokémiai reakcióval, illetve a reperfúzió után kompenzáltabb korai sav-bázis háztartás volt igazolható. A szisztémás keringésdinamikai változások egyedül a poszt kondicionálás hatására voltak kisebb mértékűek, de a vesekéreg és az alsó végtagi mikrocirkuláció károsodása mindkét módszer alkalmazásával megelőzhető volt.

Konklúzió: A két módszer protektív hatása véleményezhető alsó végtagi rekonstrukciós nagyérműtétek során a veseszövődmények megelőzésére. Eredményeink új hipotéziseket vetnek fel a protektív hatás hátterében. A poszt kondicionálás mechanikus módszerével a mioglobin és acidotikus anyagcseretermékek felszabadulása fékezhető meg a sérült izomszövetből, egyben a szisztémás keringési redisztribúció is enyhíthető. Levosimendan többszörös kedvező farmakodinámiás tulajdonságával, a vesekeringés több oldalról való támogatásával fejthet ki protektív hatást.

10. Summary

Aims and objectives: A most severe complication of infrarenal aortic and lower extremity arterial reconstructions in vascular surgery is an acute renal failure. The underlying mechanism is the vascular occlusion, an ischaemia-reperfusion injury of a vast mass of muscle tissues, and a consequential metabolic upset and haemodynamic redistribution. The aim was to study postconditioning and levosimendan, two methods that both have the potential of opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, a known final effector in ischaemia-reperfusion injuries.

Methods: Wistar rats underwent bilateral lower limb ischaemia for 180 min followed by reperfusion. Postconditioning consisted of 6 cycles of 10 sec aortic reocclusion and 10 sec declamping. Levosimendan was administered continuously throughout the whole course of ischaemia and the first 3 hours of reperfusion. The pretreatment groups were compared with sham-operated and ischaemia-reperfusion control groups, respectively.

Results: Muscle viability showed no improvement with the use of postconditioning in terms of ischaemic rhabdomyolysis. Levosimendan significantly preserved viability at the 4th and 24th hour after the onset of reperfusion. Renal functional laboratory tests and kidney histology demonstrated significantly less expressed kidney injury in postconditioned and levosimendan-pretreated animals. After postconditioning a less expressed myoglobin-induced tubular injury was proven by immunohistochemistry and a better compensated early acid-base balance after reperfusion. Systemic haemodynamics improved only in the postconditioned group after reperfusion, but kidney microcirculation was significantly less impaired in both treatment groups.

Conclusion: The results claim a protective role for postconditioning and also levosimendan in vascular surgery to prevent renal complication. Furthermore, this study raises new hypotheses about the protective potential these methods possess. Altering the release of toxic metabolites, myoglobin and acidic substances from the injured limb tissues, postconditioning makes a prolonged but thus lesser degree of acidic and toxic load in the systemic circulation and urinary filtrate, while it impacts a milder disturbance of systemic haemodynamics, affecting autoregulatory mechanisms. Levosimendan, with multiple pharmacodynamic actions, exerts possibly protective effect on rhabdomyolysis, acute tubular injury, renal blood flow and microcirculation.

11. Irodalomjegyzék

1. Blaisdell FW. (2002) The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg*, 10:620-630.
2. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285:H579-588.
3. McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC, Forrest CR, Lipa JE, Pang CY. (2008) Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295:R681-689.
4. Toller WG, Stranz C. (2006) Levosimendan, a new inotropic and vasodilator agent. *Anesthesiology*, 104:556-569.
5. Heusch G. (2015) Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res*, 116:674-699.
6. DiMauro S, Schon EA. (2003) Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *N Engl J Med*, 348:2656-2668.
7. Jang S, Lewis TS, Powers C, Khuchua Z, Baines CP, Wipf P, Javadov S. (2016) Elucidating Mitochondrial Electron Transport Chain Supercomplexes in the Heart During Ischemia-Reperfusion. *Antioxid Redox Signal*.
8. Cohen MM. (1973) Biochemistry of cerebral anoxia, hypoxia and ischemia. *Monogr Neural Sci*, 1:1-49.
9. Srinivasan S, Avadhani NG. (2012) Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 53:1252-1263.
10. Patel KP, O'Brien TW, Subramony SH, Shuster J, Stacpoole PW. (2012) The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: Clinical, biochemical and genetic features in 371 patients. *Mol Genet Metab*, 106:385-394.
11. Adeva-Andany M, Lopez-Ojen M, Funcasta-Calderon R, Ameneiros-Rodriguez E, Donapetry-Garcia C, Vila-Altesor M, Rodriguez-Seijas J. (2014) Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion*, 17:76-100.

12. Adeva M, González-Lucán M, Seco M, Donapetry C. (2013) Enzymes involved in l-lactate metabolism in humans. *Mitochondrion*, 13:615-629.
13. Cohen PJ. (1981) Oxygen and intracellular metabolism. *Int Anesthesiol Clin*, 19:9-19.
14. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. (2011) Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301:H1723-1741.
15. Widgerow AD. (2014) Ischemia-reperfusion injury: influencing the microcirculatory and cellular environment. *Ann Plast Surg*, 72:253-260.
16. Michel LY, Verkaart S, Koopman WJ, Willems PH, Hoenderop JG, Bindels RJ. (2014) Function and regulation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger NCX3 splice variants in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem*, 289:11293-11303.
17. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. (2007) The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. *Eur J Intern Med*, 18:90-100.
18. Hernando V, Inserte J, Sartório CL, Parra VM, Poncelas-Nozal M, Garcia-Dorado D. (2010) Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 49:271-279.
19. Granger DN. (1988) Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*, 255:H1269-1275.
20. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. (2012) The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*, 133:230-255.
21. Bers DM. (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*, 70:23-49.
22. Campanella M, Pinton P, Rizzuto R. (2004) Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in health and disease. *Biol Res*, 37:653-660.
23. Schafer C, Ladilov Y, Inserte J, Schafer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM. (2001) Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res*, 51:241-250.
24. Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Agullo L, Pina P, Soler-Soler J. (2004) Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of

- structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res*, 64:105-114.
25. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. (1973) Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol*, 5:395-407.
 26. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol*, 2:702-714.
 27. Pac-Soo CK, Mathew H, Ma D. (2015) Ischaemic conditioning strategies reduce ischaemia/reperfusion-induced organ injury. *Br J Anaesth*, 114:204-216.
 28. Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol*, 73:26-33.
 29. Ren M, Phoon CKL, Schlame M. (2014) Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Prog Lipid Res*, 55:1-16.
 30. Tajeddine N. (2016) How do reactive oxygen species and calcium trigger mitochondrial membrane permeabilisation? *Biochim Biophys Acta*, 1860:1079-1088.
 31. Stadtman ER, Levine RL. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25:207-218.
 32. Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM. (2003) Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 60:617-625.
 33. Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C. (2005) Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol*, 20:205-219.
 34. Rexroth S, Poetsch A, Rogner M, Hamann A, Werner A, Osiewacz HD, Schafer ER, Seelert H, Dencher NA. (2012) Reactive oxygen species target specific tryptophan site in the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1817:381-387.
 35. Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. (2012) p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 149:1536-1548.

36. Tomita Y, Marchenko N, Erster S, Nemaajerova A, Dehner A, Klein C, Pan H, Kessler H, Pancoska P, Moll UM. (2006) WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem*, 281:8600-8606.
37. Lei K, Davis RJ. (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:2432-2437.
38. Arakaki N, Ueyama Y, Hirose M, Himeda T, Shibata H, Futaki S, Kitagawa K, Higuti T. (2001) Stoichiometry of subunit e in rat liver mitochondrial H(+)-ATP synthase and membrane topology of its putative Ca(2+)-dependent regulatory region. *Biochim Biophys Acta*, 1504:220-228.
39. Toledo FD, Perez LM, Basiglio CL, Ochoa JE, Sanchez Pozzi EJ, Roma MG. (2014) The Ca(2+)-calmodulin-Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II signaling pathway is involved in oxidative stress-induced mitochondrial permeability transition and apoptosis in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol*, 88:1695-1709.
40. Giorgi C, Baldassari F, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, Missiroli S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wieckowski MR, Pinton P. (2012) Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis. *Cell Calcium*, 52:36-43.
41. Moratalla MB, Braun P, Fornas GM. (2008) Importance of MRI in the diagnosis and treatment of rhabdomyolysis. *Eur J Radiol*, 65:311-315.
42. Zimmerman JL, Shen MC. (2013) Rhabdomyolysis. *Chest*, 144:1058-1065.
43. (2012) Update: Exertional rhabdomyolysis, active component, U.S. Armed Forces, 2011. *Msmr*, 19:17-19.
44. Kuzmanovska B, Cvetkovska E, Kuzmanovski I, Jankulovski N, Shosholcheva M, Kartalov A, Spirovska T. (2016) Rhabdomyolysis in Critically Ill Surgical Patients. *Med Arch*, 70:308-310.
45. Warren JD, Blumbergs PC, Thompson PD. (2002) Rhabdomyolysis: a review. *Muscle Nerve*, 25:332-347.
46. Vukanovic S, Hauser H, Curati WL. (1983) Myonecrosis induced by drug overdose: pathogenesis, clinical aspects and radiological manifestations. *Eur J Radiol*, 3:314-318.

47. Amend KL, Landon J, Thyagarajan V, Niemcryk S, McAfee A. (2011) Incidence of hospitalized rhabdomyolysis with statin and fibrate use in an insured US population. *Ann Pharmacother*, 45:1230-1239.
48. Park JS, Seo MS, Gil HW, Yang JO, Lee EY, Hong SY. (2013) Incidence, etiology, and outcomes of rhabdomyolysis in a single tertiary referral center. *J Korean Med Sci*, 28:1194-1199.
49. Hohenegger M. (2012) Drug induced rhabdomyolysis. *Curr Opin Pharmacol*, 12:335-339.
50. Sirvent P, Mercier J, Lacampagne A. (2008) New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity. *Curr Opin Pharmacol*, 8:333-338.
51. Zutt R, van der Kooi AJ, Linthorst GE, Wanders RJA, de Visser M. (2014) Rhabdomyolysis: Review of the literature. *Neuromuscul Disord*, 24:651-659.
52. Hechanova LA, Sadjadi SA. (2014) Severe hypercalcemia complicating recovery of acute kidney injury due to rhabdomyolysis. *Am J Case Rep*, 15:393-396.
53. Chatzizisis YS, Misirli G, Hatzitolios AI, Giannoglou GD. (2008) The syndrome of rhabdomyolysis: complications and treatment. *Eur J Intern Med*, 19:568-574.
54. Bosch X, Poch E, Grau JM. (2009) Rhabdomyolysis and Acute Kidney Injury. *N Engl J Med*, 361:62-72.
55. Watson JD, Gifford SM, Clouse WD. (2014) Biochemical markers of acute limb ischemia, rhabdomyolysis, and impact on limb salvage. *Semin Vasc Surg*, 27:176-181.
56. Shrestha SM, Berry JL, Davies M, Ballardie FW. (2004) Biphasic hypercalcemia in severe rhabdomyolysis: serial analysis of PTH and vitamin D metabolites. A case report and literature review. *Am J Kidney Dis*, 43:e31-35.
57. Cervellin G, Comelli I, Lippi G. (2010) Rhabdomyolysis: Historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features. *Clin Chem Lab Med*, 48:749-756.
58. Haimovici H. (1973) Proceedings: Myopathic-nephrotic-metabolic syndrome associated with massive acute arterial occlusions. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 14:589-600.
59. Hertzner NR, Mascha EJ, Karafa MT, O'Hara PJ, Krajewski LP, Beven EG. (2002) Open infrarenal abdominal aortic aneurysm repair: the Cleveland Clinic experience from 1989 to 1998. *J Vasc Surg*, 35:1145-1154.

