

Received: 2016.01.25
Accepted: 2016.11.16
Published: 2017.02.15

Mitochondria w niedotlenieniu mózgu

Mitochondria in brain hypoxia

Jacek Lenart

Zakład Neurochemii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

Streszczenie

Neurony różnią się znacznie kształtem, rozmiarem, rodzajem neuroprzebieżników i liczbą tworzonych synaps. Ich wspólną cechą charakterystyczną jest bardzo duża wrażliwość na zmiany stężenia tlenu. Następstwem niedotlenienia mózgu są reakcje biochemiczne zwane kaskadą niedokrwienną. Termin ten jest nieco mylący, gdyż sugeruje, że są to następujące po sobie, w sposób liniowy, wydarzenia. W istocie kaskada niedokrwienna obejmuje bardzo złożone procesy, które odbywają się jednocześnie i wzajemnie na siebie oddziałują. Podstawowe znaczenie w odpowiedzi neuronów na niedotlenienie mają zmiany związane z zaburzeniem pracy mitochondriów, które występują tuż po niedotlenieniu, na początku kaskady niedokrwienną. Zaburzenia w pracy mitochondriów są coraz częściej uznawane za główny element nie tylko ostrego, ale również przewlekłego niedotlenienia mózgu, a także chorób neurodegeneracyjnych.

Słowa kluczowe: mitochondria • neuron • niedotlenienie

Summary

Neurons vary widely in shape, size, type of neurotransmitters and number of synapses. Their common characteristic is a very high sensitivity to changes in oxygen concentration. The consequence of hypoxia is to launch a series of biochemical reactions called the ischemic cascade. The term is a bit misleading, because it suggests that there is a succession of events, in a linear fashion. In fact, the ischemic cascade involves very complex processes that take place simultaneously and interact with each other. The key role in neuronal responses to hypoxia is played by changes related to mitochondria, which occur immediately after hypoxia, at the beginning of the ischemic cascade. Disturbances in the mitochondrial functions are recognized as an essential element not only in acute but also in chronic hypoxia, as well as neurodegenerative diseases.

Keywords: mitochondria • neuron • hypoxia

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1231613>

Word count: 5178
Tables: 1
Figures: –
References: 84



Adres autora: dr Jacek Lenart, Zakład Neurochemii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mosakowskiego PAN, ul. A. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa; e-mail: jlenart@imdik.pan.pl

Wykaz skrótów: **3'UTR** – 3' obszar nieulegający translacji, **ADP** – adenozy-5'-difosforan, **Ago2** – argonaute 2, **AP1** – activator protein 1, **ARD1** – arrest-defective protein 1, **ATP** – adenozy-5'-trifosforan, **cAMP** – cykliczny adenozy-3',5'-monofosforan, **CMT2** – Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathy type 2, **CO₂** – ditlenek węgla, **COX** – cytochrome c oxidase/complex IV, **DAG** – 1,2-diacylglicerol, **DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy, **EEG** – elektroencefalogram, **FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy, **G6P** – glukoza-6-fosforan, **GABA** – kwas γ-aminomasłowy, **GS** – syntaza glikogenu (glycogen synthase), **GSH** – glutation, **HIF-1** – czynnik indukowany hipoksją 1 (hypoxia-inducible factor 1), **HRMs** – hypoxia-regulated miRNA, **Hsp90** – heat shock protein 90, **IP₃** – 1,4,5-trisfosforan inozytolu, **MAP** – microtubule-associated proteins, **MAPK** – kinazy aktywowane mitogenami, **mCU** – mitochondrialny uniporter wapniowy, **miRNA** – mikroRNA, **MIRO** – mitochondrial Rho GTPase, **mK_{ATP}** – mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP, **MNF1** – mitofusyn-1, **MNF2** – mitofusyn-2, **MPP** – mitochondrial processing peptidase, **mtDNA** – mitochondrialny DNA, **NADPH** – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, **NBR1** – neighbor of BRCA1 gene 1 protein, **NMDA** – kwas N-metylo-D-asparaginowy, **NO** – tlenek azotu, **NO₂⁻** – azotyn, **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy, **P62** – ubiquitin-binding protein p62, **PARL** – presenilins-associated rhomboid-like protein, **PFKFB3** – 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3, **PHD** – hydroksylazy proliny, **PINK1** – PTEN-induced putative kinase 1, **PIP₂** – 3,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu, **PKC** – kinaza białkowa C (protein kinase C), **PLA2** – fosfolipaza A2, **PLC** – fosfolipaza C, **PPP** – szlak pentozofosforanowy (pentose phosphate pathway), **PSCs** – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (induced pluripotent stem cells), **PDH** – dehydrogenaza pirogronianowa (pyruvate dehydrogenase), **pVHL** – białko von Hippel-Lindaua, **RFT** – reaktywne formy tlenu, **RNA** – kwas rybonukleinowy, **RQ** – rhodoquinone, **rt-PA** – rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu, **TCA** – cykl kwasów trkarboksylowych, **VDAC** – voltage-dependent anion channels.

WSTĘP

Mózg jest nie tylko najważniejszym narządem ludzkiego ciała, ale również najbardziej skomplikowanym systemem w przyrodzie. Decyduje o wszystkich funkcjach organizmu. Zarazem jest najbardziej wrażliwym na niedotlenienie i niedokrwienie organem ludzkiego ciała. Pozbawiony tlenu i substancji odżywczych (głównie glukozy) ulega uszkodzeniu już po 4 minutach. Mimo że mózg od dawna jest przedmiotem badań uczonych z wielu dziedzin nauki (np. medycyna, biologia, genetyka czy biochemia), to dalsze jego poznawanie ma ciągle znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne, jest ogromnym wyzwaniem stojącym przed nauką XXI wieku. Najpoważniejsza choroba mózgu – udar, jest nie tylko najczęstszą przyczyną zgonów na świecie, ale również głównym powodem niepełnosprawności osób dorosłych. Udary niedokrwienne stanowią około 80% wszystkich udarów mózgu i są następstwem zakrzepowej lub zatorowej niedrożności tętnicy mózgu lub jej głównych rozgałęzień. Równie poważnym problemem są choroby neurodegeneracyjne ośrodkowego układu nerwowego (OUN), wśród których za najczęstsze uważa się: chorobę Alzheimera, Parkinsona i stwardnienie rozsiane, wynikające ze stopniowej, postępującej utraty komórek nerwowych. Uznany czynnikiem ryzyka zarówno udaru mózgu jak i większości chorób neurodegeneracyjnych jest starszy wiek. Obecnie choroby mózgu stanowią ponad jedną trzecią (35%) ogółu kosztów ochrony zdrowia w Unii Europejskiej [4]. Wydatki z nimi związane są w przybliżeniu takie same jak

koszty chorób nowotworowych, sercowo-naczyniowych i cukrzycy liczonych razem. Również w Polsce choroby mózgu powodują ogromne koszty [51] i to nie tylko medyczne, ale także społeczne oraz ekonomiczne. Wydatki związane z tym problemem obecnie pochłaniają 3% produktu narodowego brutto. Zmiany w strukturze demograficznej społeczeństwa, wzrost średniej długości życia oraz procentowy wzrost ludzi starszych w populacji powodują, że w przyszłości choroby neurodegeneracyjne i udary mózgu będą coraz większym, rosnącym obciążeniem dla systemów opieki zdrowotnej. Dlatego pilnie potrzebne jest znaczne zwiększenie finansowania badań naukowych nad tymi problemami. Waga problemu została dostrzeżona zarówno przez władze Unii Europejskiej, jak i administrację prezydenta Baracka Obamy. W 2013 r. rozpoczął się program Human Brain Project (<http://www.humanbrainproject.eu>), a w 2014 r. projekt BRAIN Initiative [36]. Miejmy nadzieję, że planowane, gigantyczne nakłady finansowe, doprowadzą do lawinowego wzrostu wiedzy i zaowocują znacznym postępem w diagnostyce i terapii, szeroko pojętych, chorób mózgu. Polskie instytuty badawcze zajmujące się różnymi aspektami pracy mózgu czekają na podobną inicjatywę ze strony ministerstwa nauki.

