

# O Nicorandil Preserva a Funcionalidade do Sistema Fosforilativo e Oxidativo Mitochondrial num Modelo Animal de Isquémia-Reperfusão Global [33]

RAQUEL CARREIRA, PEDRO MONTEIRO, LINO M. GONÇALVES, LUÍS A. PROVIDÊNCIA

Serviço de Cardiologia, Hospitais da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Faculdade de Medicina de Coimbra, Coimbra, Portugal

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Rev Port Cardiol 2007; 28 (5): 521-528

## RESUMO

A isquémia seguida de reperfusão (IR) afecta negativamente a função mitocondrial. Ao nível do sistema oxidativo-fosforilativo, a isquémia-reperfusão inibe os complexos respiratórios e a ATP sintase e aumenta o “leak” passivo de prótons através da membrana mitocondrial interna, desacoplando a respiração da fosforilação, diminuindo o potencial mitocondrial e, consequentemente, a produção de ATP. Fármacos capazes de minimizar os danos mitocondriais induzidos pela IR podem revelar-se clinicamente eficazes. No presente trabalho analisou-se o impacto do nicorandil, um agonista dos canais mitocondriais de potássio sensíveis a ATP, na disfunção mitocondrial ao nível do sistema oxidativo-fosforilativo de corações de ratos submetidos a IR. A diminuição do índice de controlo respiratório (ICR) pela IR permite-nos concluir que a IR tem um impacto negativo na actividade da cadeia respiratória mitocondrial, desacoplando a oxidação da fosforilação mitocondrial. Este efeito é revertido pelo nicorandil, o qual aumenta tanto o ICR, como o índice ADP/O. No que diz respeito às velocidades respiratórias, a velocidade respiratória no estado 3 é sensivelmente a mesma para os três grupos, enquanto que a velocidade no estado 4 é menor para o grupo em que a IR foi induzida na presença de nicorandil. Este resultado está de acordo com os dados obtidos para o ICR e ADP/O. A velocidade respiratória no estado 4 é a mais

## ABSTRACT

### Nicorandil Preserves the Function of the Mitochondrial Phosphorylative and Oxidative System in an Animal Model of Global Ischemia-Reperfusion

Ischemia followed by reperfusion (IR) negatively affects mitochondrial function. At the level of the oxidative-phosphorylative system, IR inhibits the respiratory complexes and ATP synthase, and increases the passive leak of protons through the inner mitochondrial membrane, uncoupling respiration from phosphorylation, decreasing mitochondrial potential and, consequently, ATP production. Drugs that minimize the mitochondrial damage induced by IR may prove to be clinically effective. In the present work, we analyzed the impact of nicorandil, a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel agonist, on mitochondrial dysfunction at the level of the oxidative-phosphorylative system of rat hearts subjected to IR. The decrease in the respiratory control ratio (RCR) induced by IR leads to the conclusion that IR has a negative impact on the activity of the mitochondrial respiratory system, uncoupling oxidation from phosphorylation. This effect is reversed by nicorandil, which increases not only RCR, but also the ADP/O ratio. Regarding respiratory rate, state 3 rate was approximately the same for all the experimental groups, while state 4 rate was lower for the group where IR was induced in the presence of nicorandil. This

afectada pelo desacoplamento, dado que é controlada pelo “leak” de prótons. As mitocôndrias em que a IR foi induzida na presença de nicorandil têm uma menor velocidade respiratória no estado 4, ou seja, estão menos desacopladas. Destes resultados conclui-se que o nicorandil preserva a funcionalidade de mitocôndrias sujeitas a IR, tanto ao nível da respiração, como da capacidade fosforilativa.

#### Palavras-Chave

Fosforilação oxidativa; Isquémia; Mitocôndria; Nicorandil; Reperusão.

