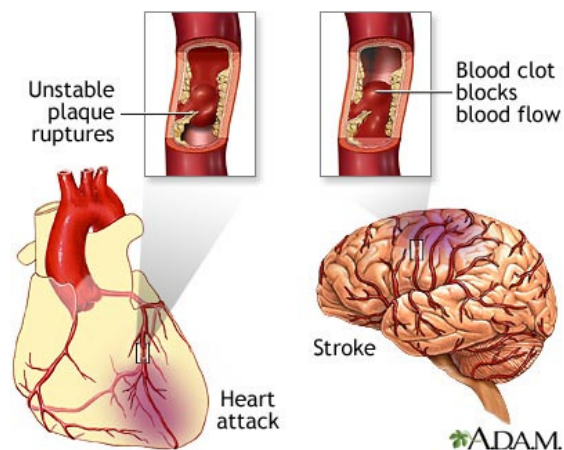


*Smrt srdeční a nervové buňky:*  
**Ischemicko-reperfusní poškození**  
**Excitotoxicita**

**MUDr. Jan Pláteník, Ph.D.**

Ischemické poškození srdce nebo mozku je celosvětově nejčastější příčinou smrti



<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19314.htm>

## *Rozlišujte:*

- **HYPOXIE (ANOXIE)**

- Nedostatek kyslíku

- **ISCHEMIE**

- Nedostatek kyslíku

- Průtok krve tkání omezen/zastaven

- porucha dodávky živin

- porucha odstraňování zplodin metabolismu

## **Metabolické změny při hypoxii/ischemii: Nedostatek energie**

- Zdravý myokard:

- Oxiduje glukózu (32 ATP/mol) a mastné kyseliny (106 ATP/mol palmitát)

- 95% ATP z oxidační fosforylace

- 60-70% ATP využito na svalovou kontrakci

- 30-40% ATP využito na iontové pumpy

- Hypoxie/ischemie:

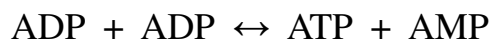
- Zbývá jen anaerobní glykolýza, poskytuje 2 ATP/mol z dodané glukózy, nebo 3 ATP/mol z glykogenu (poslední zdroj)

- ...nevyhnutelný rozvoj kontraktilní dysfunkce

## Metabolické změny při hypoxii/ischemii: **Katabolismus ATP**

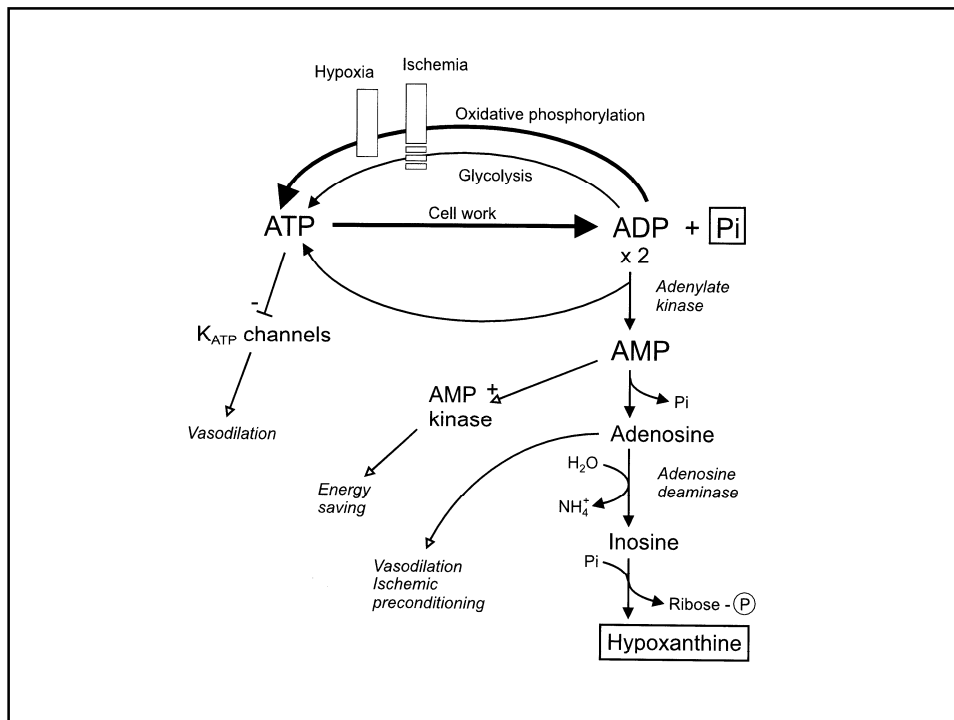


- Zásoba energie v srdeční svalů:
  - ATP ~ 5  $\mu\text{mol/g}$  tkáň
  - Kreatin fosfát ~ 8  $\mu\text{mol/g}$  tkáň
- Spotřeba energie:
  - ~ 0.5  $\mu\text{mol ATP/g}$  tkáň za vteřinu
- Adenylátkinázová reakce:



## AMP-dependentní proteinkináza

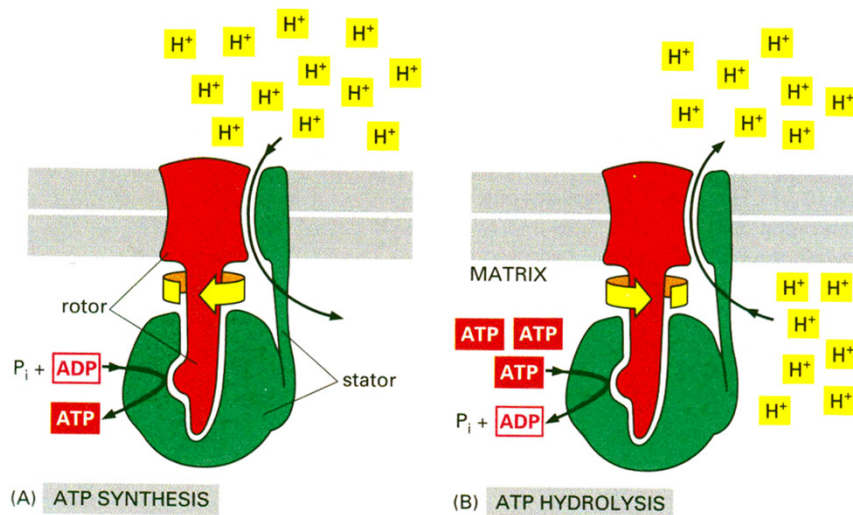
- Stimuluje:
    - Vstup glukózy do buněk
    - Glykolýza
    - Autofagie
    - Mitochondriální biogenese
  - Inhibuje:
    - Proteosyntéza
    - Syntéza mastných kyselin
- ...úspora energie při ischemii



## Adenosin

- Vznik při ischemii činností:
  - Buněčných 5'-endonukleáz z AMP
  - Membránových fosfohydroláz z ATP/ADP
- Působí na svých membránových receptorech:
  - A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R, A<sub>3</sub>R
- Prospěšné účinky při ischemii:
  - Snižuje tepovou frekvenci (...šetří energii)
  - Vazodilatace koronárních arterií
  - Inhibice zánětlivé odpovědi na hypoxii
  - Ischemic preconditioning

## Metabolické změny při hypoxii/ischemii: ATP syntáza funguje obráceně!



© Garland Publishing

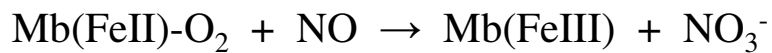
## Inhibiting factor 1 (IF-1)

- Obecně rozšířený mitochondriální polypeptid
- Částečně inhibuje ATP syntázu/hydrolázu
- pH optimum 6.8...cytoprotektivní při ischemii
- Inhibován cAMP-dependentní fosforylací
- Úloha v regulaci metabolismu (nastavení poměru mezi glycolýzou/oxidační fosforylací)
- Rychlá regulace syntézy ATP dle okamžité potřeby

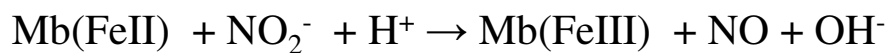
### Metabolické změny při hypoxii/ischemii:

#### Myoglobin a NO

- Myoglobin – pouze krátkodobá rezerva kyslíku
- Odstraňuje přebytek NO:



- Při hypoxii naopak tvorba NO:



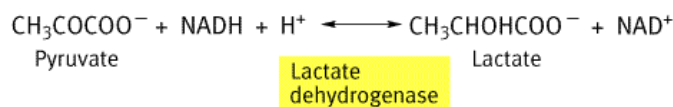
- Účinky NO při srdeční ischemii:

- Vazodilatace koronárních arterií
  - Snižuje kontraktilitu
  - Snižuje produkci mito ATP (a ROS)
- } Kardio-  
protektivní

