

**Szívvédelem szervesen nitrítéssel; lehetséges mechanizmusok vizsgálata,
különös tekintettel a mitokondriális morfológia és funkció változásaira**

A doktori értekezés tézisei

Demeter-Haludka Vivien



Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

„A keringési rendszer élet- és kórtana, farmakológiája”

című Doktori Program

Témavezető: Prof. Dr. Ágnes Végh

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2019

KÖZLEMÉNYEK

A disszertáció alapját képző közlemények:

I. Demeter-Haludka V, Juhász L, Kovács M, Gardi J, Vegh A Is there a role of iNOS activation in the delayed antiarrhythmic effect of sodium nitrite? CANADIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY ÉS PHARMACOLOGY 95:(4) pp. 447-454.-2017 IF: 2.21

II. Demeter-Haludka V, Kovács M, Petrus A, Patai R, Muntean DM, Siklós L, Végh Á Examination of the role of mitochondrial morphology és function in the cardioprotective effect of sodium nitrite administered 24 h before Ischemia/reperfusion injury FRONTIERS IN PHARMACOLOGY 9:(MAR) Paper 286.-2018 IF: 3.83

Egyéb közlemények:

III. Végh Á, Demeter-Haludka V, Kovács M, Miskolczi G Szívvédelem szervesen nitrátokkal CARDIOLOGIA HUNGARICA 47:(Suppl.G) pp. G56-G63.-2017

IV. Juhász Laszlo, Haludka Vivien Demeter, Seprényi Gyorgy, Kaszaki Jozsef, Gardi Janos, Vegh Agnes Acute inhibition of monoamine oxidase with pargyline does not modify the severity of ischemia és reperfusion-induced ventricular arrhythmias in dogs EXPERIMENTAL ÉS CLINICAL CARDIOLOGY 19:(1) pp. 1-7.-2013

V. Demeter-Haludka V, Kovács M, Petrus A, Patai R, Siklós L, Muntean D, Végh Á A nátrium-nitrit mitokondriális morfológiára és kalcium szintre gyakorolt késői hatása altatott kutya-modellben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 47:(Suppl.C) pp. C36-C37. A Magyar Kardiológusok Társasága 2017. Évi Tudományos Kongresszusa. Balatonfüred-2017

VI. Demeter-Haludka V, Kovács M, Petrus A, Patai R, Siklós L, Muntean D, Végh Á A nátrium-nitrit késői hatása a mitokondriális funkcióra és morfológiára altatott kutya iszkémia/reperfúzió modellben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 46:(Suppl.F) pp. F35-F46. Magyar Kardiológusok Társaságának Kongresszusa. Balatonfüred-2016

VII. Demeter-Haludka V, Juhász L, Seprényi Gy, Végh Á A nátrium-nitrit késői hatásának vizsgálata a koszorúér-okklúzió és reperfúzió kiváltotta korai kamrai ritmuszavarokra altatott kutya-modellben CARDIOLOGIA HUNGARICA 45:(Suppl. D) p. D30.-2015

VIII. Demeter-Haludka V, Kovács M, Petrus A, Muntean D, Nagy N, Varró A, Végh Á The effect of sodium nitrite on the calcium homeostasis of the cell In: Ravingerova T, Farkasova V, Slezak J (szerk.) Advances in Cardiovascular Research: From basic mechanisms to therapeutic strategies. Konferenciahelye, ideje: Smolenice, Szlovákia, Bratislava :2018. p. 72. 5th European Section Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS-ES)-2018

IX. Demeter-Haludka V, Kovács M, Petrus A, Patai R, Siklós L, Muntean D, Végh Á Altered mitochondrial morphology és function involved in the delayed antiarrhythmic effect of sodium nitrite in anaesthetized dogs. CURRENT RESEARCH: CARDIOLOGY - EXPERIMENTAL CLINICAL 3:(3) p. 106. 3rd European Section Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS-ES). Marseille, Franciaország-2016

X. Gazdag P, Hartai T, Demeter-Haludka V, Ördög B, Oravecz K, Nagy N, Acsai K, Barta B, Oláh A, Radovits T, Merkely B, Papp J Gy, Varró A, Prorok J Characterization of changes in Ca²⁺ hűsling és contractile function in a rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy In: Ravingerova T, Farkasova V, Slezak J (szerk.) Advances in Cardiovascular Research: From basic mechanisms to therapeutic strategies. Konferenciahelye, ideje: Smolenice, Szlovákia, Bratislava: 2018. p. 78. 5th European Section Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS-ES)-2018

XI. Prorok J, Gazdag P, Oravecz K, Hartai T, Demeter-Haludka V, Ördög B, Acsai K, Barta BA, Oláh A, Radovits T, Merkely B, Papp J Gy, Nagy N, Varró A Az intenzív edzés hatására kialakult változások jellemzése szív hipertrófiás patkánymodell Ca²⁺ háztartásában és kontraktilis funkciójában. CARDIOLOGIA HUNGARICA 48:(Suppl.C) p. C43. (2018) Magyar Kardiológusok Társasága 2018. Évi Tudományos Kongresszusa. Balatonfüred-2018

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

3-NT	3-nitrotirozin
ABP	Artériás vérnyomás
CI	Mitokondriális légzési lánc I-es komplex
CII	Mitokondriális légzési lánc II-es komplex
CytC	Citokrórn c
DABP	Diasztolés artériás vérnyomás
DHE	Dihidroetídium
eNOS	Endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
ETS	Elektron transzportrendszer
FCCP	Carbonyl cyanide p-(trifluoro-methoxy) phenyl-hydrazone
HR	Szívfrekvencia
I/R	Iszkémia és reperfúzió
IMF	Intermiofibrilláris
iNOS	Indukálható nitrogén-monoxid szintáz
LAD	Bal koronária artéria descendens anterior
LVEDP	Bal kamrai vég diasztolés nyomás
LVSP	Bal kamrai szisztolés nyomás
MPTP	Mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus
OXPHOS	Oxidatív foszforiláció
PN	Perinukleáris
RCR	Légzési kontroll ráta
ROS	Reaktív oxigén gyökök
SNO	S-nitroziláció
SSM	Szubsarkolemmális
VF	Kamrafi brilláció
VPBs	Kamrai extraszisztolé
VT	Kamrai tachikardia

BEVEZETŐ

Az iszkémiás szívbetegségek száma és az ezek talaján kialakuló hirtelen szívhalál, az elmúlt évtizedek csökkenő tendenciájának ellenére, napjainkban is a vezető halálokok közé tartoznak (Finegold és *mtsai*, 2013; IHME és *mtsai*, 2018).