60. Holt SG, Moore KP. (2001) Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis. *Intensive Care Med*, 27:803-811.
61. Melli G, Chaudhry V, Cornblath DR. Rhabdomyolysis: an evaluation of 475 hospitalized patients. *Medicine*, 84:377-385.
62. Sun J, Wang T, Zhang J. (2014) [Application of continuous renal replacement therapy in the treatment of myoneuropathic metabolic syndrome caused by acute lower extremity ischemia]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 94:2665-2668.
63. Honda N. (1983) Acute renal failure and rhabdomyolysis. *Kidney Int*, 23:888-898.
64. Ordway GA, Garry DJ. (2004) Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol*, 207:3441-3446.
65. Garry DJ, Kanatous SB, Mammen PP. (2003) Emerging roles for myoglobin in the heart. *Trends Cardiovasc Med*, 13:111-116.
66. Brunori M. (2001) Nitric oxide moves myoglobin centre stage. *Trends Biochem Sci*, 26:209-210.
67. Zager RA. (1989) Studies of mechanisms and protective maneuvers in myoglobinuric acute renal injury. *Lab Invest*, 60:619-629.
68. Garimella PS, Sarnak MJ. (2016) Uromodulin in kidney health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*.
69. Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME. (1992) Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest*, 90:267-270.
70. Reeder BJ, Wilson MT. (2005) Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from molecular mechanisms to disease States. *Curr Med Chem*, 12:2741-2751.
71. Wink DA, Nims RW, Saavedra JE, Utermahlen WE, Jr., Ford PC. (1994) The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:6604-6608.
72. Zager RA, Burkhart KM, Conrad DS, Gmur DJ. (1995) Iron, heme oxygenase, and glutathione: effects on myohemoglobinuric proximal tubular injury. *Kidney Int*, 48:1624-1634.

73. Dee G, Rice-Evans C, Obeyesekera S, Meraji S, Jacobs M, Bruckdorfer KR. (1991) The modulation of ferryl myoglobin formation and its oxidative effects on low density lipoproteins by nitric oxide. *FEBS Lett*, 294:38-42.
74. Moore KP, Holt SG, Patel RP, Svistunenko DA, Zackert W, Goodier D, Reeder BJ, Clozel M, Anand R, Cooper CE, Morrow JD, Wilson MT, Darley-USmar V, Roberts LJ, 2nd. (1998) A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure. *J Biol Chem*, 273:31731-31737.
75. Holt S, Reeder B, Wilson M, Harvey S, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd, Moore K. (1999) Increased lipid peroxidation in patients with rhabdomyolysis. *Lancet*, 353:1241.
76. Zager RA, Gamelin LM. (1989) Pathogenetic mechanisms in experimental hemoglobinuric acute renal failure. *Am J Physiol*, 256:F446-455.
77. Better OS. (1990) The crush syndrome revisited (1940-1990). *Nephron*, 55:97-103.
78. Shulman LM, Yuhas Y, Frolkis I, Gavendo S, Knecht A, Eliahou HE. (1993) Glycerol induced ARF in rats is mediated by tumor necrosis factor-alpha. *Kidney Int*, 43:1397-1401.
79. Noma A. (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*, 305:147-148.
80. Trube G, Hescheler J. (1984) Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflugers Arch*, 401:178-184.
81. Quast U. (1996) ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 354:213-225.
82. Tinker A, Aziz Q, Thomas A. (2014) The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 171:12-23.
83. Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. (1998) ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 274:C25-37.

84. Chen P-C, Bruederle CE, Gaisano HY, Shyng S-L. (2011) Syntaxin 1A regulates surface expression of β -cell ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300:C506-C516.
85. Lederer WJ, Nichols CG. (1989) Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive K⁺ channels in isolated membrane patches. *J Physiol*, 419:193-211.
86. Terzic A, Tung RT, Kurachi Y. (1994) Nucleotide regulation of ATP sensitive potassium channels. *Cardiovasc Res*, 28:746-753.
87. Flagg TP, Nichols CG. (2005) Sarcolemmal K(ATP) channels: what do we really know? *J Mol Cell Cardiol*, 39:61-70.
88. Findlay I. (1988) Effects of ADP upon the ATP-sensitive K⁺ channel in rat ventricular myocytes. *J Membr Biol*, 101:83-92.
89. Clement JPt, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J. (1997) Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron*, 18:827-838.
90. Swale DR, Kharade SV, Denton JS. (2014) Cardiac and renal inward rectifier potassium channel pharmacology: emerging tools for integrative physiology and therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*, 15:7-15.
91. Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron*, 22:537-548.
92. Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *science*, 280:69-77.
93. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J*, 66:1061-1067.
94. Giebisch G. (2001) Renal potassium channels: function, regulation, and structure. *Kidney Int*, 60:436-445.
95. Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC, Nichols CG. (2010) Muscle K(ATP) Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. *Physiol rev*, 90:799-829.

96. George AM, Jones PM. (2012) Perspectives on the structure-function of ABC transporters: the Switch and Constant Contact models. *Prog Biophys Mol Biol*, 109:95-107.
97. Higgins CF. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 8:67-113.
98. Bryan J, Munoz A, Zhang X, Dufer M, Drews G, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L. (2007) ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K⁺ channels. *Pflugers Arch*, 453:703-718.
99. Schwappach B, Zerangue N, Jan YN, Jan LY. (2000) Molecular Basis for KATP Assembly: Transmembrane Interactions Mediate Association of a K⁺ Channel with an ABC Transporter. *Neuron*, 26:155-167.
100. Linton KJ, Higgins CF. (2007) Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch*, 453:555-567.
101. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90:291-366.
102. Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM. (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature*, 387:179-183.
103. Bienengraeber M, Alekseev AE, Abraham MR, Carrasco AJ, Moreau C, Vivaudou M, Dzeja PP, Terzic A. (2000) ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the KATP channel complex. *Faseb j*, 14:1943-1952.
104. Crawford RM, Ranki HJ, Botting CH, Budas GR, Jovanovic A. (2002) Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel in vivo. *Faseb j*, 16:102-104.
105. Carrasco AJ, Dzeja PP, Alekseev AE, Pucar D, Zingman LV, Abraham MR, Hodgson D, Bienengraeber M, Puceat M, Janssen E, Wieringa B, Terzic A. (2001) Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:7623-7628.

106. Crawford RM, Budas GR, Jovanovic S, Ranki HJ, Wilson TJ, Davies AM, Jovanovic A. (2002) M-LDH serves as a sarcolemmal K(ATP) channel subunit essential for cell protection against ischemia. *Embo j*, 21:3936-3948.
107. Han J, So I, Kim EY, Earm YE. (1993) ATP-sensitive potassium channels are modulated by intracellular lactate in rabbit ventricular myocytes. *Pflugers Arch*, 425:546-548.
108. Flagg TP, Kurata HT, Masia R, Caputa G, Magnuson MA, Lefer DJ, Coetzee WA, Nichols CG. (2008) Differential structure of atrial and ventricular KATP: atrial KATP channels require SUR1. *Circ Res*, 103:1458-1465.
109. Bao L, Kefaloyianni E, Lader J, Hong M, Morley G, Fishman GI, Sobie EA, Coetzee WA. (2011) Unique properties of the ATP-sensitive K(+) channel in the mouse ventricular cardiac conduction system. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 4:926-935.
110. Yoshida H, Feig JE, Morrissey A, Ghiu IA, Artman M, Coetzee WA. (2004) K ATP channels of primary human coronary artery endothelial cells consist of a heteromultimeric complex of Kir6.1, Kir6.2, and SUR2B subunits. *J Mol Cell Cardiol*, 37:857-869.
111. Foster MN, Coetzee WA. (2016) KATP Channels in the Cardiovascular System. *Physiol Rev*, 96:177-252.
112. Beech DJ, Zhang H, Nakao K, Bolton TB. (1993) K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 110:573-582.
113. Nelson MT, Quayle JM. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, 268:C799-822.
114. Quinn KV, Giblin JP, Tinker A. (2004) Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channel. *Circ Res*, 94:1359-1366.
115. Shi Y, Wu Z, Cui N, Shi W, Yang Y, Zhang X, Rojas A, Ha BT, Jiang C. (2007) PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular KATP channel activation by beta-adrenergic receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293:R1205-1214.

116. Hayabuchi Y, Davies NW, Standen NB. (2001) Angiotensin II inhibits rat arterial KATP channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase C. *J Physiol*, 530:193-205.
117. Cole WC, Malcolm T, Walsh MP, Light PE. (2000) Inhibition by protein kinase C of the K(NDP) subtype of vascular smooth muscle ATP-sensitive potassium channel. *Circ Res*, 87:112-117.
118. Shi Y, Cui N, Shi W, Jiang C. (2008) A short motif in Kir6.1 consisting of four phosphorylation repeats underlies the vascular KATP channel inhibition by protein kinase C. *J Biol Chem*, 283:2488-2494.
119. Jiao J, Garg V, Yang B, Elton TS, Hu K. (2008) Protein kinase C-epsilon induces caveolin-dependent internalization of vascular adenosine 5'-triphosphate-sensitive K⁺ channels. *Hypertension*, 52:499-506.
120. Vleugels A, Carmeliet E. (1976) Hypoxia increases potassium efflux from mammalian myocardium. *Experientia*, 32:483-484.
121. Vleugels A, Vereecke J, Carmeliet E. (1980) Ionic currents during hypoxia in voltage-clamped cat ventricular muscle. *Circ Res*, 47:501-508.
122. Isenberg G, Vereecke J, van der Heyden G, Carmeliet E. (1983) The shortening of the action potential by DNP in guinea-pig ventricular myocytes is mediated by an increase of a time-independent K conductance. *Pflugers Arch*, 397:251-259.
123. Taniguchi J, Noma A, Irisawa H. (1983) Modification of the cardiac action potential by intracellular injection of adenosine triphosphate and related substances in guinea pig single ventricular cells. *Circ Res*, 53:131-139.
124. Noma A, Shibasaki T. (1985) Membrane current through adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol*, 363:463-480.
125. Inagaki N, Gono T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S. (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron*, 16:1011-1017.
126. Babenko AP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Bryan J. (1998) Reconstituted human cardiac KATP channels: functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ Res*, 83:1132-1143.