#### Abreviaturas (ou fórmulas químicas) utilizadas no texto (Nomenclatura anglo-saxónica):

- Canal mitocondrial de potássio sensível a ATP (mitoK<sub>ATP</sub>)
- Impact Of Nicorandil in Angina (IONA),
- Índice de controlo respiratório (ICR)
- Isquémia-reperusão (IR)
- Potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi$ )

## INTRODUÇÃO

Um fornecimento deficitário de oxigénio e nutrientes às células cardíacas devido a uma insuficiente perfusão coronária (isquémia), seguido pelo restabelecimento dos níveis de oxigénio e nutrientes (reperusão), pode provocar danos extensos no tecido cardíaco. As mitocôndrias cardíacas constituem um dos principais alvos da isquémia-reperusão (IR) devido ao seu papel na bioenergética, homeostase iónica e modulação dos processos de morte celular<sup>(1)</sup>. Na mitocôndria, a oxidação aeróbica gera um potencial electroquímico de H<sup>+</sup>, o qual é essencial para a geração de ATP. A isquémia-reperusão inibe os complexos respiratórios e a ATP sintase e aumenta o “leak” passivo de prótons através da membrana mitocondrial interna, desacoplando a respiração da fosforilação, diminuindo o potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi$ )

result is in accordance with the data obtained for the RCR and ADP/O. State 4 rate is most affected by uncoupling, given that it is controlled by proton leak. Mitochondria subjected to IR in the presence of nicorandil have a lower state 4 rate, i.e. they are less uncoupled. From these results we conclude that nicorandil preserves the function of mitochondria subjected to IR in terms of both respiration and phosphorylative capacity.

#### Key words

Oxidative phosphorylation; Ischemia; Mitochondria, Nicorandil; Reperfusion.

#### Abbreviations:

- mitoK<sub>ATP</sub>: mitochondrial ATP-sensitive potassium channels
- IONA: Impact Of Nicorandil in Angina
- RCR: respiratory control ratio
- IR: ischemia-reperfusion
- $\Delta\Psi$ : mitochondrial potential

## INTRODUCTION

Inadequate supply of oxygen and nutrients to cardiomyocytes due to insufficient coronary perfusion (ischemia), followed by the re-establishment of normal levels (reperfusion), can cause extensive damage to cardiac tissue. Cardiac mitochondria are the main targets of ischemia-reperfusion (IR), due to their role in bioenergetics and ion homeostasis and in processes of cell death<sup>(1)</sup>. Aerobic oxidation in mitochondria generates an electrochemical potential of H<sup>+</sup>, which is essential for the production of ATP. IR inhibits respiratory complexes and ATP synthase and increases passive proton leak through the inner mitochondrial membrane, uncoupling respiration from phosphorylation, decreasing mitochondrial potential ( $\Delta\Psi$ ) and consequently ATP production. The reduction in ATP levels is aggravated by the

e, conseqüentemente, a produção de ATP. A diminuição dos níveis de ATP é ainda mais agravada pelo facto de, na ausência de oxigénio e de  $\Delta\Psi$  elevado, a ATP sintase ser convertida numa ATPase, hidrolisando ATP numa tentativa fútil de preservar  $\Delta\Psi$ <sup>(2)</sup>.

O nicorandil tem uma estrutura química resultante da combinação de um nitrato orgânico e uma nicotinamida e é um fármaco eficaz no tratamento da doença cardíaca isquémica. Este fármaco tem um mecanismo de acção duplo: actua como um vasodilatador, relaxando os músculos vasculares lisos através do aumento dos níveis de cGMP<sup>(3)</sup>. Contudo, este efeito não contribui significativamente para a cardioprotecção<sup>(4)</sup>. Um outro efeito mais importante é que, em mitocôndrias cardíacas, o nicorandil activa os canais de K<sup>+</sup> sensíveis a ATP (mitoK<sub>ATP</sub>), exercendo um efeito cardioprotector directo<sup>(4)</sup>. Kowaltowski e colaboradores<sup>(5)</sup> propuseram que o mitoK<sub>ATP</sub> regula o volume dos espaços matricial e intermembranar. A abertura do canal mitoK<sub>ATP</sub> ajudaria, então, a preservar a arquitectura do espaço intermembranar com o conseqüente abrandamento da hidrólise de ATP e a preservação da capacidade de utilizar eficientemente a creatina como substrato durante a reperfusão<sup>(5)</sup>. Apesar do mecanismo de acção do nicorandil não ser ainda consensual, o estudo IONA<sup>(6)</sup> demonstrou que o tratamento de doentes com angina estável com este fármaco diminui a incidência de eventos cardiovasculares. A administração de nicorandil antes da isquémia melhora a recuperação da função contráctil pós-isquémia e reduz a área de enfarte tanto em modelos animais<sup>(7)</sup>, como humanos<sup>(8)</sup>, protegendo os cardiomiócitos contra a morte celular.