A szerves nitríteteket és nitrátokat széles körülmények között alkalmazzák hosszú évtizedek óta angina kezelésére, védőhatásuk számos kísérletben bizonyított. A szerves nitrítet és nitrátok, mint ún. nitrogén-monoxid (NO) donorok, növelik az NO biológiai hozzáférhetőségét és ezáltal védőhatást előidéznél az iszkémia súlyos következményeivel (pl. az életet veszélyeztető kamrai aritmia) szemben.

Egészen a közelmúltig a szerves nitríteteket és nitrátokat biológiailag különböző molekuláknak tekintették, így áttörést jelentett az a felismerés miszerint a NO oxidatív termékei is képesek NO felszabadítására (Lefer és *mtsai*, 2006). Kiderült, hogy a szerves nitrítet és nitrátok is különösen redukzív körülmények között (pl. hipoxia, pH csökkenés, iszkémia) NO-vá alakulnak, és ezáltal biológiailag elérhető NO forrást biztosítanak olyan körülmények között, amikor a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzim oxigén hiányban történő korlátozott működése miatt az NO termelés csökken (Zweier és *mtsai*, 1995).

A szerves nitrítet közül a nátrium-nitrit (NaNO_2) bizonyítottan kardioprotektív hatással rendelkezik alacsony koncentrációban adva (Dejam és *mtsai*, 2004). Kutya aritmia modellben kimutattuk, hogy a szerves nátrium-nitrit ($0.2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) intravénás infúziója szignifikánsan csökkenti a kamrai aritmia számát és gyakoriságát és növeli a túlélő állapotok számát közvetlenül koronária okklúzió előtt és reperfüzió előtt adva (Kovács és *mtsai*, 2015, Végh és *mtsai*, 2017). A nátrium-nitrit csökkentette a kamrai aritmia számát (VPBs), a kamrai tachikardiás epizódok számát és gyakoriságát (VT) valamint a kamrafiibrilláció gyakoriságát (VF) iszkémia és reperfüzió során. A túlélés gyakorisága 92%-kal nőtt azokban az állatokban, amelyekben a nátrium-nitritet közvetlen a reperfüzió előtt adtuk ellentétben a kontroll csoporttal, amelyben egyetlen állat sem élt túl a kombinált okklúziós/reperfüzió inzultust (Kovács és *mtsai*, 2015). Azt is leírtuk, hogy a védőhatásban a fehérjék S-nitrozilációját és/vagy glutationilációját áll (Kovács és *mtsai*, 2015).

A NO kulcsszerepet játszik mind a korai, mind a késői védőhatás kialakításában (Végh és *mtsai*, 1992b, Végh és Parratt, 1996; Bolli és *mtsai*, 1997). Ismert, hogy a késői védőhatás kialakításában a preconditionálás (PC) során eNOS aktivációja következtében NO felszabadulás történik, amely iNOS (és eNOS) aktivációhoz vezetve további NO képződést eredményez (Bolli és *mtsai*, 1997, Kovács és *mtsai*, 2013). Vizsgáltuk, hogy nátrium-nitrit védőhatásának kialakításában szerepet játszik-e az iNOS enzim aktivációja.

A szívizomsejtek nagy számban tartalmaznak mitokondriumokat, körülbelül a sejt teljes térfogatának 30 százalékát teszik ki és olyan nélkülözhetetlen funkció fenntartásához járulnak hozzá, mint az ATP termelés. Számos kísérletben vizsgálták, hogy a mitokondriumok károsodása miképpen járul hozzá az aritmia kialakításához. Két fő mechanizmust feltételeznek: a reaktív szabadgyökök (ROS) reperfüziót követő hirtelen, szinte robbanásszerű emelkedése, valamint a kalcium túlsúly (Manning és *mtsai*, 1988). Kísérletes adatok igazolják, hogy azok a

mechanizmusok, amelyek a reaktív oxigén gyökök képződését csökkentik, képesek az aritmiák kialakulását megelőzni (Kónya és mtsai., 1992; Cho és mtsai., 2007).

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a nátrium-nitrit késői kardioprotektív hatással rendelkezik különböző rácsaló modellekben (Shiva és mtsai., 2007a). Például, Shiva és munkatársai kimutatták, hogy nátrium nitrit adását követően a mitokondriális fehérjék S-nitrozilációja következik be és ez 24 órán keresztül stabilan fennmarad, megőrizve a mitokondriális funkciót a 24 óra múlva kiváltott iszkémia alatt (Shiva és mtsai., 2007a,b). Az is jól ismert, hogy a mitokondriális légzési lánc komplexei felelősek a reaktív oxigén gyökök termeléséért. Feltételezzük, hogy a nitrit S-nitrozilálja a mitokondriális légzési lánc fehérjéit és ez megakadályozza a mitokondriális ROS termelést, védelmet nyújt az iszkémia és reperfüzió káros következményeivel szemben (Shiva és mtsai., 2007a).

CÉLKITŰZÉS

I. Elsődleges célunk volt, hogy megállapítsuk vajon a nátrium nitritnek, a jelentős akut antiaritmiás hatása mellett, az általunk alkalmazott modellben van-e késői antiaritmiás hatása. Amennyiben igen, akkor ebben a hatásban az NO/iNOS/NO útvonalnak, amely a prekondicionálás késői mechanizmusában kulcs szerepet játszik, a nitrit esetében mekkora szerepe van?

Az állatokat a kísérlet első napján intravénás infúzióban fiziológiás sóoldattal vagy $0.2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ nátrium-nitrittel kezeltük. Az infúziót 20 percen keresztül adtuk. A nátrium nitrit jelen koncentrációja sem a vérnyomást, sem a koronária áramlást számottevően nem befolyásolta. Az iNOS aktivitás szerepének meghatározásához az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) gátló S-(2-aminoethyl)-isothioureát (AEST, 2.0 mg kg^{-1} i.v.) alkalmaztuk a nitritadás, valamint 24 óra múlva az okklúzió előtt. A második napon, az állatokban a 25 perces koszorúér okklúziót végeztünk, amelyet 2 perc reperfüzió követett. Meghatároztuk a kamrai aritmiák és az iszkémia súlyosságát. Mértük továbbá az iNOS enzim aktivitását és a plazma nitrit/nitrát (NO_x) szinteket.

II. Vizsgálni kívántuk vajon a nátrium nitrit késői antiaritmiás hatásában szerepet játszik-e a mitokondriális morfológia és funkció megváltozása.

