

Endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne — co to takiego i jak to działa?

Endogenous cardioprotective mechanisms — what is it about and how does it work?

Andrzej Beręsewicz

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie

Reperfuja stanowi obecnie podstawową metodę leczenia zawału serca. Zabieg ten jest jedynym znanym sposobem ratowania niedokrwionego miokardium, ale równocześnie powoduje jego reperfuzyjne uszkodzenie, ograniczające korzystne efekty reperfuzji. Kardioprotekcja farmakologiczna skutecznie zmniejsza niepożądane efekty reperfuzji w modelach eksperymentalnych, ale nie ma dowodów na jej kliniczną skuteczność. Dlatego wielkie nadzieje wiąże się z możliwością klinicznego wykorzystania endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych, znanych jako *ischaemic preconditioning* i *ischaemic postconditioning*, odpowiednio hartowanie niedokrwieniem i hartowanie reperfuzyją. Coraz lepiej udokumentowana jest hipoteza, że hartowanie działa kardioprotekcyjnie, dlatego że zapobiega aktywacji przez reperfuzyję megakanala mitochondrialnego, który jest integratorem i ostatecznym mediatorem różnych mechanizmów reperfuzyjnego uszkodzenia.

Słowa kluczowe: reperfuzyjne uszkodzenie serca, kardioprotekcja, hartowanie niedokrwieniem, hartowanie reperfuzyją, megakanal mitochondrialny

Abstract

Reperfusion therapy is the primary treatment for acute myocardial infarction. Its infarct-limiting effectiveness is, however, limited by so called reperfusion-induced myocardial injury likely related to reperfusion-mediated opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). While pharmacologic cardioprotection has proved to effectively reduce infarct size in the experimental models its clinical usefulness is problematic. In this context, a clinical exploitation of endogenous cardioprotective mechanisms, known as *ischaemic preconditioning* and *ischaemic postconditioning*, emerges as an attractive therapeutic alternative. This is particularly so because *ischaemic pre- and post-conditioning* seem to afford cardioprotection by preventing reperfusion-induced deleterious opening of mPTP.

Key words: myocardial reperfusion injury, cardioprotection, *ischaemic preconditioning*, *ischaemic postconditioning*, mitochondrial permeability transition pore

Kardiol Pol 2011; 69, supl. III: 59–66

USZKODZENIE SERCA SPOWODOWANE NIEDOKRWIENIEM I REPERFUZYJĄ

Źródłem energii zasilającej pracę mechaniczną pompy sercowej są w > 95% tlenowe przemiany glukozy i kwasów tłuszczowych zachodzące w mitochondriach. Dlatego produkcja ATP, a następnie czynność skurczowa miokardium w sposób krytyczny zależą od równowagi między aktualnym przepływem wieńcowym i zapotrzebowaniem na przepływ. W pa-

tologii ludzkiej występują liczne stany (tab. 1), w których zachodzi nierówność:

Przepływ wieńcowy < Zapotrzebowanie na przepływ

Wszystkie one są definiowane jako niedokrwienie miokardium, gdyż towarzyszy im uwalnianie z serca kwasu mlekowego (produkt glikolizy beztlenowej) oraz adenozyiny (pro-

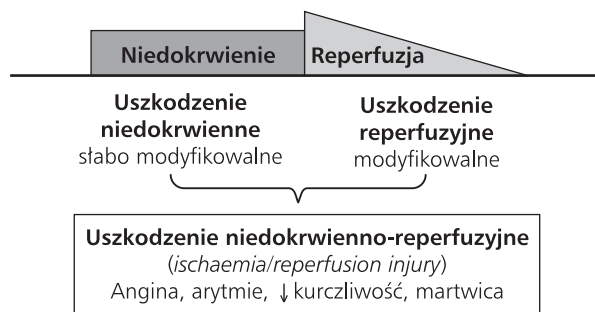
Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Andrzej Beręsewicz, Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01–813 Warszawa, tel: +48 22 569 38 40, faks: +48 22 569 38 49, e-mail: aberesew@cmkp.edu.pl

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

Tabela 1. Kliniczne postaci niedokrwienia

Niedokrwienia spoczynkowe	Niedokrwienia wysiłkowe
Zawał serca	Angina wysiłkowa
Spazm naczyniowy	Próba wysiłkowa
Niedokrwienia okołoproceduralne	
— plastyka wieńcowa	
— krążenie pozaustrojowe	
— transplantacja serca	



Rycina 1. Koncepcja niedokrwienno-reperfuzyjnego uszkodzenia serca. Niedokrwienie i oddzielnie reperfuja są źródłem uszkodzenia. W warunkach klinicznych efekty te sumują się. Długość niedokrwienia jest główną modyfikowalną determinantą niedokrwienno-reperfuzyjnego uszkodzenia (i wtórnie uszkodzenia reperfuzyjnego). Kardioprotekcja, jeżeli w ogóle działa, skutkuje redukcją jedynie reperfuzyjnego uszkodzenia

dukt katabolizmu ATP). Jeżeli deficyt przepływu trwa odpowiednio długo, niedokrwienie skutkuje różnymi postaciami uszkodzenia mięśnia sercowego.

Kliniczne postaci niedokrwienia (tab. 1) kończą się najczęściej spontaniczną bądź indukowaną reperfużą, skutkującą przynajmniej częściowym powrotem równowagi między przepływem wieńcowym i zapotrzebowaniem na przepływ. Reperfuja stanowi jedyny znany sposób ratowania niedokrwionych komórek, ale jest równocześnie czynnikiem uszkadzającym i ostateczny wynik reperfuzyjnego uszkodzenia serca.