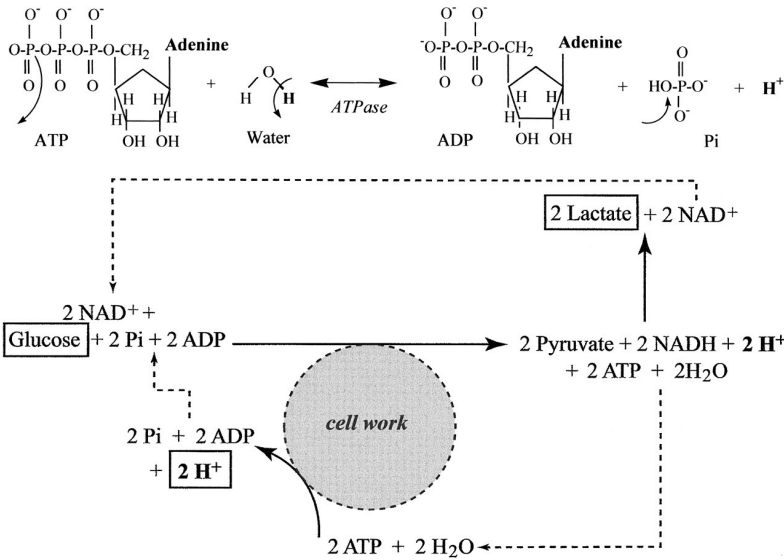
### Metabolické změny při hypoxii/ischemii:

#### Acidóza při ischemii není způsobena laktátem!

- Laktát se tvoří jako anion
- Přeměna glukózy na laktát je pH neutrální
- $\text{H}^+$  produkují reakce:
  - Hexokináza + 1 $\text{H}^+$
  - Fosfofruktokináza + 1 $\text{H}^+$
  - Glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza + 2 $\text{H}^+$
- $\text{H}^+$  spotřebovávají reakce:
  - Pyruvátkináza – 2 $\text{H}^+$
  - Laktátdehydrogenáza – 2 $\text{H}^+$



## Protony se hromadí v důsledku převahy obratu ATP mimo mitochondrie!



Robergs et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287: R502-R516, 2004

## Metabolické změny při hypoxii/ischemii: **ACIDÓZA**

- Obrat ATP mimo mitochondrie
- Nahromadění oxidu uhličitého
- Nahromadění fosfátu z degradace AMP
- Vyčerpání/inhibice homeostatických mechanismů:
  - Pufrování anorganickým fosfátem a proteiny
  - Transport laktátu a  $\text{H}^+$  přes buněčnou membránu

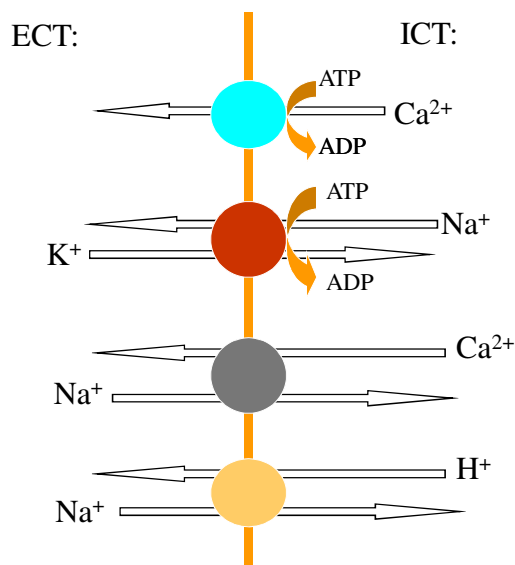
## Metabolické změny při hypoxii/ischemii:

### Rozvrat iontových gradientů

- Fyziologické gradienty:

	ICT:	ECT:
H <sup>+</sup> :	70 μM (pH 7.2)	40 μM (pH 7.4)
Na <sup>+</sup> :	5-15 mM	145 mM
K <sup>+</sup> :	140 mM	5 mM
Ca <sup>2+</sup> :	10 <sup>-4</sup> mM	2.5 mM

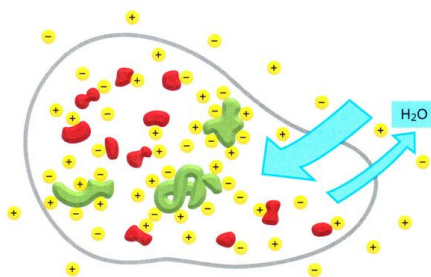
### Iontové gradienty udržuje stálá činnost pump na buněčné/ER membráně





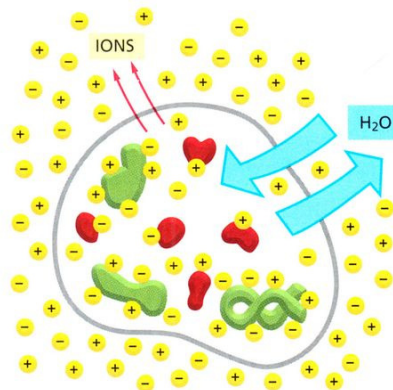
## Základní důvod pro potřebu stálého čerpání iontů: **Donnanova rovnováha**

Problém:



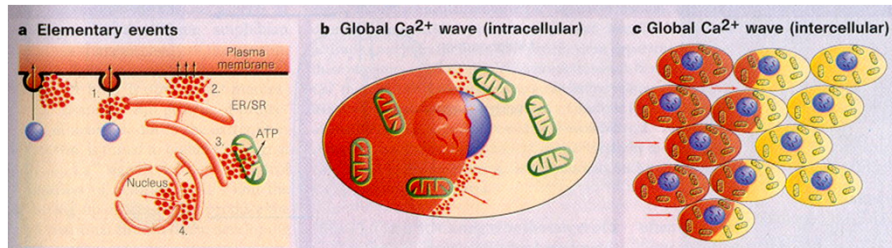
© Garland Publishing

Řešení:



## **Calcium v buňce:**

- ‚Second messenger‘ důležitý v naprosto všech životních projevech buňky
- V cytoplasmě jen 0.1-0.2  $\mu\text{M}$ , cca 1  $\mu\text{M}$  je již signál
- Zdroj signálu je:
  - zvnějšku:
    - ligandem aktivované  $\text{Ca}^{2+}$  kanály
    - napětím řízené  $\text{Ca}^{2+}$  kanály
  - ze zásob v ER:
    - PI3 receptor/kanál
    - ryanodinový receptor/kanál
      - závislý na membránovém potenciálu (kosterní sval)
      - závislý na  $\text{Ca}^{2+}$  (srdce, CNS)



- **O tom jakou informaci  $\text{Ca}^{2+}$  signál nese, rozhoduje jeho**

- **LOKALIZACE**
- **FREKVENCE**
- **AMPLITUDA**

(Berridge et al., Nature 1998, 395: 645-648)

### (Pato)biochemické účinky zvýšení intracelulárního kalcia:

- Aktivace mnoha enzymů:
  - Ca/kalmodulin-dependentní proteinkinasy
  - Některé fosfatasy (calcineurin)
  - Endoteliální a neuronální NO synthasy
  - Kalpainy (Ca-aktivované non-lysosomální proteasy)
  - Fosfolipasy (→ poškození membrán, syntéza prostanoidů)
  - Endonukleasy (→ fragmentace DNA při apoptose)
- Svalová kontrakce
- Uvolnění hormonů a neurotransmitterů
- Regulace genové exprese
- Skladba cytoskeletu (vysoké Ca → „membrane blebbing“)
- Mitochondrie:
  - Regulace respirace
  - Indukce MPT (mitochondrial permeability transition)

## Metabolické změny při hypoxii/ischemii:

### Rozvrat iontových gradientů

$H^+$  ↑

Acidóza

$Na^+$  ↑

Selhání Na/K ATP-asy

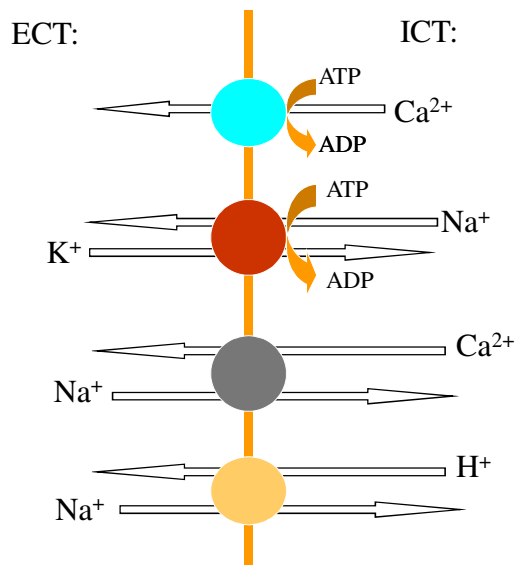
Směna Na/H na membráně

$Ca^{2+}$  ↑

Selhání ATP-dependentního čerpání do  
ECT (PMCA) a ER (SERCA)

Porucha směny Na/Ca na membráně

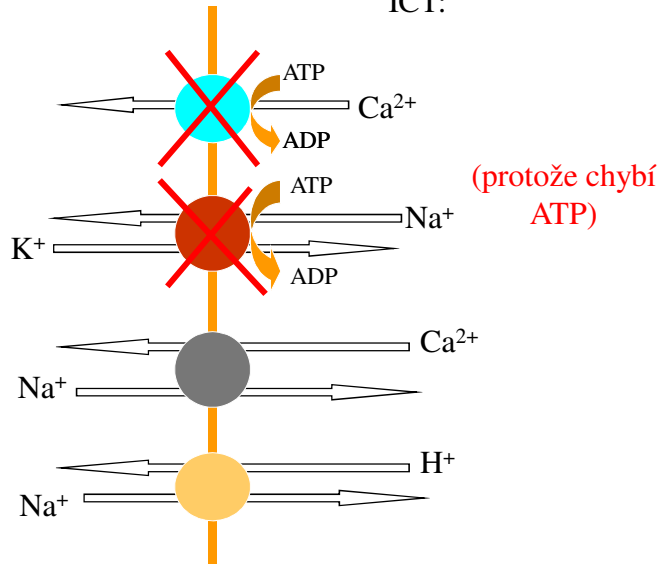
### Rozvrat iontových gradientů při ischemii:



## Rozvrat iontových gradientů při ischemii:

ECT:

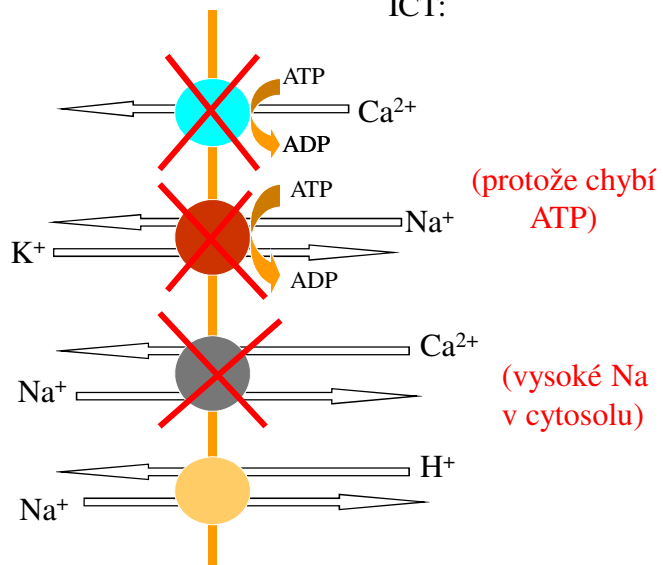
ICT:



## Rozvrat iontových gradientů při ischemii:

ECT:

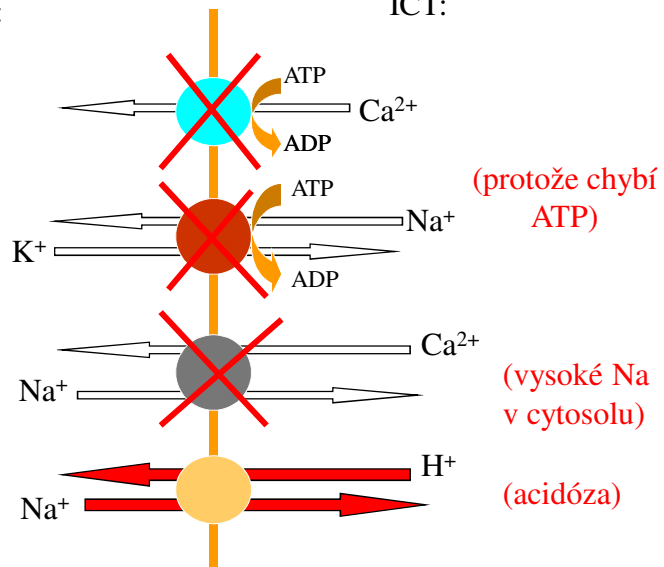
ICT:



## Rozvrat iontových gradientů při ischemii:

ECT:

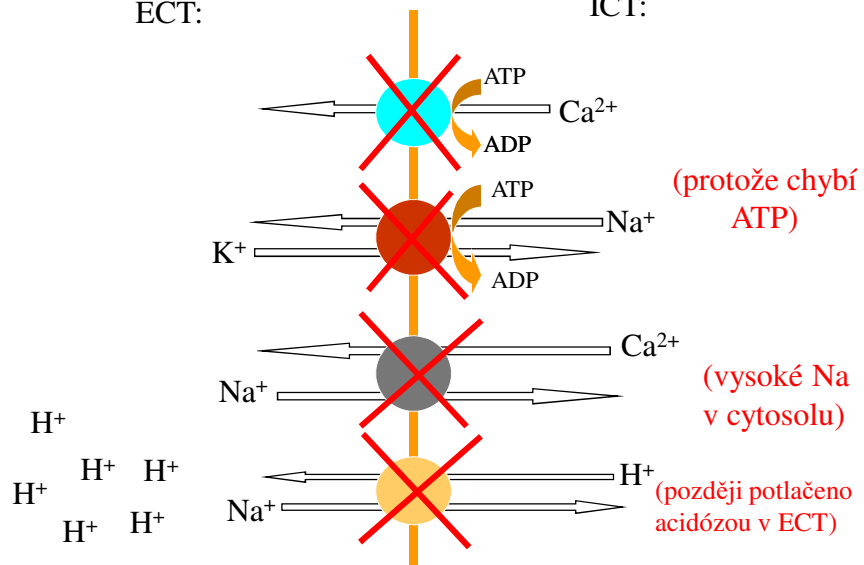
ICT:



## Rozvrat iontových gradientů při ischemii:

ECT:

ICT:



**Metabolické změny při hypoxii/ischemii:  
Rozvrat iontových gradientů**

**$H^+$  ↑ ,  $Na^+$  ↑,  $Ca^{2+}$  ↑**

**Důsledky:**

Účinky  $Ca^{2+}$  jsou potlačeny acidózou

Zvýšená intracelulární osmolarita  
...bobtnání, prasknutí buňky, smrt

**Reoxygenační poškození**

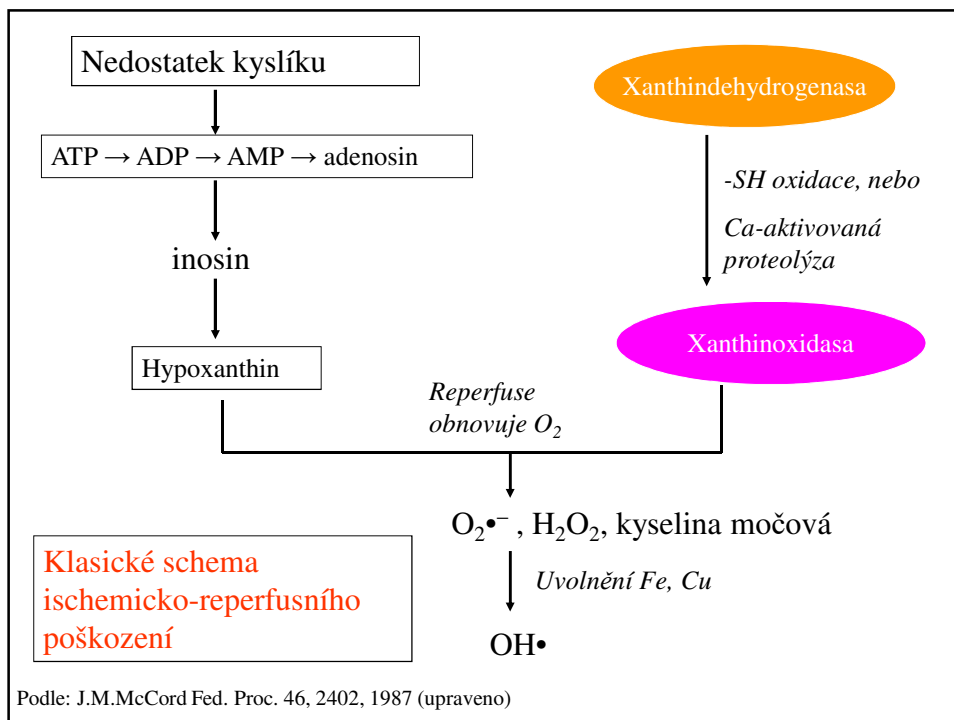
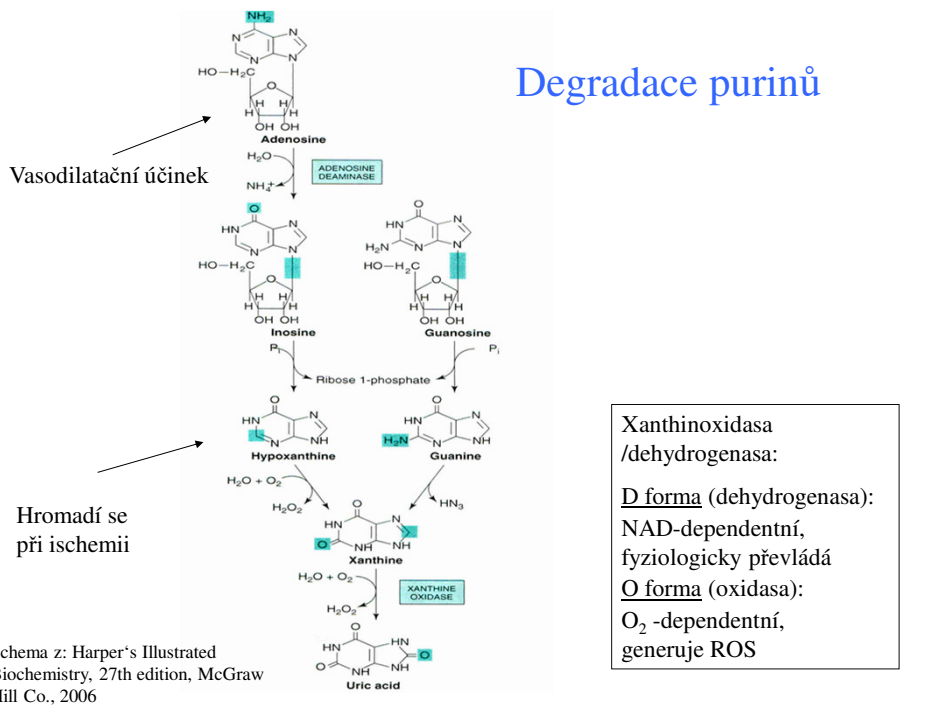
## Reoxygenační poškození