Ebben a kísérletsorozatban az állatokat négy csoportra osztottuk. A kutyák az első napon vagy fiziológiás sóoldatot vagy nátrium-nitritet kaptak ($n=5-5$) $0.2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ koncentrációban. A második napon az állatok egy csoportjában okklúzió és reperfüzió nélkül, a másik csoportban 25 perc koszorúér okklúzió és reperfüziót követően eltávolítottuk a szíveket és meghatároztuk a mitokondriális morfológiai elváltozásokat, valamint a légzési paramétereket (többek között az oxidatív foszforilációt, a légzési kontroll rátát és a P/E arányt), azt ATP képződés sebességét, valamint a szuperoxid és peroxinitrit szinteket.

MÓDSZEREK

3.1 Etika

Az állatkísérletek kivitelezése a 40/2013 (II. 14.) kormányrendeletnek megfelelően történt. Engedélyek száma: I-74-5-2012 (I.) és 4657/2016 (II.).

3.2 Kísérleti állatok

A kísérleteket mindkét nemhez tartozó altatott kutyákon végeztük. Az I-es kísérletsorozatban 33 darab, átlagosan 21 ± 4 kg tömegű keverék kutyát, míg a második kísérletsorozatban 30 darab átlagosan 22 ± 4 kg tömegű kutyát használtunk.

3.3 *In vivo* mérések, műtéti beavatkozások

Az állatokat első napon nátrium-pentobarbitáttal (30 mg kg^{-1} , i.v., Euthasol 40%, Produlab Pharma B.V., Netherlands; Végh et al., 1992; Végh et al. 1994) elaltattuk. A vena jugularist kipreparáltuk, amelyen keresztül adtuk az anyagokat (fiziológiás sóoldat, NaNO_2 vagy AEST). A második napon, az állatokat ismételtelen elaltattuk nátrium-pentobarbitáttal (30 mg kg^{-1} , i.v.; Euthasol 40%, Produlab Pharma B.V., Netherlands), majd az altatást α -kloralóz és uretán (60 és 200 mg kg^{-1} , i.v.; Sigma, USA) keverékével tartottuk fent. Artériás vérnyomást (ABP), balkamrai szisztolés (LVSP) és végdiasztolés (LVEDP) nyomást és pozitív és negatív $\text{dP/dt}_{\text{max}}$ értékeket mértünk Miller-tip katéter (5F, Millar Instruments Inc., USA) segítségével. A mellkas megnyitását követően a szívét feltártuk és a bal koronária artéria elülső leszálló ágát (LAD) az első marginális ágától proximálisan kipreparáltuk, az ér alá fonalat vezetettünk, amelynek megszorításával 25 perces iszkiémiát idéztünk elő, majd ezt követően 2 perces reperfúziót végeztünk (Végh et al., 1992). A kísérlet végén eutanáziát az altatószer túladagolásával végeztünk. Az epikardiális ST-szakasz változását (mV) és az elektromos aktiváció inhomogenitását (ms) mértékét ún. „kompozit” elektród segítségével mértük. A kamrai aritmiákat és a szívfrekvenciát standard végtagi elektrokardiogram alapján rögzítettük és az aritmiákat a Lambeth Konvenció szerint értékeltük (Walker et al., 1998; Végh et al., 1992). A kutyákat akkor tekintettük túlélőnek, ha a reperfúzió második percében éltek és szinuszritmusban voltak. A mérés Plugsys Hemodynamic Apparatus (Hugo Sachs Electronik, Germany) készülékkel történt, amit LabChart 7 szoftverrel (AD Instruments, Australia) elemeztünk.

3.4 „Area at risk” meghatározása

Korábbi kísérleteinkkel azonos módon végeztük a „risk area” (Végh et al., 1992) mérését.

3.5 *In vitro* mérések

3.5.1 Az iNOS enzim aktivitás meghatározása

Az iNOS enzim aktivitását radioimmunoassay technikával határoztuk meg.

3.5.2. Plazma nitrit/nitrát (NO_x) koncentráció mérése

A vérplazma NO_x szinteket Griess reakcióval határoztuk meg, a korábbiakban leírtak szerint (Kiss et al., 2010; Kisvári et al., 2014).

3.5.3. Mitokondriális morfológiai vizsgálatok

A morfológiai vizsgálatok transzmissziós elektronmikroszkóppal történtek Karnovsky festés szerint három mitokondriális régióban. Vizsgáltuk a szub-szarkolemmális (SSM), inter-miofibrilláris (IMF) és peri-nukleáris (PN) régiót. Mértük a területet (μm^2), kerületet (μm), Feret-átmérőt (μm) és a kerekességet (0-1) ($[4 \times \text{Area}] / (\pi \times [\text{Major axis}]^2)$). Régióonként öt kép átlagából kiszámoltuk egy egyed értékeit, majd azokat is átlagoltuk, ez adta a csoportok közötti összehasonlítás alapját.

3.5.4. A mitokondriális légzés meghatározása

A mitokondriális légzés meghatározása friss bal kamra szövetmintából Clarke-típusú oxigén elektróddal történt. A légzési paraméterek mérését SUIT protokoll szerint végeztük (Gnaiger, 2014). Szubsztrátként a CI függő respirációhoz kiváltásához glutamátot (végkoncentráció: 10 mM) és malátot (1 mM) CII respirációhoz rotanont (0.5 μM) és szukcinátot (10 mM) adtunk.

A következő paramétereket mértük: oxidatív foszforiláció (OXPHOS), alaplégzés (State2) és elektron-szökés (State4), elektron transzport rendszer (ETS), reziduális oxigén felhasználás. A kapott értékekből respiratory kontroll rátát ($\text{RCR} = \text{OXPHOS} / \text{State 4}$) és P/E arányt ($\text{OXPHOS} / \text{ETS}$) számoltunk.

3.5.5. Az ATP képződés sebességének meghatározása

Az ATP képződés sebességét biolumineszcens assay-jel határoztuk meg (ATP Determination Kit, Invitrogen, USA) a gyártó leírása szerint. A kapott értékeket relatíve luminescence egységben (RLU) adtuk meg. Egyedenként három párhuzamos mérést végeztünk, amelyet átlagoltunk, majd az egyedeket szintén átlagoltunk, amely a csoportok közötti összehasonlítást teszi lehetővé.