Uszkodzenia niedokrwienne i reperfuzyjne „w czystej postaci” dają się badać tylko w warunkach eksperymentu zwierzęcego. Natomiast w warunkach klinicznych z reguły spotyka się mieszanie efektów samego niedokrwienia i reperfuzyjnego uszkodzenia. Dlatego w kontekście klinicznym mówimy o uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym (*ischaemia/reperfusion injury*) (ryc. 1).

Nasilenie niedokrwienno-reperfuzyjnego uszkodzenia jest wypadkową stopnia ograniczenia perfuzji wieńcowej oraz czasu trwania tego ograniczenia:

$$\text{Efekt niedokrwienia} = \% \text{ ograniczenia perfuzji wieńcowej} \times \text{czas niedokrwienia}$$

Dodatkowa komplikacja polega na tym, że uszkodzenie reperfuzyjne jest tym większe, im większe jest poprzedzające uszkodzenie niedokrwienne. Oznacza to, że obie postaci uszkodzenia zależą ostatecznie od czasu trwania i wielkości niedokrwienia.

W obrazie kliniczno-patofizjologicznym niedokrwienia dominują: ból wieńcowy, zaburzenia kurczliwości miokardium, zaburzenia rytmu, utrata równowagi energetycznej miokardium skutkująca rozkładem ATP, m.in. do AMP i adenozy, które stają się substancjami sygnałowymi. Adenozy wywołuje ból wieńcowy i powoduje rozszerzenie naczyń. Adenozy, poprzez kinazę AMP, przekierowuje metabolizm energetyczny komórek na produkcję ATP z glukozy. Od pewnego etapu niedokrwienia, miokardium ulega martwicy, która powoli postępuje od wsierdzia do nasierdzia. Niedokrwienie skutkuje dodatkowo zaburzeniami, które są substratem dla patologicznych procesów uruchamianych w miokardium dopiero w reperfuzyjnym uszkodzeniu. Najważniejsze z nich to: (i) niskie komórkowe poziomy ADP i AMP i wysokie fosforu nieorganicznego; (ii) zmiany w mitochondriach przygotowujące je do zwiększonej reperfuzyjnej produkcji anionorodnika nadciśnieniowego (O_2^-) i innych reaktywnych form tlenu (ROS) oraz (iii) kwasica komórkowa skutkująca komórkową akumulacją Ca^{2+} . Kulminacją tych procesów jest reperfuzyjna aktywacja megakanalu mitochondrialnego (mPTP, *mitochondrial permeability transition pore*), ostatecznie skutkująca reperfuzyjną śmiercią komórek.

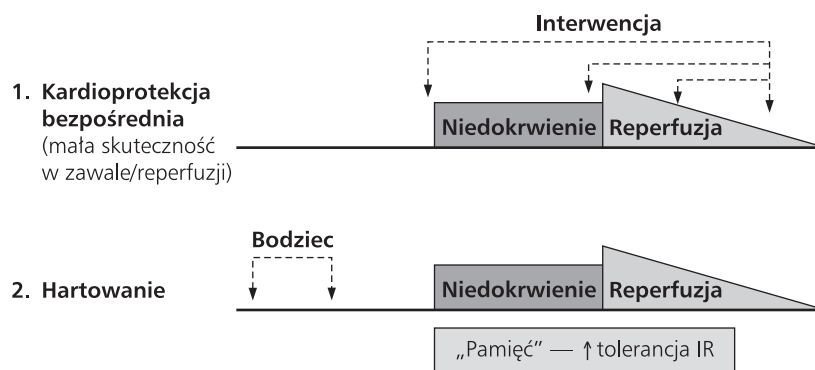
Na efekty reperfuzyjnego uszkodzenia składają się:

- częściowa odbudowa czynności skurczowej miokardium i/lub ochrona kardiomiocytów przed śmiercią w wyniku niedokrwienia. Jest to działanie korzystne i reperfuja stanowi jedyny znany sposób ratowania niedokrwionych komórek;
- reperfuzyjne uszkodzenie miokardium — jego istnienia dowodzi fakt, że różne interwencje zastosowane tuż przed reperfużą zmniejszają rozległość zawału serca (MI) u zwierząt i ludzi. Wyróżnia się 4 typy zaburzeń reperfuzyjnych: (i) ogłuszenie mięśnia sercowego; (ii) reperfuzyjne zaburzenia rytmu; (iii) śmierć komórek w wyniku nekrozy i apoptozy oraz (iv) uszkodzenie śródbłonna, którego konsekwencjami są: akumulacja granulocytów w reperfundowanym obszarze i toksyczność z tym związana oraz *no-reflow phenomenon* — stan, w którym podczas reperfuzyjnego uszkodzenia doszło do embolizacji mikrokrążenia, co ogranicza powrót perfuzji miokardium i korzyści reperfuzyjnej.

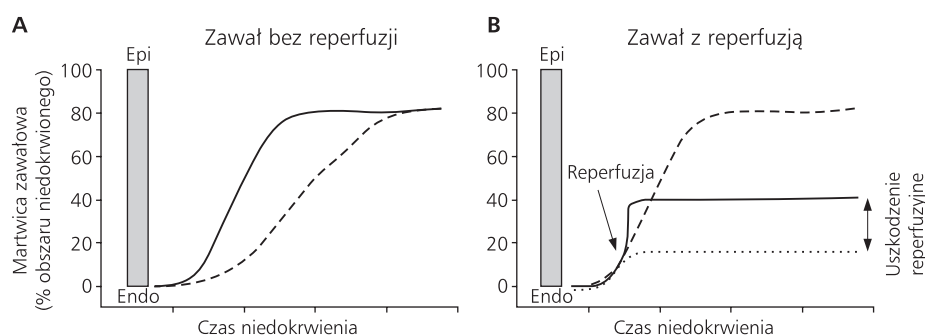
KARDIOPROTEKCJA NIEDOKRWIONEGO/REPERFUNDOWANEGO MIOKARDIUM

Wyróżnia się (ryc. 2):