- Další poškození ischemické tkáně nastávající až po obnovení průtoku krve
- Významné zejména po krátké ischemii
- Pokud je tkáň ischemií zcela zničena, reperfuse už nemůže lokální stav zhoršit, ale může vyplavit toxiny z mrtvé tkáně (HMGB1 a další DAMPs) do cirkulace
  - Multiple organ dysfunction syndrome (MODS)
  - Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)
- Záplava kyslíkových radikálů, NO a eikosanoidů

## Reoxygenační poškození: Kde je významné?

- Střevo: trombosa, torze, uskřinuté kýly
- Srdeční infarkt: trombolytická léčba, angioplastika
  - ... arytmie, porucha kontraktility („stunning“)
- Perinatální asfyxie
- Hemoragický šok po doplnění krevního objemu
- Otrava oxidem uhelnatým léčená kyslíkem
- Spánková apnoe
- Orgány před transplantací

## Degradace purinů





- Xanthinoxidasový model dobře vysvětluje ischemicko-reperfusní poškození střeva u koček
- Ale lidské srdce neobsahuje žádnou xanthinoxidasu
  - Enzym se nachází pouze v játrech, střevě a laktující mléčné žláze, v malém množství je v cévách vázán na povrchu endotelu
  - Přeměna na O formu je v lidském střevě příliš pomalá
- Tvorba ROS během reperfuse má jiné zdroje:
  - **Mitochondrie** (po ischemii jsou více „děravé“)
    - ...Mitochondrial permeability transition (MPT)
  - **Leukocyty**
    - ... no-reflow fenomén (ucpání kapilár adherovanými bílými krvinkami)

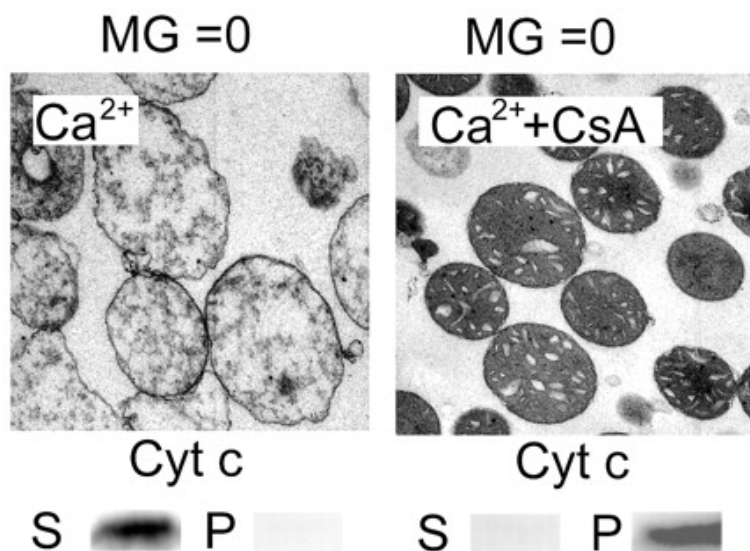
## Import $\text{Ca}^{2+}$ do mitochondrie

- $\text{Ca}^{2+}$  uniporter: facilitovaná difuze po spádu elektrochemického gradientu, kapacita obrovská
- Metabolická regulace: Kritické mitochondriální dehydrogenasy jsou stimulovány  $\text{Ca}^{2+}$ :
  - Pyruvátdehydrogenasa
  - Isocitrátdehydrogenasa
  - 2-oxoglutarátdehydrogenasa
- Sekvestrace/pufrování cytoplazmatického kalcia za určitých okolností

Takto srdeční mitochondrie reaguje na změny spotřeby ATP (nikoliv deplece ATP!)

## Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPT)

- Otevření “megakanálu” ve vnitřní mitochondriální membráně
- Propustnost pro všechny molekuly < 1500 Da
- Kolaps potenciálu vnitřní membrány, vyrovnání protonového gradientu a rozpřažení nebo inhibice respirace
- Zbobjnění mitochondrie



Speer O et al. J. Biol. Chem. 2003;278:34757-34763

©2003 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology

*jb*

## Otevření “megakanálu” (MPT)

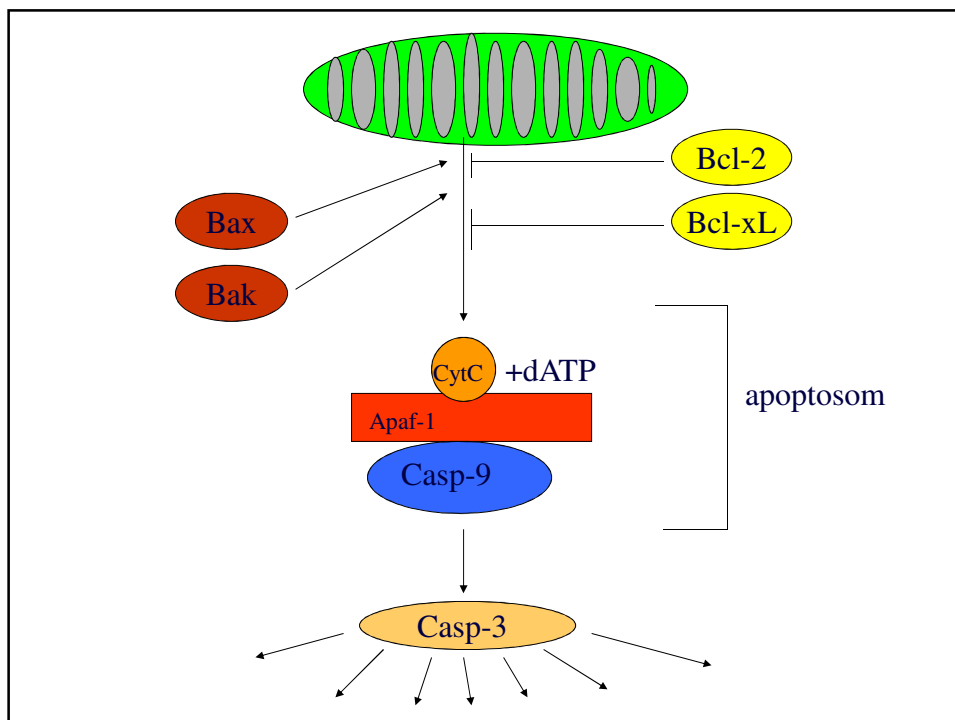
- Spouští: matrix  $\text{Ca}^{2+}$
- Stimulují:
  - Oxidanty
  - Depolarizace
  - Anorganický fosfát
- Inhibují:
  - Protony (nízké pH matrix)
  - Magnesiové ionty
  - ATP a ADP
  - Cyklosporin A