NIEDOKRWIENIE I NIEDOTLENIENIE

Udar mózgu to incydent mózgowo-naczyniowy charakteryzujący się zespołem objawów klinicznych, związanych z nagłym wystąpieniem ogniskowego lub uogólnionego zaburzenia czynności mózgu, powstały w wyniku zabu-

rzenia krążenia mózgowego. Udar może być krwotoczny (wywołany wylewem krwi do mózgu) lub niedokrwienny (wywołany zatrzymaniem dopływu krwi do mózgu). Podczas niedokrwienia zmniejsza się lub zatrzymuje ogólny lub miejscowy, mózgowy przepływ krwi. Zostają zatrzymane lub zahamowane: zaopatrywanie tkanki w substancje energetyczne, wymiana gazowa między tkanką i krwią (tlen i dwutlenek węgla) oraz wymiana wszystkich innych metabolitów. Istnieją dwa różne typy niedokrwienia mózgu: globalne i ogniskowe. Globalne niedokrwienie rozwija się po przejściowym zatrzymaniu krążenia np. na skutek zatrzymania akcji serca. Przepływ krwi w mózgu w ciągu kilku sekund spada do zera. Utrata przytomności następuje po około 10 s, aktywność EEG zanika po 30-40 s. W warunkach normotermii 10 min ogólnego niedokrwienia jest dla człowieka śmiertelne. Natomiast ogniskowe niedokrwienie jest wynikiem przejściowego lub trwałego zmniejszenia przepływu w jednym z naczyń mózgowych. Zazwyczaj zmniejszenie przepływu wynika z zatoru lub zakrzepu w naczyniu. Typowy obraz histologiczny po niedokrwieniu ogniskowym obejmuje obszar martwicy wszystkich rodzajów komórek w mózgu (neurony, oligodendrocyty, astrocyty, komórki śródbłonna), który jest otoczony strefą przygraniczną niedokrwienia. Ta część tkanki jest aktywna metabolicznie, ale nie wykazuje aktywności EEG [2].

Brak tlenu oraz glukozy zaburza depolaryzację błony komórkowej i zwiększa w komórce stężenia jonów Na^+ , Ca^{2+} i Cl^- , a jonów K^+ w przestrzeni międzykomórkowej. W wyniku wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} następuje aktywacja zależnych od wapnia enzymów, takich jak kinazy białkowe C (PKC), fosfolipazy A2 (PLA2) i C (PLC), a także wielu proteaz i endonukleaz doprowadzających do apoptozy i nekrozy. Poza tymi zmianami w czasie udaru niedokrwienego mózgu dochodzi także do reakcji zapalnej. Sekwencja molekularnych i komórkowych zdarzeń następujących po niedokrwieniu mózgu jest bardzo skomplikowana. W kaskadzie zdarzeń biorą udział liczne, często krzyżujące się, szlaki metaboliczne. Niektóre szlaki pozostają aktywne przez kilkanaście sekund, a inne są aktywne kilkanaście minut lub nawet kilka godzin po udarze [79,82]. Niezwykła złożoność występujących jednocześnie zjawisk i procesów powoduje, że nadal nie opracowano skutecznej terapii udaru. Ponadto mnogość stosowanych modeli i metod badawczych spowodowała, że badane są tylko poszczególne elementy, a nie udar jako całość.

W niedotlenieniu przepływ krwi nie tylko zostaje zachowany, ale jest nawet podwyższony, nie następuje zwiększenie

stężenia metabolitów, takich jak np. mleczan i nie ma zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej.

Mimo to pojęcia niedokrwienie i niedotlenienie nie należy używać zamiennie, bo niedotlenienie jest jednym z elementów towarzyszących niedokrwieniu.

Mózg dorosłych ssaków (głównie neuronów) jest bardzo wrażliwy na niedotlenienie.

W artykule omówiono jedynie pierwsze etapy zmian metabolicznych będące bezpośrednim następstwem niedotlenienia. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie: Dlaczego neurony są tak bardzo wrażliwe na niedotlenienie?



Powietrze, którym oddychamy, czyli najniższa część ziemskiej atmosfery, jest mieszaniną gazów i zawiera około 78% azotu, 21% tlenu, 0,9% argonu, a także śladowe ilości innych gazów szlachetnych oraz zmienne ilości pary wodnej, ozonu, dwutlenku węgla i dwutlenku siarki. Na przestrzeni dziejów skład atmosfery zmieniał się diametralnie: przez pierwsze dwa miliardy lat atmosfera Ziemi była całkowicie pozbawiona tlenu [68]. Pierwsze, prymitywne rośliny, glony i sinice wykorzystywały jako źródło energii światło słoneczne, a tlen był tylko produktem odpadowym z rozszczepiania cząsteczki wody. Pod koniec ery paleozoicznej stężenie tlenu osiągnęło maksymalną wartość 35%. Uważa się, że przez ostatnie 350 mln lat utrzymuje się na stabilnym poziomie (21%) [45]. Pierwiastek ten jest niezbędny do życia dla większości organizmów żyjących obecnie na Ziemi. Metabolizm tlenowy pozwala na bardziej efektywne wytwarzanie energii, bo jedna cząsteczka heksozy daje w warunkach tlenowych około 16-18 razy więcej cząsteczek adenosyno-5'-trifosforanu (ATP) niż w warunkach beztlenowych. Uzależnienie komórek od stałej i obfitej dostawy ATP oznacza uzależnienie od tlenu. Układ oddechowy i system naczyń krwionośnych zapewniają dopływ tlenu do wszystkich narządów, tkanek i komórek. Nowoczesne metody badawcze umożliwiają precyzyjny pomiar stężenia tlenu wewnątrz żywego organizmu. Mimo że mózg zużywa aż 20% tlenu, jego średnie stężenie w tej tkance jest, w porównaniu do innych narządów, stosunkowo niskie i wynosi $4,45 \pm 0,34\%$. Z badań porównawczych wiadomo, że nie ma znaczących różnic w stężeniu tlenu w mózgach różnych zwierząt, natomiast nawet blisko położone rejony u jednego gatunku mogą być różnie natlenione [22]. Przedstawiono to w tabeli 1, która

Tabela 1. Stężenie tlenu, *in situ*, w różnych częściach mózgu

Region mózgu	Stężenie tlenu [%]	Literatura
Kora mózgu	2,5-5,3	[80]
Hipokamp	7,0	[5]
Mózdzek	3,0-5,0	[15]



zawiera przykładowe stężenia tlenu w różnych częściach mózgu ssaków. Aby ułatwić porównanie wszystkie wartości liczbowe ciśnienia cząstkowego są przeliczone na % tlenu.

Niezdolność mózgu do magazynowania tlenu oraz jego duże zużycie powodują, że jest szczególnie podatny na niedotlenienie. Jest to związane m.in. z tym, że w komórkach ssaków istnieje ponad 100 reakcji enzymatycznych, które wykorzystują tlen jako substrat [75]. Na przykład oksydoreduktazy wykazują bardzo różne powinowactwo do tlenu. Enzymy, których wartość stałej Michaelisa-Menten (K_m) oscyluje wokół wartości fizjologicznych stężenia tlenu, mogą być aktywowane lub „wyłączone” w odpowiedzi na drobne fluktuacje w dostępności tlenu. Dla kontrastu, wartość K_m dla jednego enzymu, oksydazy cytochromu c, osiąga wartości 0,35-3,53% [42], które są znacznie mniejsze niż średnie stężenie tlenu w mózgu i w związku z tym enzym ten, nawet w warunkach niedotlenienia, pracuje z maksymalną szybkością.

Dokładna wartość tzw. „krytycznego ciśnienia tlenu” (tj. takiego, przy którym zaczynają być widoczne pierwsze skutki ograniczenia wytwarzania energii w postaci ATP) jest przedmiotem sporu. Większość badaczy podaje wartości między 3,24 i 5,26% dla ciśnienia parcjalnego tlenu w krwi tętniczej, ale najnowsze eksperymenty, w których mierzono zarówno ciśnienie tlenu w tkankach, jak i stężenie wysoko energetycznych związków fosforanowych sugerują, że pierwsze oznaki niedotlenienia, małe obniżenie pH i spadek stężenia fosforanu kreatyny pojawiają się w korze mózgu już przy stężeniu 0,90-1,15% [63]. Poniżej 0,79% następuje hydroliza fosforanu kreatyny i wzrost stężenia kreatyny oraz fosforanów, czemu towarzyszy spadek stężenia ATP i wzrost stężenia adenozy-5'-difosforanu (ADP) i adenozy-5'-monofosforanu (AMP) [23]. Gdy stężenie tlenu zmniejsza się do poziomu krytycznego, w zaledwie 5 min następuje spadek stężenia ATP aż o 90% [22].

