

**”Adrenomedullins antiapoptotiske protektive  
potensiale ved ischemi-reperfusjon av venstre-  
og høyre ventrikkel”**

**MED-3950 5.-årsoppgaven Profesjonsstudiet i  
medisin ved Universitetet i Tromsø**

**Av Sondre Flægstad Koren, MK-09**

**Veileder: Truls Myrmel, IKM**

**01.06.14 Tromsø**



# Innholdsfortegnelse

<b>INNHALDSFORTEGNELSE</b> .....	<b>2</b>
<b>RESYMÉ</b> .....	<b>3</b>
<b>INNLEDNING</b> .....	<b>4</b>
<b>MATERIALE OG METODE</b> .....	<b>5</b>
MÅL .....	5
OPPBYGNING .....	5
VALG AV OPPGAVE.....	5
ARBEIDSPROSESSEN .....	5
DATAINNSAMLING OG VALG AV KILDER .....	6
KILDEKRITIKK.....	6
<b>ADRENOMEDULLIN</b> .....	<b>7</b>
FARMAKOKINETIKK .....	9
DOSERING .....	10
<b>ANATOMI</b> .....	<b>10</b>
HØYRE VENTRIKKEL (HV) .....	10
KORONAR BLODFORYSNING .....	12
<i>Høyre koronararterie</i> .....	12
<i>LAD</i> .....	13
<b>ISCHEMI/REPERFUSJON</b> .....	<b>14</b>
DEFINISJON.....	14
HISTORIE .....	15
REPERFUSJON .....	16
<b>APOPTOSE</b> .....	<b>18</b>
MORFOLOGI.....	19
CASPASER .....	21
<i>Procaspase-aktivering</i> .....	22
INTRINSIC PATHWAY .....	22
EXTRINSIC PATHWAY .....	24
BCL-2-FAMILIEN .....	24
FOXO .....	26
P53 .....	28
MDM2 .....	28
NF-KAPPAB.....	31
<b>DISKUSJON</b> .....	<b>33</b>
<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>34</b>
<b>REFERANSER:</b> .....	<b>35</b>

## Resymé

Dette er et litteraturstudium om adrenomedullins (AM) kardioprotektive antiapoptotiske potensiale ved ischemi-/reperfusjonsskade av høyre- og venstre ventrikkel. Jeg vil også se på apoptose ved myokardiell ischemi. Formålet med denne oppgaven er å belyse den kunnskap som allerede er kjent og komme opp med ideer for videre forskning på hvordan man kan komme frem til ny kunnskap innenfor dette feltet.

Akutt hjerteinfarkt fører til mye sykdom og død i dagens samfunn og hovedbehandlingen vi har mot det, reperfusjon, er dessverre ikke uten bivirkninger og kan gi reperfusjonsskade. En reperfusjonsskade vil kunne manifestere seg på flere måter, og en av disse er apoptose. AM er, siden det ble oppdaget tidlig på 1990-tallet, vist å ha flere heldige effekter. En av disse er at det kan hemme apoptose. Gitt under reperfusjon er AM vist å hemme apoptose via økt produksjon av nitrogenmonoksid (NO) og hemming av proapoptotiske proteiner som Bax og Bad via PI3K/Akt i venstre ventrikkel (VV). Høyre ventrikkel-infarkt (HVI) ses sjelden isolerte og kun halvparten av proksimale HV-okklusjoner resulterer i infarkt, men de er som regel en del av hypotensive nedreveggsinfarkt. Det er lite forsket på apoptose i HVI, og ikke ift AMs effekt på dette. Ved videre forskning på dette kan man finne mer ut om apoptosens bidrag ved HVI og reperfusjon, og hvordan AM i så fall kan virke for å hemme denne apoptosen og på den måten få en bedret post-ischemisk effekt av hjertemuskelen.

## Innledning

Kardiovaskulær sykdom står for 17,3 millioner dødsfall i året og av disse er 7,3 millioner grunnet koronar hjertesykdom. I 2030 regner WHO med at det totale tallet døde av kardiovaskulær sykdom vil være oppe i 23,3 millioner på verdensbasis (1). Det er også et av de feltene det forskes mest på. Den primære behandlingen for hjerteinfarkt er reperfusjon, men reperfusjonen kan også være med på å gi reperfusjonsskade (2), blant annet ved økt apoptose (3) og dermed en dårligere post-ischemisk pumpefunksjon. AM har siden det ble isolert fra humant feokromocytom i 1993 (4) vist å blant annet ha antiapoptotiske effekter og er vist å sette ned apoptosen, minske infarktstørrelse og bedre post-ischemisk pumpefunksjon (5). HV er forskjellig fra VV på mange måter, og responderer annerledes på okklusjon av tilførende koronararterie enn venstre ventrikkel. Hvordan hemmer AM apoptose ved ischemi/reperfusjon og er det mulig å utnytte dette ved behandling av hypotensive HVI?

## **Materiale og metode**

### **Mål**

Målet med denne oppgaven er å dykke dypere ned i hvordan AM virker antiapoptotisk og hvordan man kan utnytte dette til å behandle reperfusjonsskade slik at man får en bedret post-ischemisk funksjon av hjertet.

### **Oppbygning**

Denne oppgaven er et litteraturstudium der jeg først presenterer problemet og så hva AM er. Jeg presenterer nødvendig anatomi og apoptose ned til molekylærnivå som er nødvendig for å forstå hvorfor AM har et antiapoptotisk potensiale. Til slutt er det en diskusjonsdel hvor jeg diskuterer denne kunnskapen og ideer for ny forskning basert på dette.

### **Valg av oppgave**

Gjennom Forskerlinja har jeg brukt mye tid på nettopp AM, både på laboratoriet, hvor vi har gjort forsøk på AMs funksjon på den elektriske ledningen i hjertet i en grisemodell, og ved lesing av artikler. Jeg kom da over en artikkel av Okumuras (5) arbeide med AM som behandling ved reperfusjon av iskemiske rottehjerter. Resultatene her, sammen med en interesse for apoptose, gjorde at jeg ønsket å se nærmere på dette. Jeg ønsket da å finne ut om dette var mulig i en grisemodell og om det antiapoptotiske potensialet også var tilstede ved høyre ventrikkel-infarkt og hva mekanismene bak AMs antiapoptotiske evne er. Andre spørsmål er hvordan AM så skal administreres og hvilke doser man må gi for antiapoptotisk effekt.

### **Arbeidsprosessen**

Arbeidet med denne oppgaven startet våren 2013 samtidig som jeg jobbet på lab under forskeråret mitt med litteraturinnhenting og utforming av idé. Jeg har så jobbet med dette på kveldstid og i helgene gjennom praksis i sykehus og på allmennlegekontor høsten/vinter 2013/2014, for så å sette av enda mer tid til oppgaven fra 14.mars da jeg var ferdig i praksis og frem til nå. Jeg har hatt veiledning per e-post, telefon og gjennom

møter med veileder Truls Myrmel, og dette mener jeg har fungert godt. Jeg har i tillegg rådført meg med tidligere 5.årsstudenter underveis og føler prosessen totalt sett har vært god.

### **Datainnsamling og valg av kilder**

Okumuras (5) artikkel var som sagt mitt utgangspunkt for denne oppgaven. Jeg har brukt spesifikke kilder som denne artikkelen refererte til i tillegg til å bruke databasene Pubmed og Google scholar som søkemotorer. Her har jeg gjort systematiske- og usystematiske søk, hvor de systematiske søkene ble gjort med søkeordene "adrenomedullin apoptosis", "Adrenomedullin ischemia reperfusion", "apoptosis", "ischemia", "myocardial ischemia", "ischemia reperfusion", "ischemia reperfusion injury", "myocardial ischemia reperfusion", "myocardial ischemia reperfusion injury", "normal coronary artery anatomy" for å nevne noen. Jeg valgte så de passende artiklene ut fra disse søkene og brukte i tillegg disse artiklenes referanser for videre arbeid.

### **Kildekritikk**

Jeg har i mine søk vært ute etter oversiktsartikler for de store linjene hvor forfatterne systematisk legger frem gjeldende kunnskap. Dette vil kunne føre til at artiklene farges av forfatterens syn, og det er en svakhet. Jeg har ved å sjekke opp disse artiklenes kilder forsøkt å gjøre opp for dette. Jeg har også brukt flere primærstudier, og selv om studiene gir signifikante funn på cellekulturer er det ikke sikkert at dette vil gi samme effekt in vivo.

## Adrenomedullin

AM er et 52 aminosyrer langt peptid med en potent vasodilaterende effekt som først ble isolert fra humant feokromocytom (4). AM finnes i celler fra binyremarg, nyre, kardiomyocytter, vaskulært endotel og glatt muskel (6). Både humant, gris- og hundeadrenomedullin ligner veldig i oppbygning med kun en amminosyre i forskjell, noe som gjør at man kan bruke humant AM til forskning på disse dyrene (7).

AM er et sirkulerende hormon som i tillegg virker parakrint og autokrint (8). Den mest karakteristiske effekten er en hypotensiv effekt på grunn av vasodilatasjon (9). Dette ser man blant annet ved intrakoronar infusjon, hvor AM er vist å føre til en koronar vasodilatasjon som oppheves ved samtidig infusjon av NO-synthase-hemmeren L-NNA. Den samme dosen ga ikke effekt når AM ble gitt intravenøst. Dette viser at AM øker produksjonen av NO (10). AM er også vist å virke direkte på glatt muskel i left anterior descending artery (LAD) fra gris ved å øke cyclic AMP (cAMP) og på den måten senke  $Ca^{2+}$ konsentrasjonen i glatt muskel og hemme kontraksjon (11). AM vasodilaterer altså koronarkar både ved økt produksjon av NO og økt uttrykk av cAMP (figur 3). Plasma AM øker i flere vevstyper ved kardiovaskulær sykdom, blant annet ved akutt hjerteinfarkt (12) (13), nyresykdom og septisk sjokk (14). Man ser også en progressiv økning i plasmanivåer av AM ved økende grad av ervervet hjertesvikt (15). AM er vist å aktivere PI3k/Akt (5) (figur 1) og på denne måten har AM flere potensielle antiapoptotiske virkemåter (figur 1).

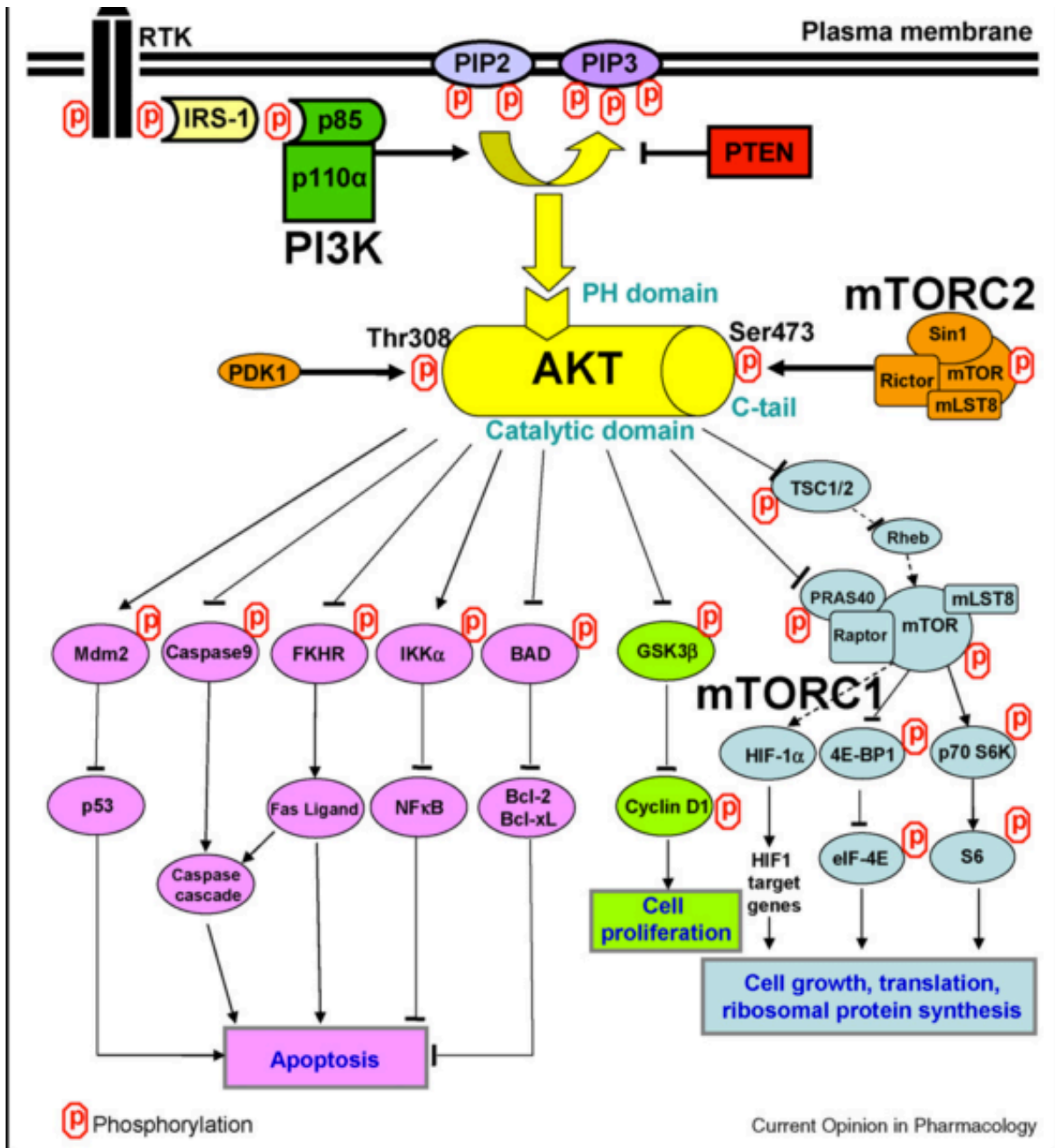
En klinisk studie av AMs virkning på ischemi/reperfusjon hos mennesker viste at ved systemisk infusjon av AM før reperfusjon med dosen  $0,025 \text{ ug} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  de 3 første timene, for så å halvere dosen de neste 9 timene, at pasientene fikk redusert infarkt område og bedret veggbevegelse 3 måneder etter reperfusjon. Det er vanskelig å si noe om AMs direkte påvirkning her, da man ikke har noen kontroller (16).