- kardioprotekcję bezpośrednią, w której substancje o spodziewanym działaniu protekcyjnym są podawane przed,



Rycina 2. Schemat dwóch typów kardioprotekcji niedokrwionego/reperfundowanego miokardium (szczegóły w tekście)



Rycina 3. Schemat pokazujący hipotetyczną dynamikę postępu martwicy zawałowej od wsierdzia (Endo) do nasierdzia (Epi) oraz wpływ kardioprotekcji i reperfuzji na tę dynamikę i ostateczną wielkość martwicy; **A.** Kontrolny zawał (linia ciągła) i kardioprotekcja (linia przerywana). Kardioprotekcja zwalnia proces umierania miokardium, ale nie zmniejsza ostatecznej wielkości martwicy; **B.** Zawał bez reperfuzji (linia przerywana), reperfuzja (linia ciągła) i reperfuzja z kardioprotekcją (linia kropkowana). Zwraca uwagę fakt, że reperfuzja zmniejsza wielkość zawału o ok. 50% i że kardioprotekcja dodana do reperfuzji zmniejsza wielkość zawału o kolejne ok. 50%. Martwica zawałowa ratowana przez kardioprotekcję dodaną do reperfuzji jest miarą reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium

w trakcie lub po niedokrwieniu, z założeniem, że ich korzystne działanie dotyczy jedynie okresu, w którym mają one kontakt z miokardium;

- kardioprotekcję w mechanizmie „hartowania” miokardium — wykorzystuje się tu endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne polegające na tym, że pod wpływem pewnych bodźców (np. krótkotrwałe nieuszkodzające niedokrwienie) w miokardium pozostaje „pamięć” w postaci przedłużającego się w czasie okresu zwiększonej tolerancji miokardium na niedokrwienie/reperfuzję. Jeżeli kolejny incydent niedokrwienia/reperfuzji trafi na okres zwiększonej tolerancji, spowodowane nim uszkodzenie będzie mniejsze.

Intensywne poszukiwania sposobów ograniczania konsekwencji niedokrwienia/reperfuzji zaczęły się w 1974 r., kiedy to Braunwald i Maroko [1], na podstawie obserwacji, że rokowanie pacjentów z MI pogarsza się wraz z ilością utraconego miokardium, stworzyli hipotezę, że sposobem na poprawę rokowania mogłoby być leczenie nastawione na ograniczanie rozmiaru martwicy zawałowej. Mniej więcej w tym

samym czasie wykazano, że rozwój martwicy zawałowej jest procesem rozciągniętym w czasie (zaczyna się w warstwie podwsierdziowej i powoli postępuje w kierunku nasierdzia) (*wave-front phenomenon*) [2, 3] (ryc. 3), co pokazało, że istnieje dość długi przedział czasowy, w którym proponowane przez Braunwalda i Maroko [1] leczenie kardioprotekcyjne mogłoby być skuteczne. W kolejnych latach przebadano tysiące interwencji o potencjalnym działaniu kardioprotekcyjnym, głównie w zwierzęcych modelach MI. W 1980 r. ukazała się publikacja DeWooda i wsp. [4] dowodząca, że przyczyną MI jest niedrożność tętnicy wieńcowej spowodowana skrzepliną. W efekcie rozpoczął się okres trombolitycznego leczenia MI oraz fascynacji reperfuzją i jej konsekwencjami.

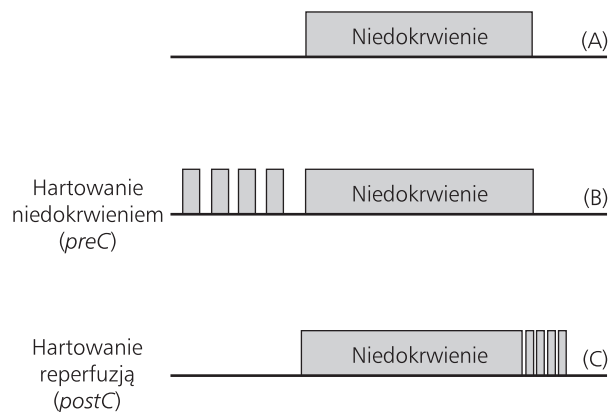
Badania dotyczące kardioprotekcji można podsumować w następujących punktach:

1. W modelach eksperymentalnych interwencje farmakologiczne lub metaboliczne o działaniu kardioprotekcyjnym jedynie zwalniają proces rozwoju martwicy zawałowej i nie wpływają na jej ostateczną wielkość (ryc. 3). Podobnie, nie ma dowodów na to, by któraś z tych in-