SKUTKI NIEDOBORU ATP

Brak tlenu oznacza dla komórek brak ATP, który jest głównym źródłem energii dla większości funkcji komórkowych. Energia uwalniana podczas hydrolizy ATP jest wykorzystywana do syntezy makrocząsteczek, DNA, RNA i białek oraz do transportu jonów i makrocząsteczek przez błony komórkowe. ATP jest też niezbędne w procesie przekazywania sygnału w komórce, jest wykorzystywane przez kinazy jako źródło grup fosforanowych i modyfikacji aktywności podstawowych dla komórki reakcji.

ATP i ADP, są również ważnymi neuroprzekaznikami, oddziałującymi z receptorami nukleotydowymi. U ludzi, ta sygnalizacja odgrywa ważną rolę zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym. Ponadto ATP jest przekształcane przez cykazy adenylowe do wtórnego przekazywnika sygnału, cyklicznego AMP (cAMP), który bierze udział w uwalnianiu Ca^{2+} z maga-

zynów wewnątrzkomórkowych. Ta postać transdukcji sygnału jest szczególnie ważna w mózgu, ale również bierze udział w regulacji wielu innych procesów komórkowych [10].

Brak szczegółowych danych kinetycznych nie pozwala na pełną analizę sekwencji zdarzeń, które następują w wyniku spadku stężenia ATP. Można przypuszczać, że następuje jednoczesne wyłączenie bądź ograniczenie wielu szlaków metabolicznych. Dane eksperymentalne wskazują, że jako pierwsza następuje depolaryzacja błony. Dzieje się tak dlatego, że nawet wtedy, gdy mózg pozostaje w spoczynku aż 40-60% całkowitego wytwarzania ATP jest zużywane do generowania i utrzymywania gradientu jonowego w błonie. Oczywiście ta wartość wzrasta w czasie zwiększonej aktywności mózgu [31]. Najważniejszym i najbardziej energochłonnym białkiem błonowym jest ATPaza sodowo-potasowa [21]. Pozostałe pompy jonowe, takie jak chlorkowa czy wapniowa zużywają mniej energii. Należy uwzględnić, że wejście do komórek mózgu pewnych metabolitów, takich jak kwas γ -aminomasłowy (GABA) czy glutaminian występuje z jednoczesnym transportem Na^+ i innych kationów. Skutkiem zaniku gradientu jonów jest zanik polaryzacji błony. Depolaryzacja umożliwia cytotoksyczny wzrost stężenia wapnia i niekontrolowane uwolnienie pobudzających neuroprzekazników, takich jak glutaminian. W ten sposób rozpoczyna się sekwencja zdarzeń określana jako „kaskada niedokrwienna”.

PRZEPROGRAMOWANIE ŁAŃCUCHA ODDECHOWEGO

W literaturze opisano dwa modele funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego. W pierwszym z nich – modelu losowym założono, że poszczególne elementy łańcucha są rozmieszczone w błonie w sposób przypadkowy i mogą w niej swobodnie dyfundować, a przepływ elektronów między poszczególnymi składnikami łańcucha następuje podczas ich przypadkowych kolizji. W drugim modelu założono, że elementy łańcucha są połączone w uporządkowany sposób i tworzą tzw. superkompleksy. Taka organizacja pozwala zwiększyć szybkość i wydajność transportu elektronów, a także ograniczyć powstawanie szkodliwych reaktywnych form tlenu (RFT) przez kompleks I [17,26,43]. W warunkach normoksji przepływ elektronów w łańcuchu oddechowym jest związany głównie z utlenianiem substratów związanych z NAD i odbywa się poprzez kompleks I. Szacuje się, że jest odpowiedzialny za 55-65% oddychania mitochondrialnego, pozostała część jest związana z aktywnością kompleksu II. Procentowy udział obu kompleksów zależy od właściwości kinetycznych głównych elementów kompleksów I i II. Są różne dla różnych typów komórek i tkanek. W mózgu procentowy udział kompleksu I wynosi aż 90% [46]. Energia uwolniona przez parę elektronów wędrujących przez cały łańcuch oddechowy, pozwala na syntezę 2,5 cząsteczek ATP. Jeśli jednak para elektronów odbywa krótszą drogę (z poziomu FAD) ilość energii jest mniejsza (tylko 1,5 cząsteczek ATP). W czasie niedotlenienia następuje

odwracalne zahamowanie aktywności kompleksu I przy jednoczesnym, kompensacyjnym wzroście aktywności kompleksu II. Całkowita wydajność transportu elektronów spada, ale nie zostaje całkowicie zahamowana. W mózgu obserwuje się aktywację dehydrogenazy bursztynianowej i wzrost udziału kompleksu II w przepływie elektronów. Procentowy udział może się zwiększyć aż do 70-80%. W warunkach niedotlenienia kompleks II może pracować w sposób niezależny od kompleksu I, a jego aktywność jest ograniczona jedynie dostępnością substratu [32,47]. Przeprogramowanie łańcucha oddechowego działa efektywnie przy krótkotrwałych i niezbyt głębokich epizodach niedotlenienia, ale końcowym akceptorem elektronów pozostaje tlen.

CZY MOŻLIWE JEST PRZEŻYCIE KILKUMINUTOWYCH, A NAWET KILKUGODZINNYCH EPIZODÓW NIEDOTLENIEŃ?

W toku ewolucji, kręgowce niższe (ryby, płazy i gady) wykształciły mechanizmy pozwalające im przeżyć w warunkach ograniczonej dostępności tlenu. Jak wiadomo zawartość tlenu w powietrzu jest stała. Natomiast ilość tlenu rozpuszczonego w wodzie, w której żyją te organizmy, zależy od różnych czynników (np. od pory roku czy pory dnia) i może się zmieniać radykalnie [55]. Przetwarzanie w warunkach ostrego niedoboru tlenu jest możliwe dzięki sprawności, a także współpracy wielu narządów i układów oraz zmianom w metabolizmie polegającym na optymalizacji: ekstrakcji tlenu ze środowiska i jego dostawy do obwodu oraz dostosowania zużycia energii do jej wytwarzania.

Z medycznego punktu widzenia najbardziej interesujące jest poznanie molekularnych mechanizmów adaptacyjnych zaangażowanych w redukcję zużycia energii w neuronach organizmów wodnych. Być może najbardziej niezwykłym przykładem zwierzęcia odpornego na niedotlenienie jest żółw malowany (*Chrysemys picta*). Ten gatunek może przetrwać bez tlenu do czterech miesięcy w okresie spoczynku zimowego [73]. Jedynym źródłem energii w tym czasie jest dla niego glikogen. Jego zapasy u *C. picta* są ogromne, bo stężenie tego związku w jego mięśniach wynosi aż 5100 mg%, w sercu 3600 mg%, w wątrobie 15000 mg%, a w mózgu 600 mg% [13].

Gdy maleje stężenie ATP i glukozy w komórce następuje proces rozkładu glikogenu. Aby zapobiec nadmiernemu zakwaszeniu kwas mlekowy powstający w czasie glikogenolizy jest w układzie kostnym, buforowany w postaci węglanów.

Po zahamowaniu fosforylacji oksydacyjnej spada w neuronach stężenie ATP, wywołujące wzrost stężenia ADP, AMP i adenozyliny. Ta ostatnia aktywuje metabotropowe receptory adenozyliny, która za pośrednictwem białka G aktywuje cyklastę adenylową i fosfolipazę C (PLC). Fosfolipaza C działa hydrolitycznie na fosfatydyloinozytol-(4,5)-bisfosforan (PIP₂). W wyniku hydrolizy powstają dwa wtórne przekazywniki informacji trójfosforan inozytolu (IP₃) i diacyloglicerol (DAG). IP₃ dyfunduje z błony

plazmatycznej do siateczki śródplazmatycznej. Siateczka śródplazmatyczna jest głównym magazynem jonów wapnia w komórce zwierzęcej. IP₃ łączy się ze swoistym receptorem znajdującym się w błonie organelli. Po związaniu IP₃ kanał receptora otwiera się i zmagazynowany Ca²⁺ zostaje uwolniony do cytosolu. Za wzrost stężenia wapnia jest odpowiedzialny także jego wyrzut z mitochondriów. Aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych (mK_{ATP}) powoduje napływ K⁺ do mitochondriów, w wyniku czego następuje depolaryzacja błony mitochondrialnej. Ca²⁺ jest uwalniany z mitochondriów i zwiększa się jego stężenie w cytoplazmie [59]. Mimo że wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia rośnie prawie dwukrotnie, to taki poziom nie jest dla neuronów szkodliwy. Wzrost Ca²⁺ aktywuje odpowiednie kinazy i fosfatazy białkowe. Skutkiem ich działania jest zahamowanie glikogenolizy i spadek aktywności zależnych od potencjału kanałów sodowych, potasowych i wapniowych [6]. Jednak główną rolę w hamowaniu aktywności neuronalnej w mózgu żółwia w niedotlenieniu odgrywa tłumienie aktywności receptorów N-metylo-D-asparaginowych (NMDA). Wzrost stężenia Ca²⁺ aktywuje fosfatazę białkową (PP1/2A), która usuwa resztę seryny z C-końca podjednostki NR1 kanału. Pozwala to na odłączenie receptora NMDA od cytoszkieletu i połączeniu go z α -aktyną, co jest jednoznaczne z przejściem receptora w stan nieaktywny. Wykazano (metodą stabilizacji skrawka błony, tj. „patch-clamp”), że u żółwia malowanego w czasie niedotlenienia czas otwarcia receptora NMDA jest o 75% krótszy niż u ssaków [67].