## Funkce MPT:

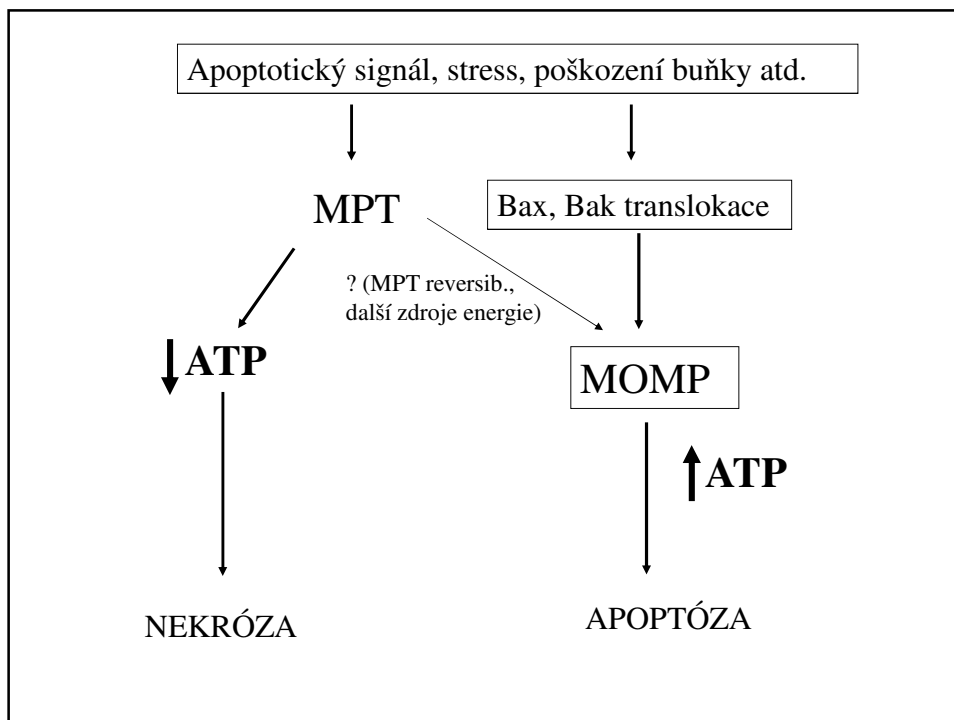
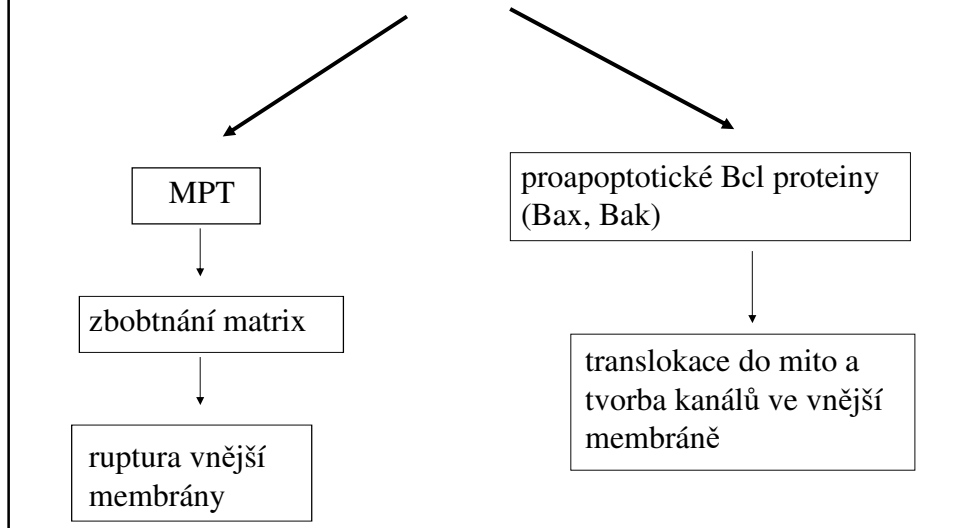
- Fyziologické (reversibilní) otevření MPT:
  - Energeticky výhodný eflux  $\text{Ca}^{2+}$  z mitochondrie
  - Kalciová signalizace:
    - Uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  indukované kalcium
    - ....mitochondrie jako “ $\text{Ca}^{2+}$  signalling storing memory device”
- Patologické (ireversibilní):
  - Buněčná smrt (nekróza a apoptóza)
  - Mechanismus jak jsou staré mitochondrie označeny pro autofagii

## MPT a apoptosa:

## Rozšířený omyl ?



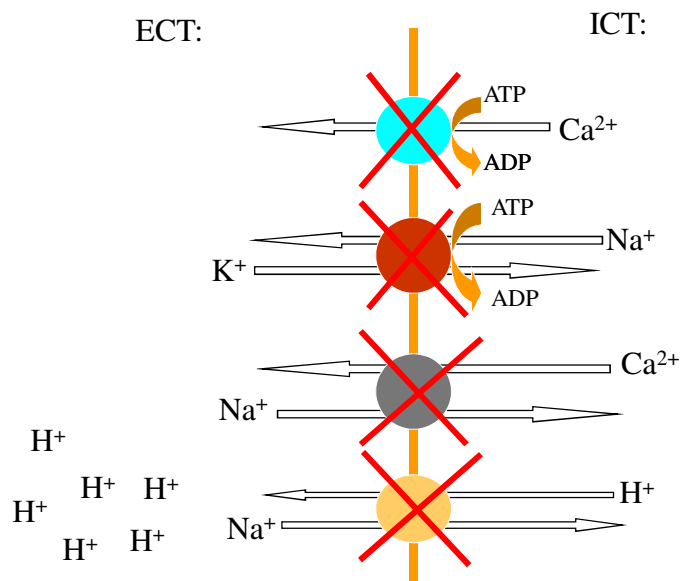
## Mechanismus uvolnění cytochromu c z mitochondrie ?



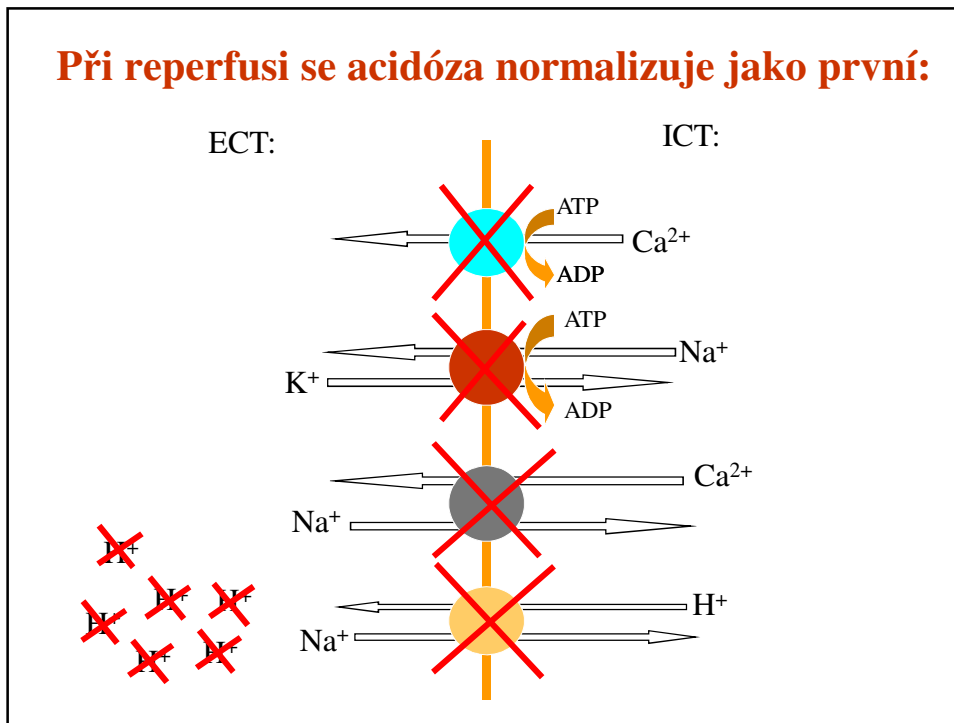
## MPT je zřejmě hlavní mechanismus reoxygenačního poškození myokardu

- Ischemie: nízké pH chrání před MPT
- Reperfuse: v myokardu nastávají podmínky pro MPT koincidencí těchto faktorů:
  - Nadprodukce oxidantů
  - Deplece adeninových nukleotidů
  - Vysoká koncentrace Pi (z degradace ATP)
  - Vysoká koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$
  - Normalizace pH

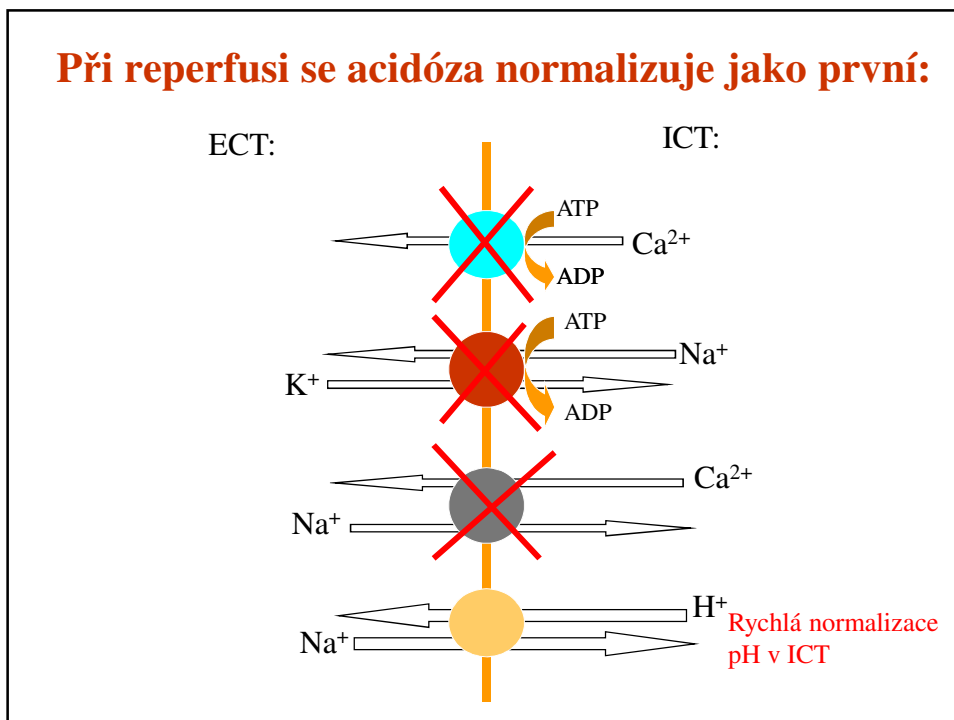
### Při reperfusi se acidóza normalizuje jako první:



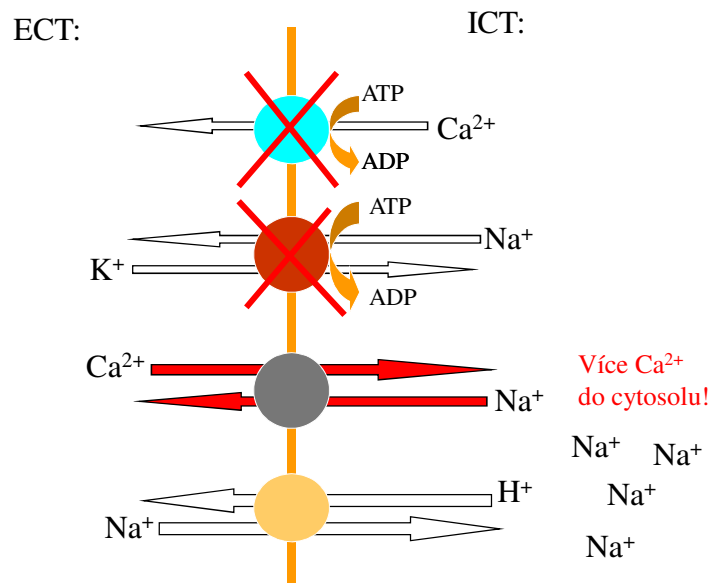
**Při reperfusi se acidóza normalizuje jako první:**



**Při reperfusi se acidóza normalizuje jako první:**



## Na/Ca směna se může obrátit!



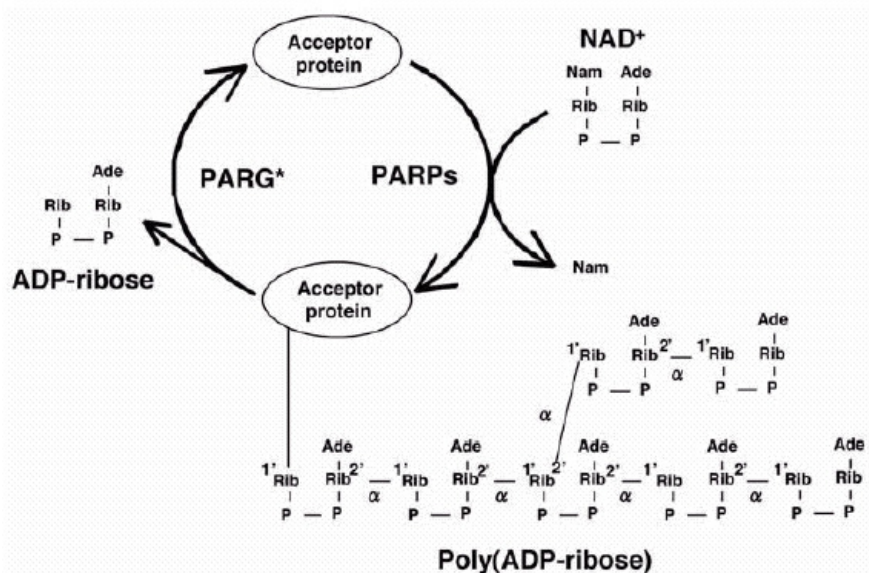
## MPT je zřejmě hlavní mechanismus reoxyenačního poškození myokardu

- Nastává při reperfusi v důsledku vysokého  $Ca^{2+}$ , nahromadění fosfátu, ještě nízkého ATP/ADP + rychlé normalizace pH
- Mitochondrie po MPT:
  - Degradují ATP (zpětný chod ATP-synthasy)
  - Produkuje více ROS (ztráta cytochromu c)
  - Vylévají  $Ca^{2+}$
- ...stimulace MPT v dalších mitochondriích
- ... ..Nekrotická smrt buněk



## Poly(ADP-ribose)polymeráza (PARP-1)

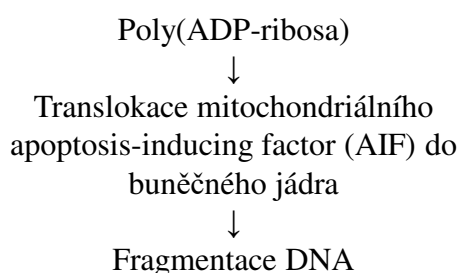
- Enzym vázaný na chromatin, aktivovaný poškozením DNA (jednořetězcové zlomy)
  - ROS
  - Kalciem aktivované endonukleasy
- Štěpí  $\text{NAD}^+$ , přenáší poly(ADP-ribose) na jaderné proteiny



Zdroj obr.: Miwa M et al: Roles of Poly(ADP-Ribose) Metabolism in the Regulation of Centrosome Duplication and in the Maintenance of Neuronal Integrity, DNA Surveillance and Repair, Madame Curie Bioscience Database, Landes Biosciences

## Poly(ADP-ribose)polymeráza (PARP-1)

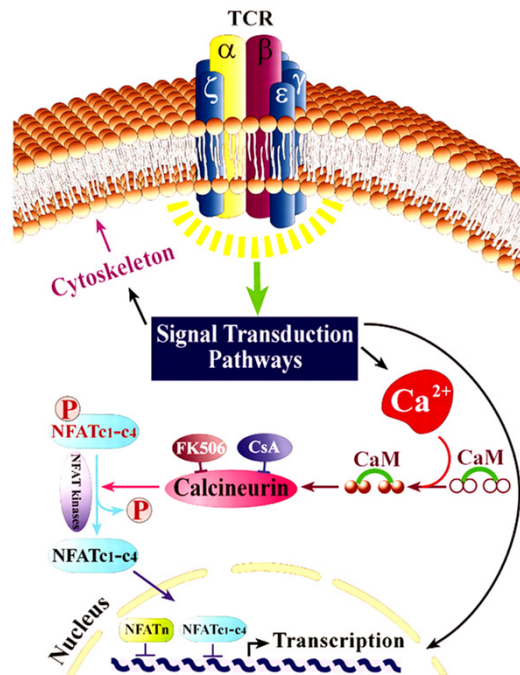
- Enzym vázaný na chromatin, aktivovaný poškozením DNA
- Štěpí NAD<sup>+</sup>, přenáší poly(ADP-ribosa) na jaderné proteiny
- Usnadňuje opravu DNA a podporuje přežití
- Štěpen (inaktivován) kaspázami při apoptóze
- DNA poškozena příliš → deplece buněčného NAD<sup>+</sup>
- Parthanatos – forma regulované buněčné smrti:



## Prevence ischemicko-reperfusního poškození?

- TERAPEUTICKÁ HYPOTERMIE
- MPT inhibitory
  - Cyklosporin A:
    - Váže cyklofilin D (součást MPT póru) – ale není specifický.
    - Efekt u srdeční ischemie?
    - Nyní fáze II/III klinických testů u traumatu mozku.
  - TRO40303: neprošel fází II klinického testování u infarktu myokardu.
- Antioxidanty?
- PARP-1 inhibitory
  - užívané v léčbě rakoviny, další v klinickém testování

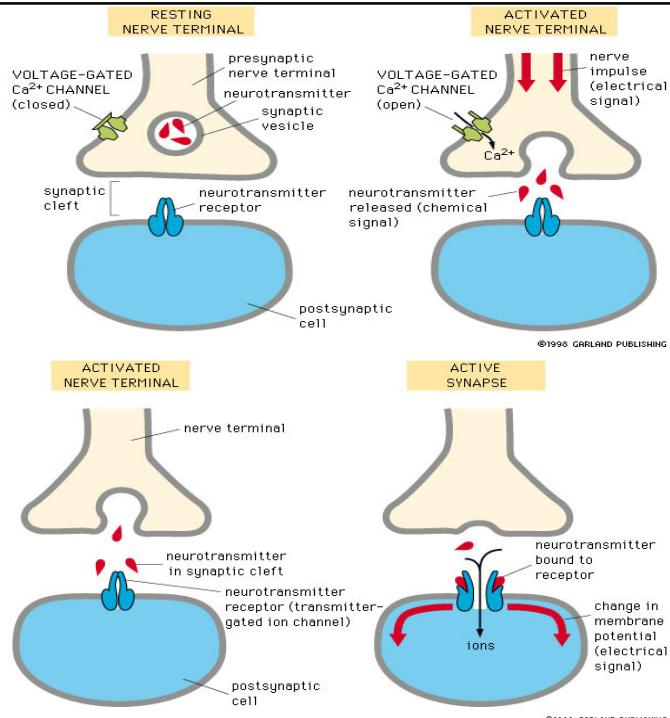
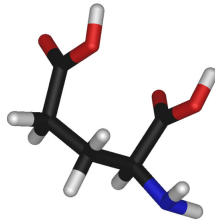
**Imunosupresivní  
účinek cyklosporinu A  
není způsoben inhibicí  
MPT**



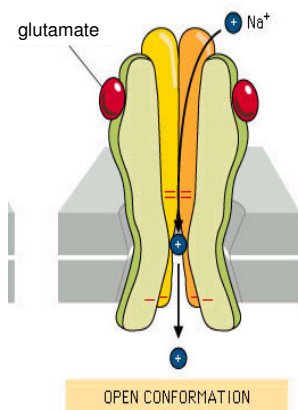
Katzav S, Blood 2004, 103  
(7), 2443-51.