AM er via Akt vist å ha en rekke heldig effekter ved ischemi/reperfusjon i venstre ventrikkel hos rotter. Dette gjelder blant annet en signifikant bedring i infarktstørrelse, apoptose og hemodynamiske parametre (maksimalhastighet på trykkgenerering (dP/dt) og endediastolisk trykk i venstre ventrikkel (LVEDP)) med AM, en effekt som ble

opphevet av PI3K-inhibitoren wortmannin (5). Akt er også vist å være anti-apoptotisk ved ischemi/reperfusjon hos mus (17). AM beskytter mot arrytmier og minsker infarktstørrelse gjennom økte nivåer av cyclic GMP (cGMP) i hjertet og redusjon av reaktive oksygen species (ROS), det proapoptotiske proteinet Bax, og caspase-3 aktivitet som tegn på mindre apoptose. Samtidig skjedde det en økning i fosforylering av de antiapoptotiske proteinene Bad og Bcl-2 (18). Antiarrytmisk effekt er også sett når AM er gitt pre-ischemisk gjennom økt produksjon av NO (19).

Måten AM øker aktiviteten av Akt er via aktivering av PI3K (figur 1). PI3K fosforylerer så PIP2 til PIP3. PIP3 fungerer som en høyaffinitets-ligand for proteiner med PH-domene slik som Akt, og Akt rekruteres til cellemembranen. Ved cellemembranen skjer det en konformasjonell endring i Akt som gjør at Akt kan fosforyleres av PDK1 og PDK2, noe som fører til at Akt blir aktivert. Det kan så translokere ut i cytoplasma og til nukleus hvor det fosforylerte proteinet kan gjøre sitt virke (20), (21).





**Figur 1:** PI3K fosforylerer PIP2 til PIP3 som binder Akt. Akt kan så fosforyleres og på den måten aktiveres og slik bidra antiapoptotisk ved å fosforylere Mdm2, Caspase9, FKHR (FoxO), Ikka og BAD og på den måten virke anti-apoptotisk. PTEN står for negativ regulering av Akt ved at den defosforylerer PIP3 tilbake til PIP2 (21).

### Farmakokinetikk

Hos mennesker er halveringstiden til AM rapportert til å være 22,0 +/-1,6 min med en metabolic clearance rate (MCR) på 27,4 +/-3,6 ml/kg x min med et distribusjonsvolum på 880 +/-150ml/kg (22). Andre har vist at det tyder på at det er i lungene hoveddelen av clearance skjer(23).

## Dosering

En systemisk infusjon hos mennesker på  $3,4 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  mer enn firedoblet normal sirkulerende konsentrasjon av AM ga ingen effekt på hverken hjerterefrekvens eller blodtrykk. Når de så økte dosen til  $13,4 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , noe som er 40-doblet den sirkulerende konsentrasjonen, så de et signifikant blodtrykksfall fra  $69 \pm 2$  til  $53 \pm 2$  og en økning i hjerterefrekvens fra  $57 \pm 3$  til  $95 \pm 4$  (22). Med en så mye høyere plasmakonsentrasjon nødvendig for hypotensiv effekt legger Meeran et. al frem en hypotese om at AM fungerer parakrint på vaskulær glatt muskel. Ved Okumuras nevnte studie på rotter opererte de med en dosering på  $0,05 \text{ ug} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  i 60 min etter ligering administrert gjennom venstre vena jugularis (5). Ved De Matteos studie på sau brukte de en intrakoronar administrering med dose på  $0,5 \text{ ug} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{time}^{-1}$ . Denne doseringen gav ingen effekt når den ble gitt intravenøst (10). Hvilken dose man må opp i for antiapoptotisk effekt hos gris eller mennesker er ikke beskrevet, og videre forsøk må til for å finne ut hva den mest gunstige administreringsmåte, om det er intrakoronar eller systemisk infusjon, og dosering er.

## Anatomi

Jeg går i denne oppgaven ut ifra at leseren har basale kunnskaper om hjertets anatomi og funksjon. Jeg vil dog gå dypere inn på høyre ventrikkel og den koronare karanatomien (figur 2).

### Høyre ventrikkel (HV)

HV er en del av et lavtrykkssystem som pumper venøst blod inn i lungene for reoksygenering. Den har samme slagvolum som venstre ventrikkel, men lengre ejsjonstid grunnet hangout-intervallet (24). HV pumper mot  $1/5$  av det systemiske trykket og  $1/10$  av den systemiske motstanden. HV mottar venøst blod ved lavere diastoliske trykk enn venstre ventrikkel (VV). Den har  $1/6$  av VVs muskelmasse,  $1/3$  av VVs veggtykkelse og gjør  $1/4$  av VVs slagarbeid. I motsetning til VV perfunderes HV i både systole og diastole.

HVs kontraksjon er delt i tre. Den første fasen er når laterale vegg beveger seg innover, så kommer septums kontraksjon og til slutt en effekt av traksjon fra VV (24). Avhengig

av den enkelte pasients koronaranatomi kan det derfor ha stor betydning at høyre koronararteries (HC) forsyning av septum opphører.

Høyre ventrikkel-infarkt (HVI) ser man vanligvis ved nedreveggsinfarkt.

Sannsynligheten for HVI øker proporsjonalt med størrelsen på nedreveggsinfarkt og graden av hemodynamisk påvirkning. 1/7 av hemodynamisk stabile nedreveggsinfarkt har kliniske funn på HV-påvirkning. 2/3 av hypotensive nedreveggsinfarkt og alle nedreveggsinfarkt som gir kardiogent sjokk. Jo lengre proksimalt okklusjonen i en koronarartie sitter, jo mer uttalt vil svikten bli. Likevel er det bare halvparten av proksimale okklusjoner av HC som resulterer i HVI, noe som kan tyde på en rik kolateralisering. Ved obduksjon ser man HVI ved 2/3 av alle nedreveggsinfarkt. (25) HVI er en selvstendig prediktor for prognose ved akutt nedreveggsinfarkt og en metaanalyse av seks studier på HVI med 1200 pasienter involvert var OR for død 3,2, kardiogent sjokk 3,2 og AV-blokk 3,4. (26) Kliniske tegn på HV-svikt er en blek, klam, bradykard og hypotensiv (grunnet nedsatt fylning av VV) pasient. Man kan også se det ved kardiogent sjokk med struttende halskar uten dyspnoe.

HV er veldig preload-avhengig, og man skal derfor være forsiktig ved bruk av nitroglyserin og morfin, som er standard behandling ved venstre ventrikkel-infarkt (VVI). Dette gjelder også bruk av diuretika. Ved et HVI blir atriets kontraksjon viktig, noe som fører til at en slik pasient vil være ekstra sårbar for atrieflimmer eller om okklusjonen sitter slik at den også affisserer HA. Den tynne muskelveggen gjør at HV og høyre atrium (HA) dilaterer lettere enn VV og venstre atrium (VA). Dette kan videre føre til at plassforholdene inne i perikard blir ugunstige i form av at HV etter hvert presser septum inn i VV, noe som gjør at en allerede underfylt VV får dårligere kontraksjonsbetingelser (25). Et dilatert HA vil også kunne føre til strekk og gjennoppretting av foramen ovale, og økt trykk i HA vil kunne føre til en shunting fra HA til VA.

Tidlig reperfusjon er en viktig del av behandlingen av HVI og hos pasienter med suksessfull behandling med percutan coronary intervention (PCI) er prosentandelen med vedvarende hypotensjon og lav cardiac output og dødelighet signifikant bedret. Forsøk gjort på hunder viser at reperfusjon av en ischemisk HV gir en raskere heling av

HV og dens funksjon, men at funksjonen likevel bedres om man ikke reperfunderer i det hele tatt (27). Dette forklares med økt kolateral blodforsyning og at HV er en tynnere muskelvegg som trenger mindre oksygen.

## **Koronar blodforsyning**

Koronarteriene er de første arteriene som går av fra aortoa, like etter aortaklaffen. Det er starten på to løp, høyre og venstre, hvor høyre går til høyre koronararterie og venstre raskt deler seg i LAD og circumflex coronary artery (CX) (figur 2).

### **Høyre koronararterie**

Like etter aortaklaffen finner man Valsava-sinusene. Dette er innbuktninger i aorta hvor man finner ostiene til venstre og høyre koronarkar. På høyre side går følgelig høyre koronararterie (HC) av, men hos mange går også den conale/infundibulare grenen til høyre ventrikkel av her, eller hos over halvparten, grenen som forsyner sinusknuten. Om den conale/infundibulare grenen ikke går av her finner vi den som en tidlig avgreining av HC. De med velutviklede infundibulære arterier har en større forsyning til ventrikkelens fremre vegg og danner av og til anastomoser med LAD og med det Vieussens sirkel.

HC følger den atrioventrikulære groove, mellom høyre atrie (HA) og høyre ventrikkel (HV), ut mot høyre. Her går acute marginal artery av, samt flere atrielle grener fra den kranielle delen av HC. Acute marginal artery går helt ned mot apex og danner av og til anastomoser med LAD.

På undersiden av hjertet finner man hos om lag 90 % av befolkningen avgreiningen fra HC til den inferiore intraventrikulære arterien (IIA), også kjent som posterior decending artery (PDA), som forsyner bakre tredjedel av septum og nedre del av HV, samt noe av en posteriore/inferiore del av VV. (Hos de resterende 10 % går denne greinen av fra CX.) Den forsyner også den posteromediale papillemuskelen, ofte som eneste arterie, i motsetning til den anterolaterale papillemuskelen som forsynes av både LAD og CX. Dette gjør at den posteromediale papillemuskelen er mer utsatt for infarkt og følgelig mitral insuffiens. I tillegg går også avgreiningen til arterien som forsyner AV-knuten av

fra HC hos de samme om lag 90%. Om HC forsyner IIA og AV-knuten, så kalles det at man er koronar høyre dominant. Den samme greinen som forsyner AV-knuten er den som sammen med septale avgreininger fra LAD, forsyner den proksimale atrioventrikulære ledningen. Ser man på koronar dominans hos griser og hunder finner man at grisene har en tilnærmet lik koronar dominans som mennesker (28), men at hunder i stor grad er venstredominante hvor CX forsyner IIA og AV-knuten (29).

