

# Ischémie–reperfusion myocardique — Aspects physiopathologiques

## Myocardial ischaemia and reperfusion — pathophysiological aspects

D. Coquerel · F. Tamion

© SRLF et Springer-Verlag France 2011

### Introduction

L'ischémie est classiquement définie par une réduction ou par l'interruption du débit sanguin dans un territoire vasculaire donné, responsable de l'inadéquation entre les apports en oxygène et les besoins de la cellule pour son fonctionnement et sa survie. Elle peut être secondaire à une interruption complète du flux sanguin comme dans l'infarctus du myocarde, l'arrêt cardiaque ou la transplantation d'organe. Elle peut aussi être liée à une diminution de la perfusion tissulaire en dessous d'un seuil critique, comme cela s'observe dans de nombreuses circonstances d'insuffisances circulatoires aiguës (choc septique, hémorragique ou cardiogénique, par exemple). Si la reperfusion reste le seul moyen logique de « sauver » les territoires ischémiques, il est également admis aussi qu'elle engendre par elle-même d'autres lésions cellulaires, voire plus sévères, définissant « le paradoxe de la reperfusion ». Dans l'exemple de l'ischémie myocardique, une partie des cardiomyocytes est irréversiblement lésée par l'ischémie. Classiquement, seule la reperfusion peut limiter et stabiliser la zone de l'infarctissement. Pourtant, on sait aujourd'hui que la reperfusion est à l'origine d'une extension des lésions cellulaires qui pourrait compter jusqu'à 50 % de la taille finale de l'infarctus. La preuve de ces lésions de reperfusion a pu être apportée récemment en mettant en évidence que des interventions qui n'ont lieu qu'au moment de la désocclusion coronaire sont capables de réduire considérablement la taille de l'infarctus. Qualitativement, la nécrose est le mécanisme majoritaire de mort des cardiomyocytes au cours de l'ischémie, conséquence directe d'une privation en oxygène. Néan-

moins, un pourcentage non négligeable de cardiomyocytes disparaît secondairement à des phénomènes d'apoptose.

Depuis la description initiale de ce phénomène par Jennings et al., il y a plus 50 ans, notre compréhension des mécanismes de reperfusion a considérablement augmenté. Sa pathogénie reflète la mise en place de nombreux processus biochimiques et cellulaires comme les espèces réactives de l'oxygène, les canaux ioniques, la dysfonction mitochondriale et l'inflammation (Tableau 1) [1].

Ce sont ces processus biochimiques et cellulaires qui seront abordés dans cette revue.

### Acteurs physiopathologiques

#### Espèces radicalaires de l'oxygène (ERO)

Les ERO sont produits à la fois par les cellules endothéliales et l'ensemble des cellules circulantes. Les cardiomyocytes sont également impliqués dans leur production [2]. Les ERO et les espèces radicalaires de l'azote (ERN) les plus souvent impliquées en pathologie humaine sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ), l'oxyde nitrique ( $\cdot NO$ ) et le peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ). Ces ERO sont générées au cours du métabolisme normal de l'oxygène et ne sont en rien synonyme d'une situation pathologique.

Au cours du syndrome de reperfusion, la production de ces ERO devient massive et pathogène pour l'organisme. Les ERO sont formées :

- pendant la phase d'ischémie : la génération d'ERO et d'ERN durant la période ischémique est faible, mais a été observée sur des cardiomyocytes en culture et sur le cœur isolé [3] ;
- pendant la phase de reperfusion : il ne fait plus aucun doute qu'une production d'ERO anormalement élevée se produit durant cette phase. Ce sont surtout des ERN (dont le  $\cdot NO$ ) qui sont produits à cette phase [4].