3.5.6. A szuperoxid szintek meghatározása

A szuperoxid szinteket dihidroetidium (DHE) festéssel (1 μM DHE (Sigma, USA) konfokális mikroszkóp segítségével határoztuk meg. Egyedenként véletlenszerűen választott négy kép értékeit átlagoltuk.

3.5.7. A peroxinitrit képződésének mérése

A peroxinitrit képződést a 3-nitrotirozin (3-NT) szintek meghatározásával mértük western blot segítségével. A teljes fehérje izolálást követően 10% SDS-PAGE gélen futtattuk a mintákat. A blokkolást követően elsődleges jelölésként egér monoklonális anti-nitrotirozin antitestet (Chemicon, Millipore, USA; 4 °C; hígítás: 1:3000), másodlagos antitestként HRP konjugált nyúl anti-egér IgG (Dakocytomation, Denmark; 1h, szobahőmérsékleten, hígítás: 1:1000) használtunk. A detektálás ECL kittel (Western Bright ECL, Advansta, USA) röntgen filmre hívással történt. Kontrollként Coomassie Brilliant Blue festést használtunk. Az integrált optikai denzitást Image J (Fiji; NIH, Bethesda, MD) szoftverrel határoztuk meg.

3.6 Statisztikai analízis

Az eredményeket átlagoltuk és a standard hiba átlagával tüntettük fel (S.E.M.) számoltuk. A kamrai extraszisztolék és a VT-k számát Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottuk össze. A VT és VF gyakoriságát és a túlélést Fisher exact teszttel hasonlítottuk össze. A többi paramétert egyutas ANOVA/Bonferroni post-hoc tesztekkel és Welch-ANOVA/Bonferroni-Holm post-hoc tesztekkel hasonlítottuk össze. $P < 0.05$ különbséget tekintettünk szignifikánsnak.

3.7 Kísérleti protokollok

I. protokoll

Kísérleteinket altatott kutyák három csoportjában végeztük. Az állatok az első napon a kontroll csoportban ($n=12$) a kutyák fiziológiás sóoldatot kaptak, a kezelt csoportban ($n=12$) NaNO_2 -et (Merck, USA) $0.2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ dózisban 20 percen keresztül. 9 állat a nitritkezelést megelőzően majd a második napon az iszkémiát megelőzően iNOS enzim gátló S-(2-aminoethyl)-isothioureát (AEST, 2.0mg kg^{-1}) kapott. 24 óra elteltével, a második napon, minden csoportban 25 min LAD okklúziót hajtottunk végre, amit 2 perc reperfüzió követett. Három kutya álműtött kontrollként szolgált.

II. protokoll

Ezt a kísérlet sorozatot altatott kutyák négy csoportjában végeztük. Két csoportban ($n=5-5$) az állatok az első napon fiziológiás sóoldatot kaptak, a másik két csoportban ($n=5-5$) NaNO_2 -et, $0.2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; Merck) kaptak *iv.*, 20 percen keresztül. Ezek a csoportokon belül 5 állaton 25 perces okklúziót és 2 perc reperfüziót végeztük, a másik 5 állatnak pedig eltávolítottuk *in vitro* analízis céljából a szívét.

EREDMÉNYEK

4.1. A nátrium-nitrit késői antiaritmiás hatásának és az iNOS szerepének vizsgálata (I. tanulmány)

4.1.1. A fiziológiás sóoldat, NaNO_2 , AEST, NaNO_2 +AEST és a koronária okklúzió hemodinamikai hatásai

A fiziológiás sóoldathoz képest a NaNO_2 infúzióját követően csak kis mértékben csökkent az artériás vérnyomás és emelkedett a szívfrekvencia. Az AEST adása nem befolyásolta a hemodinamikai paramétereket. A LAD okklúziót követően szignifikánsan csökkent az artériás vérnyomás, az LVSP-t, a pozitív és negatív dP/dt_{max} valamint emelkedett az LVEDP, azonban a szívfrekvencia számottevően nem változott. Ezek a hatások jelentősen mérséklődtek a NaNO_2 kezelt csoportban, amíg az AEST kezelés ezen lényegesen nem változtatott.

4.1.2. A kamrai aritmiák súlyossága a 25 perces LAD okklúzió és reperfúzió alatt

A kontroll csoportban a 25 perces koronária elzárás hatására kamrai számottevő kamrai ektópiás aktivitás (ES száma: 379 ± 89) jelentkezett, és minden állatban (100%) kamrai tachikardia (VT száma: 11.2 ± 3.2). A kontroll csoportban az állatok 40%-ban kamrafibrilláció (VF) lépett fel okklúzió alatt, és az összes maradék kutyában VF lépett fel a reperfúzió hatására, így ebben a csoportban egyetlen állat sem élte túl az okklúziós/reperfúziós inzultust. Az okklúziós/reperfúziós inzultus előtt 24 órával korábban adott NaNO_2 infúzió szignifikánsan csökkentette a súlyos kamrai aritmiákat (ES: 47 ± 15 ; VT: 0.2 ± 0.2 ; VT%: 22%; VF%: 0%), és növelte a túlélést (0% a kontroll csoportban vs. 50% a nitrit kezelt csoportban). Az AEST bár csökkentette, de teljes mértékben nem szüntette meg a NaNO_2 aritmiákra gyakorolt védőhatását. AEST jelenlétében a ES száma (170 ± 43), a VT száma (3.7 ± 1.1), valamint a VT (67%) gyakorisága szignifikánsan emelkedett, az okklúzió alatti VF gyakorisága (11%) és a túlélés (11%) azonban számottevően nem különbözött a nitrit kezelt állatoktól.

4.1.3. Az iszkémia súlyossága a LAD 25 perces okklúziója alatt

Mind az epikardiális ST-szakasz, mind az elektromos aktiváció inhomogenitás meredeken emelkedett és már az iszkémia első 5 percében elérte a maximum értékeket. A NaNO_2 hatására mindkét iszkémiát jellemző paraméter okklúzió hatására bekövetkező változása szignifikánsan kisebb volt. Ezt az anti-iszkémiás hatást az AEST megszüntette.

4.1.4. A NaNO_2 hatása az „area at risk”-re

A vizsgált csoportok között számottevő eltérés nem volt a „risk” terület tekintetében: kontroll csoport: $36 \pm 3\%$, nitrittel kezelt csoport: $37 \pm 3\%$ és az AEST+ NaNO_2 kezelt csoport: $35 \pm 4\%$.