127. Aguilar-Bryan L, Clement JPt, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J. (1998) Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. *Physiol Rev*, 78:227-245.
128. Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marban E, Nakaya H. (2002) Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest*, 109:509-516.
129. Du Q, Jovanovic S, Clelland A, Sukhodub A, Budas G, Phelan K, Murray-Tait V, Malone L, Jovanovic A. (2006) Overexpression of SUR2A generates a cardiac phenotype resistant to ischemia. *Faseb j*, 20:1131-1141.
130. Cole WC, McPherson CD, Sontag D. (1991) ATP-regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res*, 69:571-581.
131. Lederer WJ, Nichols CG, Smith GL. (1989) The mechanism of early contractile failure of isolated rat ventricular myocytes subjected to complete metabolic inhibition. *J Physiol*, 413:329-349.
132. McPherson CD, Pierce GN, Cole WC. (1993) Ischemic cardioprotection by ATP-sensitive K⁺ channels involves high-energy phosphate preservation. *Am J Physiol*, 265:H1809-1818.
133. Alekseev AE, Reyes S, Yamada S, Hodgson-Zingman DM, Sattiraju S, Zhu Z, Sierra A, Gerbin M, Coetzee WA, Goldhamer DJ, Terzic A, Zingman LV. (2010) Sarcolemmal ATP-sensitive K(+) channels control energy expenditure determining body weight. *Cell Metab*, 11:58-69.
134. Zingman LV, Zhu Z, Sierra A, Stepniak E, Burnett CML, Maksymov G, Anderson ME, Coetzee WA, Hodgson-Zingman DM. (2011) Exercise-induced expression of cardiac ATP-sensitive potassium channels promotes action potential shortening and energy conservation. *J Mol Cell Cardiol*, 51:72-81.
135. Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA, Moore RL. (2005) Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J Physiol*, 569:913-924.
136. Zingman LV, Zhu Z, Sierra A, Stepniak E, Burnett CM, Maksymov G, Anderson ME, Coetzee WA, Hodgson-Zingman DM. (2011) Exercise-induced expression

- of cardiac ATP-sensitive potassium channels promotes action potential shortening and energy conservation. *J Mol Cell Cardiol*, 51:72-81.
137. Boluyt MO, Loyd AM, Roth MH, Randall MJ, Song EY. (2003) Activation of JNK in rat heart by exercise: effect of training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285:H2639-2647.
 138. Jovanovic A, Jovanovic S. (2009) SUR2 targeting for cardioprotection? *Curr Opin Pharmacol*, 9:189-193.
 139. Bao L, Hadjiolova K, Coetzee WA, Rindler MJ. (2011) Endosomal KATP channels as a reservoir after myocardial ischemia: a role for SUR2 subunits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300:H262-270.
 140. Yao Z, Gross GJ. (1994) Effects of the KATP channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation*, 89:1769-1775.
 141. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Parham CS, Darbenzio RB. (1995) Cardioprotection with the KATP opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26:145-152.
 142. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*, 81:1072-1082.
 143. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*, 352:244-247.
 144. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA. (1996) The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem*, 271:8796-8799.
 145. Garlid KD, Costa AD, Quinlan CL, Pierre SV, Dos Santos P. (2009) Cardioprotective signaling to mitochondria. *J Mol Cell Cardiol*, 46:858-866.
 146. Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'Hahan N, Vivaudou M. (2000) The molecular basis of the specificity of action of K(ATP) channel openers. *Embo j*, 19:6644-6651.
 147. Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191:144-148.

148. Mitchell P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 41:445-502.
149. Beavis AD, Garlid KD. (1990) Evidence for the allosteric regulation of the mitochondrial K⁺/H⁺ antiporter by matrix protons. *J Biol Chem*, 265:2538-2545.
150. Zotova L, Aleschko M, Sponder G, Baumgartner R, Reipert S, Prinz M, Schweyen RJ, Nowikovsky K. (2010) Novel components of an active mitochondrial K⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange. *J Biol Chem*, 285:14399-14414.
151. Beavis AD, Lu Y, Garlid KD. (1993) On the regulation of K⁺ uniport in intact mitochondria by adenine nucleotides and nucleotide analogs. *J Biol Chem*, 268:997-1004.
152. Matlib M, Rouslin W, Vaghy P, Schwartz A: Isolation of Cardiac Muscle Mitochondria: An Update. In *Myocardial Biology*. Edited by Schwartz A: Springer US; 1984: 25-37
153. Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD. (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem*, 267:26062-26069.
154. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. (2001) Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*, 89:1177-1183.
155. Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Jaburek M, Garlid KD. (1997) The nucleotide regulatory sites on the mitochondrial KATP channel face the cytosol. *Biochim Biophys Acta*, 1321:128-136.
156. Singh H, Hudman D, Lawrence CL, Rainbow RD, Lodwick D, Norman RI. (2003) Distribution of Kir6.0 and SUR2 ATP-sensitive potassium channel subunits in isolated ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 35:445-459.
157. Hu H, Sato T, Seharaseyon J, Liu Y, Johns DC, O'Rourke B, Marban E. (1999) Pharmacological and histochemical distinctions between molecularly defined sarcolemmal KATP channels and native cardiac mitochondrial KATP channels. *Mol Pharmacol*, 55:1000-1005.

158. Hambrock A, Preisig-Muller R, Russ U, Piehl A, Hanley PJ, Ray J, Daut J, Quast U, Derst C. (2002) Four novel splice variants of sulfonylurea receptor 1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283:C587-598.
159. Seharaseyon J, Ohler A, Sasaki N, Fraser H, Sato T, Johns DC, O'Rourke B, Marban E. (2000) Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels probed by viral Kir gene transfer. *J Mol Cell Cardiol*, 32:1923-1930.
160. Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H, Seino S. (2002) Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med*, 8:466-472.
161. Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S, Takata K. (1997) Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 241:693-697.
162. Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marban E, Seharaseyon J. (2001) Pharmacological comparison of native mitochondrial K(ATP) channels with molecularly defined surface K(ATP) channels. *Mol Pharmacol*, 59:225-230.
163. Lacza Z, Snipes JA, Miller AW, Szabo C, Grover G, Busija DW. (2003) Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K⁺ channels. *J Mol Cell Cardiol*, 35:1339-1347.
164. Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E. (2004) Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:11880-11885.
165. Hanley PJ, Daut J. (2005) K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*, 39:17-50.
166. Wang W-H. (2006) Regulation of ROMK (Kir1.1) channels: new mechanisms and aspects. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290:F14-F19.
167. Testai L, Rapposelli S, Martelli A, Breschi MC, Calderone V. (2015) Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs. *Med Res Rev*, 35:520-553.

168. Foster DB, Ho AS, Rucker J, Garlid AO, Chen L, Sidor A, Garlid KD, O'Rourke B. (2012) Mitochondrial ROMK channel is a molecular component of mitoK(ATP). *Circ Res*, 111:446-454.
169. Garlid KD. (2000) Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol*, 95:275-279.
170. Calderone V, Testai L, Martelli A, Rapposelli S, Digiacomio M, Balsamo A, Breschi MC. (2010) Anti-ischemic properties of a new spiro-cyclic benzopyran activator of the cardiac mito-KATP channel. *Biochem Pharmacol*, 79:39-47.
171. Nowikovsky K, Schweyen RJ, Bernardi P. (2009) Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochim Biophys Acta*, 1787:345-350.
172. Testai L, Marino A, Piano I, Brancaleone V, Tomita K, Di Cesare Mannelli L, Martelli A, Citi V, Breschi MC, Levi R, Gargini C, Bucci M, Cirino G, Ghelardini C, Calderone V. (2016) The novel H₂S-donor 4-carboxyphenyl isothiocyanate promotes cardioprotective effects against ischemia/reperfusion injury through activation of mitoKATP channels and reduction of oxidative stress. *Pharmacol Res*, 113, Part A:290-299.
173. Morota S, Piel S, Hansson MJ. (2013) Respiratory uncoupling by increased H(+) or K(+) flux is beneficial for heart mitochondrial turnover of reactive oxygen species but not for permeability transition. *BMC Cell Biol*, 14:40.
174. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74:1124-1136.
175. Heusch G, Buchert A, Feldhaus S, Schulz R. (2006) No loss of cardioprotection by postconditioning in connexin 43-deficient mice. *Basic Res Cardiol*, 101:354-356.
176. Cao S, Liu Y, Wang H, Mao X, Chen J, Liu J, Xia Z, Zhang L, Liu X, Yu T. (2016) Ischemic postconditioning influences electron transport chain protein turnover in Langendorff-perfused rat hearts. *PeerJ*, 4:e1706.
177. Szwarc I, Soullier S, Gayraud N, Mejean C, Mourad G, Argiles A. (2007) Ischemic postconditioning prevents ischemic acute renal failure. *Transplant Proc*, 39:2554-2556.

178. Wang KX, Hu SY, Jiang XS, Zhu M, Jin B, Zhang GY, Chen B. (2008) Protective effects of ischaemic postconditioning on warm/cold ischaemic reperfusion injury in rat liver: a comparative study with ischaemic preconditioning. *Chinese Medical Journal*, 121:2004-2009.
179. Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. (2006) Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26:1114-1121.
180. Xu B, Gao X, Xu J, Lei S, Xia ZY, Xu Y, Xia Z. (2011) Ischemic postconditioning attenuates lung reperfusion injury and reduces systemic proinflammatory cytokine release via heme oxygenase 1. *J Surg Res*, 166:e157-164.
181. Cheng CH, Lin HC, Lai IR, Lai HS. (2013) Ischemic postconditioning attenuate reperfusion injury of small intestine: impact of mitochondrial permeability transition. *Transplantation*, 95:559-565.
182. Sivaraman V, Mudalagiri NR, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Keogh B, Hausenloy DJ, Yellon DM. (2007) Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK pathway. *Basic Res Cardiol*, 102:453-459.
183. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, Andre-Fouet X, Ovize M. (2005) Postconditioning the human heart. *Circulation*, 112:2143-2148.
184. Touboul C, Angoulvant D, Mewton N, Ivanes F, Muntean D, Prunier F, Ovize M, Bejan-Angoulvant T. (2015) Ischaemic postconditioning reduces infarct size: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Cardiovasc Dis*, 108:39-49.
185. Ong SB, Samangouei P, Kalkhoran SB, Hausenloy DJ. (2015) The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 78:23-34.
186. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2004) Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*, 62:74-85.

187. Cohen MV, Philipp S, Krieg T, Cui L, Kuno A, Solodushko V, Downey JM. (2007) Preconditioning-mimetics bradykinin and DADLE activate PI3-kinase through divergent pathways. *J Mol Cell Cardiol*, 42:842-851.
188. Cohen MV, Downey JM. (2015) Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future. *Br J Pharmacol*, 172:1913-1932.
189. Hausenloy DJ, Yellon DM. (2004) New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*, 61:448-460.
190. Ertracht O, Malka A, Atar S, Binah O. (2014) The mitochondria as a target for cardioprotection in acute myocardial ischemia. *Pharmacol Ther*, 142:33-40.
191. Downey JM, Krieg T, Cohen MV. (2008) Mapping preconditioning's signaling pathways: an engineering approach. *Ann N Y Acad Sci*, 1123:187-196.
192. Downey JM, Davis AM, Cohen MV. (2007) Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev*, 12:181-188.
193. Quinlan CL, Costa AD, Costa CL, Pierre SV, Dos Santos P, Garlid KD. (2008) Conditioning the heart induces formation of signalosomes that interact with mitochondria to open mitoKATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295:H953-h961.
194. Ron D, Mochly-Rosen D. (1995) An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:492-496.
195. Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD. (2006) Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291:H2067-2074.
196. Costa AD, Garlid KD. (2008) Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295:H874-882.
197. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*, 113:1535-1549.

198. Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N. (2005) Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res*, 65:10545-10554.
199. Watcharasit P, Bijur GN, Song L, Zhu J, Chen X, Jope RS. (2003) Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. *J Biol Chem*, 278:48872-48879.
200. Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, Ohori K, Hotta H, Terashima Y, Shimamoto K. (2007) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol*, 43:564-570.
201. Azzone GF, Azzi A. (1965) Volume changes in liver mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 53:1084-1089.
202. Anastacio MM, Kanter EM, Makepeace CM, Keith AD, Zhang H, Schuessler RB, Nichols CG, Lawton JS. (2013) Relationship between mitochondrial matrix volume and cellular volume in response to stress and the role of ATP-sensitive potassium channel. *Circulation*, 128:S130-135.
203. Ardehali H, O'Rourke B. (2005) Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J Mol Cell Cardiol*, 39:7-16.
204. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280:H649-657.
205. Bice JS, Baxter GF. (2015) Postconditioning signalling in the heart: mechanisms and translatability. *Br J Pharmacol*, 172:1933-1946.
206. Kuno A, Critz SD, Cui L, Solodushko V, Yang XM, Krahn T, Albrecht B, Philipp S, Cohen MV, Downey JM. (2007) Protein kinase C protects preconditioned rabbit hearts by increasing sensitivity of adenosine A2b-dependent signaling during early reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 43:262-271.
207. Lecour S. (2009) Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion? *J Mol Cell Cardiol*, 46:607-609.