Rapidement, il se crée un déséquilibre entre la production des ERO et la défense endogène antioxydante de

D. Coquerel · F. Tamion (✉)  
Inserm U644, institut hospitalo-universitaire  
de recherche biomédicale, IFRMP23, université de Rouen,  
22, boulevard Gambetta, F-76183 Rouen, France  
e-mail : fabienne.tamion@chu-rouen.fr

F. Tamion  
Service de réanimation médicale,  
CHU Charles-Nicolle, 1, rue de Germont,  
F-76031 Rouen, France

<b>Tableau 1</b> Principaux mécanismes physiopathologiques de l'ischémie-reperfusion
Production excessive d'ERO Altération du métabolisme du NO Effets délétères du NO produit Production accrue de peroxy-nitrite Modifications ioniques Concentration intracellulaire de Ca augmentée Concentration intracellulaire de Na augmenté Altération du pH intracellulaire Dysfonction mitochondriale avec altération du pore mitochondriale : mPTP Apoptose Dysfonction endothéliale Expression de nombreuses molécules d'adhésion Agrégation plaquettaire Activation du processus inflammatoire Activation du complément Expression des <i>toll-like receptor</i> Accumulation de neutrophiles
mPTP : <i>mitochondrial permeability transition pore</i> .

l'organisme, définissant le stress oxydatif [5]. Les ERO, produites en grandes quantités sans aucun rétrocontrôle, deviennent de véritables agents toxiques menant à des lésions irréversibles lipidiques, protéiques et de l'ADN. Au niveau myocardique, les ERO sont produits par la chaîne respiratoire des mitochondries, l'activation des NO synthases (NOS), NADPH oxydase, xanthine oxydase et le système des cytochromes [6]. Enfin, l'oxydation de certaines substances, comme les catécholamines, peut être impliquée dans cette formation. Les ERO vont intervenir dans la modulation de nombreux systèmes intracellulaires en activant certains canaux calciques et les systèmes kinases (MAPK). Ainsi, la peroxydation lipidique induit à la fois des lésions des membranes cellulaires, dont la membrane mitochondriale, et l'activation indirecte de l'inflammation en recrutant les leucocytes et en stimulant la production de cytokines. Cet excès d'ERO génère au final des effets délétères pour le fonctionnement myocytaire [4,7,8]

Les travaux de l'équipe de Paradies et al. [9] ont impliqué les ERO dans la survenue de phénomènes d'apoptose au cours de la reperfusion. Ils ont démontré que le *primum novens* de l'apoptose intrinsèque commence dans les mitochondries avec la libération du cytochrome c dans le cytosol, grâce à l'ouverture du *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP). Cette sortie du cytochrome c nécessite la séparation entre la protéine hémique et une cardiolipine mitochondriale qui s'effectue par la peroxydation des acides gras non saturés, dont le processus est initié par les ROS [10].

Ainsi, l'ensemble de la littérature montre le rôle clé des ERO dans les processus biochimiques et cellulaires de la reperfusion.

### **Monoxyde d'azote : NO**

Le NO est impliqué dans plusieurs aspects de la physiologie et de la physiopathologie du myocarde [11]. Le rôle du NO dépend de facteurs aussi divers que la quantité de NO libérée, le type cellulaire, le type de donneur de NO, les conditions redox de l'environnement, la présence d'une stimulation  $\beta$  et/ou muscarinique.

Le NO possède des effets inotropes positifs et négatifs dose-dépendants. Le NO est impliqué dans la régulation de la contractilité du myocarde, qui est renforcée par de faibles concentrations et déprimée par des concentrations élevées [12]. Une augmentation de l'expression de la NOSi est observée dans l'insuffisance cardiaque ischémique, où le NO produit atténue la réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique accrue. Au cours de la reperfusion, la surexpression de la NOSi et la production accrue de NO génèrent des quantités massives de peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) liées au stress oxydatif [13]. Dans les conditions physiologiques, la production de peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) est faible et le potentiel de dommages oxydatifs contrôlé par les défenses anti-oxydantes endogènes [14]. À l'inverse lors de la reperfusion, la production de peroxy-nitrite devient massive et incontrôlée, menant aux dommages cellulaires. Les mécanismes de ces altérations sont très nombreux et comprennent l'oxydation directe ainsi que des réactions de nitration radicalaire. Le peroxy-nitrite peut altérer la fonction cellulaire en dégradant la structure des membranes cellulaires par la peroxydation des lipides. Il peut de manière irréversible altérer les fonctions mitochondriales et endommager les acides nucléiques [15].