4.1.5. A plazma nitrit/nitrát (NO_x) szintjeinek változása

A nitrit infúzió után négy időpontban történtek a mérések. 20 perccel a nitrit infúziót követően az NO_x szint szignifikánsan megemelkedett és emelkedett marad 24 óra elteltével is. Az NO_x emelkedés a kezelt csoportokban egyértelműen a nitrát szintek megemelkedéséből fakad. Okklúziót követően az NO_x szintek ismét emelkedtek a kezelt csoportokban, ez azonban főként a megemelkedett nitrit szintből eredt. Az AEST infúziója a nitrit ezen hatását lényegesen nem befolyásolta.

4.1.6. Nitrit hatása az iNOS enzim aktivitásra

Az álműtött kontroll csoporthoz képest az iszkémiás kontroll csoportban nem történt iNOS enzim aktiváció. NaNO_2 infúziója bár nem szignifikánsan, de megemelte az iNOS enzim aktivitást, amit az AEST adás teljesen megszüntetett.

4.2 A mitokondrium szerepe a nátrium-nitrit késői védőhatásának kialakításában (II. tanulmány)

4.2.1. A mitokondriális morfológia változása I/R és nitrit kezelés hatására

A transzmissziós elektronmikroszkópos képek alapján megállapítottuk, hogy az álműtött kontroll csoporthoz képest az I/R csoportban mindhárom vizsgált rétegben (szubszarkolemmális, inter-miofibrilláris és peri-nukleáris) a kontraktilis egységek eltávolodtak egymástól, a mitokondriumok megduzzadtak, a kriszta állomány tömött szerkezete fellazult. Továbbá iszkémia hatására a mitokondriumok területe, kerülete, Feret-átmérője csökkent, és a kerekésege nőtt. Ezek az I/R okozta eltérések a NaNO_2 kezelt állatokban szignifikánsan kisebbek voltak. Ugyanakkor a NaNO_2 önmagában (I/R nélkül) nem befolyásolta a mitokondriumok morfológiáját.

4.2.2. A mitokondriális légzés változása I/R és nitrit kezelés hatására

A CI és CII függő mitokondriális légzést közvetlenül mérhető (State 2, OXPHOS, State 4, ETS) és ezekből számított (RCR és P/E) paraméterekkel jellemeztük. Az alaplégzésben (State 2) a négy csoport között nem volt számottevő eltérés. Ugyanakkor a 25 perces I/R-t követően szignifikánsan csökkent a CI-függő OXPHOS, az ETS és az RCR, míg a P/E arány hasonló volt, mint álműtött kontroll csoportban. A CII-függő légzésre vonatkozóan ezek a változások kisebbek voltak. Az álműtött kontrollhoz képest a NaNO_2 önmagában csökkentette az OXPHOS-t, az ETS-t és az RCR-t, anélkül, hogy a State 4 és a P/E arány befolyásolta volna. Ugyanakkor a NaNO_2 +I/R csoportban az I/R csoporthoz képest tovább csökkent az OXPHOS, az RCR és növekedett a State 4. Ebben a csoportban az OXPHOS szignifikánsan csökkent, de az ETS változatlan maradt az iszkémiás csoporthoz képest, a P/E arány ugyanakkor szignifikánsan csökkent, ami arra utalhat, hogy iszkémia alatt a nitrit számottevően befolyásolja a foszforilációs rendszert.

4.2.3. A nátrium-nitrit hatása az ATP képződésre

Az ATP képződés sebességét RLU-ban adtuk meg (30 sec/mg fehérje). Az álműtött kontroll csoporthoz képest a 25 perc I/R szignifikánsan csökkentette az ATP képződést (12232 ± 1291 vs. 7213 ± 1117 RLU/30s/mg fehérje). A nitrit adása önmagában (13001 ± 3109 RLU/30s/mg fehérje vs SC csoport) és iszkémiás körülmények között (7130 ± 1560 RLU/30s/mg fehérje vs. IC csoport) ezen szignifikánsan nem változtatott.

4.2.4. A nátrium-nitrit hatása a szuperoxid és a peroxinitrit termelésre

Az álműtött kontrollokhoz képest a 25 perc iszkémia és 2 perc reperfüzió szignifikánsan megemelte a szuperoxid és peroxinitrit szinteket. Ezt az I/R indukálta emelkedést a NaNO_2 kivédte.

ÉRTÉKELÉS

A jelen értekezésben ismertetett kísérleteink egyértelműen igazolták, hogy a nátrium nitrit számottevő késői antiaritmiás hatással rendelkezik nagyállat I/R modellben. A NaNO_2 infúziója szignifikánsan csökkentette a kamrai extraszisztolék számát (ES), a kamrai tachikardiás

epizódok számát és gyakoriságát (VT), valamint a kamrafibrilláció gyakoriságát (VF), iszkémia és reperfúzió során. Szemben a kontroll csoporttal, amelyben egyetlen állat sem élte túl az okklúziós/reperfúziós inzultust a nitrittel kezelt állatok 50% túlélő volt. A nitrit 24 órával az I/R előtt adva számottevően csökkentette az iszkémiára jellemző epikardiális ST-szakasz és elektromos aktiváció inhomogenitás emelkedését.

Megállapítottuk, hogy a nitrit késői kardioprotektív hatásában szerepet játszó mechanizmusok, különböznek a korábban már a prekondicionálás (PC) mechanizmusában igazolt mechanizmusoktól, ugyanis szemben a prekondicionálással, amelyben az iNOS aktivációt blokkoló AEST teljesen megszüntette a védőhatást (Kis és *mtsai.*, 1999b), a nátrium nitrit aritmiákkal szembeni védőhatása AEST jelenlétében csak részlegesen szűnt meg. Ugyanakkor az AEST teljes mértékben megszüntette a NaNO_2 anti-iszkémiás hatását. Ezt igazolták az iNOS enzim aktivitásának vizsgálatára vonatkozó kísérleteink is, amely azt mutatták, hogy ellentétben a prekondicionálással, nátrium-nitrit hatására az enzim aktivitása csak kis mértékben fokozódott, ami arra utalhat, hogy a nitrit késői hatásában az iNOS enzim indukciójának kisebb a szerepe van.

A két mechanizmus különbsége abból fakadhat, hogy a PC és a nitrit esetében az NO forrása eltérő. A prekondicionálás kiváltotta késői védőhatásban az iNOS indukálta NO-nak központi szerepe van (Végh és Parratt, 1996; Bolli és *mtsai.*, 1997; Dawn és Bolli, 2002). Erre utal, hogy az iNOS enzim gátlása megszüntette a PC kardioprotektív hatását (Végh és *mtsai.*, 1994; Kis és *mtsai.*, 1999a,b). Ezzel szemben az exogén úton bevitt nitrit esetében az NO más forrásból származik.