### **Venstre koronararterie**

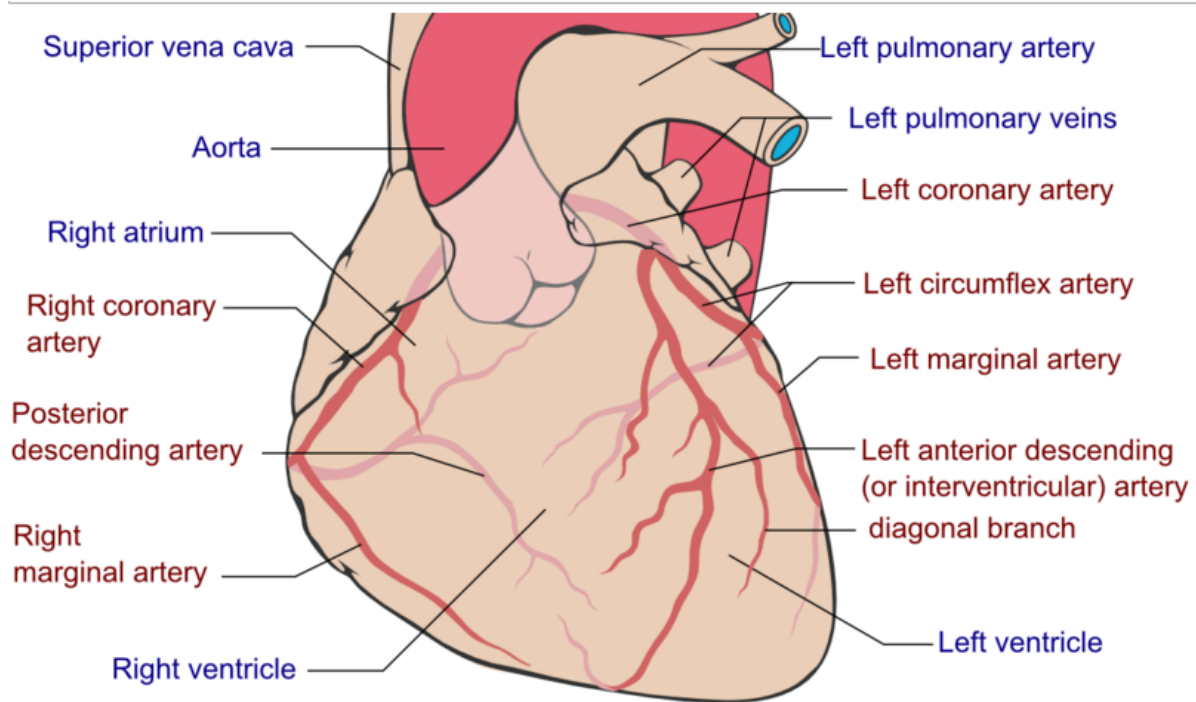
Venstre koronararterie, eller venstre hovedstamme går ut fra den venstre Valsavasinus hvor den går ut mellom truncus pulmonalis og venstre aurikkel før den deler seg hos voksne etter 1-2cm i left anterior decending artery (LAD) eller den anteriore intraventrikulære arterien, og circumflex (CX). Venstre hovedstamme står da med sine avgreininger for blodforsyningen til mesteparten av venstre ventrikkel, 2/3 av septum, den superolaterale papillemuskelen til mitralklaffen, venstre atrium og hos litt under halvparten også sinusknuten.

### **LAD**

LAD forsyner apikale deler av både VV og HV og det går på LADs vei mot apex av flere grener som forsyner VVs fremre vegg. Den kan også, som tidligere nevnt, ha en infundibulær avgreining til HV, og den kan fortsette forbi apex og perfundere området som hos de aller fleste gjøres av IIA.

### **CX**

CX har omlag samme dimensjon som LAD. Den følger den venstre atrioventrikulære groove, posteriort. Hos de nevnte 10% som er venstredominante, så fortsetter CX videre og forsyner AV-knuten og avgreining til IIA. CX forsyner laterale og posteriore del av VV, samt den nevnte forsyningen av mitralklaffens superolaterale papillemuskel sammen med grener fra LAD. CX forsyner også deler av VA og VV i langs den venstre atrioventrikulære groove (30).



**Figur 2:** Normal koronar anatomi. Tidlig på aorta går venstre koronararterie av og deler seg i LAD og CX. Høyre koronararterie går i den atrioventrikulære groove og gir opphav til PDA/IIA. (31)

## Ischemi/reperfusjon

Koronar hjertesykdom er en forsnevring eller blokkering av blodstrømmen til en av arteriene som forsyner hjertet med blod. Når blodstrømmen blir senket tilstrekkelig skjer det ischemi. Ischemi er nedsatt eller opphør av oksygentilførsel til vev, og blir det uttalt nok kan det resultere i infarkt som er permanent vevsskade, som ved et akutt hjerteinfarkt.

## Definisjon

Akutt hjerteinfarkt er definert av Joint Task Force of the European Society of Cardiology, American College of Cardiology Foundation, the American Heart Association, og World Heart Federation som “en klinisk hendelse som fører til død av kardiomyocytter (myokardiell nekrose) som er forårsaket av ischemi (i motsetning til andre etiologier som myokarditt eller traume)” (32).

Akutt hjerteinfarkt er forbundet med symptomer som brystmerter og epigastriesmerter med stråling til arm, skulder, rygg eller kjeve. Smertene er assosiert

med dyspnoe, kvalme, oppkast og synkopetendens/svimmelhet. Symptomene varer vanligvis minst 20 minutter, men kan ha kortere varighet. Smertene er ikke påvirket av bevegelse i musklene i den affiserte region eller forverret av dyp inspirasjon (33).

## **Historie**

At hjerteinfarkt var noe som kunne skje som følge av trombosering av koronarkar ble først beskrevet av Herrick i 1912, men det var ikke før DeWood et al. i 1980 så at det var obstruktive tromber i koronarkar da de undersøkte pasienter med akutt hjerteinfarkt med angiografi. Forsøk gjort av blant annet Reimer og Jennings viste så effekt av reperfusjon og dette kom da mer i fokus som terapi. Remmer og Jennings så at ved å okkludere CX i 40 min, 3 timer og 6 timer, for så å reperfunderer i 2-4 dager at området med transmural nekrose i posterior papillemuskel var en effekt av hvor lang tid karet var okkludert. Irreversibel skade skjer altså over tid og den starter subendokardielt hvor de første myocytene dør etter 20-40 minutter, og beveger seg ut mot subepikard hvor det fortsatt er myocytter det er mulig å redde etter 6 timer (34).

## **Diagnostikk**

Sammen med symptomer tas det i første omgang et 12-avlednings EKG og biomarkører for å se etter tegn på hjerteinfarkt. På EKG skal man da kunne se nye ST-elevasjoner i to eller flere nærliggende avledninger med en økning på mer eller lik 0,2 mV i V1-V3 eller 0,1mV i de andre avledningene. Har man ikke ST-elevasjon kan man se etter ST-depresjon i V1-V3 som et tegn på bakreveggs-infarkt eller T-bølgeabnormaliteter som T-inversjon eller hyperakutte T-bølger (som tidlig tegn på akutt hjerteinfarkt).

Biomarkører man kan måle er myoglobin, hjertespesifikk troponin-T og troponin-I og CK-MB. Myoglobin stiger nesten med en gang, peaker tidlig og er tilbake innen 12t. Troponiner og CK-MB stiger relativt kjapt og kan måles i plasma etter 4-12 timer. Troponiner forblir forhøyet i 1-2 uker, men CK-MB er tilbake til normalnivå etter 3-4 dager. Man kan slik bruke disse diagnostisk til å se ca hvor ferskt et hjerteinfarkt er. Man kan også bruke disse markørene for å monitorere etter eventuelle reinfarkt. (35). Man kan også gjøre ekkokardiografi og koronar angiografi for videre utredning av hjerteinfarkt.

## Reperfusjon

Reperfusjon er gjenoppretting av blodstrøm i et blodkar. I hjertet dreier dette seg om å gjenopprette blodstrøm i et tett koronararterie, det kan være venstre hovedstamme, høyre koronararterie, LAD eller CX. Dette kan gjøres med blant annet percutan coronary intervention (PCI), trombolyse eller koronar bypass (36). Reperfusjon gjør at oksygentilførselen gjenoprettes i tillegg til at man får vasket vekk toksiske metabolitter (37). Reperfusjon kan også føre til reperfusjonsskade, definert som myokardiell-, vaskulær-, eller elektrofysiologisk dysfunksjon induisert av gjenoppretting av blodgjennomstrømning til tidligere ischemisk vev (38). Dette involverer økt inflammasjon, arytmier og apoptose. Det som i hovedsak fører til disse hendelsene er ROS, nøtrophile granulocytter og kalsiumloading. Dette fører til celledød av celler som var fungerende rett før reperfusjon. Dyrestudier på akutt hjertesvikt har vist at reperfusjonsskade er skyld i opptil 50% av den endelige infarktstørrelsen (39).

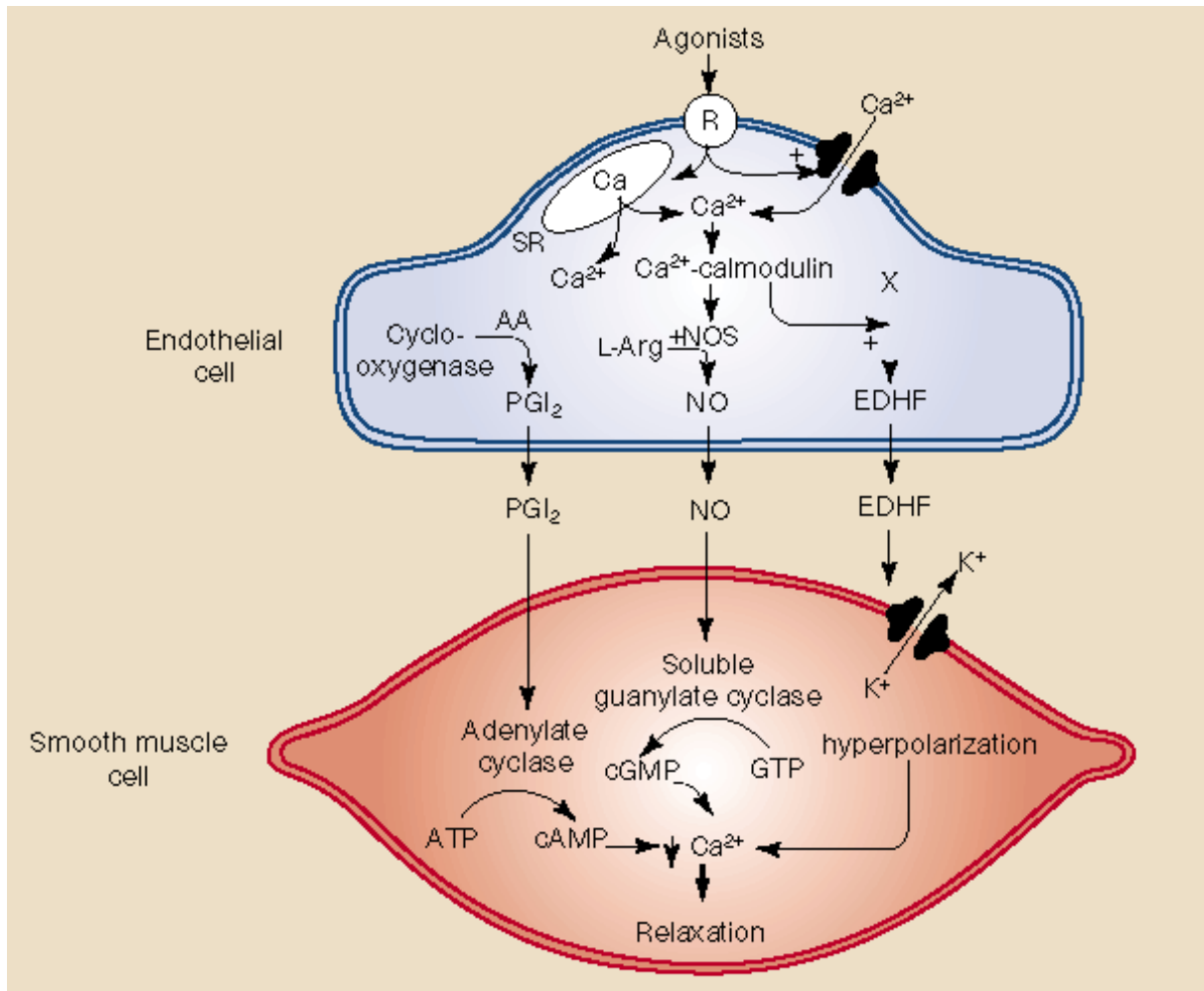
Under ischemi i hjertet dannes det ROS, som under reperfusjon distribueres til nærliggende vev (40). Når ROS overstiger cellens nivå av antioksidanter skjer celledød. Eksempler på ROS er superoksid ( $O_2^-$ ) og hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) (41). ROS genereres av skadde myocytter og endotelceller i den ischemisk affiserte sonen. I tillegg genereres de av nøtrophile granulocytter som blir aktiverte ved reperfusjon. ROS fører så til skade på cellemembraner som igjen fører til kalsium loading av cellene i tillegg til at ROS blant annet fungerer som apoptotisk stimuli (2).

Ved obduksjon av mennesker med akutt hjerteinfarkt som dødsårsak har man funnet at celledøden i hjertet skjer som en kombinasjon av både nekrose og apoptose (42). Det er rapporter om at apoptose står for hoveddelen av celledøden etter ischemi/reperfusjon (43), men også om at nekrose dominerer og at apoptosen kun står for 8% (44). Hos hunder finner man både nekrose og apoptose etter ischemi/reperfusjon (45).