Enfin, le rôle du stress oxydatif a été démontré sur l'activité des NOS. Les différentes isoformes de NOS agissent en convertissant la L-arginine en L-citrulline et NO et nécessitent pour cela la présence de substrats, NADPH et oxygène, ainsi que la présence de leur cofacteur : la tétrahydrobioptérine (BH4). Lors du stress oxydatif, il a été démontré une altération de ce cofacteur BH4. Dans ces conditions, la NOSe induit la formation non plus de NO mais de peroxy-nitrite, créant un véritable cercle vicieux dans la production d'ERO [16].

Ainsi, le NO et les différents isoformes de la NOS sont des éléments clés dans le syndrome de reperfusion.

### **Changements ioniques**

Le déséquilibre de la balance ionique est une cause majeure du syndrome de reperfusion. Pendant l'ischémie, la production par phosphorylation oxydative de composés riches en

énergie, principalement l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) et la phosphocréatine, devient insuffisante pour assurer le métabolisme et la survie des cellules. Or, les myocytes consomment de grandes quantités d'énergie ATP pour leur fonctionnement. La glycolyse anaérobie devient alors la principale source de production d'ATP de la cellule. Elle est peu rentable sur le plan énergétique, et la conversion du pyruvate en lactate entraîne une surcharge intracellulaire en protons générant une acidose intracellulaire. Celle-ci active des pompes ioniques comme l'échangeur  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ , afin de restaurer le pH intracellulaire. L'entrée de sodium active à son tour d'autres pompes comme l'échangeur  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ , aboutissant à une surcharge calcique intracellulaire au niveau du réticulum sarcoplasmique. Lorsque l'ischémie se prolonge, l'acidose intracellulaire inactive finalement la glycolyse anaérobie et entraîne l'arrêt des pompes dépendantes de l'ATP. L'accumulation des produits terminaux des différentes voies métaboliques (lactate, protons, acides gras libres...) et les troubles ioniques non compensés entraînent une perte de la polarité membranaire, un gonflement cellulaire et une désorganisation du cytosquelette. Des lésions cellulaires irréversibles, essentiellement par nécrose, peuvent alors apparaître.

### Surcharge calcique

- Changements ioniques calciques dans le cytosol

La reperfusion réintroduit brutalement de l'oxygène en grande quantité dans les cellules qui en étaient privées [17]. La chaîne respiratoire mitochondriale, fonctionnellement endommagée par l'ischémie, ne peut pas utiliser correctement cet excès d'oxygène. Au lieu de synthétiser de l'ATP, la mitochondrie produit des ERO. De plus, l'hypoxanthine, produit de la dégradation de l'ATP, induit également à la reperfusion une surproduction d'ERO. Ceux-ci diminuent en outre l'activité des protéines de la pompe SERCA 2, ATPase dépendante. La pompe SERCA contrôle la recapture du calcium cytosolique et le contenu calcique du réticulum sarcoplasmique et par conséquent le taux de calcium disponible pour la fonction contractile myocytaire [18]. L'excès de calcium provoque l'activation de nombreuses enzymes (protéases, lipases, NOS, déshydrogénases) qui conduisent directement ou indirectement à une production accrue de ROS.

- Changements ioniques calciques dans les mitochondries

La captation du calcium cytosolique par les mitochondries se fait par l'intermédiaire du canal calcique : l'uniprot calcique. Il est situé sur la membrane interne de la mitochondrie et joue un rôle important au cours de la reperfusion dans la concentration calcique intracellulaire. Si au cours de l'ischémie, cette concentration calcique augmente de 50 %, elle augmente quatre à cinq fois plus lors de la reperfusion.