Ennek felderítésére vizsgáltuk a plazma NO_x szinteket NaNO_2 infúziója után, majd 24 órával később iszkémia előtt és után. Míg a nitrit infúzió előtti alapértékekben nem volt különbség a csoportok között, a nitrittel kezelt csoportokban 20 perccel az infúziót követően az NO_x szint szignifikánsan emelkedett, és ezen a szinten maradt 24 óra elteltével is. Az NO_x emelkedés elsődlegesen a nitrát koncentráció fokozódásából fakad, ami arra utal, hogy a nitrit a beadást követően nitráttá alakul. Okklúzió hatására az NO_x szint ugyancsak emelkedett a kezelt csoport állataiban, de háttérben elsődlegesen a nitrit szintet emelkedése áll. Ezt a hatást az AEST infúziója lényegesen nem befolyásolta. A második napon nitrit kezelt csoportban az NO_x redukciója főként a nitrát csökkenéséből ered, ami arra enged következtetni, hogy iszkémiás körülmények hatására a nitrát nitritté, majd NO-vá redukálódik.

Míndezek alapján feltételezzük, hogy a nitrit adást követően a nitrit nitráttá oxidálódik és ürtés hiányában nitrát formában kering a vérben legalább a következő 24 órában. Iszkémia hatására a nitrát nitritté, majd NO-vá alakul, amely előidézi a kardioprotektív hatást.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy a szervesetlen nátrium nitrit számottevő késői antiaritmiás hatással rendelkezik, azonban ellentétben a PC antiaritmiás hatásával, a védőhatás kialakításában az iNOS enzim aktiváció nem játszik központi szerepet.

A továbbiakban kísérleteket terveztünk arra vonatkozóan, hogy megállapítsuk vajon a mitokondriumoknak milyen szerepe van a késői védőhatás kialakításában.

Shiva és munkatársai korábbi munkai alapján ismert, hogy a prekondicionálás vagy a nitrit kiváltotta kardioprotektív hatás kialakításában a mitokondriális funkcióban bekövetkező

változásoknak fontos szerepe van (Shiva és *mtsai.*, 2007). Leírták, hogy a nitrit adás során felszabaduló NO S-nitrozilálja a mitokondriális légzési lánc fehérrjét, főként a I-es komplexet, amelynek fontos szerepe van mind a korai, mint a késői kardioprotekcióban (Couchani és *mtsai.*, 2013). Az S-nitroziláció és az S-glutathioniláció korai védőhatásban játszott szerepét saját kísérleteink is igazolták (Kovács és *mtsai.*, 2015).

Irodalmi adatok utalnak arra, hogy szívízomban a mitokondriális ROS fő forrása az I-es és III-as komplex (Turrens és *mtsai.*, 2003), bár a II-es komplexnek is szerepe lehet (Dröse és *mtsai.*, 2014). A komplexek ROS termelésében betöltött fontos szerepét mutatja, hogy a csökkent CI és CII aktivitás megakadályozza az elektron transzferet a CIII-ra, ezáltal csökkentve az elektronszivárgást és a reaktív oxigén gyökök képződését (Chen és *mtsai.*, 2006; Stewart és *mtsai.*, 2009). Feltételezhető, hogy a NO S-nitrozilációval módosítja a légzési lánc komplexek aktivitását és ezzel befolyásolja a ROS termelést (Dröse és *mtsai.*, 2014).

Ezeknek az előzményeknek a figyelembevételével vizsgálni kívántuk a mitokondrium szerepét a nitrit késői antiaritmiás hatásának kialakításában.

Kimutattuk, hogy a nitrit csökkentette a mitokondriumok I/R okozta strukturális elváltozásait; a nátrium-nitrit kezelt csoport állataiban csökkent az I/R okozta ödéma következtében létrejövő duzzadás, a kontraktilis elemek eltávolodása, valamint a krisztaállomány fellazulása. Nitrit adás hatására a terület, kerület, Feret átmérő és a kerekesség is az álműtött kontrollokhoz hasonlóan alakult.

A mitokondriális funkció vizsgálatára irányuló kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a nátrium-nitrit elsődlegesen a CI, kisebb mértékben a CII-függő OXPPOS-t befolyásolja és hatással van a foszforilációs rendszerre. Kimutattuk, hogy a 25 perces I/R-t követően szignifikánsan csökkent a CI OXPPOS, az ETS és az RCR, ugyanakkor a P/E arány hasonló maradt az álműtött kontrollhoz. Ezek a változások kevésbé voltak kifejezettek a CII indukciója esetében. Ugyanakkor, az álműtött kontrollhoz képest a NaNO₂ önmagában is csökkentette a mitokondriális légzést és ez a csökkenés tovább fokozódott, ha a nitrittel kezelt állatokban I/R-t váltottunk ki. A NaNO₂+I/R csoportban az I/R csoporthoz képest tovább csökkent az OXPPOS, az RCR, és növekedett a State 4, míg az ETS változatlan maradt. Az iszkémiás kontroll csoporthoz képest, a nitrittel kezelt állatokban a P/E arány azonban szignifikánsan csökkent, ami arra utal, hogy iszkémia alatt a nitrit befolyásolja a foszforilációs rendszert. Nitritadás után csökkentek az I/R hatására megemelkedett szuperoxid és peroxinitrit szintek.

Jól ismert, hogy a mitokondriális légzési lánc termelte reaktív oxigén gyökök adják a szívízomsejtek ROS termelésének legnagyobb hányadát és kiemelkedő szerepük van a reperfüziós károsodás kialakításában (Ambrosio és *mtsai.*, 1993). Elsődlegesen a légzési lánc CI és CIII, de a CII komplexe is, hozzájárul ROS termelésre képes (Turrens és *mtsai.*, 2003; Turrens és *mtsai.*, 2003; Dröse és *mtsai.*, 2014), ugyanis amint a légzési lánc komplexei redukzív körülmények közé (pl. iszkémia) kerülnek, a komplexek sérülnek és elektronszivárgás történik, ami szuperoxid képződéshez vezet. Azt is kimutatták, hogy az elektrontranszfer gátlása a CI és a CII komplexekről a CIII-ra, csökkenti az elektronszivárgást és a ROS képződést (Chen és *mtsai.*, 2003, 2006; Stewart és *mtsai.*, 2009), ezáltal védve a szívízmot az I/R okozta károsodástól (Chen és *mtsai.*, 2006; Stewart és *mtsai.*, 2009). Arra is vannak adatok, hogy a nitrogén monoxid (NO) az ETS és az uncoupling fehérjék S-nitrozilációjával csökkenteni képes a szuperoxid

termelődést (Burwell és Brookes, 2008; Couchani és *mtsai.*, 2013; Dröse és *mtsai.*, 2014). Korábbi, a nátrium nitrit korai antiaritmiás hatását vizsgáló kísérleteink eredményei is arra utaltak, hogy nitritadást követően számos fehérje S-nitrozilációja következett be (Kovács et al., 2015), azonban azt, hogy ennek a mechanizmusnak milyen szerepe van a késői védőhatás kialakításában, további vizsgálatokat igényel.