**Excitotoxicita**

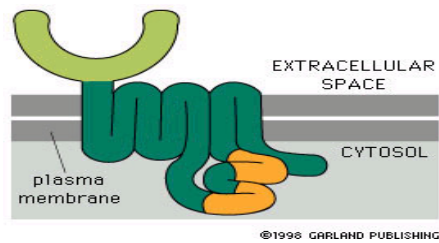
Většina  
excitačních  
synapsí v  
lidském mozku  
používá  
glutamát

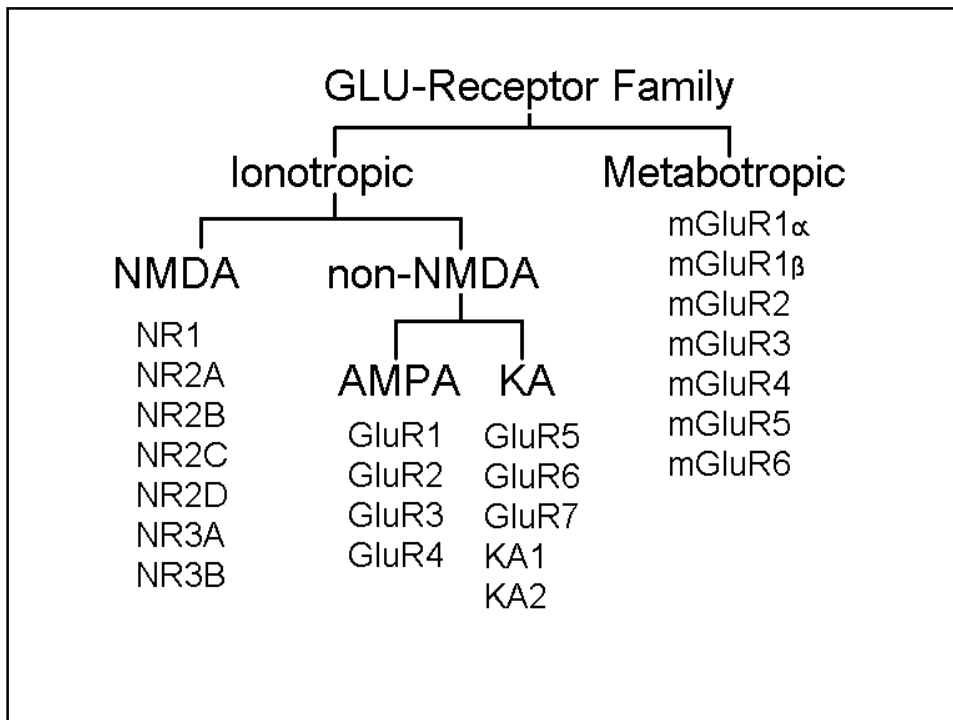


**Ionotropní  
glutamátové receptory:  
Ligandem-řízené  
iontové kanály**

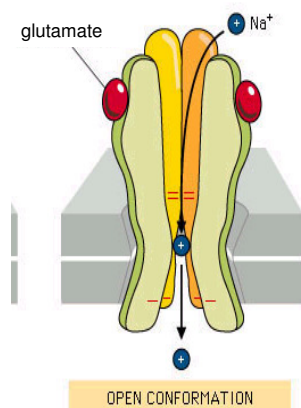


**Metabotropní  
glutamátové receptory:  
„Seven-spanning“  
Spřažené s G proteiny**





**Ionotropní  
glutamátové receptory:  
Ligandem-řízené  
iontové kanály**



©1998 GARLAND PUBLISHING

Non-NMDA receptory  
(AMPA, kainát):

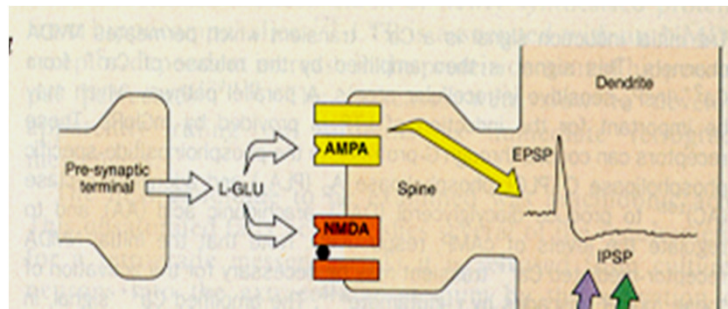
Rychlá synaptická transmise,  
propustné pro Na<sup>+</sup>

NMDA receptory:

Dlouhodobé změny v síle  
synaptického přenosu,  
propustné pro Na<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup>

## Glutamátové receptory a indukce LTP (long-term potentiation)

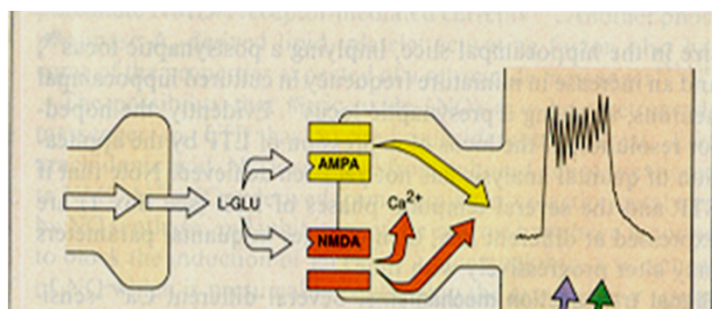
### 1. Nízká frekvence impulzů: pouze AMPA receptory aktivní



Bliss & Collingridge, Nature 1993, 361: 31-39)

## Glutamátové receptory a indukce LTP (long-term potentiation)

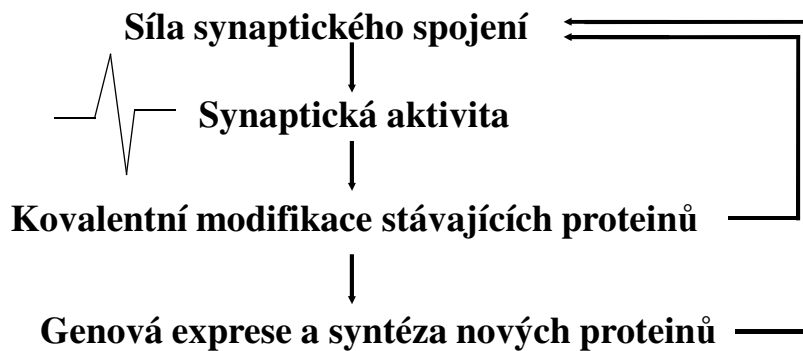
### 2. Vysoká frekvence: AMPA i NMDA receptory aktivní



...NMDA receptor: “coincidence detector”

Bliss & Collingridge, Nature 1993, 361: 31-39)

## Synaptická plasticita:

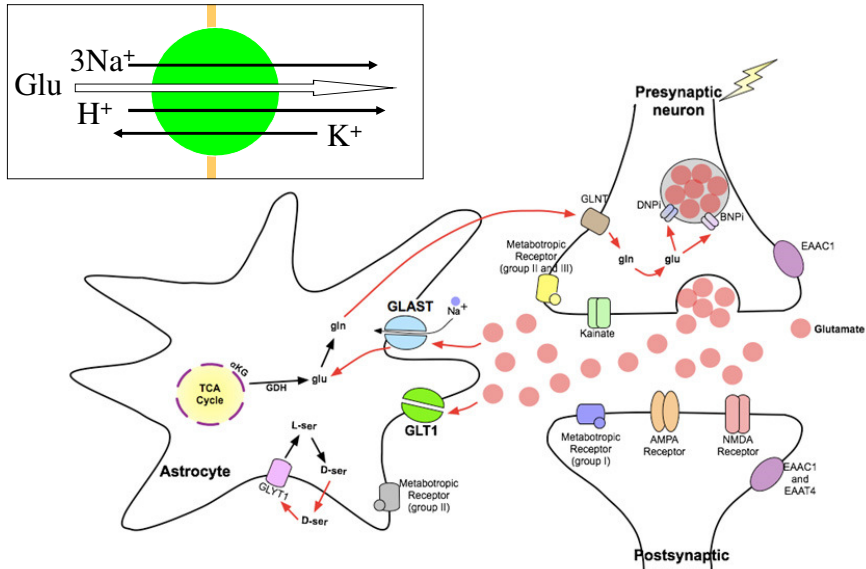


(Finkbeiner & Greenberg, J. Neurobiol. 1998, 37: 171-189).