208. Lecour S. (2009) Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol*, 47:32-40.
209. Mann DL. (2003) Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol*, 65:81-101.
210. Dorge H, Schulz R, Belosjorow S, Post H, van de Sand A, Konietzka I, Frede S, Hartung T, Vinten-Johansen J, Youker KA, Entman ML, Erbel R, Heusch G. (2002) Coronary microembolization: the role of TNF-alpha in contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol*, 34:51-62.
211. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. (2009) Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res*, 84:201-208.
212. Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, Osugi T, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. (2001) Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation*, 104:979-981.
213. Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R. (2001) An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:9050-9055.
214. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. (2006) The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291:H827-834.
215. Ozog MA, Bernier SM, Bates DC, Chatterjee B, Lo CW, Naus CC. (2004) The complex of ciliary neurotrophic factor-ciliary neurotrophic factor receptor alpha up-regulates connexin43 and intercellular coupling in astrocytes via the Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Mol Biol Cell*, 15:4761-4774.
216. Lecour S, Smith RM, Woodward B, Opie LH, Rochette L, Sack MN. (2002) Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*, 34:509-518.

217. Somers SJ, Frias M, Lacerda L, Opie LH, Lecour S. (2012) Interplay between SAFE and RISK pathways in sphingosine-1-phosphate-induced cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther*, 26:227-237.
218. Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, Schulz R, Kremastinos DT, Heusch G. (2009) Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol*, 104:469-483.
219. Hausenloy DJ, Erik Botker H, Condorelli G, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Heusch G, Lecour S, van Laake LW, Madonna R, Ruiz-Meana M, Schulz R, Sluijter JP, Yellon DM, Ovize M. (2013) Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*, 98:7-27.
220. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. (2005) Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, 100:295-310.
221. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, Zhao ZQ, Guyton RA, Headrick JP, Vinten-Johansen J. (2005) Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res*, 67:124-133.
222. Lønborg JT. (2015) Targeting reperfusion injury in the era of primary percutaneous coronary intervention: hope or hype? *Heart*, 101:1612-1618.
223. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. (2005) Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*, 111:194-197.
224. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. (2007) The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*, 115:1895-1903.
225. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. (2008) Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic Res Cardiol*, 103:464-471.
226. Lønborg J, Kelbæk H, Vejlstrup N, Jørgensen E, Helqvist S, Saunamäki K, Clemmensen P, Holmvang L, Treiman M, Jensen JS, Engstrøm T. (2010)

- Cardioprotective effects of ischemic postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated by magnetic resonance. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 3:34-41.
227. Hu XQ, Cheng J, Tang B, Zhang ZH, Huang K, Yang YP, Mao YY, Zhong M, Fu SW. (2015) Clinical effect of postconditioning in ST-elevation myocardial infarction patients treated with primary percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Zhejiang Univ Sci B*, 16:198-207.
228. Hahn JY, Yu CW, Park HS, Song YB, Kim EK, Lee HJ, Bae JW, Chung WY, Choi SH, Choi JH, Bae JH, An KJ, Park JS, Oh JH, Kim SW, Hwang JY, Ryu JK, Lim DS, Gwon HC. (2015) Long-term effects of ischemic postconditioning on clinical outcomes: 1-year follow-up of the POST randomized trial. *Am Heart J*, 169:639-646.
229. Iliodromitis EK, Paraskevaïdis IA, Fountoulaki K, Farmakis D, Andreadou I, Antoniadis A, Ikonomidis I, Leftheriotis D, Kremastinos DT. (2009) Staccato reperfusion prevents reperfusion injury in patients undergoing coronary angioplasty: a 1-year follow-up pilot study. *Atherosclerosis*, 204:497-502.
230. Hahn JY, Song YB, Kim EK, Yu CW, Bae JW, Chung WY, Choi SH, Choi JH, Bae JH, An KJ, Park JS, Oh JH, Kim SW, Hwang JY, Ryu JK, Park HS, Lim DS, Gwon HC. (2013) Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial. *Circulation*, 128:1889-1896.
231. Freixa X, Bellera N, Ortiz-Perez JT, Jimenez M, Pare C, Bosch X, De Caralt TM, Betriu A, Masotti M. (2012) Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*, 33:103-112.
232. Kim EK, Hahn JY, Song YB, Lee SC, Choi JH, Choi SH, Lee SH, Choe YH, Gwon HC. (2015) Effect of ischemic postconditioning on myocardial salvage in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction: cardiac magnetic resonance substudy of the POST randomized trial. *Int J Cardiovasc Imaging*, 31:629-637.

233. Bulluck H, Yellon DM, Hausenloy DJ. (2016) Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities. *Heart*, 102:341-348.
234. Yetgin T, Magro M, Manintveld OC, Nauta ST, Cheng JM, den Uil CA, Simsek C, Hersbach F, van Domburg RT, Boersma E, Serruys PW, Duncker DJ, van Geuns RJ, Zijlstra F. (2014) Impact of multiple balloon inflations during primary percutaneous coronary intervention on infarct size and long-term clinical outcomes in ST-segment elevation myocardial infarction: real-world postconditioning. *Basic Res Cardiol*, 109:403.
235. Wu N, Zhang X, Jia P, Jia D. (2015) Hypercholesterolemia abrogates the protective effect of ischemic postconditioning by induction of apoptosis and impairment of activation of reperfusion injury salvage kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 458:148-153.
236. Ungi I, Ungi T, Ruzsa Z, Nagy E, Zimmermann Z, Csont T, Ferdinandy P. (2005) Hypercholesterolemia attenuates the anti-ischemic effect of preconditioning during coronary angioplasty. *Chest*, 128:1623-1628.
237. Badalzadeh R, Mohammadi M, Yousefi B, Farajnia S, Najafi M, Mohammadi S. (2015) Involvement of Glycogen Synthase Kinase-3beta and Oxidation Status in the Loss of Cardioprotection by Postconditioning in Chronic Diabetic Male Rats. *Adv Pharm Bull*, 5:321-327.
238. Li H, Yao W, Liu Z, Xu A, Huang Y, Ma XL, Irwin MG, Xia Z. (2016) Hyperglycemia Abrogates Ischemic Postconditioning Cardioprotection by Impairing AdipoR1/Caveolin-3/STAT3 Signaling in Diabetic Rats. *Diabetes*, 65:942-955.
239. Liu M, Zhou B, Xia ZY, Zhao B, Lei SQ, Yang QJ, Xue R, Leng Y, Xu JJ, Xia Z. (2013) Hyperglycemia-induced inhibition of DJ-1 expression compromised the effectiveness of ischemic postconditioning cardioprotection in rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:564902.
240. Molgaard S, Faricelli B, Salomonsson M, Engstrom T, Treiman M. (2016) Increased myocardial vulnerability to ischemia-reperfusion injury in the presence of left ventricular hypertrophy. *J Hypertens*, 34:513-523; discussion 523.
241. Pichot S, Mewton N, Bejan-Angoulvant T, Roubille F, Rioufol G, Giraud C, Boussaha I, Lairez O, Elbaz M, Piot C, Angoulvant D, Ovize M. (2015) Influence

- of cardiovascular risk factors on infarct size and interaction with mechanical ischaemic postconditioning in ST-elevation myocardial infarction. *Open Heart*, 2:e000175.
242. Wagner C, Ebner B, Tillack D, Strasser RH, Weinbrenner C. (2013) Cardioprotection by ischemic postconditioning is abrogated in hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 61:35-41.
243. Perez V, V DA, Mazo T, Marchini T, Caceres L, Evelson P, Gelpi RJ. (2016) Ischemic postconditioning confers cardioprotection and prevents reduction of Trx-1 in young mice, but not in middle-aged and old mice. *Mol Cell Biochem*, 415:67-76.
244. McCafferty K, Forbes S, Thiemermann C, Yaqoob MM. (2014) The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans: the role of comorbidities. *Dis Model Mech*, 7:1321-1333.
245. Zhou C, Yao Y, Zheng Z, Gong J, Wang W, Hu S, Li L. (2012) Stenting technique, gender, and age are associated with cardioprotection by ischaemic postconditioning in primary coronary intervention: a systematic review of 10 randomized trials. *Eur Heart J*, 33:3070-3077.
246. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R. (2014) Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev*, 66:1142-1174.
247. Yang XM, Cui L, Alhammouri A, Downey JM, Cohen MV. (2013) Triple therapy greatly increases myocardial salvage during ischemia/reperfusion in the in situ rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther*, 27:403-412.
248. Yang XM, Liu Y, Cui L, Yang X, Liu Y, Tandon N, Kambayashi J, Downey JM, Cohen MV. (2013) Two classes of anti-platelet drugs reduce anatomical infarct size in monkey hearts. *Cardiovasc Drugs Ther*, 27:109-115.
249. Roubille F, Tardif JC. (2013) Cardioprotection--time to take into account clinical complexity: the case of antiplatelet agents : editorial to "two classes of anti-platelet drugs reduce anatomical infarct size in monkey hearts" by Xi-Ming Yang et al. *Cardiovasc Drugs Ther*, 27:105-107.

250. Yang XM, Liu Y, Cui L, Yang X, Liu Y, Tandon N, Kambayashi J, Downey JM, Cohen MV. (2013) Platelet P2Y₁(2) blockers confer direct postconditioning-like protection in reperfused rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 18:251-262.
251. Barrabes JA, Inserte J, Mirabet M, Quiroga A, Hernando V, Figueras J, Garcia-Dorado D. (2010) Antagonism of P2Y₁₂ or GPIIb/IIIa receptors reduces platelet-mediated myocardial injury after ischaemia and reperfusion in isolated rat hearts. *Thromb Haemost*, 104:128-135.
252. Iliodromitis EK, Cohen MV, Dargès N, Andreadou I, Kremastinos DT, Downey JM. (2015) What is Wrong With Cardiac Conditioning? We May be Shooting at Moving Targets. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 20:357-369.
253. Roubille F, Lairez O, Mewton N, Rioufol G, Ranc S, Sanchez I, Cung TT, Elbaz M, Piot C, Ovize M. (2012) Cardioprotection by clopidogrel in acute ST-elevated myocardial infarction patients: a retrospective analysis. *Basic Res Cardiol*, 107:275.
254. Safaei N, Sheikhalizadeh MA, Badalzadeh R. (2016) Effect of ischemic postconditioning on myocardial protection in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery with cardiopulmonary bypass. *J Cardiovasc Thorac Res*, 8:65-71.
255. Ji Q, Mei Y, Wang X, Feng J, Wusha D, Cai J, Zhou Y. (2011) Effect of ischemic postconditioning in correction of tetralogy of Fallot. *Int Heart J*, 52:312-317.
256. Louhelainen M, Vahtola E, Forsten H, Merasto S, Kyto V, Finckenberg P, Leskinen H, Kaheinen P, Tikkanen I, Levijoki J, Mervaala E. (2009) Oral levosimendan prevents postinfarct heart failure and cardiac remodeling in diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Hypertens*, 27:2094-2107.
257. Jalanko M, Kivikko M, Harjola VP, Nieminen MS, Laine M. (2011) Oral levosimendan improves filling pressure and systolic function during long-term treatment. *Scand Cardiovasc J*, 45:91-97.
258. Antila S, Pesonen U, Lehtonen L, Tapanainen P, Nikkanen H, Vaahtera K, Scheinin H. (2004) Pharmacokinetics of levosimendan and its active metabolite OR-1896 in rapid and slow acetylators. *Eur J Pharm Sci*, 23:213-222.