Com o trabalho experimental realizado pretendeu-se determinar o efeito do nicorandil na função de mitocôndrias de corações submetidos a isquémia-reperfusão, utilizando para tal um modelo animal de perfusão ex-vivo com um sistema de Langendorff.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes:

Os reagentes foram adquiridos à Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo) ou à Merck (Darmstadt, Germany), com a excepção do nicorandil que foi cedido pela *Chugai Pharmaceutical Co.* (Japan).

fact that, in the absence of oxygen and with low  $\Delta\Psi$ , ATP synthase is converted to ATPase, hydrolyzing ATP in a vain attempt to preserve  $\Delta\Psi$ <sup>(2)</sup>.

The chemical structure of nicorandil results from the combination of an organic nitrate with a nicotinamide. It is an effective drug in the treatment of ischemic heart disease, with a dual action: it is a vasodilator, relaxing vascular smooth muscle by increasing cGMP levels<sup>(3)</sup>, although this does not contribute significantly to its cardioprotective effect; and, more importantly, in cardiac mitochondria, it opens ATP-dependent potassium channels (mitoK<sub>ATP</sub>), which has a direct cardioprotective effect<sup>(4)</sup>. Kowaltowski et al.<sup>(5)</sup> proposed that mitoK<sub>ATP</sub> regulate the volume of matrix and intermembrane spaces, and so opening these channels would help to preserve the architecture of the intermembrane space, slowing ATP hydrolysis and preserving the ability to use creatine efficiently as a substrate during reperfusion<sup>(5)</sup>. Although there is disagreement on nicorandil's mechanism, the IONA study<sup>(6)</sup> demonstrated that treating patients with stable angina with this drug reduced the incidence of cardiovascular events. Administering nicorandil before the occurrence of ischemia improves post-ischemia recovery of contractile function and reduces infarct size in both animal models<sup>(7)</sup> and humans<sup>(8)</sup>, protecting cardiomyocytes against cell death.

The objective of this experimental study was to determine the effect of nicorandil on mitochondrial function in hearts subjected to ischemia-reperfusion, using an animal model of ex-vivo perfusion in a Langendorff system.

## METHODS

### Reagents:

The reagents were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) or Merck (Darmstadt, Germany), with the exception of the nicorandil, which was provided by Chugai Pharmaceutical Co. (Japan).

### Perfusion of hearts:

Hearts of Wistar rats were rapidly excised from the thoracic cavity and perfused in a Krebs-Henseleit solution containing 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM

### **Perfusão dos corações:**

Corações de ratos da estirpe Wistar foram rapidamente removidos da cavidade torácica e perfundidos com meio de Krebs-Hanseleit contendo 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glicose e 10mM HEPES (pH=7,4 e à temperatura de 37°C) a uma pressão de 90 mmHg num sistema de perfusão do tipo Langendorff. A solução para indução de isquémia não continha glicose nem oxigénio. Os corações foram distribuídos pelos seguintes grupos: i) controlo - 175 minutos de perfusão; ii) isquémia-reperfusão - 20 minutos de perfusão seguidos de 35 minutos de isquémia e 120 minutos de reperfusão; iii) isquémia-reperfusão + nicorandil - 20 minutos de perfusão seguidos de 35 minutos de isquémia e 120 minutos de reperfusão, na presença de 100 µM de nicorandil.