Normalt er konsentrasjonen av NO mye høyere enn konsentrasjonen av superoxide ( $O_2^-$ ) i endotelcellene, og dette gjør at NO effektivt kan ta seg av de relativt små nivåene av intracellulært  $O_2^-$ , redusere arteriell tonus via guanylate cyklase-aktivering som gir økt



cGMP og lavere nivåer av  $\text{Ca}^{2+}$  i glatt muskel. NO hemmer og plateaggregering og trombedannelse og minimerer adhesjon mellom leukocytter og endotelcellenes overflate. Innen minutter etter reperfusjon endres dette forholdet mellom NO og  $\text{O}_2^-$ , som så blir i overtall.



**Figur 3:** NO fører gjennom guanylate cyclase til økt cGMP i glatt muskel. Dette fører sammen med økt konsentrasjon av cAMP til lavere  $\text{Ca}^{2+}$  konsentrasjon, noe som hemmer kontraksjon og gir vasodilatasjon (46).

Nå får vi en situasjon hvor endotelcellene og leukocytter produserer mer  $\text{O}_2^-$ , sammen med lavere NO-produksjon for å ta hånd om  $\text{O}_2^-$ . Det som er igjen av NO vil reagere med  $\text{O}_2^-$  og dette gjør at den vasodilatoriske effekten til NO opphører siden NO nå ikke kan fungere som second messenger til glatt muskel. Akkumuleringen som skjer ved lave

NO-nivåer etter ischemi/reperfusjon gjør at det skjer en økt produksjon av hydrogenperoxide ( $H_2O_2$ ) og dette gjør igjen til at inflammasjonen i endotelcellene går opp og leukocytadhesjonen øker. Det er altså en situasjon etter ischemi/reperfusjon med en hemmet vasodilatasjon og økt produksjon av ROS, både på grunn av at NO-produksjonen hemmes og  $O_2^-$  dermed øker, men også pga en økt leukocytadhesjon. (2)

Apoptose i kardiomyocytter hos kaniner og hunder induseres under ischemi, men fullføres ikke før blodstrømmen gjenåpnes ved reperfusjon (3), (45). 2 timer ischemi uten reperfusjon gjør at man finner apoptotiske kardiomyocytter hos rotter. Denne prosessen akselleres ved 45min ischemi fulgt av 60min reperfusjon (47). Det kan altså tyde på at det er enkelte speciesforskjeller på dette feltet.

ROS' evne til å indusere apoptose i kardiomyocytter har vært undersøkt ved å se på en cellekultur med kardiomyocytter og tilsette enten  $H_2O_2$  eller  $O_2^-$ . Man fant ut at begge disse ser ut til å kunne indusere apoptose, og begge viste en økning i uttrykk av p53, men bare  $H_2O_2$  viste økt uttrykk av Bad og ingen påvirket Bcl-2 eller Bax.  $H_2O_2$  førte også til økt cytochrome c-release i cytosol som følge av oppregulering av caspase-3. Man så også at Bad og Bax heterodimeriserte med Bcl-2, noe som fører til økt cytochrome c-release. ROS kan altså indusere apoptose i kardiomyocytter (48).

## Apoptose

Apoptose er "programmert celledød" hvor celler får et signal om å selvdestruere. Dette skjer normalt i embryologisk utvikling og aldring, og det skjer hele tiden en apoptose for å opprettholde cellepopulasjonen i kroppen ved å holde apoptosen lik celledelingen. Om dette ikke er balansert vil vev enten vokse eller bli mindre. Eksempler på dette i dyreriket er for eksempel dannelsen av klør hos mus. De starter ut som en spadelignende struktur, før apoptose fører til at det kan dannes klør. Et annet eksempel er når rumpetroll utvikler seg videre til frosker (49). Halen de før hadde som rumpetroll trengs ikke lengre og dens celler får signal om å gå i apoptose. Hos mennesker skjer det for eksempel når ductus arteriosus lukkes og apoptose inntreffer. I beinmarg og tarm skjer det hver time apoptose av milliarder av celler og opp til halvparten av alle nerveceller som dannes dør før de er ferdige.

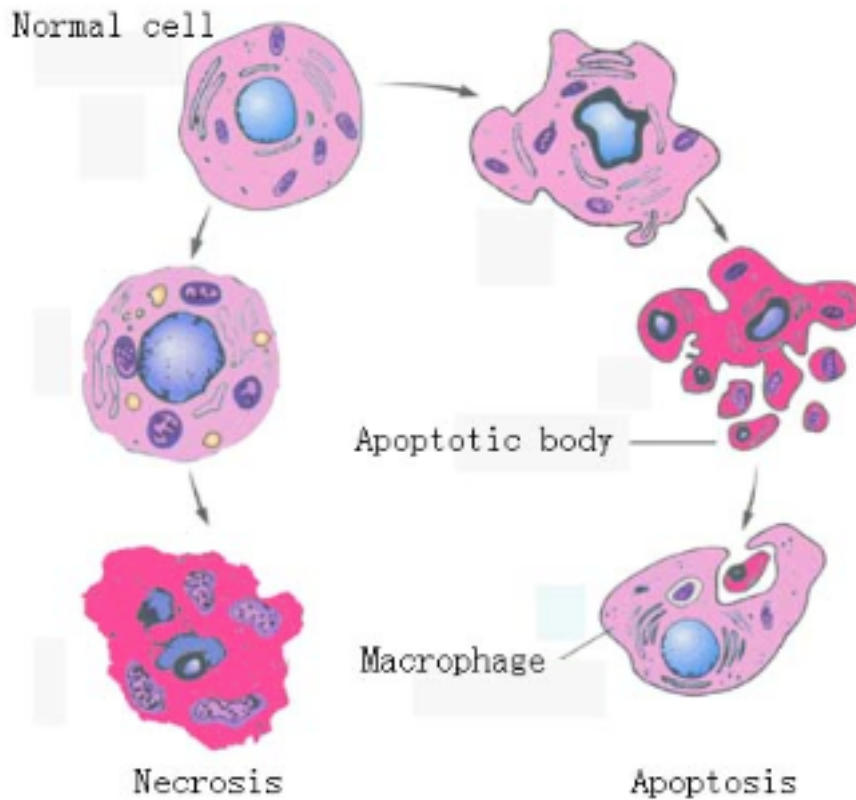
Apoptose krever ATP og er en nøye regulert prosess. Hvordan prosessen er regulert vil jeg komme tilbake til, men man kan godt forstå at den er så regulert som den er siden alle celler vi har med kjerne har muligheten til å gå i apoptose om de skulle få riktig signal. En løst regulert apoptose ville kunne fått fatale konsekvenser. Apoptose kan i tillegg til embryonal utvikling og aldring settes i gang som følge av forskjellige stimuli som varme, kulde, stråling, inflammasjon og ischemi. De samme stimuli som gir apoptose i lave doser, vil kunne gi nekrose i høye doser (49).

### **Morfologi**

Når en celle får et apoptotisk signal vil forløpet kunne se slik ut:

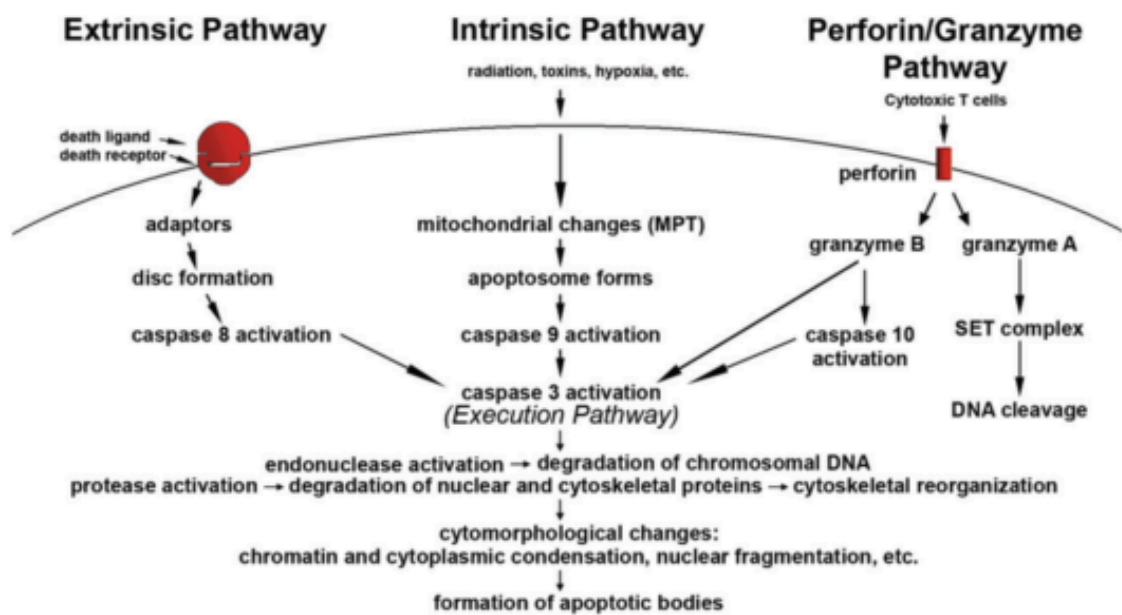
- Kondensasjon av chromatinet i nucleus, pyknose, dette er irreversibelt.
- Cellen krymper, tettpakkede organeller, tykkere cytosol
- Cytoskjelettet kollapser
- Kjernemembranen åpnes
- DNA-fragmentering
- Cellemembranen markeres for fagocytose

Cellen fagocyteres av en makrofag uten at den selv sprekker og gir ikke inflammasjonsuttrykk siden bestanddelene ikke kommer ut i interstitiet og de fagocyterende cellene ikke uttrykker cytokiner pga apoptose. Dette gjør også at den apoptotiske cellens bestanddeler kan gjenbrukes (50) (figur 4).



**Figur 4:** Den apoptotiske cellen krymper og danner etter hvert apoptotiske legemer som kan fagocytteres av makrofager. Dette i motsetning til den nekrotiske cellen som sveller og etter hvert sprekker. (51)

Apoptose har tre forskjellige pathways den kan følge, extrinsic, intrinsic og perforin/granzyme pathway som man kan se på figuren nedenfor, men før jeg kommer dit vil jeg forklare noen av begrepene.



**Figur 5:** *Intrinsic pathway viser hvordan et apoptotisk signal fører til endringer i mitokondrienes porer som fører til cytochrome c utslipp, apoptosomet dannes og caspase 9 er aktivert. Dette aktiverer videre caspase 3 som igangsetter execution pathway. Extrinsic pathway virker ved at en ligand, for eksempel FAS-ligand binder sin reseptor og dette fører til caspase 8-aktivering som også aktiverer caspase 3 (49).*

## Caspaser

Caspaser er en stor familie av evolusjonært konserverte proteaser som man finner fra *Caenorhabditis elegans* til mennesker. Caspasenes nøkkelrolle i apoptose er basert på tre observasjoner. For det første har man sett at syntetiske eller naturlige hemmere av caspaser vil hemme apoptose induert av et flertall stimuli. For det andre ser man at dyr som mangler visse caspaser viser en svekket evne til apoptose. For det tredje ser man at caspasene er ansvarlige for mesteparten av den proteolytiske kløyvingen som leder opp til apoptose (52).

Hver caspase er en cysteine aspartase. Det betyr at den opptar nukleofilt cysteine i sitt aktive sete for å kunne kløyve astartatesyre-peptidbindinger i andre proteiner. Caspaser er syntetisert som inaktive procaspaser. Proteolytisk prosessering av procaspasene genererer en aktiv caspase. Basert på kinetiske data, substratspesifisitet og procaspase-struktur har man kunnet dele caspasene inn i initierende caspaser og effektorcaspaser. De initierende caspasene aktiverer effektorcaspasene som en respons på et apoptotisk

signal. Effektorcaspasene kløyver så forskjellige cellulære proteiner og setter med det i gang "selve" apoptosen (52). Dysregulering av caspaser skjer i flere humane sykdommer som cancer, autoimmune sykdommer og neurodegenerative sykdommer. Det er økende bevis for at det er et terapeutisk potensiale ved å regulere caspasenes aktivitet ved apoptose (53). Hvordan dette kan gjøres med AM vil jeg komme inn på senere.

### **Procaspase-aktivering**

Oligomerisering er sett på som den universelle mekanismen for initierende caspase-aktivering (52). Et eksempel på en slik oligomerisering er når FAS-reseptor har bundet FAS-ligand i extrinsic pathway og aktiverer videre procaspase-8 til caspase-8 (54).