259. Nieminen MS, Akkila J, Hasenfuss G, Kleber FX, Lehtonen LA, Mitrovic V, Nyquist O, Remme WJ. (2000) Hemodynamic and neurohumoral effects of continuous infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 36:1903-1912.
260. Antoniades C, Tousoulis D, Koumallos N, Marinou K, Stefanadis C. (2007) Levosimendan: Beyond its simple inotropic effect in heart failure. *Pharmacol Ther*, 114:184-197.
261. Lilleberg J, Laine M, Palkama T, Kivikko M, Pohjanjousi P, Kupari M. (2007) Duration of the haemodynamic action of a 24-h infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*, 9:75-82.
262. Szilagyi S, Pollesello P, Levijoki J, Kaheinen P, Haikala H, Edes I, Papp Z. (2004) The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *Eur J Pharmacol*, 486:67-74.
263. Haikala H, Linden IB. (1995) Mechanisms of action of calcium-sensitizing drugs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26 Suppl 1:S10-19.
264. Pollesello P, Papp Z, Papp JG. (2016) Calcium sensitizers: What have we learned over the last 25 years? *Int J Cardiol*, 203:543-548.
265. Robertson IM, Pineda-Sanabria SE, Yan Z, Kampourakis T, Sun YB, Sykes BD, Irving M. (2016) Reversible Covalent Binding to Cardiac Troponin C by the Ca²⁺-sensitizer Levosimendan. *Biochemistry*.
266. Haikala H, Nissinen E, Etemadzadeh E, Levijoki J, Linden IB. (1995) Troponin C-mediated calcium sensitization induced by levosimendan does not impair relaxation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 25:794-801.
267. Jorgensen K, Bech-Hanssen O, Houltz E, Ricksten SE. (2008) Effects of levosimendan on left ventricular relaxation and early filling at maintained preload and afterload conditions after aortic valve replacement for aortic stenosis. *Circulation*, 117:1075-1081.
268. Szilagyi S, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H, Bak I, Tosaki A, Borbely A, Edes I, Papp Z. (2005) Two inotropes with different mechanisms of action: contractile, PDE-inhibitory and direct myofibrillar effects of levosimendan and enoximone. *J Cardiovasc Pharmacol*, 46:369-376.

269. Erdei N, Papp Z, Pollesello P, Edes I, Bagi Z. (2006) The levosimendan metabolite OR-1896 elicits vasodilation by activating the K(ATP) and BK(Ca) channels in rat isolated arterioles. *Br J Pharmacol*, 148:696-702.
270. Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. (1997) Levosimendan, a novel Ca²⁺ sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K⁺ channel in rat arterial myocytes. *Eur J Pharmacol*, 333:249-259.
271. Pataricza J, Hohn J, Petri A, Balogh A, Papp JG. (2000) Comparison of the vasorelaxing effect of cromakalim and the new inodilator, levosimendan, in human isolated portal vein. *J Pharm Pharmacol*, 52:213-217.
272. Kersten JR, Montgomery MW, Pagel PS, Warltier DC. (2000) Levosimendan, a new positive inotropic drug, decreases myocardial infarct size via activation of K(ATP) channels. *Anesth Analg*, 90:5-11.
273. Kaheinen P, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H. (2001) Levosimendan increases diastolic coronary flow in isolated guinea-pig heart by opening ATP-sensitive potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol*, 37:367-374.
274. Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. (1997) The novel calcium sensitizer levosimendan activates the ATP-sensitive K⁺ channel in rat ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 283:375-383.
275. Quast U, Guillon JM, Cavero I. (1994) Cellular pharmacology of potassium channel openers in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*, 28:805-810.
276. Kopustinskiene DM, Pollesello P, Saris NE. Levosimendan is a mitochondrial K(ATP) channel opener. *European Journal of Pharmacology*, 428:311-314.
277. Ibrahim MA, Abdel-Gaber SA, Amin EF, Ibrahim SA, Mohammed RK, Abdelrahman AM. Molecular mechanisms contributing to the protective effect of levosimendan in liver ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Pharmacology*, 741:64-73.
278. Torraco A, Carrozzo R, Piemonte F, Pastore A, Tozzi G, Verrigni D, Assenza M, Orecchioni A, D'Egidio A, Marraffa E, Landoni G, Bertini E, Morelli A. (2014) Effects of levosimendan on mitochondrial function in patients with septic shock: a randomized trial. *Biochimie*, 102:166-173.
279. Sommer S, Leistner M, Aleksic I, Schimmer C, Alhussini K, Kanofsky P, Leyh RG, Sommer SP. (2016) Impact of levosimendan and ischaemia-reperfusion

- injury on myocardial subsarcolemmal mitochondrial respiratory chain, mitochondrial membrane potential, Ca²⁺ cycling and ATP synthesis. *Eur J Cardiothorac Surg*, 49:e54-62; discussion e62.
280. Caimmi PP, Molinari C, Uberti F, Micalizzi E, Valente G, Mary DA, Vacca G, Grossini E. (2011) Intracoronary levosimendan prevents myocardial ischemic damages and activates survival signaling through ATP-sensitive potassium channel and nitric oxide. *Eur J Cardiothorac Surg*, 39:e59-67.
 281. Malmberg M, Vahasilta T, Saraste A, Koskenvuo JW, Parkka JP, Leino K, Laitio T, Stark C, Heikkila A, Saukko P, Savunen T. (2012) Intracoronary Levosimendan during Ischemia Prevents Myocardial Apoptosis. *Front Physiol*, 3:17.
 282. Kyzopoulos S, Adamopoulos S, Parissis JT, Rassias J, Kostakis G, Iliodromitis E, Degiannis D, Kremastinos DT. (2005) Levosimendan reduces plasma B-type natriuretic peptide and interleukin 6, and improves central hemodynamics in severe heart failure patients. *International Journal of Cardiology*, 99:409-413.
 283. Packer M, Colucci W, Fisher L, Massie BM, Teerlink JR, Young J, Padley RJ, Thakkar R, Delgado-Herrera L, Salon J, Garratt C, Huang B, Sarapohja T. (2013) Effect of levosimendan on the short-term clinical course of patients with acutely decompensated heart failure. *JACC Heart Fail*, 1:103-111.
 284. Parissis JT, Panou F, Farmakis D, Adamopoulos S, Filippatos G, Paraskevaidis I, Venetsanou K, Lekakis J, Kremastinos DT. (2005) Effects of levosimendan on markers of left ventricular diastolic function and neurohormonal activation in patients with advanced heart failure. *Am J Cardiol*, 96:423-426.
 285. Slawsky MT, Colucci WS, Gottlieb SS, Greenberg BH, Haeusslein E, Hare J, Hutchins S, Leier CV, LeJemtel TH, Loh E, Nicklas J, Ogilby D, Singh BN, Smith W. (2000) Acute hemodynamic and clinical effects of levosimendan in patients with severe heart failure. Study Investigators. *Circulation*, 102:2222-2227.
 286. Kivikko M, Lehtonen L, Colucci WS. (2003) Sustained hemodynamic effects of intravenous levosimendan. *Circulation*, 107:81-86.
 287. Mebazaa A, Nieminen MS, Filippatos GS, Cleland JG, Salon JE, Thakkar R, Padley RJ, Huang B, Cohen-Solal A. (2009) Levosimendan vs. dobutamine:

- outcomes for acute heart failure patients on beta-blockers in SURVIVE. *Eur J Heart Fail*, 11:304-311.
288. Drakos SG, Kanakakis JV, Nanas S, Bonios M, Kaldara E, Katsaros F, Pantisios C, Nanas JN. (2009) Intermittent inotropic infusions combined with prophylactic oral amiodarone for patients with decompensated end-stage heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, 53:157-161.
289. Yontar OC, Yilmaz MB, Yalta K, Erdem A, Tandogan I. (2010) Acute effects of levosimendan and dobutamine on QRS duration in patients with heart failure. *Arq Bras Cardiol*, 95:738-742.
290. du Toit E, Hofmann D, McCarthy J, Pineda C. (2001) Effect of levosimendan on myocardial contractility, coronary and peripheral blood flow, and arrhythmias during coronary artery ligation and reperfusion in the in vivo pig model. *Heart*, 86:81-87.
291. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. (2011) Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 50:940-950.
292. Rump AF, Acar D, Klaus W. (1994) A quantitative comparison of functional and anti-ischaemic effects of the phosphodiesterase-inhibitors, amrinone, milrinone and levosimendan in rabbit isolated hearts. *Br J Pharmacol*, 112:757-762.
293. Levijoki J, Pollesello P, Kaheinen P, Haikala H. (2001) Improved survival with simendan after experimental myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmacol*, 419:243-248.
294. Tarkia M, Stark C, Haavisto M, Kentala R, Vahasilta T, Savunen T, Strandberg M, Saunavaara V, Tolvanen T, Teras M, Pietila M, Nyman L, Duvall E, Saukko P, Levijoki J, Roivainen A, Saraste A, Knuuti J. (2016) Effect of levosimendan therapy on myocardial infarct size and left ventricular function after acute coronary occlusion. *Heart*, 102:465-471.
295. De Luca L, Proietti P, Celotto A, Bucciarelli-Ducci C, Benedetti G, Di Roma A, Sardella G, Genuini I, Fedele F. (2005) Levosimendan improves hemodynamics and coronary flow reserve after percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Am Heart J*, 150:563-568.

296. Sonntag S, Sundberg S, Lehtonen LA, Kleber FX. (2004) The calcium sensitizer levosimendan improves the function of stunned myocardium after percutaneous transluminal coronary angioplasty in acute myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 43:2177-2182.
297. Husebye T, Eritsland J, Muller C, Sandvik L, Arnesen H, Seljeflot I, Mangschau A, Bjornerheim R, Andersen GO. (2013) Levosimendan in acute heart failure following primary percutaneous coronary intervention-treated acute ST-elevation myocardial infarction. Results from the LEAF trial: a randomized, placebo-controlled study. *Eur J Heart Fail*, 15:565-572.
298. Moiseyev VS, Poder P, Andrejevs N, Ruda MY, Golikov AP, Lazebnik LB, Kobalava ZD, Lehtonen LA, Laine T, Nieminen MS, Lie KI. (2002) Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN). *Eur Heart J*, 23:1422-1432.
299. Lilleberg J, Nieminen MS, Akkila J, Heikkila L, Kuitunen A, Lehtonen L, Verkkala K, Mattila S, Salmenpera M. (1998) Effects of a new calcium sensitizer, levosimendan, on haemodynamics, coronary blood flow and myocardial substrate utilization early after coronary artery bypass grafting. *Eur Heart J*, 19:660-668.
300. Pieske B. (2002) Levosimendan in regional myocardial ischemia. *Cardiovasc Drugs Ther*, 16:379-381.
301. Tassani P, Schad H, Heimisch W, Bernhard-Abt A, Ettner U, Mendler N, Lange R. (2002) Effect of the calcium sensitizer levosimendan on the performance of ischaemic myocardium in anaesthetised pigs. *Cardiovasc Drugs Ther*, 16:435-441.
302. Follath F, Cleland JG, Just H, Papp JG, Scholz H, Peuhkurinen K, Harjola VP, Mitrovic V, Abdalla M, Sandell EP, Lehtonen L. (2002) Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. *Lancet*, 360:196-202.
303. Mebazaa A, Nieminen MS, Packer M, Cohen-Solal A, Kleber FX, Pocock SJ, Thakkar R, Padley RJ, Poder P, Kivikko M. (2007) Levosimendan vs dobutamine for patients with acute decompensated heart failure: the SURVIVE Randomized Trial. *Jama*, 297:1883-1891.