Inną strategię przetrwania epizodów niedotlenienia stwierdzono u ryb, karaś pospolity (*Carassius carassius*), tak jak i inne ryby, różnią się od żółwi tym, że pozostają aktywne w czasie niedotlenienia. Przy niedoborze tlenu wykorzystują duże rezerwy glikogenu z mięśni oraz wątroby, zmniejszają metabolizm i unikają kwasicy mleczanowej przez przekształcenie mleczanu do etanolu i CO₂. Produkty końcowe mogą być wydalane przez skrzela, co pozwala uniknąć poważnych zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej [56].

Równie ważnym zagadnieniem, jak przetrwanie długotrwałego niedotlenienia, jest także powrót po nim do stanu pełnej aktywności czyli reperfuzyja. Jest związana ze znacznym stresem oksydacyjnym i w niektórych przypadkach może spowodować więcej uszkodzeń niż samo niedotlenienie.

Badania nad adaptacją do niedotlenienia u niższych kręgowców [33] ujawniają dwa ogólne sposoby ograniczenia skutków stresu oksydacyjnego.

Pierwszy z nich to wysoka, konstytutywna ekspresja genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, drugi – to wzrost ich ekspresji dopiero w fazie niedotlenienia. Nie mniej jednak u wszystkich żywych organizmów tolerancja zmiennej dostępności tlenu wymaga spełnienia trzech, podstawowych wymogów:



- zdolności do zmniejszenia ogólnego tempa metabolizmu podczas niedotlenienia (tzw. depresja metaboliczna),
- tolerancji na zwiększenie stężenia produktów ubocznych metabolizmu (zwłaszcza protonów i wapnia),
- zdolności do uniknięcia i/lub naprawy uszkodzenia komórek po reoksygenacji.

Niestety, żadna z opisanych strategii, tj. gromadzenie zapasów glikogenu, czy też zahamowanie aktywności receptorów, nie może być wykorzystana przez neurony ssaków.

GLIKOGEN – UKRYTE NIEBEZPIECZEŃSTWO DLA NEURONÓW

Główną substancją odżywczą mózgu jest glukoza, magazynowana w komórkach zwierząt w postaci glikogenu. Jego obecność w mózgu jest ograniczona prawie wyłącznie do astrocytów [9]. W warunkach fizjologicznych, w większości neuronów, aktywność syntazy glikogenu (GS) jest hamowana. Znaczna akumulacja glikogenu jest stwierdzana jedynie w warunkach patologicznych. Przykładem choroby, której przyczyną jest akumulacja glikogenu w neuronach mózgu jest padaczka miokloniczna Lafora. Jest to uwarunkowana genetycznie postać padaczki spowodowana mutacjami w genach *EPM2A* (kodującym białko laforynę) i *EPM2B* (kodującym białko malinę). Kompleks tych dwóch białek hamuje aktywność syntazy glikogenu [48,77]. Cechą charakterystyczną choroby Lafora jest obecność dużych złogów glikogenu (tzw. ciałek Lafora) w aksonach i dendrytach neuronów [11]. Badania na transgenicznym myszku i muszku owocowym, ze zmutowaną, aktywną w neuronach, syntazą glikogenu (GS) [20] wykazały, że objawy kliniczne w tych chorobach są następstwem akumulacji glikogenu, co prowadzi bezpośrednio do śmierci neuronów i objawia się zaburzeniami w poruszaniu się i skróceniem średniej długości życia [19]. Dzięki zastosowaniu bardziej czułych metod detekcji glikogenu w komórkach wykazano [64], że glikogen, w bardzo niewielkich ilościach, jest obecny prawie we wszystkich neuronach. Jest syntetyzowany w bardzo małych ilościach i bardzo szybko wykorzystywany przez komórki. Nie jest wykorzystywany jako zapas energii, ale jako swego rodzaju „podręczny magazyn” używany w warunkach chwilowego, przejściowego zwiększenia zapotrzebowania na energię.

GLIKOLIZA KONTRA FOSFORYLACJA OKSYDACYJNA

Od ponad 150 lat wiadomo, że istnieje odwrotnie proporcjonalna zależność między glikolizą i fosforylacją oksydacyjną, znana w literaturze jako efekt Pasteura i Crabtree. Pierwszy z nich opisuje sytuację, w której dostarczanie tlenu do komórek zależnych od glikolizy, zwiększa ich oddychanie i zmniejsza glikolizę. Drugi, opisuje sytuację, w której dostarczanie glukozy do komórek powoduje wzrost glikolizy i zmniejszenie oddychania [74].

Neurony wykazują niewielką aktywność glikolizy. Nie mogą aktywować tego szlaku z powodu małej aktywności głównego dla tego procesu enzymu 6-fosfofrukto-2-kinazy (PFKFB3). Enzym tworzy homodimer i katalizuje zarówno syntezę, jak i degradację fruktozo-2,6-difosforanu za pomocą niezależnych domen katalitycznych. Fruktozo-2,6-difosforan jest aktywatorem szlaku glikolizy i inhibitorem szlaku glukoneogenezy. W związku z tym, enzym regulujący poziom fruktozo-2,6-difosforanu, reguluje homeostazę glukozy. Białko podlega stale degradacji w wyniku działania ligazy ubikwityny E3 [8]. Glukoza w neuronach, po przekształceniu w glukozo-6-fosforan (G6P), jest kierowana głównie do szlaku pentozofosforanowego (PPP). Głównym celem tego szlaku jest dostarczanie komórce fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) niezbędnego do utrzymania dużego stężenia zredukowanego glutationu (GSH). W czasie długiego życia, neurony są niejednokrotnie narażone na stres oksydacyjny. Ochrona przed reaktywnymi formami tlenu (RFT) wymaga sprawnego systemu antyoksydacyjnego. Jednak neurony zawierają bardzo niewielkie stężenia glutationu i małą aktywność syntazy gamma-glutamylcysteiny, głównego enzymu w syntezie GSH. Dlatego utrzymanie stałego stężenia GSH dla neuronów podstawowe znaczenie [7]. Aktywacja glikolizy w neuronach, przez nadekspresję białka PFKFB3 zwiększa wrażliwość na stres oksydacyjny i stymuluje apoptozę [34]. Neurony nie mogą utrzymać wysokiego tempa glikolizy. Jego zwiększenie następuje kosztem szlaku PPP, który jest niezbędny do wytwarzania NADPH i utrzymania komórkowego stężenia przeciwutleniaczy.

MITOCHONDRIA BEZTLENOWE

Komórki są zdolne do metabolizowania różnych substratów pokarmowych, takich jak glukoza, kwasy tłuszczowe, ciała ketonowe i aminokwasy. „Komórkowy wybór paliwa” nie tylko spełnia potrzeby biosyntezy, ale także umożliwia dostosowanie do zmian w dostępności substancji odżywczych. Niestety, zmiana jednego substratu na inny nie zmienia faktu, że końcowym akceptorem elektronów w łańcuchu oddechowym pozostaje tlen [69]. Czy zatem możliwe jest życie bez tlenu?