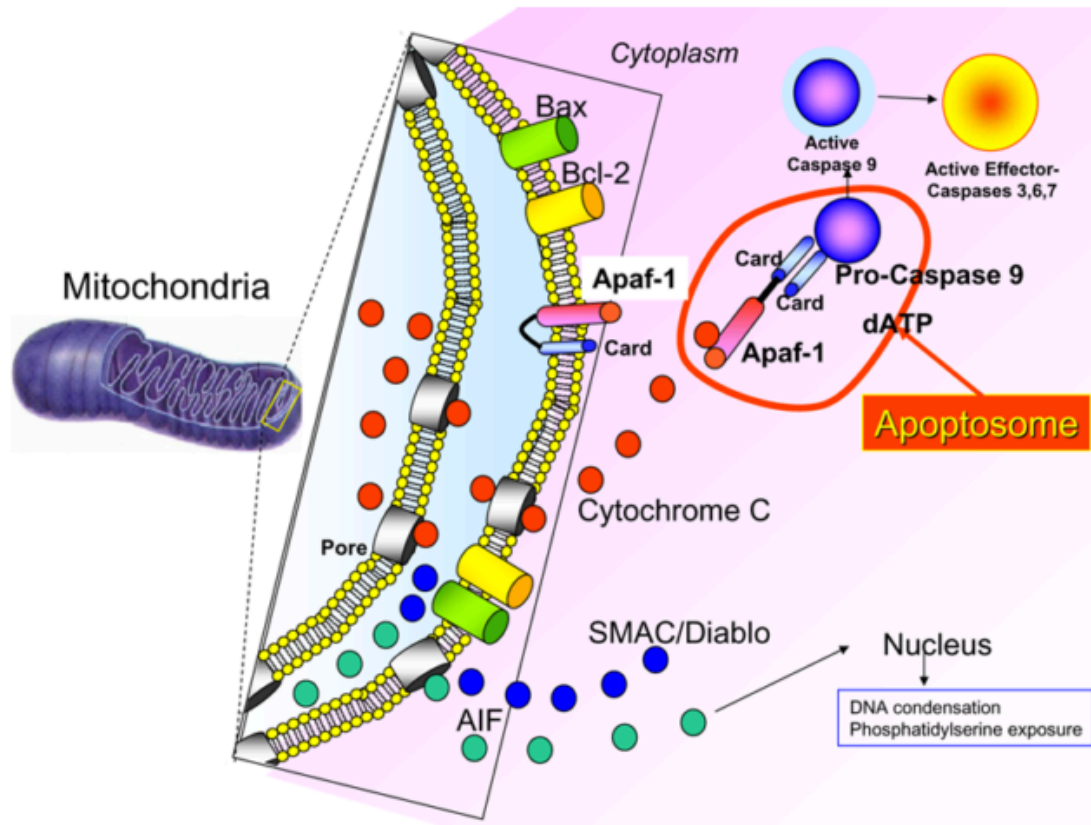
Om man induserer en økt nærhet av procaspase-8, så vil dette gjøre at dette ellers så stabile zymogenet kløyver seg og blir til et aktivt caspase-8 (55). For procaspase-9 fortøner aktiveringen seg litt annerledes. Procaspase-9 er med i intrinsic pathway og aktiveres etter at et apoptotisk signal gjør at mitokondrienes membranpotensiale og deres permeabilitet i mitochondrial permeability transition pores (MPTP) for cytochrome c endres og cytochrome c forlater mitokondriene. Her går de sammen med APAF-1, dATP og procaspase-9 danner et apoptosom. Dette aktiverer procaspase-9 til caspase-9. Akt hemmer caspase-9 ved fosforylering og gjør at den ikke kan virke apoptotisk (56).

I tillegg til den caspase-avhengige kaskaden vi her ser på intrinsic pathway kan mitokondriene også skille ut apoptosis inducing factor (AIF) som selvdestruerer cellen uten å aktivere noen caspaser (figur 7). AIF er et flavoprotein som normalt ligger i mitokondriene, men translokerer til nukleus ved induksjon av apoptose. Dette skaper kondensering av chromatin og fragmentering av DNA. Det får også mitokondriene til å slippe ut cytochrome c og slik sette igang intrinsic pathway. Bcl-2 er med på å hindre utslipp av AIF, men styrer ikke AIFs aktivitet når det er ute av mitokondriene (57).

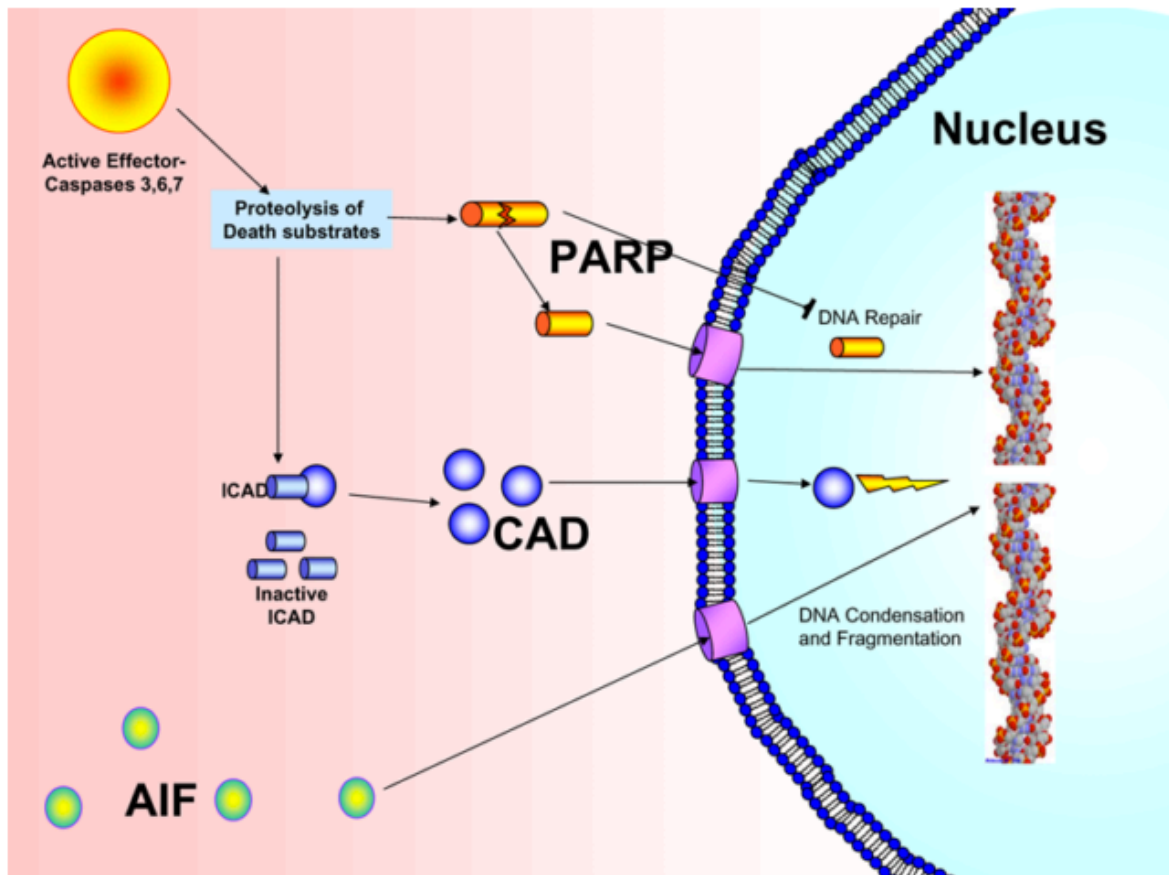
### **Intrinsic pathway**

Intrinsic pathway settes igang av et apoptotisk signal, det kan for eksempel være hypoksi som ved hjerteinfarkt. Dette signalet fører til at procaspase-9 blir aktivert som nevnt ovenfor, og dette aktiverer igjen procaspase-3 til caspase-3 som så setter i gang

execution pathway hvor Poly ADP-ribose polymerase (PARP) blir kløvet og ikke kan reparere DNA og inhibitory caspase activated DNase (ICAD) kløyves til caspase activated DNase (CAD), som igjen fører til kondensering av chromatin og DNA-fragmentering (49), (58).



**Figur 6:** Cytochrome c-utslipp gjør at apoptosomet dannes sammen med Apaf-1, card, dATP og pro-caspase 9. Dette fører så til aktivt caspase 9, som igjen aktiverer caspase 3. (58)



**Figur 7:** Her ser man hvordan execution pathway utføres ved at ICAD spaltes av til den aktive DNAsen CAD som entrer nukleus og fører til DNA-kondensering og fragmentering. PARP kløyves slik at de ikke lenger kan utføre reparasjon av DNA. AIF entrer nucleus og forårsaker DNA-kondensering og fragmentering. (58)

### Extrinsic pathway

Extrinsic pathway aktiveres ved at en death reseptor, for eksempel Fas aktiveres av Fas-ligand. Fas binder så adaptorproteinet Fas-associated death domain (FADD) som igjen rekrutterer procaspase-8 som nå aktiveres. Dette kalles tilsammen Death inducing signal complex (DISC). Procaspase-8 kløyver så Bid som så stimulerer mitokondriene til effluks av cytochrome c. Caspase-8 aktiverer også caspase-3 som videre setter igang execution pathway (59).

### Bcl-2-familien

Bcl-2-familien består av både antiapoptotiske (Bcl-xL, Bcl-2) og proapoptotiske proteiner (Bad, Bax, Bak, Bid,).

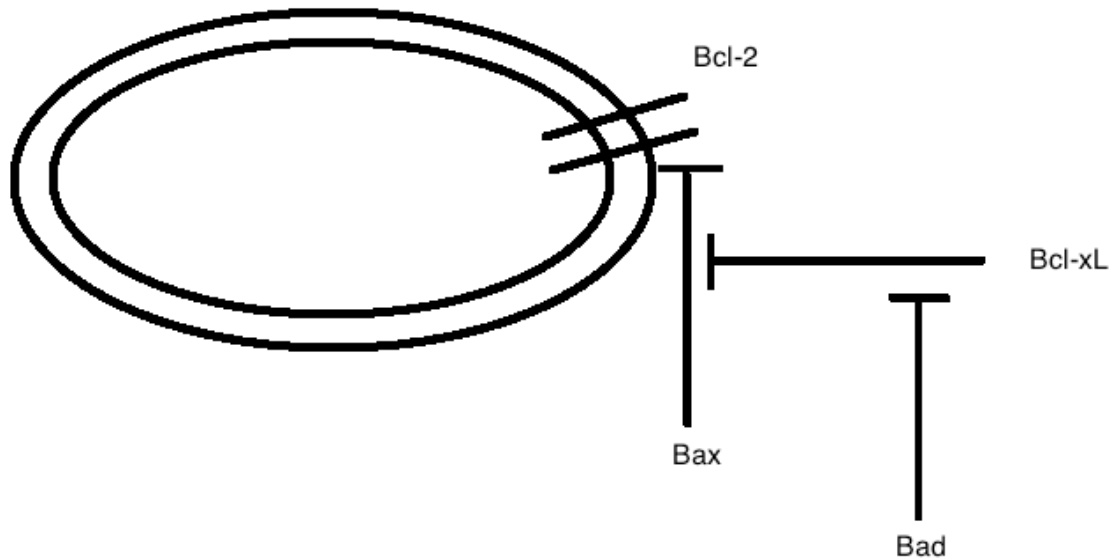


Bcl-2 er sammen med Bcl-xL lokalisert i mitokondriemembranen, i endoplasmatisk retikulum og i nuclear envelope. Bcl-2 og Bcl-xL hindrer utslipp av cytochrome c og AIF. (60) (61) (62) Bcl-2 fungerer antiapoptotisk i kardiomyocytter ved å hemme p53. (63)

Bad er et proapoptotisk protein som indirekte fører til endring i MPTP og utskillelse av cytochrome c. Bad sitt virke ved å heterodimerisere de antiapoptotiske Bcl-2 og Bcl-XL, noe som igjen fører til apoptose ved at Bcl-xL da ikke kan hemme det pro-apoptotiske Bax som fører til økt permeabilitet i mitokondriene og cytochrome c-release (64). Bad kan fosforyleres på to seter, serine 112 og serine 136. Fosforylert Bad vil så bindes av et regulatorprotein kalt 14-3-3 og kan da ikke heterodimerisere med Bcl-xL og virke apoptotisk. (65). Bad kan heterodimerisere med Bcl-2, men har større affinitet for Bcl-xL. Dette frigjør så Bax fra Bcl-xL-Bax-komplekset (66) og Bax kan så virke apoptotisk videre ved å hemme Bcl-2 (figur 8). Er halvparten av Bad bundet opp i heterodimerer med Bcl-xL så vil cellen være beskyttet mot apoptose. AM vil gjennom Akt kunne fosforylere Bad og på den måten beskytte cellen mot Bads apoptotiske virkning (67), (68).

Bax translokerer til mitokondriemembranen etter MPTP-åpning, noe som igjen skaper en økt permeabilitet for cytochrome c slik at det kan gå ut i cytosol og danne apoptosom og aktivere procaspase-9 (66), (69). Når Bax er i overtall, så vil Bax motvirke Bcl-2s antiapoptotiske evne (70). Hos hunder finner man en nedgang i Bcl-2 og en økning i Bax etter ischemi/reperfusjon (45).

Bid blir aktivert i extrinsic pathway ved at det kløyves av procaspase-8. Bid vil så føre til økt cytochrome c-utslipp fra mitokondriene og procaspase-9-aktivering (71).