Eredményeink azt mutatják, hogy a nitrit 24 órával a beadását követően képes befolyásolni a mitokondriális légzést. Az, a megfigyelés, hogy nitrit hatására csökkent a P/E arány, felveti annak a lehetőségét, hogy a nitrit (NO) a foszforilációs rendszert befolyásolva, majd a proximális komplexekre visszahatva csökkenti a mitokondriális légzést és gátolja a ROS képződést. Feltételezzük, hogy a NO befolyásolja a foszforilációs rendszer valamely tagját (pl. ATP szintáz, foszfát transzporter, ANT) és ezáltal gátolja az ATP szintáz és ciklofillin D interakcióját, mely interakció szükséges a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (MPTP) nyitásához (Halestrap és Richardson, 2015). Arra is vannak adatok, hogy a ciklofillin cisztein 203 aktivációja bizonyítottan részt vesz az MPTP nyitásban (Nguyen és *mtsai.*, 2011), és amelynek az S-nitrozilációja (Kohr és *mtsai.*, 2011) védőmechanizmusként szerepel az I/R okozta károsodással szemben (Sun és *mtsai.*, 2006).

ÚJ EREDMÉNYEK

1. Bizonyítottuk, hogy a nátrium-nitrit (NaNO₂) infúziója 24 órával a 25 perces LAD okklúzió és reperfüzió előtt adva számottevően csökkenti az I/R okozta súlyos kamrai aritmiákat és növeli a túlélő kísérleti egyedek számát. Ezzel igazoltuk a nátrium nitrit késői antiaritmiás hatását nagy állat (kutyá) I/R modellben.
2. Kimutattuk, hogy a nitrit kiváltotta késői antiaritmiás hatásban, ellentétben az iszkémiás prekondicionálással, az NO indukálta iNOS enzim aktivációnak elhanyagolható szerepe van, ugyanis az iNOS enzim gátlása a viszonylag szelektív gátló AEST-vel, a nitrit aritmiákkal szemben védőhatását csak részben szünteti meg, annak ellenére, hogy az iNOS enzim aktivítása teljes mértékben gátolódott.
3. Tudomásunk szerint elsőként mutattunk ki, hogy a NaNO₂ csökkenti a szívizomsejtek mitokondriumainak I/R okozta morfológiai változásait. Kimutattuk, hogy a nátrium nitrit megóvjá a mitokondriumok struktúráját az I/R káros hatásaitól.
4. Kimutattuk, hogy a NaNO₂ csökkenti a mitokondriális légzést a mitokondriális légzési komplexek és a foszforilációs rendszer módosításán keresztül, ennek eredményeképpen a szuperoxid és a peroxinitrit képződés csökken, melynek központi szerepe van az I/R okozta súlyos kamrai ritmuszavarokban.

REFERENCIÁK

Ambrosio, G., Zweier, J.L., Duilio, C., Kuppusamy, P., Santoro, G., Elia, P.P. 1993. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia és reflow. *J. Biol. Chem.* 268: 18532-8541.

Bolli, R., Manchikalapudi, S., Tang, X.L., Takano, H., Qiu, Y., Guo, Y., Zhang, Q., Jadoon, A.K. 1997. The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger és as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ. Res.* 81: 1094-107. DOI: 10.1161/01.RES.81.6.1094

Brés, M.D., Brindle, K.M., Buckingham, J.A., Harper, J.A., Rolfe, D.F.S., Stuart, J.A. 1999. The significance és mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int. J. Obesity.* 23: S4-S11.

Burwell, L.S., Brookes P.S. 2008. Mitochondria as a target for the cardioprotective effects of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury. *Antioxid. Redox Signal* 10: 579-599. doi: 10.1089/ars.2007.1845

Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E. J. 2006. Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria és decreases myocardial injury following reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319: 1405-1412. doi.org/10.1124/jpet.106.110262

Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. és Lesnefsky, E.J. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 278: 36027-36031. doi: 10.1074/jbc.M304854200

Cho, J., Won, K., Wu, D., Soong, Y., Liu, S., Szeto, H.H. 2007. Potent mitochondria-targeted peptides reduce myocardial infarction in rats. *Coron. Artery. Dis.* 18:215–220.

Dejam, A., Hunter, C.J., Schechter, A.N., Gladwin, M.T. 2004. Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Molecules és Diseases* 232: 423-429. DOI:10.1016/j.bcmd.2004.02.002

Dröse, S., Brést, U., Wittig, I. 2014. Mitochondrial respiratory chain complexes as sources és targets of thiol-based redox-regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1844: 1344-1354. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.02.006.

Finegold, J.A., Asaria, P., Darrel P., F. 2013. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, és age: Statistics from World Health Organisation és United Nations. *Int. J. Cardiol.* 168(2): 934–945. DOI:10.1016/j.ijcard.2012.10.046

Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2016 (GBD 2016) Results. Seattle, United States: Institute for Health Metrics és Evaluation (IHME), 2017.

Gnaiger, E., Kuznetsov, A.V., Schneeberger, S., Seiler, R., Brésacher, G., Steurer, W., Margreiter, R. Mitochondria in the cold. 2014. *Mitochondrial Physiology Network Mitochondrial Pathways és Respiratory Control. An Introduction to OXPHOS Analysis* Springer. 2000: 431-442.