Niektóre, bardziej prymitywne, organizmy eukariotyczne przez całe życie lub tylko w niektórych jego okresach, żyją w środowisku ubogim w tlen lub nawet w warunkach beztlenowych. Siedliska te obejmują, np. morskie i słodkowodne osady lub przewody pokarmowe zwierząt. Ponadto, niektóre z nich, takie jak robaki pasożytnicze, nie mają układów krążenia i oddechowego i są zbyt duże, aby utrzymać tlenowy metabolizm energii za pomocą dyfuzji tlenu. „Mitochondria beztlenowe” organizmów eukariotycznych mogą wytwarzać ATP, ale końcowym akceptorem elektronów nie jest tlen, a tym samym końcowym produktem utleniania nie jest woda tylko azotyn (NO_2^-) i tlenek azotu (NO) lub bursztynian. Lista organizmów beztlenowych obejmuje różne gatunki bezkręgowców, takie jak płazińce i nicienie pasożytnicze oraz małże i ślimaki. „Beztlenowe mitochondria”

potrzebują alternatywnej oksydazy końcowej, aby wykorzystywać substraty inne niż tlen jako końcowy akceptor elektronów. Ogólnie, w zależności od rodzaju mitochondriów („tlenowe” czy „beztlenowe”) organizmy żywe można podzielić na dwie klasy. Pierwsza, jako akceptora elektronów używa tlenu, a druga w tym celu wykorzystuje albo aniony NO_3^- obecne w środowisku, albo endogenne akceptory elektronów np. fumaran [70]. Szczególnie ciekawym organizmem należącym do drugiej grupy jest pasożyt motylca wątrobowa (*Fasciola hepatica*) [71]. Osobniki wolno żyjące oraz niektóre stadia larwalne tego pasożyta wykorzystują tlen jako końcowy akceptor elektronów, natomiast dorosłe osobniki w swoim naturalnym siedlisku, w wątrobie, jako końcowego akceptora elektronów używają fumaranu. Taka zmiana wymaga nie tylko przebudowy mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, ale również obecności enzymu przekształcającego fumaran do bursztynianu, jak i specjalnego rodzaju chinonu (rhodokuinone, RQ) przenoszącego elektrony z kompleksu I i II do reduktazy fumaranu oraz enzymu przekształcającego acetylo-CoA w octan. Znałe są także inne zwierzęta np. *Mytilus edulis* (omułek jadalny), *Arenicola marina* (piaskówka) czy też *Trypanosoma brucei* (świdrowiec nagany), wytwarzające ATP w mitochondriach w warunkach beztlenowych [54].

MITOCHONDRIA TO NIE TYLKO ATP

Oprócz wytwarzania ATP, mitochondria odgrywają główną rolę w takich procesach komórkowych jak apoptoza [28], synteza hemu i steroidów [44], regulacja termogenezy [3] oraz kontrola stężenia Ca^{2+} w komórce [49]. Zatem prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów ma zasadnicze znaczenie dla zdrowia komórki i całego organizmu. Aby to zapewnić, w toku ewolucji powstał specjalny szlak metaboliczny, który eliminuje nadmierne uszkodzone mitochondria z komórki (autofagia mitochondrialna/mitofagia) [81]. Autofagia polega na trawieniu przez komórkę uszkodzonych elementów jej struktury. Jest to proces ściśle regulowany, odgrywa ważną rolę w czasie rozwoju i wzrostu komórek, utrzymuje równowagę między procesami syntezy i degradacji, a także umożliwia ponowne wykorzystanie cennych składników komórkowych. Istnieje kilka postaci autofagii, z których każda obejmuje dostarczanie wewnątrzkomórkowego ładunku do lizosomów, gdzie następuje degradacja. Jedną z wyspecjalizowanych postaci autofagii jest mitofagia, która polega na degradacji dysfunkcyjnych mitochondriów. Może być zainicjowana na kilka różnych sposobów. Zaprogramowana mitofagia występuje podczas dojrzewania erytroblastów i polega na pozbyciu się mitochondriów z dojrzałych krwinek czerwonych [53]. Drugi typ zaprogramowanej autofagii polega na eliminacji ojcowskich mitochondriów z zapłodnionego oocyty [18]. To, że DNA mitochondrialne jest dziedziczone wyłącznie od matki jest wiadome od dawna, dopiero najnowsze badania *C. elegans* wykazały, że degradacja ojcowskich mitochondriów (a więc i mtDNA), następuje za pośrednictwem autofagii [1].

W procesie mitofagii istotną rolę odgrywa białko PINK1. Jest konstytutywnie syntetyzowane i stale rozkładane przez swoistą dla mitochondriów proteazę PARL i mitochondrialną peptydazę MPP. Utrata potencjału błonowego przez mitochondrium, w wyniku nieopisanego dotychczas mechanizmu, hamuje aktywność białek PARL i MPP. Prowadzi to do akumulacji PINK1 w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Domena kinazowa PINK1, skierowana w stronę cytosolu, fosforyluje wiele białek zewnętrznej błony mitochondrialnej, m.in. mitofuzyny 1 i 2 (MNF1, MNF2), MIRO (białko rodziny Rho występujące w mitochondrium), VDAC (zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej) oraz białko Parkin, którego ufosforylowana postać wykazuje aktywność ligazy ubikwityny E3, ubikwitynylującej wiele białek mitochondrialnych w tym VDAC. Tak zmodyfikowane białka mogą oddziaływać z białkami adaptorowymi, takimi jak NBR1 lub P62. Mają domeny wiążącą ubikwitynę i wiążącą mikrotubule. W ostatnim etapie mitochondria są transportowane do lizosomów, gdzie następuje ich degradacja [52].

Oczywistym wydaje się, że proces mitofagii może przebiegać w odmienny sposób w różnych komórkach nerwowych. Jednak nie budzi kontrowersji to, że białko Parkin ulega translokacji do mitochondriów w neuronach. Jednak fizjologiczne znaczenie tego szlaku w niedotlenionych neuronach wymaga dalszych badań.

WIELKOŚĆ JEDNAK MA ZNACZENIE

Komórki mózgu, szczególnie neurony, są bardzo wrażliwe na różne urazy, takie jak niedokrwienie, niedotlenienie, hipoglikemia, zakażenie oraz urazy mechaniczne. Wrażliwość utrudnia leczenie i rehabilitację pacjentów cierpiących z powodu urazów centralnego układu nerwowego. Nie mniej jednak neurony są w różnym stopniu wrażliwe na niedotlenienie. Powszechnie wiadomo, że krótki okres globalnego niedokrwienia mózgu powoduje śmierć komórek w neuronach piramidalnych CA1 hipokampu dopiero kilka dni po reperfuzji. Inne neurony, np. CA3 hipokampa i kory mózgowej, są znacznie mniej wrażliwe [40]. Zjawisko to jest powszechnie określane jako opóźniona śmierć neuronów [41].

Większość białek mitochondrialnych jest kodowana przez DNA jądrowy. Są syntetyzowane na rybosomach cytoplazmatycznych, a następnie importowane do mitochondriów. Niektóre białka kodowane przez mtDNA są syntetyzowane w rybosomach mitochondrialnych. Genomy jądrowy i mitochondrialny w sposób skoordynowany tworzą enzymy łańcucha oddechowego. Łańcuch oddechowy składa się z kompleksu białek, które są kodowane przez zarówno mtDNA jak i DNA jądrowy. Mitochondria są okresowo transportowane do i z ciała komórek w celu uzupełnienia, kodowanych przez genom jądrowy białek mitochondrialnych, takich jak podjednostki COX IV, dehydrogenaza bursztynianowa i mitochondrialny czynnik transkrypcyjny. Białka motoryczne, np. białko CD i kinezyrna, przekształcają



energię hydrolizy ATP w pracę mechaniczną i przenoszą organelle komórkowe, takie jak mitochondria, wzdłuż mikrotubul. Białko CD, zwane także jako MAP, [58] transportuje mitochondria do ciała komórki, a kinezyzna pośredniczy w transporcie aksonalnym, na obwód. Białka motoryczne CD i kinezyzny są znacznie bardziej wrażliwe na niedotlenienie w porównaniu z białkami konstitutywnymi, jak MAP2 i tubulina. Dysfunkcja systemu transportu mitochondrów może spowodować postępującą niewydolność w wytwarzaniu energii w neuronach CA1, która powoduje śmierć komórki.

W ostatnich latach, mutacje genów kodujących kinezyzynę opisano w takich chorobach neurodegeneracyjnych jak dziedziczna spastyczna paraplegia (Spgs) i chorobie Charcota-Mariego-Tootha typu 2 (CMT2) [62,84]. Szybkość transportu aksonalnego może służyć do obserwacji rozwoju choroby oraz do sprawdzania skuteczności terapii [35].