304. De Backer D, Biston P, Devriendt J, Madl C, Chochrad D, Aldecoa C, Brasseur A, Defrance P, Gottignies P, Vincent JL. (2010) Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock. *N Engl J Med*, 362:779-789.
305. Krell MJ, Kline EM, Bates ER, Hodgson JM, Dilworth LR, Laufer N, Vogel RA, Pitt B. (1986) Intermittent, ambulatory dobutamine infusions in patients with severe congestive heart failure. *Am Heart J*, 112:787-791.
306. Tacon CL, McCaffrey J, Delaney A. (2012) Dobutamine for patients with severe heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Intensive Care Med*, 38:359-367.
307. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML, Mallis GI, Sollano JA, Shannon J, Tandon PK, DeMets DL, Group* tPSR. (1991) Effect of Oral Milrinone on Mortality in Severe Chronic Heart Failure. *N Engl J Med*, 325:1468-1475.
308. Cohn JN, Goldstein SO, Greenberg BH, Lorell BH, Bourge RC, Jaski BE, Gottlieb SO, McGrew F, 3rd, DeMets DL, White BG. (1998) A dose-dependent increase in mortality with vesnarinone among patients with severe heart failure. Vesnarinone Trial Investigators. *N Engl J Med*, 339:1810-1816.
309. Sackner-Bernstein JD, Kowalski M, Fox M, Aaronson K. (2005) Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *Jama*, 293:1900-1905.
310. O'Connor CM, Starling RC, Hernandez AF, Armstrong PW, Dickstein K, Hasselblad V, Heizer GM, Komajda M, Massie BM, McMurray JJV, Nieminen MS, Reist CJ, Rouleau JL, Swedberg K, Adams KFJ, Anker SD, Atar D, Battler A, Botero R, Bohidar NR, Butler J, Clausell N, Corbalán R, Costanzo MR, Dahlstrom U, Deckelbaum LI, Diaz R, Dunlap ME, Ezekowitz JA, Feldman D, Felker GM, Fonarow GC, Gennevois D, Gottlieb SS, Hill JA, Hollander JE, Howlett JG, Hudson MP, Kociol RD, Krum H, Laucevicius A, Levy WC, Méndez GF, Metra M, Mittal S, Oh B-H, Pereira NL, Ponikowski P, Tang WHW, Tanomsup S, Teerlink JR, Triposkiadis F, Troughton RW, Voors AA, Whellan DJ, Zannad F, Califf RM. (2011) Effect of Nesiritide in Patients with Acute Decompensated Heart Failure. *N Engl J Med*, 365:32-43.

311. O'Connor CM, Starling RC, Hernandez AF, Armstrong PW, Dickstein K, Hasselblad V, Heizer GM, Komajda M, Massie BM, McMurray JJV, Nieminen MS, Reist CJ, Rouleau JL, Swedberg K, Adams KFJ, Anker SD, Atar D, Battler A, Botero R, Bohidar NR, Butler J, Clausell N, Corbalán R, Costanzo MR, Dahlstrom U, Deckelbaum LI, Diaz R, Dunlap ME, Ezekowitz JA, Feldman D, Felker GM, Fonarow GC, Gennevois D, Gottlieb SS, Hill JA, Hollander JE, Howlett JG, Hudson MP, Kociol RD, Krum H, Laucevicius A, Levy WC, Méndez GF, Metra M, Mittal S, Oh B-H, Pereira NL, Ponikowski P, Tang WHW, Tanomsup S, Teerlink JR, Triposkiadis F, Troughton RW, Voors AA, Whellan DJ, Zannad F, Califf RM. (2011) Effect of Nesiritide in Patients with Acute Decompensated Heart Failure. *N Engl J Med*, 365:773-773.
312. Kivikko M, Pollesello P, Tarvasmaki T, Sarapohja T, Nieminen MS, Harjola VP. (2016) Effect of baseline characteristics on mortality in the SURVIVE trial on the effect of levosimendan vs dobutamine in acute heart failure: Sub-analysis of the Finnish patients. *Int J Cardiol*, 215:26-31.
313. Landoni G, Biondi-Zoccai G, Greco M, Greco T, Bignami E, Morelli A, Guarracino F, Zangrillo A. (2012) Effects of levosimendan on mortality and hospitalization. A meta-analysis of randomized controlled studies. *Crit Care Med*, 40:634-646.
314. Koster G, Wetterslev J, Gluud C, Zijlstra JG, Scheeren TW, van der Horst IC, Keus F. (2015) Effects of levosimendan for low cardiac output syndrome in critically ill patients: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Intensive Care Med*, 41:203-221.
315. Pollesello P, Parissis J, Kivikko M, Harjola VP. (2016) Levosimendan meta-analyses: Is there a pattern in the effect on mortality? *Int J Cardiol*, 209:77-83.
316. Gyurkovics E, Aranyi P, Turóczy Z, Garbaisz D, Varga M, Hegedüs V, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2010) Postconditioning attenuates remote organ injury after lower limb arterial occlusion. *Interventional Medicine and Applied Science*, 2:169-177.
317. Turoczy Z, Aranyi P, Varga M, Garbaisz D, Lotz G, Kupcsulik P, Szijarto A. (2010) Modeling acute critical ischemia in vascular surgery. *British Journal of Surgery*, 97:S14-S14.

318. Turóczy Z, Arányi P, Lukáts Á, Garbaisz D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. (2014) Muscle Fiber Viability, a Novel Method for the Fast Detection of Ischemic Muscle Injury in Rats. *PLoS one*, 9:e84783.
319. Szijártó A, Turóczy Z, Arányi P, Nagy Z, Gyurkovics E. (2010) Akut kritikus ischaemia az alsó végtagon. *Orv Hetil*, 151:2057-2066.
320. Aranyi P, Turoczi Z, Garbaisz D, Lotz G, Geleji J, Hegedus V, Rakonczay Z, Balla Z, Harsanyi L, Szijarto A. (2015) Postconditioning in major vascular surgery: prevention of renal failure. *J Transl Med*, 13:21.
321. Onody P, Aranyi P, Turoczi Z, Stangl R, Fulop A, Dudas E, Lotz G, Szijarto A. (2016) Levosimendan Administration in Limb Ischemia: Multicomponent Signaling Serving Kidney Protection. *PLoS One*, 11:e0163675.
322. Turoczi Z, Aranyi P, Lukats A, Garbaisz D, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats. *PLoS One*, 9:e84783.
323. Matsue Y, van der Meer P, Damman K, Metra M, O'Connor CM, Ponikowski P, Teerlink JR, Cotter G, Davison B, Cleland JG, Givertz MM, Bloomfield DM, Dittrich HC, Gansevoort RT, Bakker SJ, van der Harst P, Hillege HL, van Veldhuisen DJ, Voors AA. (2016) Blood urea nitrogen-to-creatinine ratio in the general population and in patients with acute heart failure. *Heart*.
324. Needham E. (2005) Management of acute renal failure. *Am Fam Physician*, 72:1739-1746.
325. Andreucci M, Faga T, Pisani A, Perticone M, Michael A. (2016) The ischemic/nephrotoxic Acute Kidney Injury and the use of renal biomarkers in clinical practice. *Eur J Intern Med*.
326. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. (2015) Biomarkers of renal function, which and when? *Clin Chim Acta*, 438:350-357.
327. Prowle J, Bagshaw SM, Bellomo R. (2012) Renal blood flow, fractional excretion of sodium and acute kidney injury: time for a new paradigm? *Curr Opin Crit Care*, 18:585-592.
328. Stapleton FB, Jones DP, Green RS. (1987) Acute renal failure in neonates: incidence, etiology and outcome. *Pediatr Nephrol*, 1:314-320.

329. Sezai A, Nakata K, Iida M, Yoshitake I, Wakui S, Hata H, Shiono M. (2014) Early results of human atrial natriuretic peptide infusion in non-dialysis patients with chronic kidney disease undergoing isolated coronary artery bypass grafting: the NU-HIT trial for CKD-II. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 20:217-222.
330. Barratt M: *Oxford Handbook of Clinical Nephrology*. 3rd Edition edn; 2005.
331. Petersen LJ. (2013) Direct comparison of laser Doppler flowmetry and laser Doppler imaging for assessment of experimentally-induced inflammation in human skin. *Inflamm Res*, 62:1073-1078.
332. Engelhart M, Petersen LJ, Kristensen JK. (1988) The Local Regulation of Blood Flow Evaluated Simultaneously by 133-Xenon Washout and Laser Doppler Flowmetry. *Journal of Investigative Dermatology*, 91:451-453.
333. Szijarto A, Hahn O, Lotz G, Schaff Z, Madarasz E, Kupcsulik PK. (2006) Effect of ischemic preconditioning on rat liver microcirculation monitored with laser Doppler flowmetry. *J Surg Res*, 131:150-157.
334. Rakonczay Z, Jarmay K, Kaszaki J, Mandi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takacs T. (2003) NF-kappa B activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 34:696-709.
335. Kurucz I, Tombor B, Prechl J, Erdo F, Hegedus E, Nagy Z, Vitai M, Koranyi L, Laszlo L. (1999) Ultrastructural localization of Hsp-72 examined with a new polyclonal antibody raised against the truncated variable domain of the heat shock protein. *Cell Stress Chaperones*, 4:139-152.
336. Top 10 causes for death. In *Fact sheet No 310*, Updated May 2014 edition. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>: World Health Organization.
337. Heron M. (2016) Deaths: Leading causes for 2014. *NCHS Data Brief*, 65:1-96.
338. Murphy SL, Kochanek KD, Xu J, Arias E. (2015) Mortality in the United States, 2014. *NCHS Data Brief*, 229:1-8.
339. Zhao ZQ. (2010) Postconditioning in reperfusion injury: a status report. *Cardiovasc Drugs Ther*, 24:265-279.
340. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Yellon DM, Deanfield JE, MacAllister RJ. (2006) Postconditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury in the human forearm. *Circulation*, 113:1015-1019.

341. Zhang ZY, Liu XH, Guo XS, Liu FY. (2007) [Calreticulin is involved in ischemic postconditioning-induced attenuation of ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle]. *Sheng Li Xue Bao*, 59:643-650.
342. Sinay L, Kurthy M, Horvath S, Arato E, Shafiei M, Lantos J, Ferencz S, Bator A, Balatonyi B, Verzar Z, Suto B, Kollar L, Weber G, Roth E, Jancso G. (2008) Ischaemic postconditioning reduces peroxide formation, cytokine expression and leukocyte activation in reperfusion injury after abdominal aortic surgery in rat model. *Clin Hemorheol Microcirc*, 40:133-142.
343. Szijarto A, Gyurkovics E, Aranyi P, Onody P, Stangl R, Tatrai M, Lotz G, Mihaly Z, Hegedus V, Blazovics A, Kupcsulik P. (2009) [Effect of postconditioning in major vascular operations on rats]. *Magy Seb*, 62:180-187.
344. Yan H, Zhang F, Kochevar AJ, Akdemir O, Gao W, Angel M. (2010) The effect of postconditioning on the muscle flap survival after ischemia-reperfusion injury in rats. *J Invest Surg*, 23:249-256.
345. Park JW, Kang JW, Jeon WJ, Na HS. (2010) Postconditioning protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery*, 30:223-229.
346. Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, Piquard F, Geny B. (2011) Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg*, 98:511-516.
347. Guo XS, Li YZ, Liu XH, Zhang ZY, Liu FY, Hu WC. (2011) Calcineurin mediates the protective effect of postconditioning on skeletal muscle. *Shock*, 36:312-316.
348. Eberlin KR, McCormack MC, Nguyen JT, Tatlidede HS, Randolph MA, Austen WG, Jr. (2009) Sequential limb ischemia demonstrates remote postconditioning protection of murine skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg*, 123:8s-16s.
349. Liang H, Yu F, Tong Z, Yuan B, Wang C. (2013) Effect of ischemia postconditioning on skeletal muscle oxidative injury, mTOR, Bax, Bcl-2 proteins expression, and HIF-1alpha/beta-actin mRNA, IL-6/beta-actin mRNA and caveolin-3/beta-actin mRNA expression in ischemia-reperfusion rabbits. *Mol Biol Rep*, 40:507-514.