Ce taux calcique mitochondrial est maintenu au-delà de la correction de la concentration cytoplasmique. Cette perturbation de la distribution calcique est un élément majeur des dommages cellulaires. L'association d'une élévation calcique avec un excès d'ERO va être un élément clé dans l'atteinte mitochondriale par l'ouverture du pore mitochondriale : mPTP [19]. Selon Kim et al., c'est la formation des ERO qui provoquerait l'ouverture du mPTP, enclenchant les processus apoptotiques, et qui serait alors suivie des troubles calciques [20]. La surcharge calcique induit une hypercontractilité des myofibrilles (IFM), une déplétion en ATP et l'aspect de *stunning* myocardique.

- Cas particuliers des mitochondries myocardiques

Ces organelles se groupent en deux populations [21] :

- les mitochondries du subsarcolemme (SSM) qui ont une faible capacité d'accumulation du calcium. Elles pâtiennent plus rapidement de l'ischémie ;
- celles localisées entre les IFM qui peuvent stocker de fortes quantités de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Surcharge potassique

Les pompes potassiques mitochondriales sont dépendantes de l'ATP. En son absence, les canaux potassiques s'ouvrent, avec afflux de potassium et alcalinisation massive. Cet effet potentiellement protecteur est impliqué dans les mécanismes protecteurs du préconditionnement.

- Rôle des canaux mitoK<sup>+</sup>ATP

Les canaux mitoK<sup>+</sup>ATP traversent la membrane mitochondriale interne. Ils permettent la sortie du potassium, et leur ouverture est reconnue unanimement comme favorable à la récupération. L'inhibition de la sortie de K<sup>+</sup> par des inhibiteurs des canaux K<sup>+</sup>ATP bloque la protection fournie par le préconditionnement : la glibenclamide et l'acide 5-hydroxydécanoïque en suppriment ainsi les effets bénéfiques [22], tandis que le diazoxyde, qui promeut l'ouverture des canaux potassiques, induit un préconditionnement. Des canaux semblables, obéissant aux mêmes agents pharmacodynamiques, traversent la membrane cellulaire et permettent la sortie du potassium cytosolique. Il a été montré que la bradykinine par une chaîne de réaction biochimique entraîne l'ouverture de ces canaux et ainsi prévient les lésions cardiaques de l'ischémie-reperfusion [23,24].

Ces canaux apparaissent de plus en plus comme des cibles importantes pour lutter contre la nécrose myocardique, et divers médicaments ont été proposés pour les ouvrir, tel le nicorandil, un médicament à double action ouvrant le canal mitoK<sup>+</sup>ATP et exerçant un effet vasodilatateur (donneur de •NO) [25].

- Rôle des canaux mitoK<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>

Ces canaux abaissent également la concentration intramitochondriale en potassium, et leur activation permet d'obtenir un préconditionnement pharmacologique [26]. On dispose d'un inhibiteur de ce canal, la paxilline.

### Surcharge sodique

Lors de l'ischémie, les taux de Na intracellulaire sont majorés par la modification du pH intracellulaire. Ils augmentent de plus de 150 % lors de la reperfusion. Cette situation induit des dommages myocytaires par l'activation des pompes échangeurs calciques [27].