NIEDOTLENIE DŁUGOTRWALE

Długotrwałe bądź powoli narastające niedotlenienie, które nie przekracza znacznie poziomu krytycznego, powoduje zupełnie inną odpowiedź komórki niż niedotlenienie ostre. W tym pierwszym przypadku następuje zmiana ekspresji genów i aktywacja czynników transkrypcyjnych, takich jak HIF-1. W normoksji, HIF-1 α jest związany z cząsteczką białka opiekuńczego Hsp90 (heat shock protein 90). W obecności tlenu i 2-oksoglutaranu, cząsteczka HIF-1 α jest hydroksylowana przez hydroksylazę prolinową (PHD) i acetylowana przez acetylotransferazę (ARD1). Tak zmodyfikowane białko jest łatwo rozpoznawane i wiązane przez białko von Hippel-Lindau (pVHL). Wiązanie z pVHL doprowadza do ubiquitytacji HIF-1 α , a ubiquitytowany kompleks pVHL/HIF-1 α ulega rozkładowi [61]. Chociaż transkrypcja i synteza czynnika HIF-1 α są konstitutywne i niezależne od stężenia tlenu, to HIF-1 α ma krótki okres półtrwania (kilka minut) i jest w warunkach normoksji szybko rozkładany. Niedotlenienie aktywuje kinazy aktywowane mitogenami (MAPK), które fosforylują HIF-1 α , a tym samym go stabilizują. W tym samym czasie fosforylacji ulega także HIF-1 β , znany również pod nazwą ARNT. Te dwa białka ulegają dimeryzacji z wytworzeniem HIF-1. Powstały heterodimer przyłącza się do swoistych sekwencji DNA – HRE (hypoxia response elements) i w ten sposób jest uruchamiana ekspresja określonych genów w odpowiedzi na niedotlenienie [65]. Zidentyfikowano ponad 100 genów aktywowanych przez HIF-1 [37]. W grupie tej są m.in. geny zaangażowane w procesy: erytropoezy, metabolizmu żelaza, rozwoju naczyń, metabolizmu glukozy i apoptozy. Najnowsze wyniki z doświadczeń *in vitro* sugerują, że selektywna utrata funkcji HIF-1 α w astrocytach zapewnia neuroprotekcję po hipoksji, a w neuronach zwiększa ich podatność na uszkodzenia wywołane niedotlenieniem [76]. Jednak grupa mikroRNA (hypoxia-regulated miRNA – HRMs) działa w przeciwnym kierunku i eliminuje mRNA, który nie powinien ulegać ekspresji w warunkach niedoboru tlenu [66]. Wyci-

szenie genów może się odbywać albo przez degradację określonego mRNA, albo w wyniku zahamowania translacji transkryptu. Cząsteczki miRNA są przyłączane do regionu 3' nieulegającego translacji (3'UTR) docelowego mRNA. Jeśli istnieje całkowita komplementarność między cząsteczką miRNA a określoną sekwencją mRNA, białko Ago2 może rozszczepiać cząsteczkę mRNA doprowadzając do jej bezpośredniej degradacji. W niepełnej komplementarności wyciszenie odbywa się na zasadzie blokowania translacji [29]. Końcowym skutkiem tych dwóch, przeciwstawnych procesów (wzrost ekspresji i wyciszenie genów) jest dostosowanie metabolizmu komórki do warunków hipoksji.

STARE I NOWE STRATEGIE TERAPEUTYCZNE

Jak dotąd nie ma żadnego swoistego leku, który mógłby odwrócić niedokrwienie i przywrócić do życia komórki nerwowe. Obecnie stosowane metody terapeutyczne polegają na jak najszybszym przywróceniu krążenia mózgowego w pobliżu obszaru martwicy oraz na zapobieganiu i leczeniu powikłań udaru, a także wprowadzeniu jak najwcześniej odpowiedniej profilaktyki zapobiegającej wystąpieniu ponownego udaru mózgu. Najskuteczniejszym sposobem udrożnienia mózgowego naczynia krwionośnego jest tromboliza, mająca na celu rozpuszczenie zakrzepu zamykającego lub zwężającego światło naczynia. Najczęściej stosowanym lekiem jest rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (rt-PA).

Potencjalnym punktem uchwytu dla leków zmniejszających wrażliwość na niedotlenienie lub zmniejszających negatywne skutki niedotlenienia neuronów są mitochondria. Do grupy leków zwiększających wydajność łańcucha oddechowego należą m.in. analogi koenzymu Q i pochodne bursztynianu [47,50]. Do grupy leków ograniczających skutki niedotlenienia zalicza się m.in. wymiatacze wolnych rodników, które niwelują skutki zwiększonego wytwarzania RFT. Często nie stosuje się jednej substancji, a koktajl składający się z analogu koenzymu Q, L-karnityny oraz witamin B, C i K1. Badania przeprowadzone na komórkach izolowanych od pacjentów z chorobami mitochondrialnymi wykazały znaczny wzrost wydajności łańcucha oddechowego, ale nie towarzyszyła temu poprawa stanu klinicznego, a czasem wręcz przeciwnie leki wykazywały działania niepożądane wynikające z hamowania przez te związki szlaków metabolicznych wykorzystujących RFT jako przekazniki sygnału. Jedynym z obiecujących kierunków rozwoju przeciwutleniaczy jako leków w hipoksji jest zastosowanie związków, które w sposób swoisty i wybiórczy będą działać tylko w mitochondriach, np. MitoQ [38].

W hipoksji, z powodu braku ATP, komórki nie mogą utrzymać ujemnego potencjału błonowego. Depolaryzacja neuronów wywołuje napływ do wnętrza komórki jonów wapnia. Wzrost cytosolowego stężenia wapnia aktywuje mitochondrialny uniporter wapniowy (mCU) [16]. Nadmierny wzrost stężenia wapnia w macierzy mitochondrialnej zmniejsza ich zdolność do genero-

wania ATP oraz powoduje uwalnianie czynników proapoptotycznych [27]. Na etapie badań przedklinicznych są obecnie leki (np. Ru360), których skutkiem działania jest blokada mitochondrialnego uniportera wapniowego (mCU) [25]. Nawet częściowe zahamowanie wchłaniania wapnia zapobiega depolaryzacji mitochondriów, otwarciu mitochondrialnego megakanalu i uwolnieniu cytochromu c.

Postęp w leczeniu udaru mózgu jest powolny, a liczba stosowanych metod leczniczych bardzo ograniczona [14]. Niezwykle obiecującą strategią jest prekondukcjonowanie hipoksyjne, a zwłaszcza dwie jego odmiany: prekondukcjonowanie oddalone (remote preconditioning) oraz postkondukcjonowanie. Pierwsza z technik polega na tym, że niedotlenienie lub niedokrwienie jednej części jakiegoś narządu zwiększa ochronę w innej jego części, a nawet narządów sąsiednich [60]. Druga polega na krótkotrwałych epizodach niedotlenienia lub niedokrwienia bezpośrednio po fazie reperfuzji i ma na celu ograniczenie stopnia uszkodzeń [78]. Metoda jest skuteczna u wielu gatunków (człowiek, szczur, mysz, królik, świnia), a jej działanie wykazano w takich organach jak serce, mózg, wątroba, nerki i rdzeń kręgowy.

Badania nad mechanizmami molekularnymi prekondukcjonowania wykazały, że jest to bardzo złożony proces. Obejmuje fazę początkową, w której aktywowane są receptory związane z białkiem G i receptory opiatowe [30] oraz fazę transdukcji sygnału i odpowiedź genomu polegającą na ekspresji genów, takich jak czynnik transkrypcyjny AP1 czy protoonkogenów, takich jak *c-fos*, *jun B*, *c-jun* i *jun D* [72].

Użycie różnych modeli i technik eksperymentalnych często uniemożliwia bezpośrednie porównanie wyników i wyciągnięcie wniosków dotyczących ekspresji konkretnych genów. Porównanie danych genetycznych i proteomicznych wykazało istnienie dwóch różnych „programów genetycznych”. Pierwszy jest realizowany po krótkotrwałym niedotlenieniu i ma charakter protekcyjny, drugi następuje po długotrwałym i rozległym niedotlenieniu i prowadzi do zmian nieodwracalnych [12]. Aż 40% genów zaangażowanych w program protekcyjny koduje białka mitochondrialne, szczególnie składniki kompleksu IV [39].

Konieczne są dalsze badania, które pozwolą na zrozumienie mechanizmów prowadzących do tolerancji niedotlenienia. Powinno to umożliwić opracowanie nowych, skutecznych procedur w leczeniu następstw udaru mózgu oraz być może transplantacji tego organu.