### **Isolamento da fracção mitocondrial:**

A fracção mitocondrial foi isolada de acordo com o método descrito por Belisle e Kowaltowski<sup>(9)</sup> com ligeiras alterações. Resumidamente, os corações foram homogeneizados em 300 mM sacarose, 0,5 mM K<sup>+</sup>-EGTA, 0,2% (m/V) BSA e 10 mM K<sup>+</sup>-HEPES, pH 7,4 e o homogeneizado resultante centrifugado a 600 g durante 7 min. O sobrenadante foi seguidamente centrifugado a 12000 g por 7 min. O pellet obtido (fracção mitocondrial) foi ressuspensão em 300 mM sacarose, 10 µM K<sup>+</sup>-EGTA e 10 mM K<sup>+</sup>-HEPES, pH 7,4 e centrifugado a 12000 g por 7 min. Repetiu-se esta operação e ressuspendeu-se o *pellet* obtido num volume mínimo de meio contendo 300 mM sacarose e 10 mM K<sup>+</sup>-HEPES, pH 7,4.

### **Avaliação da actividade respiratória mitocondrial:**

O consumo de O<sub>2</sub> foi avaliado polarograficamente, utilizando um eléctrodo de oxigénio (Yellow Springs Instruments Co.) do tipo Clark<sup>(10)</sup> ligado a um registador *Kipp & Zonen*. Como substrato respiratório foi usado piruvato/malato.

### **Análise dos resultados e tratamento estatístico:**

Os resultados deste trabalho são apresentados como média ± erro padrão, para um número de experiências igual ou superior a 10. O tratamento estatístico dos resultados foi realizado utilizando

glucose and 10 mM HEPES (pH=7.4, at a temperature of 37 °C), at a pressure of 90 mmHg in a Langendorff-type perfusion system. The solution used to induce ischemia contained no glucose or oxygen. The hearts were distributed randomly between the following groups: i) control- 175 minutes of perfusion; ii) ischemia-reperfusion - 20 minutes of perfusion, followed by 35 minutes of ischemia and 120 minutes of reperfusion; iii) ischemia-reperfusion + nicorandil - 20 minutes of perfusion followed by 35 minutes of ischemia and 120 minutes of reperfusion in the presence of 100 µM of nicorandil.

### **Isolation of mitochondrial fraction:**

The mitochondrial fraction was isolated following the method described by Belisle and Kowaltowski<sup>(9)</sup> with slight modifications. Briefly, the hearts were homogenized in 300 mM sucrose, 0.5 mM K<sup>+</sup>-EGTA, 0.2% (m/V) BSA and 10 mM HEPES, pH 7.4, and centrifuged at 600 g for 7 min. The supernatant was then centrifuged at 12 000 g for 7 min. The resulting pellet, the mitochondrial fraction, was resuspended in 300 mM sucrose, 10 µM K<sup>+</sup>-EGTA and 10 mM HEPES, pH 7.4 and centrifuged for 7 minutes at 12 000 g. The operation was repeated and the pellet was resuspended in a minimal volume of solution containing 300 mM sucrose and 10 mM K<sup>+</sup>-HEPES, pH 7.4.

### **Assessment of mitochondrial respiratory activity:**

Oxygen consumption was assessed by polarography, using a Clark-type oxygen electrode (Yellow Springs Instruments Co.), connected to a Kipp & Zonen recorder. The respiratory substrate used was pyruvate/malate.

### **Statistical analysis:**

The results are presented as means ± standard error for ten or more experiments. Statistical analysis of the results was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). The level of significance used was p<0.05, obtained by the Student-Newman-Keuls multiple comparisons post-test (GraphPad Prism, version 4.00, GraphPad Software).