**Figur 8:** *Bcl-2* regulerer MPTP, med *Bax* som en hemmer av *Bcl-2*. *Bcl-xL* hemmer igjen *Bax* ved å heterodimerisere og binde *Bax* og *Bad* hemmer *Bcl-xL*s evne til å heterodimerisere med *Bax* ved å kompetitivt binde *Bcl-xL*. (figur av undertegnede).

## FOXO

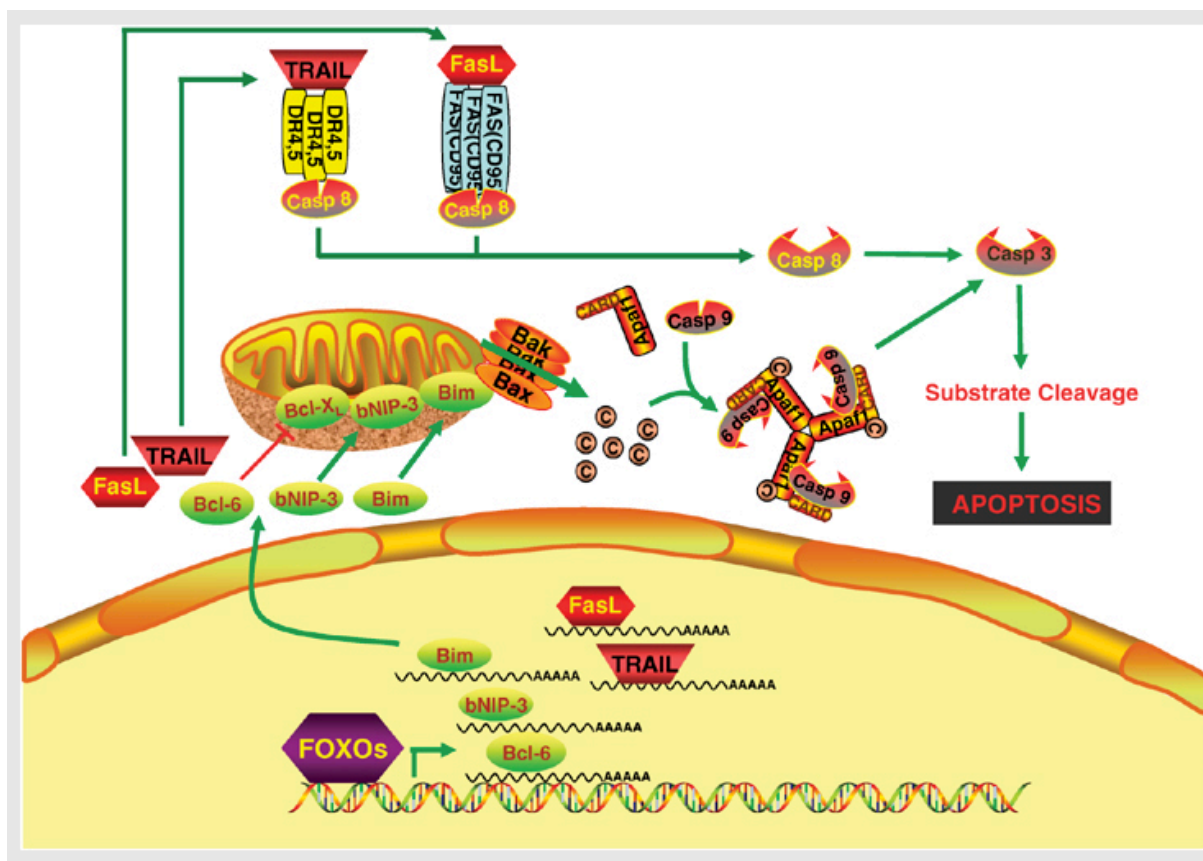
FOXO (forkhead box O) er en gruppe transkripsjonfaktorer, FoxO1, FoxO3, FoxO4 og FoxO6, hvor FoxO4 og FoxO4 er spesielt som uttrykt i kardiomyocytter. (72) (73) FoxO hemmes av insulin og vekstfaktorer, hvor de fosforyleres av Akt (som stimuleres av AM) og blir bundet opp av 14-3-3. (74) Fosforylert Foxo bundet til 14-3-3 gjør at Foxo ikke kan binde DNA og føre til transkripsjon. Komplekset blir så fraktet ut av nukleus og 14-3-3 må slippe før noe kan skje videre med Foxo. (75)

Under sult eller oksidativt stress kan FoxO aktiveres ved økt AMP-activated protein kinase (AMPK)-aktivitet eller nedsatt Akt-aktivitet. De kan både fungere pro- og antiapoptotiske. Proapoptotisk fungerer de ved å oppregulere transkripsjonen av Fas-ligand og TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) og fører så til aktivering av extrinsic pathway som går via aktivering av caspase.8 og caspase-3. I tillegg øker FOXO transkripsjonen av pro-apoptotiske proteiner i Bcl-2-familien som fører til økt utskillelse av cytochrome c og videre en typisk intrinsic pathway med aktivering av apoptosom og

caspase-3 (figur 9). Antiapoptotisk fungerer de med at de motvirker ROS-produksjon under oksidativt stress. Denne både pro- og antiapoptotiske effekten kan være et uttrykk for at FoxO er med på bekjempe "små" celledskader, men om intensiteten på stimuliet blir større, så sender den cellen inn i arrest eller apoptose. (76)

Kardiomyocytterne utgjør 75% av det totale vevsvolumet i hjertet., men ser man på antall, så er det tre ganger så mange cardiac microvaskular endothelial cells (CMEC) som kardiomyocytter. (77) Disse CMEC har man sett nærmere på i forhold til apoptose ved ischemi/reperfusjon. Det har blitt vist at CMEC går i apoptose før kardiomyocytterne som følge av ischemi/reperfusjon. Etter 5-60 minutter reperfusjon ser man TUNEL-positive (TP) endotelceller som tegn på apoptose. Så ser man at omkringliggende kardiomyocytter blir TP i et økende omfang. Det at apoptosen starter i endotelcellene, for så å spre seg rundt i nærliggende kardiomyocytter kan tyde på at det skjer en parakrin aktivering av apoptose i kardiomyocytterne enten ved diffusjon av proapoptotiske mediatorer som FAS-ligand eller TRAIL eller frie radikaler som skader mitokondriene. (78)

FoxO3a er signifikant økt i CMECs under simulert ischemi/reperfusjonsskade og fosforyleringen av FoxO3a av Akt (som inaktiverer den) går ned i CMECs sammenlignet med normale celler, og dette indikerer en deaktivering av Akt og en aktivering av FoxO3a. (79) En økning i aktiveringen av FoxO3a ble også observert i hjertevev fra rotter med myokardiell ischemi/reperfusjonsskade. Hemmet man så FoxO3a, så man en signifikant reduksjon i infarkt område og apoptose av kardiomyocytter. (80) (81) Økt aktivering av FoxO3a så man også i hjertevev fra mus med ischemi/reperfusjonsskade. (73).



**Figur 9:** FOXO øker transkripsjonen av antiapoptotiske proteiner som fører til økt cytochrome c-utslipp og apoptosomdannelse og til slutt apoptose. Det fører også via oppregulering av Fas-ligand og TRAIL til caspase 8-aktivering, som igjen fører til apoptose (82).

### p53

p53 er et tumor suppressor protein som sørger for kontroll av normal vekst og stabilitet i genomet. Viktigheten av dette ser man ved at ervervede mutasjoner i P53 eller dens oppstrøms aktivatorer er observert i alle humane former for cancer. Avhengig av hvilken type stress og kofaktorer kan p53 sette igang forskjellige prosesser. Den kan blant annet sette igang både intrinsic og extrinsic apoptotisk pathway ved oppregulering av forskjellige apoptotiske mediatorer som Fas, PUMA, Bax, og NOXA og bidrar til en hemming av blant annet Bcl-xL og da indirekte Bcl-2. Om p53 faktisk er apoptotisk ved ischemi i kardiomyocytter diskuteres og er foreløpig noe uvisst (83), men om p53 deltar her så kan man hemme den med AM via aktivering av Mdm-2 og da også hemme apoptose.

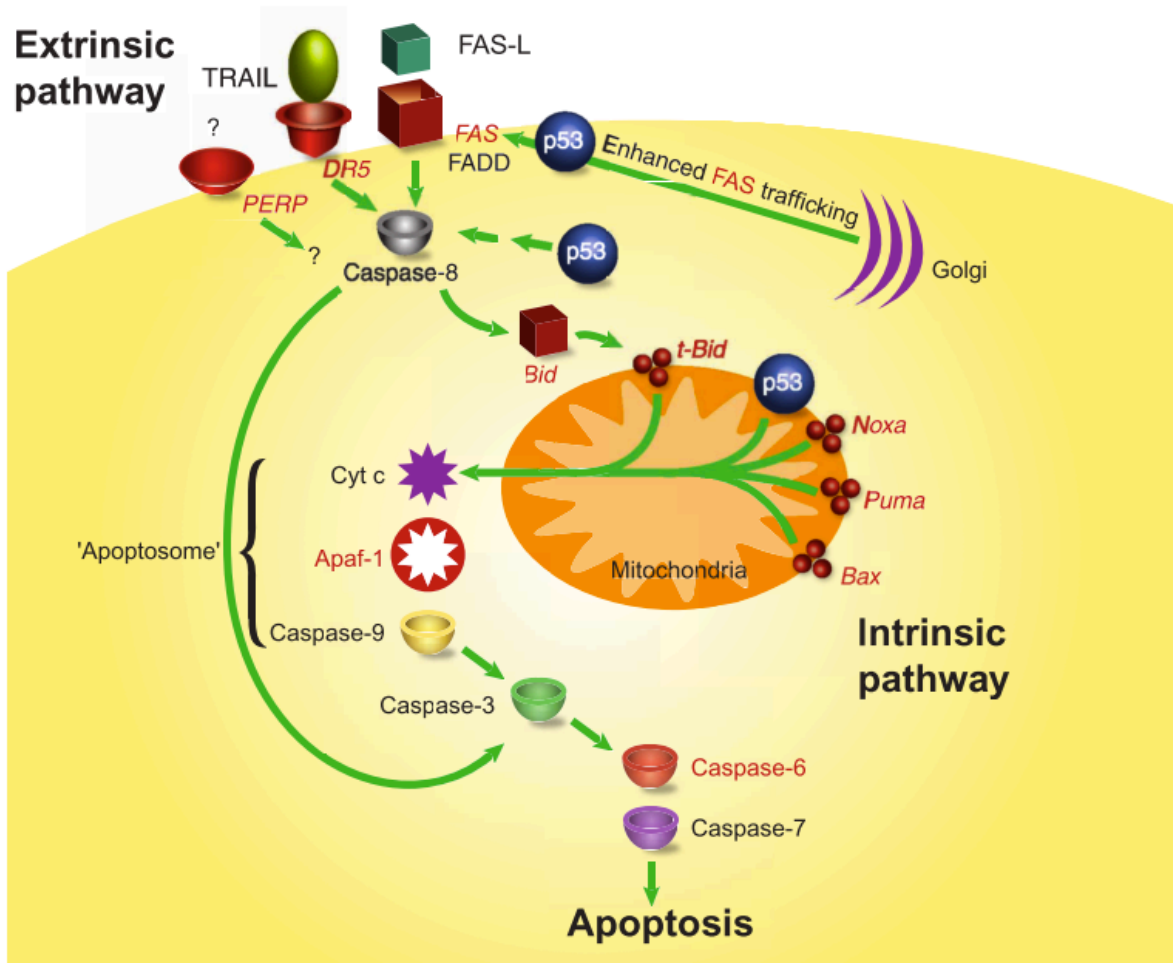
### Mdm2

Mdm2 er et oncoprotein som beskytter cellen mot apoptose ved å hemme p53. Dette kan gjøre at celler deler seg uhemmet, slik man ser i flere typer cancer hvor man finner en