- terwencji działała korzystnie u pacjentów z MI bez reperfuzyj (badania sprzed ery trombolitycznego leczenia MI);
2. Reperfuzyja, wykonana odpowiednio wcześnie jest jedyną znaną interwencją ratującą niedokrwione komórki przed śmiercią, więc zgodnie z definicją jest interwencją o działaniu kardioprotekcyjnym. Zgodnie z hipotezą Braunwalda i Maroko [1], reperfuzyja, jeżeli skutkuje redukcją rozległości MI, poprawia rokowanie pacjentów z MI;
 3. Ostateczny wynik reperfuzyj stanowi sumę jej korzystnych i niekorzystnych efektów. Innymi słowy, spodziewany korzystny efekt reperfuzyj jest zwykle pomniejszany o skutki reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium (ryc. 3);
 4. W modelach zwierzęcych wykazano, że różne interwencje kardioprotekcyjne nacelowane wybiórczo na reperfuzyjne uszkodzenie (interwencje przeciwzapalne, antyrodnikowe, zapobiegające komórkowej akumulacji Ca^{2+} , hartowanie i inne), zmniejszają martwicę w niedokrwionym/reperfundowanym sercu nawet o 30–50% (ryc. 3) (przegląd literatury wg [5]);
 5. Badania kliniczne testujące możliwości farmakologicznego ograniczania reperfuzyjnego uszkodzenia serca w kontekście ostrych zespołów wieńcowych (OZW) zakończyły się spektakularnym niepowodzeniem, którego powody nie są jeszcze znane [5–7]. W efekcie w Stanach Zjednoczonych i Europie nie zarejestrowano dotąd żadnego leku przeznaczonego do ograniczania rozległości MI u pacjentów z OZW;
 6. Pozytywnymi przykładami skuteczności kardioprotekcji w warunkach klinicznych są jedynie kardioplegia w kardiochirurgii i ewentualnie skuteczność leków „wieńcowych” w leczeniu stabilnej choroby wieńcowej. Prawdopodobnie wynika to z tego, że kardioprotekcja farmakologiczna jest skuteczna u ludzi jedynie w postaciach łagodnego i/lub krótkotrwałego niedokrwienia;
 7. Ograniczanie reperfuzyjnego uszkodzenia serca pozostaje ciągle ważnym, choć niezrealizowanym celem terapeutycznym. Ostrożne nadzieje w tym względzie budzą wstępne doniesienia o klinicznej skuteczności endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych, w tym hartowania.

HARTOWANIE SERCA

Hartowanie jest formą kardioprotekcji z wykorzystaniem endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych (ryc. 2). W 1986 r. Murry i wsp. [8] wykonali sławny eksperyment, w którym grupie kontrolnej psów podwiązywali na 40 min tętnicę wieńcową, a w grupie badanej 40-minutowe niedokrwienie poprzedzali czterema 5-minutowymi epizodami niedokrwienia rozdzielonymi 5-minutowymi okresami reperfuzyj (ryc. 4A, B). Okazało się, że krótkie poprzedzające niedokrwienia/reperfuzyje skutkują drastyczną redukcją martwicy zawałowej (z 30% obszaru niedokrwionego w grupie kontrolnej do 7% w grupie badanej), mimo że niedokrwienie w grupie badanej trwało 50% dłużej. Autorzy nazwali to zjawisko



Rycina 4. Schemat klasycznego protokołu hartowania: (B) niedokrwieniem (*ischaemic preconditioning*) oraz (C) reperfuzyją (*ischaemic postconditioning*). Szczegóły w tekście

ischaemic preconditioning (*conditioning* — indukowanie oduruchu warunkowego). W polskiej literaturze funkcjonuje termin hartowanie (serca) niedokrwieniem (HN).

W 2003 r., w podobnym eksperymencie na psach, Zhao i wsp. [9] wykazali, że analogiczne działanie ograniczające rozległość MI jak HN ma także HR — hartowanie reperfuzyją (*ischaemic postconditioning*), tj. zabieg, w którym miokardium poddaje się działaniu krótkich incydentów niedokrwienia i reperfuzyj (w tym wypadku trzy 30-sekundowe niedokrwienia następujące w 30-sekundowych odstępach) na początku reperfuzyj, a nie przed niedokrwieniem (ryc. 4C).

Wykazano ponadto, że krótkie hartujące zamknięcie tętnicy pozasercowej (ramiennej, udowej etc.) skutkuje zwiększoną odpornością miokardium na uszkodzenie niedokrwienne/reperfuzyjne. Zjawisko to znane jest jako hartowanie na odległość (*remote preconditioning, preconditioning at a distance*).

W modelach eksperymentalnych wykazano, że trening fizyczny odnosi efekty sercowe analogiczne do HN (*exercise preconditioning, hartowanie wysiłkiem fizycznym*) [10].

W przypadku HN i HR wiadomo, że zabiegi te redukują martwicę w niedokrwionym/reperfundowanym miokardium poprzez zapobieganie reperfuzyjnej aktywacji mPTP i reperfuzyjnej komponentie uszkodzenia [11].

Najlepiej scharakteryzowano HN, o którym wiemy, że [12–14]:

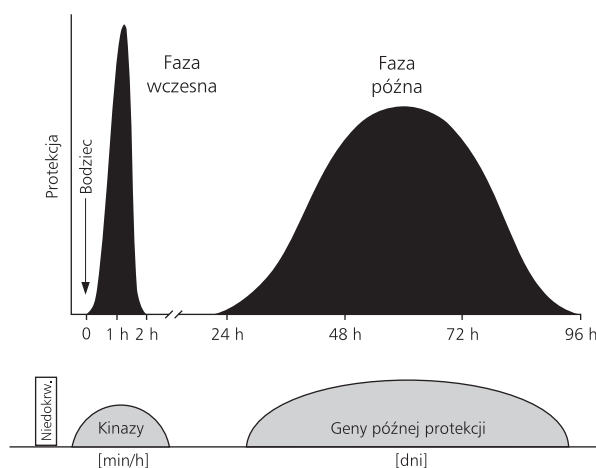
- jest endogennym i do tego niezwykle silnym mechanizmem cytoprotekcyjnym;
- występuje u wszystkich badanych dotąd ssaków, w tym u człowieka;
- dotyczy, obok miokardium, także innych narządów (mózg, nerka, żołądek, oko, wątroba);
- obok 4 epizodów niedokrwienia/reperfuzyj (patrz eksperyment Murry i wsp. [8]), wywołują je także inne bodźce wytrącające miokardium z równowagi energetycznej, w tym:

- pojedynczy epizod całkowitego niedokrwienia trwający 1,5–2,5 min,
 - 15-minutowa częściowa okluzja tętnicy wieńcowej,
 - krótkie okresy szybkiej stymulacji serca niewywołującej niedokrwienia,
 - krótkie okresy niedotlenienia,
 - krótkie epizody przeciążenia objętościowego komory,
 - 15-minutowy pobyt w środowisku o temperaturze 42°C (*heat shock*);
- redukcja martwicy zawałowej nie jest jedynym korzystnym efektem HN. Inne to [13]:
- wolniejszy spadek poziomu ATP i fosfokreatyny w niedokrwionym miokardium,
 - mniej zaburzeń rytmu w czasie niedokrwienia i reperfuzji,
 - szybsza i bardziej kompletna odbudowa skurczu mięśnia po reperfuzji,
 - redukcja apoptozy,
 - mniejsze reperfuzyjne uszkodzenie śródbłonka naczyń wieńcowych, w tym mniejsze uszkodzenie glikokaliksu śródbłonkowego, mniejsza ekspresja śródbłonkowych cząstek adhezyjnych oraz mniejsza adhezja granulocytów w reperfundowanym miokardium [15, 16],
 - mniejsze wykrzepianie w naczyniach wieńcowych zależne od płytek krwi;
- kardioprotekcja związana z HN ma przebieg dwufazowy (ryc. 5).

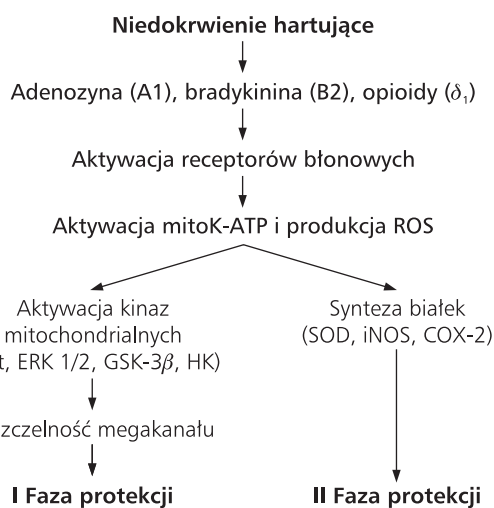
MOLEKULARNY MECHANIZM HARTOWANIA

Od dawna podejmuje się próby zastąpienia inwazyjnej i skomplikowanej technologicznie procedury HN hartowaniem farmakologicznym (zastąpienie hartowania lekiem). Skuteczność tych usiłowań jest ograniczona przez brak powszechnie akceptowanej hipotezy na temat molekularnego mechanizmu HN. Trudność wynika z tego, że w mechanizm HN jest zaangażowanych kilka równoległych ścieżek sygnalizacyjnych, że gatunki różnią się ich udziałem w mechanizmie kardioprotekcji i że niewiele wiadomo na temat ich udziału w mechanizmie hartowania u człowieka. Zgodnie z aktualną hipotezą, na komórkowy mechanizm HN składają się następujące elementy (ryc. 6):

- w wyniku hartującego niedokrwienia z miokardium uwalniają się substancje czynne wyzwalające proces hartowania, w tym adenozyina (działająca przez receptory A_1 i A_3), opioidy (receptor δ), bradykinina (receptory B_2) oraz noradrenalina (głównie w sercu szczura, receptory α) [17];
- substancje te, działając na odpowiednie receptory błonowe, inicjują wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnalizacyjne prowadzące do aktywacji kanału potasowego regulowanego stężeniem ATP zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (mitochondrialny kanał potasowy ATP-zależny, mitoK-ATP), która to aktywacja skutkuje niewielką mitochondrialną produkcją O_2^- i innych ROS [17, 18]. Substancjami aktywującymi mitoK-ATP



Rycina 5. Dwie fazy zwiększonej odporności miokardium na uszkodzające działanie niedokrwienia i reperfuzji spowodowane hartowaniem. Faza wczesna rozpoczyna się prawie natychmiast po bodźcu hartującym, trwa 1–2 h i jest spowodowana aktywacją tzw. kinaz białkowych wczesnej protekcji. Faza późna rozpoczyna się 24 h po bodźcu, trwa 3 doby i jest spowodowana aktywacją „genów późnej protekcji”



Rycina 6. Uproszczony schemat ścieżek sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za wczesną i późną fazę hartowania niedokrwieniem. Szczegóły w tekście

- i naśladującymi działanie HN są diazoksyd i pinacydyl. Glibenklamid i inne pochodne sulfonilomocznika blokują mitoK-ATP i efekty HN [17, 18];
- mitochondrialne ROS aktywują ścieżki sygnalizacyjne, których efektorami są:
- kaskada mitochondrialnych kinaz efektorowych [kinazy wczesnej protekcji — RISK (*reperfusion injury salvage kinases*). Aktywacja RISK skutkuje „uszczelnieniem” mPTP w reperfuzji (kinazy zapobiegają reperfuzyjnej aktywacji mPTP), co stanowi ważny argument na rzecz

hipotezy o jego centralnej roli w mechanizmie reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium. Ważnymi elementami kompleksu kinaz RISK są: kinaza Akt, kinaza Erk 1/2, kinaza 3β syntazy glikogenu (GSK- 3β) oraz enzym glikolityczny heksokinaza (HK). Końcowymi efektorami kaskady są najpewniej HK i GSK- 3β i ten ostatni enzym prawdopodobnie fosforyzuje niezidentyfikowany dotąd komponent mPTP, co skutkuje zmniejszoną wrażliwością mPTP na czynniki aktywujące [19, 20]. Aktywacja RISK może się okazać atrakcyjnym celem działania interwencji kardioprotekcyjnych. Wskazuje na to fakt, że do aktywacji RISK dochodzi (przynajmniej w modelach eksperymentalnych) w wyniku działania takich interwencji kardioprotekcyjnych, jak HN, HR oraz podawanie razem z reperfuzją insuliny, erytropoetyny, peptydów natriuretycznych czy statyn [17].