Bardzo istotne dane otrzymano badając komórki macierzyste. Okazało się, że pluripotencjalne komórki macierzyste (PSCs) podczas różnicowania zmieniają swój metabolizm energetyczny i głównym szlakiem pozyskiwania energii staje się fosforylacja oksydacyjna (zamiast glikolizy). Odwrotna zmiana (od fosforylacji oksydacyjnej do glikolizy) zachodzi w czasie przeprogramowania komórek somatycznych w indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSCs) [83]. Przewaga wykorzystania jednego szlaku pozyskiwania energii nad drugim jest kontrolowana na różnych poziomach. Obejmuje wzmożenie transkrypcji genów glikolitycznych, zahamowanie ekspresji genów kodujących mitochondrialne składniki łańcucha oddechowego, inaktywację dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) przez jej fosforylację i związane z tym zmniejszenie wykorzystania pirogronianu w cyklu kwasu trikarboksylowego (TCA) [24,57]. Te właściwości metaboliczne są związane z różnicami w morfologii i organizacji przestrzennej mitochondriów w komórce. Być może w przyszłości będzie można „przeprogramować” metabolizm neuronów, aby mogły choćby w ograniczonym zakresie, korzystać z innych niż fosforylacja oksydacyjna, sposobów pozyskiwania energii.

PODSUMOWANIE

Neurony to bardzo wyspecjalizowane komórki. Ich główną rolą jest wytwarzanie różnic potencjału i przekazywanie impulsów elektrycznych do innych komórek. Pochłania to bardzo dużo energii. Zależność neuronów od stałego, znacznego wytwarzania ATP (w mitochondriach) jest ich słabym punktem. Brak możliwości gromadzenia zapasów energii w postaci glikogenu, przełączenie metabolizmu z fosforylacji oksydacyjnej na glikolizę czy też wykorzystania jako końcowego akceptora elektronów innych substratów niż tlen jest przyczyną wrażliwości tych komórek na niedotlenienie. Paradoksalnie, to właśnie mitochondria są celem nowoczesnych i najbardziej obiecujących metod terapeutycznych w leczeniu udaru mózgu i chorób neurodegeneracyjnych.

PIŚMIENICTWO

[1] Al Rawi S., Louvet-Vallée S., Djeddi A., Sachse M., Culetto E., Hajjar C., Boyd L., Legouis R., Galy V.: Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*, 2011; 334: 1144-1147

[2] Astrup J., Siesjö B.K., Symon L.: Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. *Stroke*, 1981; 12: 723-725

[3] Azzu V., Brand M.D.: The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci.*, 2010; 35: 298-307

[4] Barcikowska M., Członkowska A., Derejczyk J., Gabryelewicz T., Gębska-Kuczerowska A., Herczyńska G., Sienkiewicz-Jarosz H., Józwiak A., Naruszewicz M., Opala G., Parnowski T., Pawińska-Proniewska M., Radzikowska M., Rajska-Neumann A., Rószkiewicz M. i wsp.: Problemy zdrowia publicznego w kontekście starzenia się populacji Polski. Raport. *Postępy Psychiatrii i Neurologii*, 2006; 15: 203-211

[5] Bazán N.G., Rodríguez de Turco E.B.: Membrane lipids in the pathogenesis of brain edema: phospholipids and arachidonic acid, the earliest membrane components changed at the onset of isch-



emia. *Adv Neurol.*, 1980; 28: 197-205

[6] Bickler P.E., Buck L.T.: Adaptations of vertebrate neurons to hypoxia and anoxia: maintaining critical Ca^{2+} concentrations. *J. Exp. Biol.*, 1998; 201: 1141-1152

[7] Bolaños J.P., Almeida A.: The pentose-phosphate pathway in neuronal survival against nitrosative stress. *IUBMB Life*, 2010; 62: 14-18

[8] Bolaños J.P., Almeida A., Moncada S.: Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci.*, 2010; 35: 145-149

[9] Brown A.M.: Brain glycogen re-awakened. *J. Neurochem.*, 2004; 89: 537-552

[10] Burnstock G., Krügel U., Abbracchio M.P., Illes P.: Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol.*, 2011; 95: 229-274

[11] Collins G.H., Cowden R.R., Nevis A.H.: Myoclonus epilepsy with Lafora bodies. An ultrastructural and cytochemical study. *Arch Pathol.*, 1968; 86: 239-254

[12] Das D.K., Maulik N.: Cardiac genomic response following preconditioning stimulus. *Cardiovasc. Res.*, 2006; 70: 254-263

[13] Daw J.C., Wenger D.P., Berne R.M.: Relationship between cardiac glycogen and tolerance to anoxia in the western painted turtle, *Chrysemys picta bellii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1967; 22: 69-73

[14] Diener H.C., Foerch C., Riess H., Röther J., Schroth G., Weber R.: Treatment of acute ischaemic stroke with thrombolysis or thrombectomy in patients receiving anti-thrombotic treatment. *Lancet Neurol.*, 2013; 12: 677-688

[15] Domańska-Janik K., Zalewska T.: Effect of brain ischemia on protein kinase C. *J. Neurochem.*, 1992; 58: 1432-1439

[16] Duchen M.R.: Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J. Physiol.*, 2000; 529: 57-68

[17] Dudkina N.V., Kouril R., Peters K., Braun H.P., Boekema E.J.: Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1797: 664-670

[18] Dumollard R., Ward Z., Carroll J., Duchen M.R.: Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development*, 2007; 134: 455-465

[19] Duran J., Gruart A., García-Rocha M., Delgado-García J.M., Guinovart J.J.: Glycogen accumulation underlies neurodegeneration and autophagy impairment in Lafora disease. *Hum. Mol. Genet.*, 2014; 23: 3147-3156

[20] Duran J., Tevy M.F., García-Rocha M., Calbó J., Milán M., Guinovart J.J.: Deleterious effects of neuronal accumulation of glycogen in flies and mice. *EMBO Mol. Med.*, 2012; 4: 719-729

[21] Erecińska M., Silver I.A.: Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.*, 1994; 43: 37-71

[22] Erecińska M., Silver I.A.: Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir. Physiol.*, 2001; 128: 263-276

[23] Folbergrová J., Minamisawa H., Ekholm A., Siesjö B.K.: Phosphorylase alpha and labile metabolites during anoxia: correlation to membrane fluxes of K^+ and Ca^{2+} . *J. Neurochem.*, 1990; 55: 1690-1696

[24] Folmes C.D., Nelson T.J., Martinez-Fernandez A., Arrell D.K., Lindor J.Z., Dzeja P.P., Ikeda Y., Perez-Terzic C., Terzic A.: Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.*, 2011; 14: 264-271

[25] García-Rivas Gde J., Carvajal K., Correa F., Zazueta C.: Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, 2006; 149: 829-837

[26] Genova M.L., Bianchi C., Lenaz G.: Supercomplex organization of the mitochondrial respiratory chain and the role of the Coenzyme Q pool: pathophysiological implications. *Biofactors*, 2005; 25: 5-20

[27] Gouriou Y., Demaurex N., Bijlenga P., De Marchi U.: Mitochondrial calcium handling during ischemia-induced cell death in neurons. *Biochimie*, 2011; 93: 2060-2067

[28] Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G.: Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science*, 2014; 345: 1250256

[29] Grenda A., Budzyński M., Filip A.A.: Biogenesis of microRNAs and their role in the development and course of selected hematologic disorders. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 174-185

[30] Gross E.R., Gross G.J.: Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res.*, 2006; 70: 212-221

[31] Hansen A.J.: Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.*, 1985; 65: 101-148

[32] Hawkins B.J., Levin M.D., Doonan P.J., Petrenko N.B., Davis C.W., Patel V.V., Madesh M.: Mitochondrial complex II prevents hypoxic but not calcium- and proapoptotic Bcl-2 protein-induced mitochondrial membrane potential loss. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 26494-26505

[33] Hermes-Lima M., Zenteno-Savín T.: Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 2002; 133: 537-556

[34] Herrero-Mendez A., Almeida A., Fernández E., Maestre C., Moncada S., Bolanos J.P.: The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 747-752

[35] Hinckelmann M.V., Zala D., Saudou F.: Releasing the brake: restoring fast axonal transport in neurodegenerative disorders. *Trends Cell Biol.*, 2013; 23: 634-643

[36] Insel T.R., Landis S.C., Collins F.S.: Research priorities. The NIH BRAIN Initiative. *Science*, 2013; 340: 687-688

[37] Ke Q., Costa M.: Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.*, 2006; 70: 1469-1480

[38] Kelso G.F., Porteous C.M., Coulter C.V., Hughes G., Porteous W.K., Ledgerwood E.C., Smith R.A., Murphy M.P.: Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 4588-4596

[39] Kim H.K., Kang S.W., Jeong S.H., Kim N., Ko J.H., Bang H., Park W.S., Choi T.H., Ha Y.R., Lee Y.S., Youm J.B., Ko K.S., Rhee B.D., Han J.: Identification of potential target genes of cardioprotection against ischemia-reperfusion injury by express sequence tags analysis in rat hearts. *J. Cardiol.*, 2012; 60: 98-110