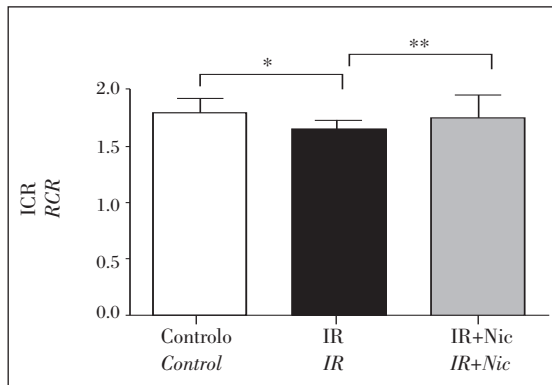


Figura 1. Efeito da isquémia-reperfusão e do nicorandil no ICR. \* $p < 0,0$  \*\* $P < 0,001$

Figure 1. Effect of ischemia-reperfusion and nicorandil on RCR. \* $p < 0.0$  \*\* $P < 0,001$

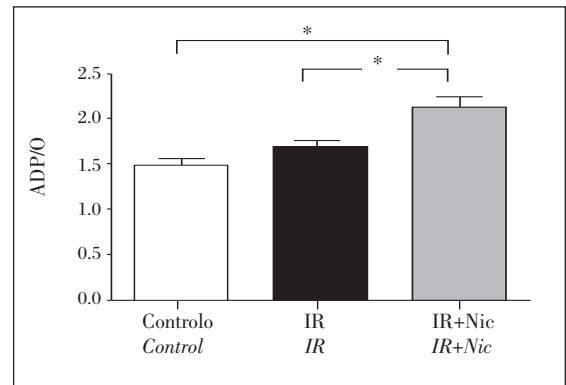


Figura 2. Efeito da isquémia-reperfusão e do nicorandil no índice ADP/O. \* $p < 0,02$

Figure 2. Effect of ischemia-reperfusion and nicorandil on ADP/O ratio. \* $p < 0.02$

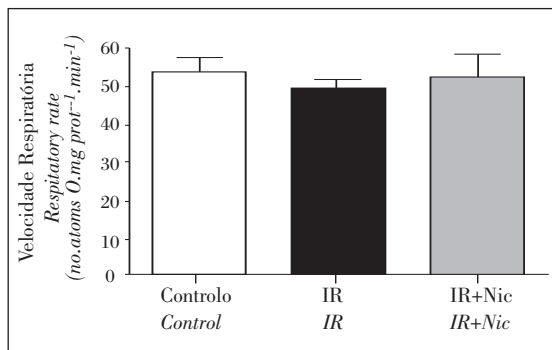


Figura 3. Efeito da isquémia-reperfusão e do nicorandil na velocidade respiratória no estado 3

Figure 3. Effect of ischemia-reperfusion and nicorandil on respiratory rate in state 3

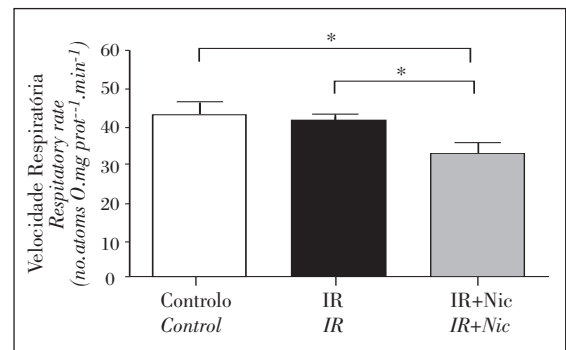


Figura 4. Efeito da isquémia-reperfusão e do nicorandil na velocidade respiratória no estado 4. \* $p < 0,02$

Figure 4. Effect of ischemia-reperfusion and nicorandil on respiratory rate in state 4. \* $p < 0.02$

o teste *one-way* ANOVA. O nível de significância utilizado foi  $p < 0,05$  obtido pelo pós-teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (GraphPad Prism, Versão 4.00, GraphPad Software).

## RESULTADOS

Com a finalidade de avaliar o efeito da isquémia-reperfusão e do nicorandil ao nível da actividade da cadeia respiratória, registou-se o consumo de oxigénio da suspensão mitocondrial em situações controlo e de isquémia-reperfusão, na ausência (IR) e na presença de nicorandil (IR+Nic).