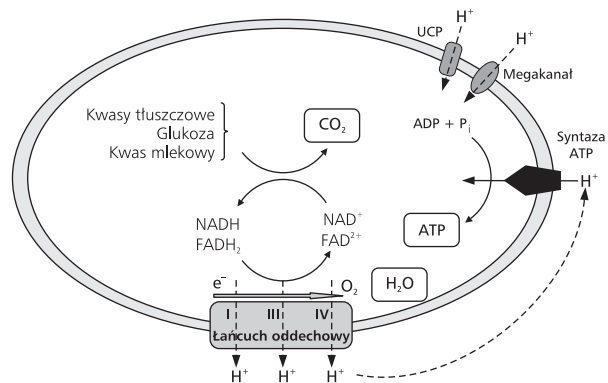
- geny licznych białek, w tym indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) i mitochondrialnej izoformy dymutazy ponadtlenkowej (MnSOD), co prawdopodobnie jest ważnym elementem mechanizmu późnej fazy kardioprotekcji [21].

MITOCHONDRIALNY MEGAKANAL INTEGRATOREM MECHANIZMÓW REPERFUZYJNEGO USZKODZENIA I MIEJSCEM DZIAŁANIA RÓŻNYCH FORM HARTOWANIA

Mitochondria stanowią ok. 30% objętości kardiomiocytów, produkują w procesie fosforylacji oksydacyjnej > 95% ATP dostępnego w kardiomiocytach, ale równocześnie mogą stanowić przyczynę uszkodzenia, w tym związanego z reperfuzją.

Fosforylacja oksydacyjna jest procesem, w którym enzymy oksydoredukcyjne, związane z wewnętrzną błoną mitochondrialną i tworzące tzw. łańcuch oddechowy (składający się z kompleksów mitochondrialnych I, II, III i IV) (ryc. 7):

- transportują elektrony z NADH i $FADH_2$ poprzez kolejne kompleksy mitochondrialne I–IV i w kompleksie IV (oksydaza cytochromowa) dochodzi do tzw. 4-elektronowej redukcji O_2 i powstania wody, a wyzwolona energia służy do syntezy ATP (niewielka część elektronów „wycieka” z łańcucha oddechowego na poziomie kompleksów I, II i III i reagując z O_2 , skutkuje produkcją toksycznego anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-). Produkcja O_2^- znacząco rośnie w reperfundowanych mitochondriach/komórkach) [22];
- przenoszą H^+ z NADH/ $FADH_2$ obecnych w macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej, co sprawia, że wewnątrz mitochondriów ma potencjał ujemny w stosunku do potencjału na zewnątrz mitochondriów (w cytoplazmie komórek), że stężenie H^+ w macierzy jest mniejsze niż w przestrzeni międzybłonowej i że wobec tego istnieje gradient elektrochemiczny H^+ ($\Delta\Psi_m$) faworyzujący ich przechodzenie z powrotem do macierzy mitochondrialnej [22];



Rycina 7. Schemat tlenowych przemian substratów energetycznych i fosforylacji oksydacyjnej. Produktem spalania kwasów tłuszczowych, glukozy i kwasu mlekowego są zredukowane kofaktory NADH i $FADH_2$. Łańcuch oddechowy związany z wewnętrzną błoną mitochondrialną przenosi z NADH i $FADH_2$: (i) elektrony na O_2 (przez kompleksy I–IV) oraz (ii) protony do przestrzeni międzybłonowej (kompleksy I, III i IV), co buduje gradient elektrochemiczny H^+ w poprzek wewnętrznego błony ($\Delta\Psi_m$). H^+ wracają do macierzy przy udziale kompleksu syntazy ATP zgodnie z $\Delta\Psi_m$, czemu towarzyszy fosforylacja ADP do ATP. Aktywacja mitochondrialnych białek rozprzęgających (UCP) i/lub megakanalu rozładowuje $\Delta\Psi_m$, co skutkuje konsumpcją O_2 bez produkcji ATP, czyli stanem rozprzęgania fosforylacji oksydacyjnej

- transportuje H^+ , zgodnie z $\Delta\Psi_m$ i przy udziale syntazy ATP z przestrzeni międzybłonowej z powrotem do macierzy, czemu towarzyszy fosforylacja ADP do ATP (elektrochemiczny gradient H^+ jest źródłem energii dla syntezy ATP) [22].

Istnieje ścisłe sprzężenie transportu elektronów z NADH/ $FADH_2$ na O_2 w łańcuchu oddechowym, transportu H^+ do przestrzeni międzybłonowej oraz procesu fosforylacji ADP do ATP. Dlatego o wielkości mitochondrialnej produkcji ATP decydują: (i) wielkość $\Delta\Psi_m$, który jest pochodną dostępności NADH/ $FADH_2$ oraz O_2 , a także (ii) poziomy ADP i fosforu nieorganicznego (P_i) w macierzy mitochondrialnej, które zależą od wielkości zużycia ATP w aparacie kurczliwym. Produkcja ATP zwalnia, kiedy maleje dostępność zredukowanych kofaktorów, O_2 i/lub ADP i P_i [22].