[40] Kirino T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.*, 1982; 239: 57-69

[41] Kirino T., Sano K.: Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol.*, 1984; 62: 201-208

[42] Krab K., Kempe H., Wikström M.: Explaining the enigmatic K_M for oxygen in cytochrome c oxidase: a kinetic model. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1807: 348-358

[43] Lenaz G., Genova M.L.: Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010; 12: 961-1008

[44] Lill R., Mühlhoff U.: Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.*, 2008; 77: 669-700

[45] Lindahl S.G.: Oxygen and life on earth: an anesthesiologist's views on oxygen evolution, discovery, sensing, and utilization. *Anesthesiology*, 2008; 109: 7-13

[46] Lukyanova L.D., Dudchenko A.M., Tsybina T.A., Germanova E.L., Tkachuk E.N., Erenburg I.V.: Effect of intermittent normobaric hypoxia on kinetic properties of mitochondrial enzymes. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2007; 144: 795-801

[47] Lukyanova L.D., Kirova Y.I.: Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Front. Neurosci.*, 2015; 9: 320

- [48] Magistretti P.J., Allaman I.: Glycogen: a Trojan horse for neurons. *Nat Neurosci.*, 2007; 10: 1341-1342
- [49] Marchi S., Pinton P.: The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *J. Physiol.*, 2014; 592: 829-839
- [50] Marriage B.J., Clandinin M.T., Macdonald I.M., Glerum D.M.: Cofactor treatment improves ATP synthetic capacity in patients with oxidative phosphorylation disorders. *Mol. Genet. Metab.*, 2004; 81: 263-272
- [51] Mazurek M.: Umieralność z powodu udarów mózgu w Polsce – rola badań obserwacyjnych opartych na danych z baz informatycznych. *Wiad. Lek.*, 2005; 58: 397-402
- [52] Mizumura K., Choi A.M., Ryter S.W.: Emerging role of selective autophagy in human diseases. *Front. Pharmacol.*, 2014; 5: 244
- [53] Mortensen M., Ferguson D.J., Simon A.K.: Mitochondrial clearance by autophagy in developing erythrocytes: clearly important, but just how much so? *Cell Cycle*, 2010; 9: 1901-1906
- [54] Müller M., Mentel M., van Hellemond J.J., Henze K., Woehle C., Gould S.B., Yu R.Y., van Der Giezen M., Tielens A.G., Martin W.F.: Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2012; 76: 444-495
- [55] Nilsson G.E., Ostlund-Nilsson S.: Hypoxia in paradise: widespread hypoxia tolerance in coral reef fishes. *Proc. Biol. Sci.*, 2004; 271, Suppl. 3: S30-S33
- [56] Nilsson G.E., Renshaw G.M.: Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *J. Exp. Biol.*, 2004; 207: 3131-3139
- [57] Panopoulos A.D., Yanes O., Ruiz S., Kida Y.S., Diep D., Tautenhahn R., Herreras A., Batchelder E.M., Plongthongkum N., Lutz M., Berggren W.T., Zhang K., Evans R.M., Siuzdak G., Izpisua Belmonte J.C.: The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res.*, 2012; 22: 168-177
- [58] Paschal B.M., Shpetner H.S., Vallee R.B.: MAP1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules *in vitro* and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.*, 1987; 105: 1273-1282
- [59] Piwońska M., Szewczyk A.: Mitochondrial neuroprotection. *Postepy Biochem.*, 2008; 54: 169-178
- [60] Przyklenk K., Whittaker P.: Remote ischemic preconditioning: current knowledge, unresolved questions, and future priorities. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 2011; 16: 255-259
- [61] Ran R., Xu H., Lu A., Bernaudin M., Sharp F.R.: Hypoxia preconditioning in the brain. *Dev. Neurosci.*, 2005; 27: 87-92
- [62] Reid E., Kloos M., Ashley-Koch A., Hughes L., Bevan S., Svenson I.K., Graham F.L., Gaskell P.C., Dearlove A., Pericak-Vance M.A., Rubinsztein D.C., Marchuk D.A.: A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am. J. Hum. Genet.*, 2002; 71: 1189-1194
- [63] Rolett E.L., Azzawi A., Liu K.J., Yongbi M.N., Swartz H.M., Dunn J.F.: Critical oxygen tension in rat brain: a combined (31)P-NMR and EPR oximetry study. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2000; 279: R9-R16
- [64] Saez I., Duran J., Sinadinos C., Beltran A., Yanes O., Tevy M.F., Martínez-Pons C., Milán M., Guinovart J.J.: Neurons have an active glycogen metabolism that contributes to tolerance to hypoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2014; 34: 945-955
- [65] Semenza G.L., Jiang B.H., Leung S.W., Passantino R., Concordet J.P., Maire P., Giallongo A.: Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 32529-32537
- [66] Shen G., Li X., Jia Y.F., Piazza G.A., Xi Y.: Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2013; 34: 336-341
- [67] Shin D.S., Wilkie M.P., Pamenter M.E., Buck L.T.: Calcium and protein phosphatase 1/2A attenuate N-methyl-D-aspartate receptor activity in the anoxic turtle cortex. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 2005; 142: 50-57
- [68] Stamati K., Mudera V., Cheema U.: Evolution of oxygen utilization in multicellular organisms and implications for cell signaling in tissue engineering. *J. Tissue Eng.*, 2011; 2: 2041731411432365
- [69] Stanley I.A., Ribeiro S.M., Giménez-Cassina A., Norberg E., Danial N.N.: Changing appetites: the adaptive advantages of fuel choice. *Trends Cell Biol.*, 2014; 24: 118-127
- [70] Tielens A.G., Rotte C., van Hellemond J.J., Martin W.: Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.*, 2002; 27: 564-572
- [71] Tielens A.G., Van Hellemond J.J.: The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1365: 71-78
- [72] Truettner J., Busto R., Zhao W., Ginsberg M.D., Pérez-Pinzón M.A.: Effect of ischemic preconditioning on the expression of putative neuroprotective genes in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2002; 103: 106-115
- [73] Utsch G.R.: The viability of nearctic freshwater turtles submerged in anoxia and normoxia at 3 and 10 degrees C. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.*, 1985; 81: 607-611
- [74] Vadlakonda L., Dash A., Pasupuleti M., Anil Kumar K., Reddanna P.: Did we get Pasteur, Warburg, and Crabtree on a right note? *Front. Oncol.*, 2013; 3: 186
- [75] Vanderkooi J.M., Erecińska M., Silver I.A.: Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *Am. J. Physiol.*, 1991; 260: C1131-C1150
- [76] Vangeison G., Carr D., Federoff H.J., Rempe D.A.: The good, the bad, and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 α in neurons and astrocytes. *J. Neurosci.*, 2008; 28: 1988-1993
- [77] Vilchez D., Ros S., Cifuentes D., Pujadas L., Vallès J., García-Fojeda B., Criado-García O., Fernández-Sánchez E., Medraño-Fernández I., Domínguez J., García-Rocha M., Soriano E., Rodríguez De Córdoba S., Guinovart J.J.: Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.*, 2007; 10: 1407-1413
- [78] Vinten-Johansen J., Shi W.: Preconditioning and postconditioning: current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption, and future directions. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 2011; 16: 260-266
- [79] Xing C., Arai K., Lo E.H., Hommel M.: Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int. J. Stroke*, 2012; 7: 378-385
- [80] Yokota M., Saido T.C., Kamitani H., Tabuchi S., Satokata I., Watanabe T.: Calpain induces proteolysis of neuronal cytoskeleton in ischemic gerbil forebrain. *Brain Res.*, 2003; 984: 122-132
- [81] Yoshii S.R., Mizushima N.: Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015; 1853: 2797-2801
- [82] Zemke D., Smith J.L., Reeves M.J., Majid A.: Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology*, 2004; 25: 895-904
- [83] Zhang L., Marsboom G., Glick D., Zhang Y., Toth P.T., Jones N., Malik A.B., Rehman J.: Bioenergetic shifts during transitions between stem cell states (2013 Grover Conference series). *Pulm. Circ.*, 2014; 4: 387-394
- [84] Zhao C., Takita J., Tanaka Y., Setou M., Nakagawa T., Takeda S., Yang H.W., Terada S., Nakata T., Takei Y., Saito M., Tsuji S., Hayashi Y., Hirokawa N.: Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1B β . *Cell*, 2001; 105: 587-597

Autor deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.