350. Wang T, Zhou YT, Chen XN, Zhu AX. (2014) Putative role of ischemic postconditioning in a rat model of limb ischemia and reperfusion: involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha expression. *Braz J Med Biol Res*, 47:738-745.
351. Nagy T, Kovacs V, Hardi P, Veres TG, Takacs I, Jancso G, Sinay L, Fazekas G, Pinter O, Arato E. (2015) Inhibition of Glutathione S-Transferase by Ethacrynic Acid Augments Ischemia-Reperfusion Damage and Apoptosis and Attenuates the Positive Effect of Ischemic Postconditioning in a Bilateral Acute Hindlimb Ischemia Rat Model. *J Vasc Res*, 52:53-61.
352. Schmucker RW, Mendenhall SD, Reichensperger JD, Yang M, Neumeister MW. (2015) Defining the Salvage Time Window for the Use of Ischemic Postconditioning in Skeletal Muscle Ischemia Reperfusion Injury. *J Reconstr Microsurg*, 31:597-606.
353. Naparus A, Ashrafpour H, Hofer SO, Zhong T, Huang N, Cahoon NJ, McAllister SE, Neligan PC, Roy T, Lipa JE, Pang CY. (2012) Efficacy and mechanism of hypoxic postconditioning in salvage of ex vivo human rectus abdominis muscle from hypoxia/reoxygenation injury. *Eur J Pharmacol*, 686:90-96.
354. Naparus A, Ashrafpour H, Huang N, Hofer SO, Zhong T, Forrest CR, Pang CY. (2012) Combination of hypoxic preconditioning and postconditioning does not induce additive protection of ex vivo human skeletal muscle from hypoxia/reoxygenation injury. *J Cardiovasc Pharmacol*, 60:347-356.
355. Mansour Z, Charles AL, Bouitbir J, Pottecher J, Kindo M, Mazzucotelli JP, Zoll J, Geny B. (2012) Remote and local ischemic postconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion. *J Vasc Surg*, 56:774-782.e771.
356. Gyurkovics E, Aranyi P, Stangl R, Onody P, Ferreira G, Lotz G, Kupcsulik P, Szijarto A. (2011) Postconditioning of the lower limb--protection against the reperfusion syndrome. *J Surg Res*, 169:139-147.
357. Rosero O, Nemeth K, Turoczi Z, Fulop A, Garbaisz D, Gyorffy A, Szuak A, Dorogi B, Kiss M, Nemeskeri A, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Collateral circulation of the rat lower limb and its significance in ischemia-reperfusion studies. *Surg Today*, 44:2345-2353.

358. Barie PS, Mullins RJ. (1988) Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. *J Surg Res*, 44:284-307.
359. Holt S, Moore K. (2000) Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: the role of myoglobin. *Exp Nephrol*, 8:72-76.
360. Salahudeen AK, Wang C, Bigler SA, Dai Z, Tachikawa H. (1996) Synergistic renal protection by combining alkaline-diuresis with lipid peroxidation inhibitors in rhabdomyolysis: possible interaction between oxidant and non-oxidant mechanisms. *Nephrol Dial Transplant*, 11:635-642.
361. Zager RA. (1996) Mitochondrial free radical production induces lipid peroxidation during myohemoglobinuria. *Kidney Int*, 49:741-751.
362. Paller MS. (1988) Hemoglobin- and myoglobin-induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity. *Am J Physiol*, 255:F539-544.
363. Shah SV, Walker PD. (1988) Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure. *Am J Physiol*, 255:F438-443.
364. Heyman SN, Greenbaum R, Shina A, Rosen S, Brezis M. (1997) Myoglobinuric acute renal failure in the rat: a role for acidosis? *Exp Nephrol*, 5:210-216.
365. Blantz RC. (1998) Pathophysiology of pre-renal azotemia. *Kidney Int*, 53:512-523.
366. Thomson SC, Blantz RC. (2008) Glomerulotubular balance, tubuloglomerular feedback, and salt homeostasis. *J Am Soc Nephrol*, 19:2272-2275.
367. Marber MS, Mestrlil R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. (1995) Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest*, 95:1446-1456.
368. Hatoko M, Tanaka A, Kuwahara M, Yurugi S, Iioka H, Niitsuma K. (2002) Stress response of systemic organs to ischemia-reperfusion of rat hind limb – study of induction of 72-kD stress protein (HSP72). *European Journal of Plastic Surgery*, 25:143-148.
369. Loukogeorgakis SP, Williams R, Panagiotidou AT, Kolvekar SK, Donald A, Cole TJ, Yellon DM, Deanfield JE, MacAllister RJ. (2007) Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation*, 116:1386-1395.

370. Bouleti C, Mewton N, Germain S. (2015) The no-reflow phenomenon: State of the art. *Arch Cardiovasc Dis*, 108:661-674.
371. Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Mirabet M, Inserte J, Agullo L, Soriano B, Massaguer A, Padilla F, Lidon RM, Soler-Soler J. (2005) Antagonism of selectin function attenuates microvascular platelet deposition and platelet-mediated myocardial injury after transient ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 45:293-299.
372. Heusch G, Kleinbongard P, Bose D, Levkau B, Haude M, Schulz R, Erbel R. (2009) Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside. *Circulation*, 120:1822-1836.
373. Arumugam TV, Magnus T, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM. (2006) Complement mediators in ischemia–reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta*, 374:33-45.
374. Chakraborti T, Mandal A, Mandal M, Das S, Chakraborti S. (2000) Complement activation in heart diseases. Role of oxidants. *Cell Signal*, 12:607-617.
375. Papp Z, Edes I, Fruhwald S, De Hert SG, Salmenpera M, Leppikangas H, Mebazaa A, Landoni G, Grossini E, Caimmi P, Morelli A, Guarracino F, Schwinger RH, Meyer S, Algotsson L, Wikstrom BG, Jorgensen K, Filippatos G, Parissis JT, Gonzalez MJ, Parkhomenko A, Yilmaz MB, Kivikko M, Pollesello P, Follath F. (2012) Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int J Cardiol*, 159:82-87.
376. Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikainen PJ. (2002) Pharmacokinetics of levosimendan and its metabolites during and after a 24-hour continuous infusion in patients with severe heart failure. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 40:465-471.
377. Sorsa T, Pollesello P, Rosevear PR, Drakenberg T, Kilpelainen I. (2004) Stereoselective binding of levosimendan to cardiac troponin C causes Ca²⁺-sensitization. *Eur J Pharmacol*, 486:1-8.
378. Du Toit EF, Muller CA, McCarthy J, Opie LH. (1999) Levosimendan: effects of a calcium sensitizer on function and arrhythmias and cyclic nucleotide levels during ischemia/reperfusion in the Langendorff-perfused guinea pig heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 290:505-514.

379. Gruhn N, Nielsen-Kudsk JE, Theilgaard S, Bang L, Olesen SP, Aldershvile J. (1998) Coronary vasorelaxant effect of levosimendan, a new inodilator with calcium-sensitizing properties. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31:741-749.
380. Pataricza J, Krassoi I, Hohn J, Kun A, Papp JG. (2003) Functional role of potassium channels in the vasodilating mechanism of levosimendan in porcine isolated coronary artery. *Cardiovasc Drugs Ther*, 17:115-121.
381. Harkin CP, Pagel PS, Tessmer JP, Warltier DC. (1995) Systemic and coronary hemodynamic actions and left ventricular functional effects of levosimendan in conscious dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26:179-188.
382. Yokoshiki H, Sperelakis N. (2003) Vasodilating mechanisms of levosimendan. *Cardiovasc Drugs Ther*, 17:111-113.
383. Kopustinskiene DM, Pollesello P, Saris NE. (2001) Levosimendan is a mitochondrial K(ATP) channel opener. *Eur J Pharmacol*, 428:311-314.
384. Li PC, Yang YC, Hwang GY, Kao LS, Lin CY. (2014) Inhibition of reverse-mode sodium-calcium exchanger activity and apoptosis by levosimendan in human cardiomyocyte progenitor cell-derived cardiomyocytes after anoxia and reoxygenation. *PLoS One*, 9:e85909.
385. Gross GJ, Fryer RM. (2000) Mitochondrial K(ATP) channels: triggers or distal effectors of ischemic or pharmacological preconditioning? *Circ Res*, 87:431-433.
386. Parissis JT, Andreadou I, Markantonis SL, Bistola V, Louka A, Pyriochou A, Paraskevaidis I, Filippatos G, Iliodromitis EK, Kremastinos DT. (2007) Effects of Levosimendan on circulating markers of oxidative and nitrosative stress in patients with advanced heart failure. *Atherosclerosis*, 195:e210-e215.
387. Kaptan K, Erinc K, Ifran A, Yildirim V, Uzun M, Beyan C, Isik E. (2008) Levosimendan has an inhibitory effect on platelet function. *Am J Hematol*, 83:46-49.
388. Adamopoulos S, Parissis JT, Iliodromitis EK, Paraskevaidis I, Tsiapras D, Farmakis D, Karatzas D, Gheorghiade M, Filippatos GS, Kremastinos DT. (2006) Effects of levosimendan versus dobutamine on inflammatory and apoptotic pathways in acutely decompensated chronic heart failure. *Am J Cardiol*, 98:102-106.

389. Tallgren M, Niemi T, Poyhia R, Raininko E, Railo M, Salmenpera M, Lepantalo M, Hynninen M. (2007) Acute renal injury and dysfunction following elective abdominal aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 33:550-555.
390. du Toit EF, Genis A, Opie LH, Pollesello P, Lochner A. (2008) A role for the RISK pathway and K(ATP) channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart. *Br J Pharmacol*, 154:41-50.
391. Morelli A, Ertmer C, Pietropaoli P, Westphal M. (2009) Reducing the risk of major elective non-cardiac surgery: is there a role for levosimendan in the preoperative optimization of cardiac function? *Curr Drug Targets*, 10:863-871.
392. Delle Karth G, Buberl A, Geppert A, Neunteufl T, Huelsmann M, Kopp C, Nikfardjam M, Berger R, Heinz G. (2003) Hemodynamic effects of a continuous infusion of levosimendan in critically ill patients with cardiogenic shock requiring catecholamines. *Acta Anaesthesiol Scand*, 47:1251-1256.
393. Morelli A, Donati A, Ertmer C, Rehberg S, Lange M, Orecchioni A, Cecchini V, Landoni G, Pelaia P, Pietropaoli P, Van Aken H, Teboul JL, Ince C, Westphal M. (2010) Levosimendan for resuscitating the microcirculation in patients with septic shock: a randomized controlled study. *Crit Care*, 14:R232.
394. Bragadottir G, Redfors B, Ricksten SE. (2013) Effects of levosimendan on glomerular filtration rate, renal blood flow, and renal oxygenation after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a randomized placebo-controlled study. *Crit Care Med*, 41:2328-2335.
395. Parissis JT, Paraskevaidis I, Bistola V, Farmakis D, Panou F, Kourea K, Nikolaou M, Filippatos G, Kremastinos D. (2006) Effects of levosimendan on right ventricular function in patients with advanced heart failure. *Am J Cardiol*, 98:1489-1492.
396. Zager RA, Johnson AC, Lund S, Hanson SY, Abrass CK. (2006) Levosimendan protects against experimental endotoxemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290:F1453-1462.
397. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. (1999) Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*, 99:1492-1498.