Pelo ICR (índice de controlo respiratório) (Fig. 1) pode-se verificar que a IR tem um impacto negativo na actividade da cadeia respiratória mitocondrial ( $1,44 \pm 0,07$  no grupo

## RESULTS

In order to assess the effect of IR and nicorandil on respiratory chain activity, the oxygen consumption of the mitochondrial suspension was recorded under control and IR conditions, in the absence (IR) and presence (IR+Nic) of nicorandil.

From the respiratory control ratio (RCR) (Fig. 1), it can be seen that IR has a negative impact on the mitochondrial respiratory system ( $1.44 \pm 0.07$  in the control group vs.  $1.23 \pm 0.02$  in the IR group;  $p < 0.01$ ), which was reversed by the presence of nicorandil ( $1.23 \pm 0.02$  in the IR group vs.  $1.61 \pm 0.10$  in the IR+Nic group;  $p < 0.001$ ). The beneficial effect of nicorandil was also seen in the ADP/O ratio (Fig. 2), in that mitochondria subjected to IR in the presence of nicorandil have greater phosphorylative capacity, indicated by a higher ADP/O ratio ( $1.67 \pm 0.07$  in

controlo *versus*  $1,23 \pm 0,02$  no grupo IR;  $p < 0,01$ ), efeito que é revertido pela presença de nicorandil ( $1,23 \pm 0,02$  no grupo IR *versus*  $1,61 \pm 0,10$  no grupo IR+Nic;  $p < 0,001$ ). O efeito benéfico do nicorandil também se verifica no ADP/O (*Fig. 2*), visto que mitocôndrias que foram sujeitas a isquémia-reperusão na presença de nicorandil têm uma maior capacidade fosforilativa, indicada por um índice ADP/O superior ( $1,67 \pm 0,07$  no grupo IR *versus*  $2,12 \pm 0,17$  no grupo IR+Nic;  $p < 0,02$ ).

No que diz respeito às velocidades respiratórias, a velocidade respiratória no estado 3 (*Fig. 3*) é sensivelmente a mesma para os três grupos ( $53,73 \pm 3,85$  no grupo controlo *versus*  $49,17 \pm 2,57$  no grupo IR *versus*  $52,31 \pm 6,23$  no grupo IR+Nic;  $p = n.s.$ ), enquanto que a velocidade no estado 4 (*Fig. 4*) é menor para o grupo IR+Nic ( $42,62 \pm 3,88$  no grupo controlo e  $41,35 \pm 2,02$  no grupo IR *versus*  $32,52 \pm 3,24$  no grupo IR+Nic;  $p < 0,02$ ).

## DISCUSSÃO

No que diz respeito à integridade funcional de mitocôndrias, a isquémia-reperusão pode ser deletéria, não provocar qualquer alteração ou até mesmo aumentar a fosforilação oxidativa. As discrepâncias nos resultados obtidos por diferentes grupos podem ser devidas, por exemplo, a diferentes idades dos animais e a diferentes protocolos, em particular diferentes durações da isquémia. O complexo I é especialmente sensível aos efeitos nefastos da isquémia. De facto, os nossos resultados demonstram que mitocôndrias de corações sujeitos a 35 minutos de isquémia (seguidos de 2h de reperusão) apresentam uma velocidade respiratória no estado III (complexo I) ligeiramente diminuída (*Fig. 3*) e uma diminuição significativa do índice de controlo respiratório (*Fig. 1*) sem alterações da capacidade fosforilativa (*Fig. 2*). O nicorandil reverte o efeito negativo da isquémia-reperusão, aumentando o índice de controlo respiratório (o qual é um indicador da integridade do sistema fosforilativo-oxidativo) para valores semelhantes aos de mitocôndrias controlo (*Fig. 1*) e aumentando a capacidade fosforilativa para valores que chegam a ser superiores aos apresentados por mitocôndrias controlo (*Fig. 2*). A velocidade respiratória no estado 4 (*Fig. 4*) é menor para o

the IR group vs.  $2.12 \pm 0.17$  in the IR+Nic group;  $p < 0.02$ ).