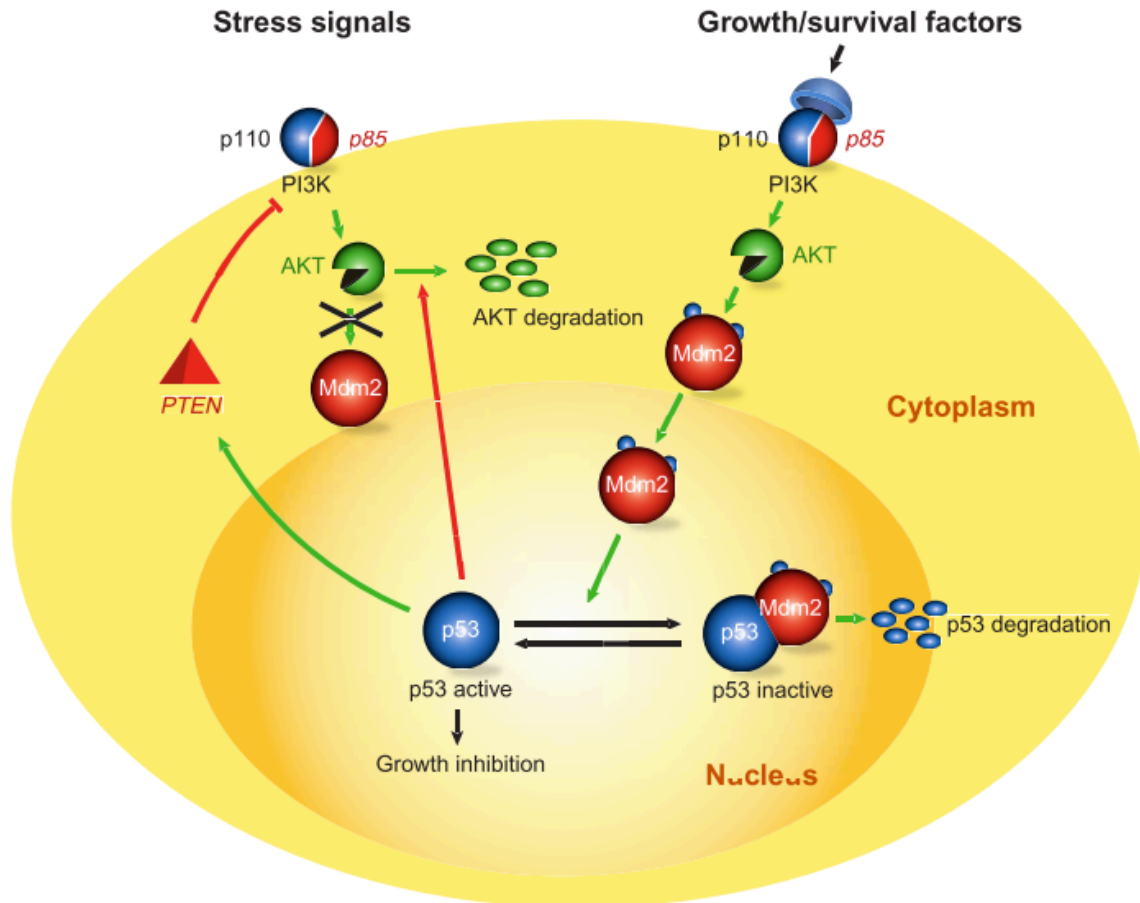
overekspresjon av Mdm2 (84). P53 induserer genet for Mdm2 som en del av en negativ feedback-loop (59). Mdm2 finnes også i cytosol og kan fraktes over til kjernen vha fosforylering. Dette gjør at Mdm2 kan entre nucleus fra cytosol og slik danne et kompleks med P53. Mdm2 binder det transkripsjonelle aktive setet på P53, og blokkerer så P53s mulighet for genekspressjon. Komplekset fraktes så ut i cytosol, og det blir degradert ved at det oppfører seg som en ligase.

Adrenomedullins funksjon på Mdm2 er å gjennom å fosforylere Akt i cytosol kan fosforylere, og aktivere Mdm2. Mdm2 fraktes så over til nukleus og binder der p53. Komplekset Mdm2 og p53 blir så fraktet ut i cytosol hvor det degraderes. P53 fungerer apoptotisk ved at den setter ned transkripsjonen av antiapoptotiske proteiner i Bcl-2-familien og øker transkripsjonen av proapoptotiske proteiner i Bcl-2 (BAX) PI3K/Akt sørger for å fosforylere serine166 og serine 186-setene på Mdm2 (figur 11) (84),(59).

Man har sett at kardiomyocytter er mer motstandsdyktige mot ischemi-/reperfusjonsskade ved økt uttrykk av Mdm2. (85) Denne protektive virkningen til Mdm-2 ser man igjen hos musehjerter med redusert Mdm2, hvor disse hjertene var mer utsatt for ischemi-/reperfusjonsskade.



**Figur 10:** *p53, Bid, Bax og Puma fører til økt cytochrome c-utslipp fra mitokondriene, og dette fører til apoptose (59).*



**Figur 11:** PI3K fosforylerer Akt som igjen fosforylerer og aktiverer Mdm2 som så kan gå inn i nukleus og binde det apoptotiske p53 og frakte det ut av nukleus for degradering (59).

## NF-kappaB

NF-kappaB er en pleiotropisk (et gen kontrollerer flere forskjellige fenotypiske uttrykk i en organisme) transkripsjonsfaktor som er med på å regulere flere prosesser i kroppen, deriblant apoptose. NF-kappaB er normalt bundet til Inhibitory-kappaB (IKB) som maskerer NF-kappaBs sete for nukleært opptak. NF-kappaB aktiveres så ved at Inhibitory kappaB (IKK)kinase fosforylerer IKB slik at NF-kB kan translokere til nukleus for regulering av genekspressjon. Fosforylert IKB blir da markert for degradering.

I hjertet har NF-kappaB vist å bli aktivert ved aterosklerose, myokarditt, frastøting ved transplantasjon, ischemi/reperfusjon, angina, ervervet hjertesvikt, dilatert kardiomyopati, ischemisk og kjemisk prekondisjonering, varmesjokk, brantraumer og hypertrofi av isolerte kardiomyocytter (86).NF-kB regulerer ekspresjon av flere anti-apoptotiske gener i hjertet etter hypoksi, ischemi/reperfusjon og ischemisk

prekondisjonering. Disse er blant annet Bcl-2 og Bcl-xL. Bcl-2 er nedregulert ved ischemi/reperfusjonsskade, men er økt ved ischemisk prekondisjonering. Det er i begge tilfeller sammenfallende med økt NF-kB-aktivitet og det viser at NF-kBs regulering av Bcl-2 mulig spiller forskjellige roller i forhold til om hvilke stimuli hjertet er utsatt for (87). NF-kB er vist å være antiapoptotisk ved anestetisk prekondisjonering før ischemi/reperfusjon i form av at det bidrar til økt uttrykk av Bcl-2, lavere utslipp av cytochrom c og mindre aktivering av caspase-3 (88). Det er på den andre siden vist at genetisk blokkering av NF-kB beskytter mot hjerteinfarkt hos gnagere etter ischemi/reperfusjon (86). Det kan derfor tyde på at NF-kB både kan være pro- og antiapoptotisk. AM virker på NF-kB via PI3K/Akt ved at det fører til fosforylering av IKB som på den måten slipper NF-kB og NF-kB blir aktivert (figur 1).

## **Aktuelle metoder for å undersøke apoptose**

### **TUNEL**

Terminal dUTP Nick End-Labeling (TUNEL) er en teknikk hvor man ser etter kløyvingsprodukter etter at endonukleaser har brutt ned cellens DNA. Dette gjøres ved at man ved enzymet terminal transferase adderer merket dUTP til DNA-fragmentene. Disse kan man så se etter med lys- og fluorescensmikroskopi eller ved flow cytometri. Fordelene med denne metoden er at det går relativt raskt, det kan gjøres ila. 3 timer, og at sensitiviteten er høy. Bakdelen er at man kan få falskt positive resultater fra nekrotiske celler og celler som er under DNA-reparasjon (89). Det anbefales derfor at denne undersøkelsen kombineres med et annet assay. Siden DNA-kløyving er en av de siste prosessene i apoptose lønner den seg ikke til å se på tidlige faser av apoptose (49).

### **DNA-laddering**

Endonuklease-mediert kløyving av nukleært DNA (90) fører til DNA-fragmenter på 180-200 basepar. Denne metoden har en sensitivitet på  $1 \times 10^6$  celler og lønner seg dermed best på vev eller cellekulturer hvor det er mange apoptotiske celler tilstede. Dette er også som ved TUNEL en teknikk for å se på en sen fase av apoptose og man kan få falsk positive resultater som følge av at nekrotiske celler kan produsere lignende DNA-fragmenter (49).

For å se på PI3K-aktivitet kan man bruke PI3K-hemmeren wortmannin (91) som



kontroll (5). For å se på fosforylering av apoptotiske proteiner kan man bruke Western Blot.

## Diskusjon

Som man ser i denne oppgaven har AM, gjennom PI3k og Akt en direkte anti-apoptotisk virkning gjennom fosforylering av Bad (67), slik at de anti-apoptotiske proteinene Bcl-2 og Bcl-xL ikke blir hemmet. På den måten hemmes utslipp av cytochrom c, som da ikke kan føre til apoptosom-dannelse og caspase-3-aktivering og apoptose. Akt kan også sørge for fosforylering av Mdm2 som igjen vil hemme p53s apoptotiske funksjon(59,84,85). Gjennom fosforylering av Caspase 9 (56)og FoxO (79,82), vil Akt også hemme caspase-kaskaden både via intrinsic pathway og extrinsic pathway. I tillegg har AM et indirekte anti-apoptotisk potensiale ved at det stimulerer NO-produksjon (10,11), og på den måten hindrer ROS-dannelse, både ved at NO da kan fortsette sitt bidrag som scavenger mot  $O_2^-$ , men også slik at leukocytadhesjonen blir mindre.

Hvor stort bidrag apoptosen gir til celledød etter ischemi/reperfusjon ser ut til å være noe uavklart, så dette vil absolutt være noe man kan se på ved eventuelle forsøk. Jeg har ikke kunnet finne at det er gjort forsket på AMs antiapoptotiske potensiale etter ischemi/reperfusjon hos griser. Dette vil være interessant både da de er høyredominante (28)som de fleste mennesker, men også fordi man kan komme frem til hvilken dose som må til på et dyr som er tilnærmet lik mennesket på størrelse og hvordan man skal administrere druget. Dette gjelder både for HV og VV. Et problem her kan være at om den systemiske dosen som må til for anti-apoptotisk effekt er veldig stor, så vil bivirkninger i form av hypotensjon (8) kunne føre til at de heldige effektene oppveies av bivirkningene. Dette gjelder især for en sviktende HV som er avhengig av preload for å opprettholde cardiac output. Hundeforsøkene (27) som er gjort hvor man ser på hjertets effekt etter ischemi/reperfusjon av HC ser ut til å være vanskelig å relatere til mennesket når hundene er venstredominante, og her vil griser være mer hensiktsmessig med tanke på anatomien.

Et annet poeng er at bare halvparten av mennesker som får proksimal okklusjon av HC får HVI (25). Om dette også gjelder for griser, så vil det kunne tenkes at halvparten av griseforsøkene vil måtte forkastes med tanke på å undersøke AMs anti-apoptotiske

effekt, men her vil man samtidig kunne få andre data, som for eksempel nettopp hvor mange griser som får HVI ved en HC-okklusjon. Her må man og tenke på at grisene ikke kan være sine egne kontroller og man vil da måtte dele opp i fire grupper, ikke-hypotensiv + saltvann, ikke-hypotensiv + AM, hypotensiv + saltvann og hypotensiv + AM. Det vil også være interessant å se på eventuelle forskjeller i apoptose hos de som utvikler en høyresidig svikt med lav cardiac output etter okklusjon kontra de som tolererer dette bedre.

En lukket thorax-modell hvor man går inn med et kateter via arteria femoralis og inn i HC under gjennomlysning vil kunne gjøre at man okkludere HC med ballong og i tillegg administrere AM intrakoronart under reperfusjon. Lengre okklusjoner av HC med strikk ved åpen thorax har erfaringsmessig har vist å føre til arrytmier og vi har på laboratoriet måttet dele opp ischemitiden i intervaller. En annen fordel med lukket thorax er et mye lavere traume for grisen og det er mindre sjanse for at man skader koronarkar og deres avgreininger under fridissekering før avsnøring. Dette bør til sammen kunne gi bedre betingelser for et stabilt forsøk enn om man gjør det åpent. Man kan så se etter infarkt tegn med EKG, tidlige infarktmarkører og med ekko. Etter reperfusjonen avliver man grisen før man tar ut hjertet, og måler infarktstørrelse (5), apoptose ved TUNEL og DNA-laddering, apoptotiske- og anti-apoptotiske proteiner ved Western blot.

## **Konklusjon**

AM fungerer anti-apoptotisk i flere dyremodeller hovedsakelig gjennom PI3K/Akt, men også ved oppregulering av NO. Videre forskning må til for å finne ut om dette også fungerer i en grisemodell, ved HVI og hvilke doser og type administrering som må til for å oppnå antiapoptotisk effekt.