Na wielkość $\Delta\Psi_m$ wpływają różne białka wewnętrznej błony mitochondrialnej tworzące w niej kanały jonowe lub pory. W tym kontekście szczególne zainteresowanie budzą megakanal mitochondrialny (mPTP) i białka rozprzęgające (UCPs, *uncoupling proteins*). Tworzone przez nie kanały/pory umożliwiają napływ H^+ do macierzy, co skutkuje zmniejszeniem $\Delta\Psi_m$ i produkcji ATP, mimo że mitochondria ciągle konsumują O_2 . Jest to stan określany jako rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej, któremu na poziomie całego serca towarzyszy spadek efektywności mechanicznej mięśnia sercowego (normalna konsumpcja O_2 i mniejsza produkcja ATP).

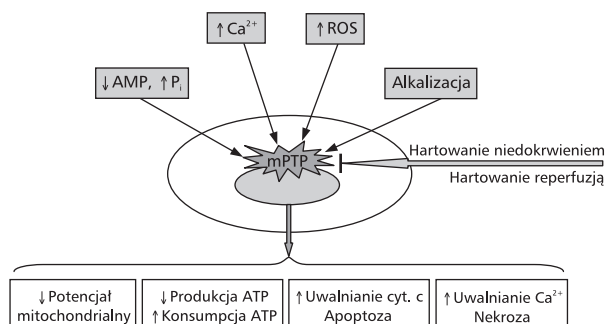
Dodatkowo, przy braku $\Delta\Psi_m$ lub kiedy jest on niewielki, reakcja katalizowana przez syntazę ATP odwraca się i enzym zamiast produkować ATP, rozkłada go do ADP i P_i [22]. W niedokrwionym miokardium wykazano, że syntaza ATP pracująca w odwróconym trybie konsumuje ATP powstający poza mitochondriami w procesie glikolizy [23].

Aktywacja mPTP następuje głównie pod wpływem zwiększonych stężeń jonów Ca^{2+} . W wewnętrznej błonie mitochondrialnej powstaje wtedy nieselektywny por (kanał), przez który mogą przechodzić do i z mitochondrium substancje o ciężarze do 1,5 kDa, w tym jony H^+ , Ca^{2+} , cytochrom c i inne. Skład białkowy mPTP i jego rola fizjologiczna są ciągle przedmiotem kontrowersji. Dość pewne są natomiast następujące fakty [20, 24, 25]:

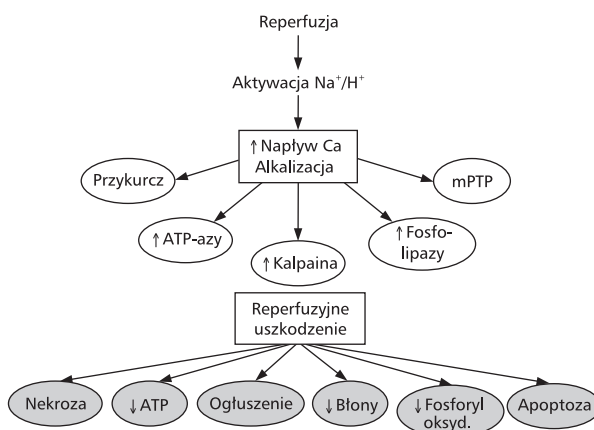
- regulatorem mPTP jest białko cyklofilina-D, związane z wewnętrzną błoną mitochondrialną [11, 24, 26];
- jony Ca^{2+} , wiążąc się z cyklofiliną-D, aktywują mPTP [11, 24, 26];
- lek cyklosporyna-A, który wiąże się z cyklofiliną-D, przeciwdziała aktywacji mPTP przez Ca^{2+} i inne czynniki [11, 24, 26];
- nieodwracalna aktywacja mPTP jest prawdopodobną końcową przyczyną reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium. Z badań eksperymentalnych wiadomo, że do takiej aktywacji dochodzi w pierwszych minutach reperfuzji (izolowane serce szczura) [20] i że jest katastrofalna w skutkach dla dotkniętego nią mitochondrium, a następnie całej komórki, gdyż powoduje [11, 24–26] (ryc. 8):
 - rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej i utratę komórkowych zasobów ATP (produkcja ATP maleje, a mitochondria stają się konsumentem ATP powstałego w innych nieuszkodzonych mitochondriach i/lub w procesie glikolizy),
 - obrzęk mitochondriów, pęknięcie ich zewnętrznej błony i przedostawanie się z przestrzeni międzybłonowej do cytoplazmy cytochromu c i innych białkowych aktywatorów apoptozy,
 - uwalnianie do cytoplazmy dużych ilości jonów Ca^{2+} , co ma działanie toksyczne (ryc. 9), m.in. skutkujące nekrozą.

Za udziałem mPTP w mechanizmie reperfuzyjnego uszkodzenia przemawiają badania eksperymentalne [11, 26] i kliniczne [27] pokazujące, że blokowanie cyklofiliny-D za pomocą cyklosporyny-A (w warunkach klinicznych jedna iniekcja cyklosporyny-A tuż przed reperfuzją) redukuje wielkość martwicy zawałowej o 30–50%.