Respiratory rate in state 3 (*Fig. 3*) was approximately the same for all three groups ( $53.73 \pm 3.85$  in the control group vs.  $49.17 \pm 2.57$  in the IR group vs.  $52.31 \pm 6.23$  in the IR+Nic group;  $p = NS$ ), while respiratory rate in state 4 (*Fig. 4*) was lower for the IR+Nic group ( $42.62 \pm 3.88$  in the control group and  $41.35 \pm 2.02$  in the IR group vs.  $32.52 \pm 3.24$  in the IR+Nic group;  $p < 0.02$ ).

## DISCUSSION

In terms of the functional integrity of mitochondria, ischemia-reperfusion can be harmful, have no effect or even increase oxidative phosphorylation. The discrepancies in the results obtained by different groups may be due to differences in the age of the experimental animals or in the protocols used, especially the duration of ischemia. Respiratory complex I is particularly sensitive to the harmful effects of ischemia; our results show that cardiac mitochondria subjected to 35 minutes of ischemia followed by 2 hours of reperfusion have a slightly reduced rate in state 3 (complex I) (*Fig. 3*) and significantly lower RCR (*Fig. 1*), with no change in phosphorylative capacity (*Fig. 2*). Nicorandil reverses the negative effect of IR, increasing the RCR (an indicator of the integrity of the phosphorylative-oxidative system) to values similar to those of control mitochondria (*Fig. 1*) and increasing phosphorylative capacity to more than that of the controls (*Fig. 2*). Respiratory rate in state 4 (*Fig. 2*) was lower for the group in which IR was induced in the presence of nicorandil. This result is in agreement with the findings for RCR and ADP/O. Respiratory rate in state 4 is most affected by uncoupling, given that it is controlled by proton leak. Mitochondria subjected to IR in the presence of nicorandil have a lower state 4 rate, i.e. they are less uncoupled, which may reflect greater integrity of the oxidation-phosphorylation system or of the mitochondrial membrane.

Although the changes in mitochondrial function during IR are relatively well known, the causes of deterioration of respiratory complexes are still poorly understood. These may include calcium overload in mitochondria due to the loss

grupo em que a isquémia-reperfusão foi induzida na presença de nicorandil. Este resultado está de acordo com os dados obtidos para o ICR e ADP/O. A velocidade respiratória no estado 4 é a mais afectada pelo desacoplamento, dado que é controlada pelo *leak* de H<sup>+</sup>. As mitocôndrias em que a IR foi induzida na presença de nicorandil têm uma menor velocidade respiratória no estado 4, ou seja, estão menos desacopladas, o que poderá reflectir uma maior integridade do sistema fosforilativo-oxidativo ou da membrana mitocondrial.

Apesar das alterações da função mitocondrial durante a isquémia-reperfusão já serem relativamente conhecidas, as causas da deterioração dos complexos respiratórios ainda estão pouco esclarecidas. Entre estas causas podem estar a sobrecarga de cálcio na mitocôndria devida à perda da homeostase de cálcio ou a formação de ROS. A sobrecarga mitocondrial de cálcio e a formação de ROS têm outros efeitos deletérios graves para os cardiomiócitos, entre os quais a indução da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). A TPM causa libertação de citocromo para o citosol, o que por sua vez inibe ainda mais a cadeia respiratória. Por outro lado, a libertação de citocromo c da mitocôndria para o citosol durante a TPM, assim como de outros factores apoptogénicos, pode também conduzir a apoptose, o que pode eventualmente culminar na morte dos cardiomiócitos. Resultados obtidos pelo nosso grupo (Raquel Carreira *et al.*, resultados não publicados) usando um modelo igual ao descrito neste trabalho, demonstraram que o nicorandil diminui a ocorrência de stresse oxidativo e de TPM em mitocôndrias sujeitas a isquémia-reperfusão. A inibição da ocorrência de stresse oxidativo e de transição de permeabilidade mitocondrial, poderá ser um mecanismo indirecto de preservação da funcionalidade do sistema fosforilativo-oxidativo.