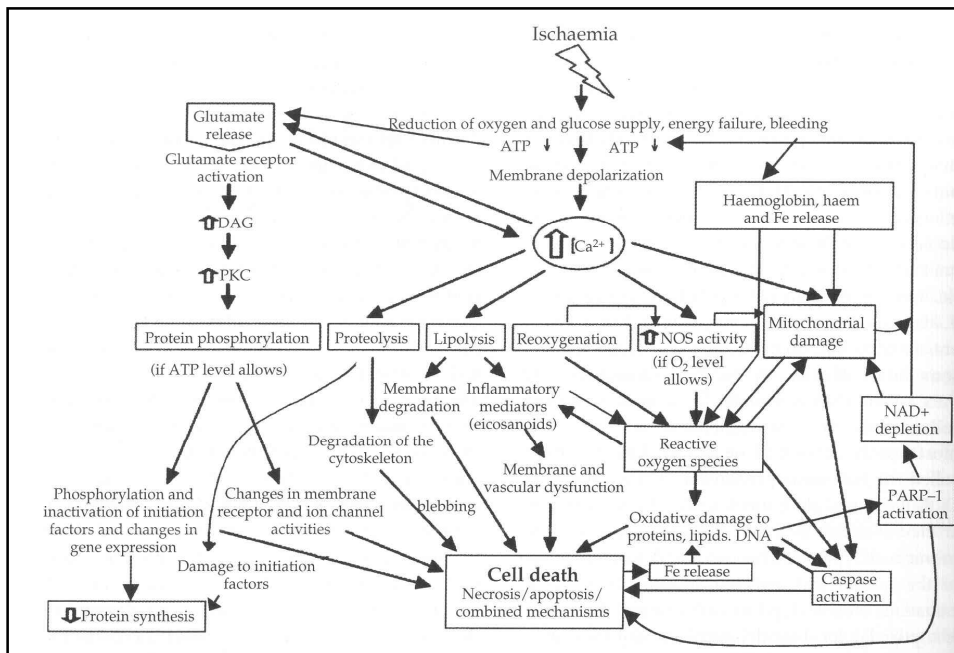
## Excitotoxicita při mozkové ischemii-reperfuzi

- Deplece ATP → kolaps iontových gradientů →  $\text{Ca}^{2+} \uparrow$  → nadměrné uvolňování glutamátu
  - Do postsynaptických neuronů proudí  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$
  - $\text{Na}^+ \uparrow$ : osmotické bobtnání, nekróza
  - $\text{Ca}^{2+} \uparrow$ :
    - Mitochondriální ROS  $\uparrow$
    - Oxid dusnatý  $\uparrow$
    - $\text{Ca}^{2+}$  -stimulované proteasy  $\uparrow$
    - $\text{Ca}^{2+}$  -stimulované fosfolipasy  $\uparrow$
    - eikosanoidy  $\uparrow$
- Poškození pokračuje  
Později buněčná smrt (apoptóza nebo nekróza)

**Glu transportery využívají iontových gradientů na buněčné membráně  
Depolarizace membrány → transport glutamátu se může obrátit !**



Zdroj obr.: Liu Y-P et al: A possible therapeutic strategy for CNS repair: To blockade calcium regulation of glutamate aspartate transporter regulation in astrocytes (<http://research.ncku.edu.tw/re/articles/e/20081128/3.html>)



Zdroj obr.: B. Halliwell & J.M.C. Gutteridge: Free Radicals in Biology and Medicine, 4<sup>th</sup> edition, Oxford University Press 2007

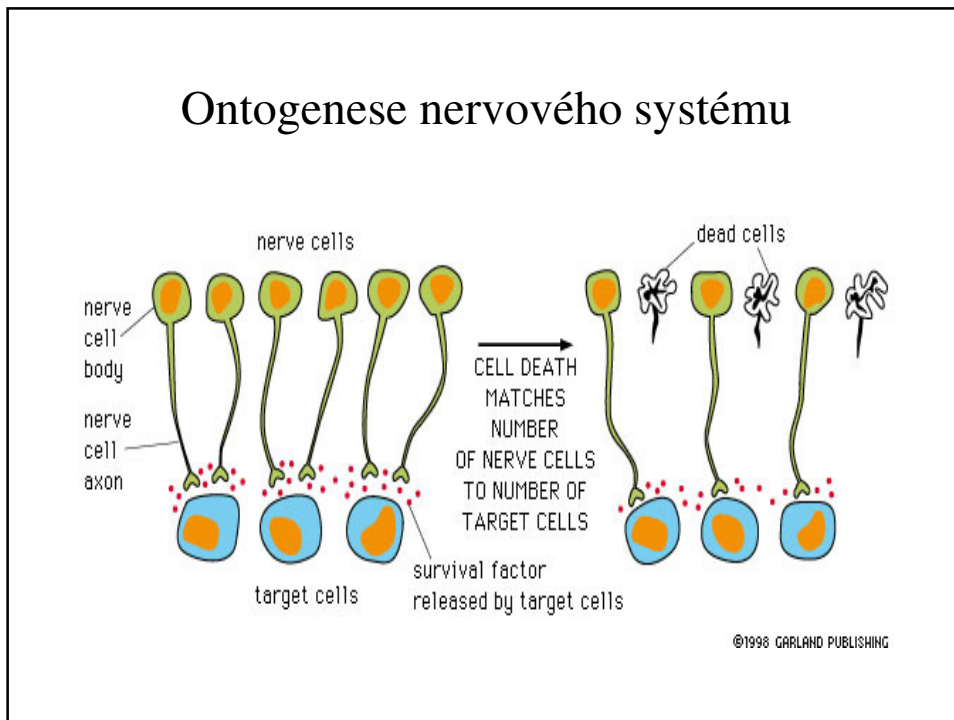
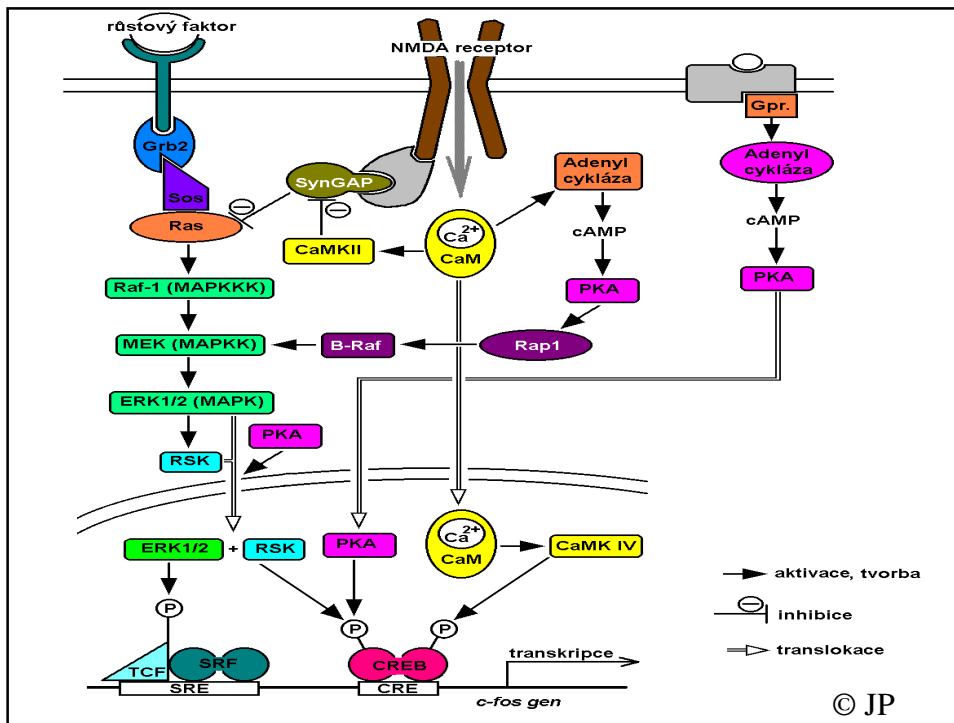


## **Excitotoxicita v chronické neurodegeneraci**

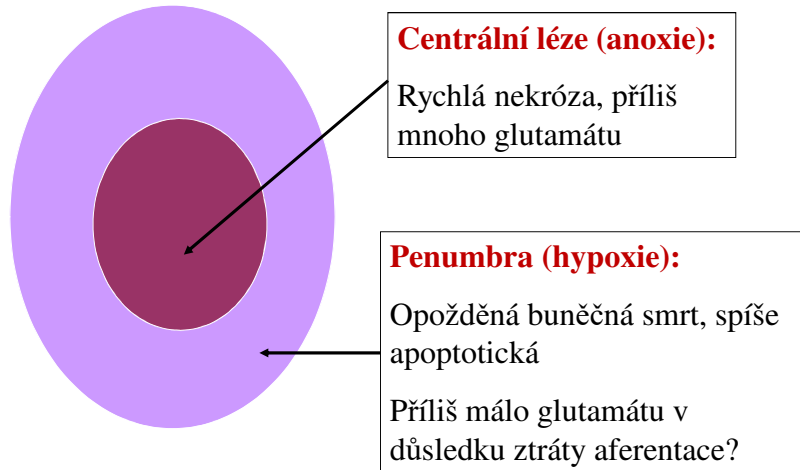
- Myšlenka **„pomalé excitotoxicity“**:
  - I fyziologická stimulace glutamátem může být toxická pro neuron pokud je porušena jeho produkce energie
  - Pokud formulováno tímto způsobem, může být významné v patogenezi mnoha chronických neurodegenerativních chorob

## **Příliš málo glutamátu ale škodí také**

- Určitá úroveň nervové aktivity je nezbytná pro přežití nervových buněk
- Kultivace neuronů in vitro: přídavky glutamátu/KCl v určité (rané) fázi vývoje kultury brání apoptóze
- NMDA receptor je napojen na signalizaci růstových faktorů (Ras/MAPK etc.)
- Antiapoptotické signální dráhy se překrývají se signalizací synaptické plasticity



## Mozkový infarkt



**A proto všechny klinické testy s inhibitory NMDAR selhaly?**

**Young et al., Nature Med., 1999, 5: 448-453 :**

- **Krasy chované v obohaceném prostředí:**
  - stimulace neurogenese a pokles spontánní apoptosy v hippocampu (o 45 %)
  - v hippocampu vyšší exprese neurotrofických růstových faktorů GDNF a BDNF
  - po podání kainátu méně křečí, vyšší odolnost proti jeho excitotoxicitě