W mPTP spotykają się i sumują różne procesy, które tradycyjnie obciążano odpowiedzialnością za powstawanie reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium. Wśród nich najważniejsze to związane z reperfuzją: (i) obciążenie komórek Ca^{2+} (ryc. 9); (ii) zwiększona komórkowa produkcja ROS i stres oksydacyjny (tzw. reperfuzyjny paradoks tlenowy); (iii) spadek komórkowego stężenia ATP i ADP, a także wysokie stężenie fosforu nieorganicznego (P_i) oraz (v) reperfuzyjne



Rycina 8. Centralna rola megakanala mitochondrialnego (mPTP) w mechanizmie reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium. Alkalizacja kardiomiocytów w reperfuzji umożliwia działanie aktywatorów mPTP, w tym Ca^{2+} i ROS. Konsekwencją nieodwracalnej aktywacji mPTP jest katastrofa energetyczna komórki, a także jej apoptoza i/lub nekroza. Różne formy hartowania przeciwdziałają reperfuzyjnej aktywacji mPTP, co ma działanie kardioprotekcyjne



Rycina 9. Procesy aktywowane przez toksyczną akumulację Ca^{2+} w reperfundowanych komórkach i zmiany czynnościowe z tym związane. Wzrost komórkowego Ca^{2+} w reperfuzji jest wtórny do reperfuzyjnej alkalizacji przestrzeni pozakomórkowej, aktywacji wymiennika Na^+/H^+ , obciążenia kardiomiocytów Na^+ i dokomórkowego napływu Ca^{2+} przez wymiennik Na^+/Ca^{2+} . Toksyczność Ca^{2+} wiąże się m.in. z „trwonieniem” ATP przez ATP-azy, aktywacją proteaz (kalpajny) i fosfolipazy, a także aktywacją mPTP, która zwiększa dodatkowo poziom Ca^{2+} w cytoplazmie [7, 25]

wyplukiwanie H^+ z zakwaszonego niedokrwionego miokardium (tzw. reperfuzyjny paradoks pH) (przegląd literatury wg [5]). Każdy z wymienionych mechanizmów ma swój indywidualny mechanizm toksyczności (ryc. 9), ale wszystkie są także czynnikami skutkującymi szkodliwą aktywacją mPTP. Klasyczne aktywatory mPTP to czynniki wymienione w punktach (i)–(iii), które są częściowo obecne już w czasie niedokrwienia. Jednak ich stymulującemu działaniu na mPTP zapobiega wtedy niskie komórkowe pH. Reperfuzyjna alkalizacja mio-

kardium usuwa ten blok, a dodatkowo reperfuzja zwiększa obecność aktywatorów. Coraz powszechniejsze jest obecnie przekonanie, że endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne, znane jako hartowanie, działają poprzez zapobieganie reperfuzyjnej aktywacji mPTP (ryc. 8) [11, 24–26].

Na obecność hartowania w sercu człowieka wskazują: (1) badania eksperymentalne na fragmentach ludzkiego miokardium; (2) obserwacje sugerujące, że bóle wieńcowe, które sygnalizują fakt niedokrwienia miokardium, paradoksalnie zwiększają tolerancję serca na kolejne dłuższe niedokrwienia oraz (3) nowe obserwacyjne prace kliniczne sugerujące: (a) skuteczność HN w ograniczaniu okołoproceduralnego uszkodzenia miokardium (HN jest nieprzydatne w leczeniu MI, gdyż wymaga zastosowania bodźca hartującego przed niedokrwieniem, ryc. 4B) oraz (b) skuteczność HR, hartowania na odległość i „mimetyków” hartowania używanych jako uzupełnienie leczenia reperfuzyjnego MI.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

- Braunwald E, Maroko PR. The reduction of infarct size — an idea whose time (for testing) has come. *Circulation*, 1974; 50: 206–209.
- Reimer KA, 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*, 1977; 56: 786–794.
- Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest*, 1979; 40: 633–644.
- DeWood M, Spores J, Notske R et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1980; 303: 897–902.
- Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 2007; 357: 1121–1135.
- Downey JM, Cohen MV. Why do we still not have cardioprotective drugs? *Circ J*, 2009; 73: 1171–1177.
- Hausenloy DJ, Baxter G, Bell R et al. Translating novel strategies for cardioprotection: the Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res Cardiol*, 2010; 105: 677–686.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986; 74: 1124–1136.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 285: H579–H588.
- Kavazis AN. Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med*, 2009; 39: 923–935.
- Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol*, 2009; 104: 189–202.
- Przyklenk K, Kloner RA. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog Cardiovasc Dis*, 1998; 40: 517–547.
- Beręsewicz A. Hartowanie niedokrwieniem — endogenny mechanizm kardioprotekcyjny. *Ann Diagn Paediatric Pathol*, 2003; 7: 37–43.
- Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Jiang R, Zatta AJ, Dobson GP. Preconditioning and postconditioning: innate cardioprotection from ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol*, 2007; 103: 1441–1448.
- Beręsewicz A, Czarnowska E, Mączewski M. Ischemic preconditioning and superoxide dismutase protect against endothelial dysfunction and endothelium glycocalyx disruption in the post-ischemic guinea-pig hearts. *Mol Cell Biochem*, 1998; 186: 87–92.
- Kurzelewski M, Czarnowska E, Mączewski M, Beręsewicz A. Effect of ischemic preconditioning on endothelial dysfunction and granulocyte adhesion in isolated guinea-pig hearts subjected to ischemia/reperfusion. *J Physiol Pharmacol*, 1999; 50: 617–628.
- Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev*, 2007; 12: 181–188.
- Murphy E, Steenbergen C. Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annu Rev Physiol*, 2007; 69: 51–67.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*, 2007; 12: 217–234.
- Miura T, Tanno M, Sato T. Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis. *Cardiovasc Res*, 2010; 88: 7–15.
- Bolli R. Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007; 292: H19–H27.
- Wojtczak L, Zabłocki K. Mitochondria in cell life, death and disease. *Postepy Biochem*, 2008; 54: 129–141.
- Rouslin W, Erickson JL, Solaro RJ. Effects of oligomycin and acidosis on rates of ATP depletion in ischemic heart muscle. *Am J Physiol*, 1986; 250: H503–H508.
- Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans*, 2010; 38: 841–860.
- Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*, 2010; 87: 406–423.
- Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*, 2010; 105: 151–154.
- Piot C, Croisille P, Staat P et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2008; 359: 473–481.