## CONCLUSÕES

O estudo realizado comprovou que a isquémia-reperfusão tem um impacto negativo na função mitocondrial cardíaca ao nível do sistema oxidativo-fosforilativo. O nicorandil foi capaz de reverter o efeito nefasto da IR, preservando a funcionalidade de mitocôndrias sujeitas a IR, tanto ao nível da respiração como da capacidade

of calcium homeostasis, or the formation of reactive oxygen species (ROS), which have other severe deleterious effects on cardiomyocytes, including induction of the mitochondrial permeability transition (MPT). The latter results in the release of cytochrome c into the cytosol, which further inhibits the respiratory chain, and may, together with other factors, also lead to apoptosis and eventually cardiomyocyte death. Data obtained by our group (Raquel Carreira *et al.*, unpublished results) using the same model as in this work showed that nicorandil reduces oxidative stress and the occurrence of the MPT in mitochondria subjected to IR. This may be an indirect way of preserving the function of the phosphorylative-oxidative system.

## CONCLUSIONS

The present study showed that ischemia-reperfusion has a negative impact on cardiac mitochondrial function at the level of the oxidative-phosphorylative system. Nicorandil can reverse the harmful effects of IR, preserving the function of mitochondria subjected to IR in terms of both respiration and phosphorylative capacity.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly funded by Procardio. The nicorandil was kindly provided by Chugai Pharmaceutical Co. (Japan).

fosforilativa.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Procardio. O nicorandil foi gentilmente cedido pela *Chugai Pharmaceutical Co.* (Japan).

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

LINO GONÇALVES

Serviço de Cardiologia - Hospitais

da Universidade de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000 Coimbra PORTUGAL

Tel: 239400400 (Extensão 13038) Fax: 239404044

E-mail: lgoncalv@ci.uc.pt

## BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1 - Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J* 1999; 341: 233-249.

2 - St-Pierre J, Brand MD, Boutilier RG. Mitochondria as ATP Consumers: Cellular Treason in Anoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97(15): 8670-8674.

3 - Meisheri KD, Cipkus-Dubray LA, Hosner JM, Khan SA. Nicorandil-induced vasorelaxation: functional evidence for K<sup>+</sup> channel dependent and cyclic GMP-dependent components in a single vascular preparation. *J. Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: 903-912.

4 - Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, Marban E. Nicorandil, a Potent Cardioprotective Agent, Acts by Opening Mitochondrial ATP-dependent Potassium Channels. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 514-518.

5 - Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H649-H657.

6 - The IONA Study Group. Effect of nicorandil on major events in patients with stable angina: the Impact Of Nicorandil in Angina (IONA) randomised trial. *Lancet* 2002; 359:1269-1275.

7 - Gross GJ. The cardioprotective effects of nicorandil. *Rev Contemp Pharmacother* 1993; 4: 199-206.

8 - Saito S, Mizumura T, Takayama T, et al. Antiischemic effects of nicorandil during coronary angioplasty in humans. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995; 9: 257-263.

9 - Belisle E, Kowaltowski AJ. Opening of mitochondrial K<sup>+</sup> channels increases ischemic ATP levels by preventing hydrolysis. *J Bioenerg Biomemb* 2002; 34: 285-298.

10 - Estabrook RW. Mitochondrial Respiratory Control and the Polarographic Measurement of ADP:O Ratios. *Methods of Enzymol* 1967; 10: 41-47.

## XII JORNADAS DE CARDIOLOGIA DE BRAGA

## XIII JORNADAS DE CARDIOLOGIA DO MINHO

14-15 de Junho

Auditório do  
Hospital de São Marcos, Braga

Informações Adicionais:  
Serviço de Cardiologia, Hospital de São Marcos,  
Apartado 2242, 4701-965 Braga  
Tel.253 209 155