Halestrap, A.P., Richardson, A.P. 2015. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity és role in ischaemia/ reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78: 129-141. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.018

- Kis, A., Végh, Á., Papp, J.Gy., Parratt, J.R. 1999b. Repeated cardiac pacing extends the time during which canine hearts are protected against ischaemia-induced arrhythmias: role of nitric oxide. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31: 1229-1241. DOI:10.1006/jmcc.1999.0955
- Kiss, A., Juhász, L., Seprényi, Gy., Kupai, K., Kaszaki, J., Végh Á. 2010. The role of nitric oxide, superoxide és peroxynitrite in the anti-arrhythmic effects of preconditioning és peroxynitrite infusion in anaesthetized dogs. *Br. J. Pharmacol.* 160: 1263-1272. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00774.
- Kisvári, G., Kovács, M., Gardi, J., Seprényi, Gy., Kaszaki, J., Végh, Á., 2014. The effect of acute simvastatin administration on the severity of ventricular arrhythmias resulting from ischaemia és reperfusion in the canine: Is there a role for nitric oxide? *Eur. J. Pharmacol.* 732: 96-104. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.03.021.
- Kléber, A.G. 1983. Resting membrane potential, extracellular potassium activity és intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig heart. *Circ. Res.* 42: 603-613.
- Kohr, M.J., Apote, A.M., Sun, J., Wang, G., Murphy, E., Gucek, M., Steenbergen, C. 2011. Characterisation of potential S-nitrosylation sites in the myocardium. *Am. J. Physiol.* 300: H1327-H1335. doi: 10.1152/ajpheart.00997.
- Konya, L., Kekesi, V., Juhasz-Nagy, S., Feher, J. 1992. The effect of superoxide dismutase in the myocardium during reperfusion in the dog. *Free. Radic. Biol. Med.* 13:527-532.
- Kovács, M., Gönczi, M., Kovács, E., Végh Á. 2013. Time course analysis of cardiac pacing-induced gene expression changes in the canine heart. *Mol. Cell. Biochem.* 372: 257-66. DOI: 10.1007/s11010-012-1467-8
- Kovács, M., Kiss, A., Gönczi, M., Miskolczi, G., Seprényi, G., Kaszaki, J., Kohr, M.J., Murphy, E. Végh, Á. 2015. Effect of sodium nitrite on ischaemia és reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized dogs: is protein S-nitrosylation involved? *PLoS One* 24:10(4): e0122243. doi: 10.1371/journal.pone.0122243.
- Lauer, T., Preik, M, Rassaf, T., Strauer, B.E., Deuson, A., Feelish, M., Kelm, M. 2001. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 12814-12819. DOI: 10.1073/pnas.221381098
- Lefer, D.J. 2006. Nitrite therapy for protection against ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290: F777-F778. DOI: 10.1152/ajprenal.00470.2005
- Manning, A., Bernier, M., Crome, R., Little, S., Hearse, D. 1988. Reperfusion-induced arrhythmias: a study of the role of xanthine oxidase-derived free radicals in the rat heart. *J Mol. Cell. Cardiol.* 20:35-45.
- Miller, M.R., Megson I.L 2007 Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.* 151: 305-321.

Murphy, E., Eisner, D.A. 2009. Regulation of intracellular és mitochondrial sodium in health és disease. *Circ. Res.* 104:292–303.

Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A. 1986. Preconditioning with ischaemia: a delay of lethal cell injury in ischaemic myocardium. *Circulation.* 74: 1124-1136.

Nguyen, T.T., Stevens, M.V., Kohr, M.J., Steenbergen, C., Sack, M.N., Murphy, E. 2011. Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 286: 40184-40192. doi: 10.1074/jbc.M111.243469.

Sasaki, N., Sato, T., Marban, E., O'Rourke, B. 2001. ATP consumption by uncoupled mitochondria activates sarcolemmal K(ATP) channels in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280:H1882–H1888.

Shiva, S., Huang, Z., Grubina, R., Sun, J., Ringwood, L.A., MacArthur, P.H., Xu, X., Murphy, E., Darley-Usmar, V.M., Gladwin, M.T. 2007a. Deoxymyoglobin is a nitrate reductase that generates nitric oxide és regulates mitochondrial respiration. *Circ. Res.* 100: 654-661. DOI: 10.1161/01.RES.0000260171.52224.6b

Shiva, S., Sack, M.N., Greer, J.J., Duranski, M., Ringwood, L.A., Burwell, L., Wang, P.H. et al. 2007b. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J. Exp. Med.* 204: 2089-2012. DOI: 10.1084/jem.20070198

Stewart, S., Lesnefsky, E.J., Chen, Q. 2009. Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. *Transl. Res.* 153: 224-231. doi: 10.1016/j.trsl.2009.02.003.

Sun, J., Steenbergen, C., Murphy, E. 2006. S-nitrosylation: NO-related redox signalling to protect against oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal.* 8: 1693-1705. doi: 10.1089/ars.2006.8.1693

Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552: 335-344. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478

Végh, Á., Parratt JR. 1996. Delayed ischaemic preconditioning induced by drugs és by cardiac pacing. in: *Myocardial Preconditioning*. Ed. C.L. Wainwright és J.R. Parratt (Springer, Berlin) 251-261.

Végh, Á., Komori, S., Szekeres, L., Parratt, J.R. 1992. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetized dogs és rats. *Cardiovasc. Res.* 26: 487–495. <https://doi.org/10.1093/cvr/26.5.487>

Végh, Á., Komori, S., Szekeres, L., Parratt, J.R. 1992. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs és rats. *Cardiovasc. Res.* 26: 487-495. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/26.5.487>

Végh, Á., Papp, J.Gy., Parratt, J.R. 1994. Prevention by dexamethasone of the marked antiarrhythmic effects of preconditioning induced 20 h after rapid cardiac pacing. *Br. J. Pharmacol.* 113: 1081-1082. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1994.tb17104.x

Végh, Á., Szekeres, L., Parratt, J.R. 1992. Preconditioning of the ischaemic myocardium; involvement of the L-arginine - nitric oxide pathway. *Br. J. Pharmacol.* 107: 648-652. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14501.x

Walker, M.J., Curtis, M.J., Hearse, D.J., Campbell, R.W., Janse, M.J., Yellon, D.M. et al. 1998. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, és reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 22: 447-455. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/22.7.447>

Zweier, J.L., Wang, P., Kuppusamy, P. 1995a. Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 270: 304-307.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Külön köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Prof. Dr. Végh Ágnesnek, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet intézetvezetőjének Prof. Dr. Varró Andrásnak. Köszönettel tartozom Dr. Kovács Máriaának, valamint Bakó Erikának.

A munkákat támogatta: GINOP 2.3.2-15-2016-00040; Szegedi Tudományegyetem Orvostudományi Kar special grant; Nemzeti Kiválósági Program TÁMOP 4.2.4.A „Konvergencia-Eötvös Loránd Hallgatói Ösztöndíj”