## Referanser:

1. WHO. Cardiovascular diseases ( CVDs ). 2013;(March). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
2. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* [Internet]. 2000 Feb;190(3):255–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10685060>
3. Gottlieb R a, Burleson KO, Kloner R a, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* [Internet]. 1994 Oct;94(4):1621–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=295322&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Kitamura K. Adrenomedullin: A novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. Osaka, Japan: Biochemical and biophysical research communications; 1993. p. Vol 192, No 2, p553–560.
5. Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, et al. Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation* [Internet]. 2004 Jan 20 [cited 2013 Jan 25];109(2):242–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691041>
6. Wong HK, Cheung TT, Cheung BMY. Adrenomedullin and cardiovascular diseases. *JRSM Cardiovasc Dis* [Internet]. 2012 Jan;1(5):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23745696>
7. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev* [Internet]. 2000 Apr;21(2):138–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782362>
8. Nishimura J, Seguchi H, Sakihara C, Kureishi Y, Yoshimura H, Kobayashi S, et al. The relaxant effect of adrenomedullin on particular smooth muscles despite a general expression of its mRNA in smooth muscle, endothelial and epithelial cells. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1997 Jan;120(2):193–200. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1564363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
9. Ishimitsu T, Ono H, Minami J, Matsuoka H. Pathophysiologic and therapeutic implications of adrenomedullin in cardiovascular disorders. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2006 Sep [cited 2014 May 24];111(3):909–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616959>
10. De Matteo R, May CN. Direct coronary vasodilator action of adrenomedullin is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2014 May 12];140(8):1414–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1574158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Yoshimoto R, Mitsui-saito M, Ozaki H, Karaki H. Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. 1998;1645–54.
12. Kobayashi K, Kitamura K, Hirayama N, Date H, Kashiwagi T, Ikushima I, et al. Increased plasma adrenomedullin in acute myocardial infarction. *Am Heart J*

- [Internet]. 1996 Apr;131(4):676–80. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8721638>
13. Miyao Y, Nishikimi T, Goto Y, Miyazaki S, Daikoku S, Morii I, et al. Increased plasma adrenomedullin levels in patients with acute myocardial infarction in proportion to the clinical severity. *Heart* [Internet]. 1998 Jan;79(1):39–44. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1728561&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
  14. Eto T. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides* [Internet]. 2001 Nov;22(11):1693–711. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754955>
  15. Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, Ishimitsu T, Eto T, Kangawa K, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 1995 Nov 15;26(6):1424–31. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7594065>
  16. Kataoka Y, Miyazaki S, Yasuda S, Nagaya N, Noguchi T, Yamada N, et al. The first clinical pilot study of intravenous adrenomedullin administration in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* [Internet]. 2010 Oct;56(4):413–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20930593>
  17. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt Promotes Survival of Cardiomyocytes In Vitro and Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Mouse Heart. *Circulation* [Internet]. 2000 Feb 15 [cited 2013 Mar 21];101(6):660–7. Available from:  
<http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.101.6.660>
  18. Kato K, Yin H, Agata J, Yoshida H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2003 Oct;285(4):H1506–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805025>
  19. Looi YH, Kane K a, McPhaden AR, Wainwright CL. Adrenomedullin acts via nitric oxide and peroxynitrite to protect against myocardial ischaemia-induced arrhythmias in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2006 Jul [cited 2013 Feb 5];148(5):599–609. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1751863&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
  20. Engelman J a, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2006 Aug [cited 2014 Apr 29];7(8):606–19. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847462>
  21. Yap T a, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2008 Aug [cited 2013 Mar 18];8(4):393–412. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721898>
  22. Meeran K, Shea DO, Upton PD, Small CJ, Ghatei MA, Byfield PH, et al. Blood Pressure but Increases Plasma Prolactin after Intravenous Infusion in Humans : A Pharmacokinetic Study \*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(1):0–5.

23. Hirayama N. Study patients , cardiac catheterization and blood sampling of antisera for AM for mAM and total AM ( MM ). *Life Sci* 1999;64(26)2505-9. 1999;64(26):0-4.
24. Haddad F, Hunt S a, Rosenthal DN, Murphy DJ. Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circulation* [Internet]. 2008 Mar 18 [cited 2012 Nov 7];117(11):1436-48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347220>
25. Elsevier. Right ventricular infarction. 2008;Chapter 6, p.1-20.
26. Mehta SR, Eikelboom JW, Natarajan MK, Diaz R, Yi C, Gibbons RJ, et al. Impact of right ventricular involvement on mortality and morbidity in patients with inferior myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2001 Jan;37(1):37-43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11153770>
27. Laster SB, Ohnishi Y, Saffitz JE, Goldstein J a. Effects of reperfusion on ischemic right ventricular dysfunction. Disparate mechanisms of benefit related to duration of ischemia. *Circulation* [Internet]. 1994 Sep 1 [cited 2013 Jun 5];90(3):1398-409. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.90.3.1398>
28. Sahni D, Kaur GD, Jit H, Jit I. Anatomy & distribution of coronary arteries in pig in comparison with man. *Indian J Med Res* [Internet]. 2008 Jun;127(6):564-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765875>
29. Oliveira CLS De, David GS, Carvalho MDO, Araújo S, da Silva NC, Ruiz CR, et al. Anatomical Indicators of Dominance between the Coronary Arteries of Dogs. *Int J Morphol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2014 May 8];29(3):845-9. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022011000300030&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022011000300030&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
30. Loukas M, Groat C, Khangura R, Owens DG, Anderson RH. The normal and abnormal anatomy of the coronary arteries. *Clin Anat* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Feb 19];22(1):114-28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19097062>
31. UNSW. Coronary arteries [Internet]. 2011. Available from: [http://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Coronary\\_arteries.png](http://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Coronary_arteries.png)
32. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* [Internet]. 2007 Oct [cited 2014 May 1];28(20):2525-38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951287>
33. Contents TOF. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* [Internet]. 2000 Sep [cited 2014 May 5];21(18):1502-13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973764>
34. Reimer K a., Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* [Internet]. 1977 Nov 1 [cited 2014 Jan 22];56(5):786-94. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.56.5.786>
35. Wu a H, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem* [Internet]. 1999 Jul;45(7):1104-21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10388496>

36. NIH. How Is a Heart Attack Treated ? NIH Natl Hear lung blood institute, US Dep Heal Hum Serv. <http://www>.
37. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. 2005 [cited 2014 Feb 10];14(4):170–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009313>
38. Gibson CM. Duane S Pinto, MD, MPH Consultant/Advisory Boards: Medtronic (Coronary stents); Medicines Company (ACS); Janssen (ACS); Lantheus (Stress test imaging); Covidien/ev3 (Iliac stents); Boston Clinical Research (Cardiology); St. Jude (Coronary guidewires). C M. 2014;
39. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 Oct 13;357(11):1121–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536610>
40. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1987 Mar;84(5):1404–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=304438&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
41. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2000 Dec;279(6):L1005–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076791>
42. Itoh G, Tamura J, Suzuki M. DNA Fragmentation of Human Infarcted Labeling Method and DNA Agarose. 1995;146(6):1325–31.
43. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. 1996;74:86–107.
44. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin a, Kostin S, Zimmermann R, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2000 Feb [cited 2013 May 7];32(2):197–208. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722797>
45. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2000 Feb;45(3):651–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728386>
46. Vanhoutte PM. Old-timer makes a comeback. *Nature*. 1998;396:213–6.
47. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* [Internet]. 1996 Nov;79(5):949–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8888687>
48. Von Harsdoft R. Signaling Pathways in Reactive Oxygen Species – Induced. *Circulation*. 1999;2934–41.
49. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
50. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition. Molecular Biology. 2002.
51. Assays B. Apoptosis assay Apoptosis. <http://www.assay-protocol.com/cell-biology/apoptosis> [Internet]. 2:2–4. Available from: <http://www.assay-protocol.com/cell-biology/apoptosis>
52. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2000 Dec;64(4):821–46. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=99015&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
53. Thompson CB. and Treatment of Disease. 1995;267(March).
  54. Stennicke HR. Pro-caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8. *J Biol Chem* [Internet]. 1998 Oct 16 [cited 2014 Jan 14];273(42):27084–90. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.42.27084>
  55. Yang X, Chang HY, Baltimore D. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell* [Internet]. 1998 Jan;1(2):319–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9659928>
  56. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998;282:1318–21.
  57. Susin S a, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* [Internet]. 1999 Feb 4;397(6718):441–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989411>
  58. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* [Internet]. 2005 [cited 2013 May 14];18(6):335–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319055>
  59. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* [Internet]. 2003 Oct 15 [cited 2013 Mar 7];116(Pt 20):4077–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972501>
  60. Kluck RM. The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science* (80- ) [Internet]. 1997 Feb 21 [cited 2014 May 8];275(5303):1132–6. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.275.5303.1132>
  61. Yang J. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science* (80- ) [Internet]. 1997 Feb 21 [cited 2014 Apr 28];275(5303):1129–32. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.275.5303.1129>
  62. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* [Internet]. 1996 Jul 12;86(1):147–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8689682>
  63. Kirshenbaum L a, de Moissac D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* [Internet]. 1997 Sep 2;96(5):1580–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9315550>
  64. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* [Internet]. 1995 Jan 27;80(2):285–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834748>
  65. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* [Internet]. 1996 Nov 15;87(4):619–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8929531>
  66. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK a, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, et al. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. [Internet]. *FASEB journal* : official publication of the Federation

- of American Societies for Experimental Biology. 2002. p. 607–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919169>
67. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* [Internet]. 1997 Oct 17;91(2):231–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9346240>
  68. Del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 1997;278:687–9.
  69. Oerlemans MIFJ, Koudstaal S, Chamuleau S a, de Kleijn DP, Doevendans P a, Sluijter JPG. Targeting cell death in the reperfused heart: pharmacological approaches for cardioprotection. *Int J Cardiol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013 May 25 [cited 2014 May 31];165(3):410–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22459400>
  70. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* [Internet]. 1993 Aug 27;74(4):609–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8358790>
  71. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* [Internet]. 1998 Aug 21;94(4):481–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727491>
  72. Evans-Anderson HJ, Alfieri CM, Yutzey KE. Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors. *Circ Res* [Internet]. 2008 Mar 28 [cited 2014 May 8];102(6):686–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218983>
  73. Sengupta A, Molkentin JD, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Oct 9 [cited 2014 May 8];284(41):28319–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2788882&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
  74. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* [Internet]. 2005 Nov 14 [cited 2014 May 8];24(50):7410–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288288>
  75. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2011 Nov [cited 2013 Mar 6];1813(11):1938–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708191>
  76. Carter ME. Quick guide FOXO transcription factors. (Figure 1):113–4.
  77. Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev* [Internet]. 2003 Jan [cited 2014 May 8];83(1):59–115. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506127>
  78. Scarabelli T, Stephanou a., Rayment N, Pasini E, Comini L, Curello S, et al. Apoptosis of Endothelial Cells Precedes Myocyte Cell Apoptosis in Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* [Internet]. 2001 Jul 17 [cited 2014 Jan 22];104(3):253–6. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.104.3.253>



79. Qi X-F, Li Y-J, Chen Z-Y, Kim S-K, Lee K-J, Cai D-Q. Involvement of the FoxO3a pathway in the ischemia/reperfusion injury of cardiac microvascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 Oct [cited 2014 Jan 21];95(2):242–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948278>
80. Juhasz B, Thirunavukkarasu M, Pant R, Zhan L, Penumathsa SV, Secor ER, et al. Bromelain induces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Akt / FOXO pathway in rat myocardium. 2008;1110:1365–70.
81. Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Samuel SM, Akita Y, Zhan L, Bertelli A a E, et al. White wine induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury is mediated by life extending Akt/FOXO3a/NFkappaB survival pathway. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2008 Aug 13;56(15):6733–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18642840>
82. Fu Z, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* [Internet]. 2008 Apr 7 [cited 2013 May 22];27(16):2312–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2819403&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
83. Crow MT. Revisiting p53 and its effectors in ischemic heart injury. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2014 Jan 24];70(3):401–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678141>
84. Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Sep 25;98(20):11598–603. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=58775&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
85. Toth A, Nickson P, Qin LL, Erhardt P. Differential regulation of cardiomyocyte survival and hypertrophy by MDM2, an E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2006;281:3679–89.
86. Jones WK, Brown M, Ren X, He S, Mcguinness M. NF- κ B as an Integrator of Diverse Signaling Pathways The Heart of Myocardial Signaling ? Role of I κ B Proteins. 2003;3(3):229–53.
87. Sasaki H, Galang N, Maulik N. Communication Redox Regulation of NF-kB and AP-1 in Ischemic Reperfused Heart. 1999;1(3).
88. Lu X, Liu H, Wang L, Schaefer S. Activation of NF- B is a critical element in the antiapoptotic effect of anesthetic preconditioning. 2009;(19):1296–304.
89. Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, et al. Significance of Myocytes With Positive DNA In Situ Nick End-Labeling (TUNEL) in Hearts With Dilated Cardiomyopathy : Not Apoptosis but DNA Repair. *Circulation* [Internet]. 1999 Jun 1 [cited 2014 May 8];99(21):2757–64. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.99.21.2757>
90. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*; 1980. p. Vol. 284 p555–556.
91. Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, et al. Wortmannin , a Potent and Selective Inhibitor of Wortmannin , a Potent and Selective Inhibitor of Phosphatidylinositol-3-kinase '. 1994;2419–23.