398. Arras M, Strasser R, Mohri M, Doll R, Eckert P, Schaper W, Schaper J. (1998) Tumor necrosis factor-alpha is expressed by monocytes/macrophages following cardiac microembolization and is antagonized by cyclosporine. *Basic Res Cardiol*, 93:97-107.
399. Pagani FD, Baker LS, Hsi C, Knox M, Fink MP, Visner MS. (1992) Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs. *J Clin Invest*, 90:389-398.
400. Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. (1995) Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol*, 146:419-428.
401. Moro C, Jouan MG, Rakotovo A, Toufektsian MC, Ormezzano O, Nagy N, Tosaki A, de Leiris J, Boucher F. (2007) Delayed expression of cytokines after reperfused myocardial infarction: possible trigger for cardiac dysfunction and ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293:H3014-3019.
402. Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. (1997) Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res*, 81:187-195.
403. Mann DL. (2002) Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*, 91:988-998.
404. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. (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 U S A*, 97:5456-5461.
405. Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z, Mann DL. (1998) Tumor necrosis factor-alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation*, 97:1392-1400.
406. Flaherty MP, Guo Y, Tiwari S, Rezazadeh A, Hunt G, Sanganalmath SK, Tang XL, Bolli R, Dawn B. (2008) The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 45:735-741.
407. Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K. (2007) Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and

- protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293:H743-753.
408. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper J, Volk HD, Coats AJ, Anker SD. (2000) Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 102:3060-3067.
409. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. (2001) Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation*, 103:2055-2059.
410. Kin H, Wang NP, Mykytenko J, Reeves J, Deneve J, Jiang R, Zatta AJ, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. (2008) Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release. *Shock*, 29:761-768.
411. Ramesh G, Reeves WB. (2004) Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl*:S56-61.
412. Sorensson P, Saleh N, Bouvier F, Bohm F, Settergren M, Caidahl K, Tornvall P, Arheden H, Ryden L, Pernow J. (2010) Effect of postconditioning on infarct size in patients with ST elevation myocardial infarction. *Heart*, 96:1710-1715.
413. Limalanathan S, Andersen GO, Klow NE, Abdelnoor M, Hoffmann P, Eritsland J. (2014) Effect of ischemic postconditioning on infarct size in patients with ST-elevation myocardial infarction treated by primary PCI results of the POSTEMI (POstconditioning in ST-Elevation Myocardial Infarction) randomized trial. *J Am Heart Assoc*, 3:e000679.
414. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blomstrom-Lundqvist C, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW, Valgimigli M, van 't Hof A, Widimsky P, Zahger D. (2012) ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*, 33:2569-2619.
415. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, Collet JP, Cremer J, Falk V, Filippatos G, Hamm C, Head SJ, Juni P, Kappetein AP, Kastrati A, Knuuti J, Landmesser U, Laufer G,

- Neumann FJ, Richter DJ, Schauerte P, Sousa Uva M, Stefanini GG, Taggart DP, Torracca L, Valgimigli M, Wijns W, Witkowski A. (2014) 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J*, 35:2541-2619.
416. O'Connor C. (2013) Dead Letter Office. *JACC: Heart Failure*, 1:181-182.
417. Califf RM. (2013) Better late than never: a welcome publication of tardy clinical trial results. *JACC Heart Fail*, 1:112-114.
418. Endoh M. (2006) Signal transduction and Ca²⁺ signaling in intact myocardium. *J Pharmacol Sci*, 100:525-537.
419. Callaghan NI. (2016) beta-Adrenergic augmentation of cardiac contractility is dependent on PKA-mediated phosphorylation of myosin-binding protein C and troponin I. *J Physiol*, 594:4707-4708.
420. Yeo PS. (2013) Levosimendan in end-stage heart failure. *JACC Heart Fail*, 1:365.
421. Caimmi PP, Kapetanakis EI, Beggino C, Molinari C, Giustini G, Crosio E, Reposo G, Micalizzi E, Vacca G, Grossini E. (2011) Management of acute cardiac failure by intracoronary administration of levosimendan. *J Cardiovasc Pharmacol*, 58:246-253.
422. Michaels AD, McKeown B, Kostal M, Vakharia KT, Jordan MV, Gerber IL, Foster E, Chatterjee K. (2005) Effects of intravenous levosimendan on human coronary vasomotor regulation, left ventricular wall stress, and myocardial oxygen uptake. *Circulation*, 111:1504-1509.
423. Atalay H, Temizturk Z, Altinsoy HB, Azboy D, Colak S, Atalay A, Dogan OF. (2016) Levosimendan Use Increases Cardiac Performance after Coronary Artery Bypass Grafting in End-Stage Renal Disease Patients. *Heart Surg Forum*, 19:E230-e236.
424. Przyklenk K. (2013) Reduction of myocardial infarct size with ischemic "conditioning" : Physiologic and technical considerations. *Anesthesia and Analgesia*, 117:891-901.

425. Wu N, Zhang X, Guan Y, Shu W, Jia P, Jia D. (2014) Hypercholesterolemia abrogates the cardioprotection of ischemic postconditioning in isolated rat heart: roles of glycogen synthase kinase-3beta and the mitochondrial permeability transition pore. *Cell Biochem Biophys*, 69:123-130.

12. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

1. Aranyi P, Turoczi Zs, Garbaisz D, Lotz G, Geleji J, Hegedus V, Rakonczay Z, Balla Z, Harsanyi L, Szijarto A. (2015) Postconditioning in major vascular surgery: prevention of renal failure. *J Transl Med*, 13:(1)21.
2. Onody P, Aranyi P, Turoczi Z, Stangl R, Fulop A, Dudas E, Lotz G, Szijarto A. (2016) Levosimendan Administration in Limb Ischemia: Multicomponent Signaling Serving Kidney Protection. *PLoS One*, 11(9):e0163675.

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

1. Szijártó A, Gyurkovics E, Arányi P, Ónody P, Stangl R, Tátrai M, Lotz G, Mihály Z, Hegedüs V, Blázovics A, Kupcsulik P. (2009) Postconditionálás kísérletes alkalmazása aortakirekesztés kapcsán. *Magy Seb*, 62(4):180-187.
2. E. Gyurkovics, P. Aranyi, Zs. Turóczi, D. Garbaisz, M. Varga, V. Hegedüs, G. Lotz, P. Kupcsulik, A. Szijarto. (2010) Postconditioning attenuates remote organ injury after lower limb arterial occlusion. *Interventional Medicine & Applied Science*, 2(4):169-177.
3. Szijártó A, Arányi P, Turóczi Zs, Kupcsulik P, Gyurkovics E. (2010) Ischaemiás-reperfüziós károsodás csökkentésének elvi és gyakorlati lehetőségei az érsebészetben. *Irodalmi áttekintés. Érbetegségek* 4:113-120.
4. Szijártó A, Arányi P, Turóczi Zs, Kupcsulik P, Gyurkovics E. (2010) A reperfüziós szindróma és a postconditionálás sejtszintű mechanizmusa. *Irodalmi áttekintés. Érbetegségek* 17(1):11-19.
5. Szijártó A, Turóczi Zs, Arányi P, Nagy Z, Gyurkovics E. (2010) Akut kritikus ischaemia az alsó végtagon. *Irodalmi összefoglaló. Orv Hetil*, 2;151(50):2057-66.
6. Szijártó A, Turóczi Z, Arányi P, Garbaisz D, Varga M, Stangl R, Lotz G, Kupcsulik P. (2010) Hosszú idejű végtagi verőér-elzáródás és izomszövet-életképesség vizsgálata kísérletes állatmodellben. *Magy Seb*, 63(6):374-9.

7. Gyurkovics E, Aranyi P, Stangl R, Onody P, Ferreira G, Lotz G, Kupcsulik P, Szijarto A. (2011) Postconditioning of the lower limb - Preconditioning against the reperfusion syndrome. *J Surg Res*, 169(1):139-47.
8. Arányi P, Turóczy Zs, Garbaisz D, Varga M, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2011) Postconditionálás: érsebészeti technika posztoperatív veseelégtelenség megelőzésére – Állatkísérletes eredmények. *Hypertonia és Nephrologia*, 15(3):117-124.
9. Szijarto A, Turoczi Z, Szabo J, Kaliszky P, Gyurkovics E, Aranyi P, Regali L, Harsanyi L, Lotz G. (2013) Rapidly progressing fatal reperfusion syndrome caused by acute critical ischemia of the lower limb. *Cardiovasc Pathol*, 22:(6)493-500.
10. Garbaisz D, Turoczi Z, Fulop A, Rosero O, Aranyi P, Onody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Z, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Therapeutic option for managing lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping. *J Surg Res*, 185(1):469-76.
11. Garbaisz D, Turóczy Z, Fülöp A, Rosero O, Arányi P, Onody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Z, Harsányi L, Szijártó A. (2013) Postconditioning can reduce long-term lung injury after lower limb ischemia-reperfusion. *Magy Seb*, 66(3):146-54.
12. Turóczy Zs, Arányi P, Lukáts Á, Garbaisz D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. (2014) Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats. *PLoS One*, 9:(1)e84783.
13. Garbaisz D, Turoczi Z, Aranyi P, Fulop A, Rosero O, Hermes E, Ferencz A, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Attenuation of skeletal muscle and renal injury to the lower limb following ischemia-reperfusion using mPTP inhibitor NIM-811. *PLoS One*, 9:(6) e101067.
14. Arányi P, Tomcsányi J. (2016) Differential diagnostic dilemmas after use of an out-of-date antihypertensive medication. Case report. *Orv Hetil*, 158(11):426-431.

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Szijártó Attilának a sok éves tanításért, nevelésért, példamutatásért, amivel vezette szakmai felkészülésemet és motiválta a közös kutatómunkát.

Köszönet illeti Kupcsulik Pétert és Harsányi Lászlót, a SE I. sz. Sebészeti Klinika igazgatóit, akik megteremtették a feltételeket a színvonalas és sikeres kísérletes munka végzéséhez.

Hálás vagyok munkahelyi főnökeimnek, Balla Rozáliának, Cseke Bélának és Tomcsányi Jánosnak, akik egyrészt lehetővé tették a felkészülésemet a fokozatszerzéshez, másrészt motiváltak és példával jártak elől életemben a szakmai utamon.

Köszönöm legközelebbi kollégámnak és barátomnak, Turóczi Zsoltnak az évek alatt a rengeteg együtt gondolkodást, közös készülést és munkát, az engem inspiráló támogatást és bátorítást, és a kísérletek kivitelezésében, az eredmények kiértékelésében, a dolgozat elkészülésében nyújtott felbecsülhetetlen és rengeteg segítségét.

Köszönöm Stangl Ritának, hogy a kezdetektől fogva lelkesített és tanított a kísérletes munkára, az elmúlt években folyamatosan mellettem állt és köszönöm a fáradhatatlan munkáját, amivel a kísérletekben és a mérések elvégzésében dolgozott a kutatásainkon.

Köszönöm édesapámnak, Arányi Józsefnek, hogy minden segítség és támogatás mellett a dolgozat és a kísérletes munka elkészülését számos meglátásával, szakmai ötletével és javaslatával is elősegítette.

Külön köszönet illeti Lotz Gábor tanáromat a szövettani minták feldolgozásában, kiértékelésében végzett munkájáért.

Köszönöm barátomnak, Geleji János matematikusnak az adatok statisztikai feldolgozásában és számos matematikai számításban nyújtott fáradhatatlan segítségét.

Köszönettel tartozom a dolgozat elővéleményezését végző tanárainknak, az értekezés házi vitájának opponenseinek, Haris Ágnesnek és Kékesi Violettának, akik nem mindennapi módon gondos és alapos munkával, korrekcióikkal és hozzáértő meglátásaikkal, javaslataikkal nagy mértékben segítettek a felkészülésemet.

Végül szeretném kifejezni hálámat a SE I. sz. Sebészeti Klinika Kísérletes Sebészeti Részlegének minden dolgozójának, külön kiemelve Tátrai Miklóst, Ónody Pétert, Garbaisz Dávidot, Dudás Emesét, Fülöp András, Varga Márkot, Rosero Olivért, Hegedüs Viktort, és az elmúlt 10 év Kísérleti Műtőben dolgozó minden hallgatójának és dolgozójának, akik támogattak és napi szinten segítettek a munka elkészülésében.

Köszönöm családomnak és barátaimnak a türelmet és megértést, amivel végigkísérték a dolgozat elkészülését.