### Rôle de la mitochondrie

L'énergie nécessaire au bon fonctionnement cellulaire est fournie par la mitochondrie, par oxydation des nutriments, et stockée sous la forme d'une liaison anhydride lors de la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP. Les cardiomyocytes consomment de très grandes quantités de cette énergie. Pour répondre à cette demande, ces cellules possèdent une très haute densité de mitochondries. L'ensemble de ces réactions est assimilé à une « respiration mitochondriale » qui consomme plus de 90 % de l'oxygène respiré. On parle également de phosphorylation oxydative pour qualifier les différentes étapes de ce processus hautement orchestré. L'oxydation des nutriments cellulaires (principalement les hydrates de carbone et les acides gras) fournit, par l'intermédiaire du cycle de Krebs, des coenzymes réduits (NADH et à un moindre degré FADH<sub>2</sub>), donneurs d'électrons de haute énergie. Ce flux d'électrons est pris en charge par différentes réactions d'oxydoréduction assurées par les quatre complexes (I à IV) de la chaîne respiratoire mitochondriale jusqu'à la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Les complexes respiratoires utilisent l'énergie générée par ce transfert d'électrons pour une translocation active de protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire. Cette expulsion de protons va avoir comme conséquence la création d'un gradient de concentration de protons (ou gradient de pH) et d'un potentiel de membrane mitochondrial (appelé  $\Delta\Psi_m$ ) à travers la membrane interne [28]. Les protons expulsés de la matrice vont, du fait d'un gradient électrochimique favorable, retourner dans la matrice en empruntant le « canal » d'une protéine particulière appelée F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATP synthase. Le flux de protons à travers ce canal active l'ATP synthase (cinquième complexe de la chaîne respiratoire) qui transforme alors de l'ADP en ATP, assurant ainsi le couplage entre les réactions d'oxydoréduction et la production d'ATP [29]. Le maintien de ce gradient électrochimique, encore appelé force protomotrice, est un élément indispensable au rôle énergétique de la mitochondrie. Mais au-delà, il conditionne l'homéostasie cellulaire tout entière en influen-

çant la composition chimique de la matrice mitochondriale (et du cytosol), en régulant la production de ROS et en participant à la régulation de la mort cellulaire par l'intermédiaire de son action sur la transition de perméabilité mitochondriale [30]. Cette transition de perméabilité caractérise la perte de l'imperméabilité constitutionnelle de la membrane mitochondriale interne, réalisant ainsi une communication libre entre la matrice et le cytosol. Elle provoque un gonflement caractéristique de la matrice (*swelling*) et un effondrement du  $\Delta\Psi_m$ . Elle s'accompagne non seulement d'un arrêt de la synthèse d'ATP, mais aussi de son hydrolyse. Dans ces conditions particulières, l'ATP synthase mitochondriale fonctionne en sens inverse et dégrade l'ATP au lieu de la produire. En plus des conséquences très néfastes de ce découplage de la chaîne respiratoire, le gonflement matriciel conduit à une rupture de la membrane externe, plus fragile, à l'origine de la libération de petites molécules protéiques, telles que l'*apoptosis-inducing factor* (AIF) et le cytochrome c [19]. Ce dernier, partenaire de la chaîne respiratoire en temps normal, est également doué de propriétés proapoptotiques en activant, une fois libéré dans le cytosol, les caspases chargées d'exécuter la voie finale de la mort cellulaire programmée.

Ce phénomène de perméabilisation de la membrane interne est le résultat de l'ouverture d'un « mégacanal » non sélectif, appelé pore de transition de perméabilité (*mitochondrial permeability transition pore* [mPTP]) [31]. Son ouverture est facilitée par la surcharge calcique, le stress oxydant, la déplétion en nucléotides adényliques et la correction d'une acidose, autant d'éléments contemporains de la reperfusion qui font admettre l'hypothèse d'une ouverture préférentielle du mPTP lors de la recirculation [32]. La nature moléculaire du mPTP est à ce jour encore mal connue, mais on pense qu'il s'agit d'un assemblage multiprotéique dont le seul constituant certain est une protéine de la matrice mitochondriale appelée cyclophiline D. D'autres protéines sont probablement impliquées telles que le transporteur des nucléotides adényliques (ANT), la porine (*voltage-dependent anion channel*), le complexe I de la chaîne respiratoire, la créatine-kinase, l'hexokinase, le récepteur des benzodiazépines, ainsi que des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 [33]. Chez les souris transgéniques déficientes en cyclophiline D (Cyp D<sup>-/-</sup>), dont le phénotype est normal, la transition de perméabilité est inhibée en présence d'une surcharge calcique ou d'un stress radicalaire, ce qui les rend résistantes à l'I/R. Il est intéressant de noter que la transition de perméabilité est également inhibée pharmacologiquement par la ciclosporine A (CsA) via sa fixation à la cyclophiline D, indépendamment de ses propriétés immunosuppressives, en lien avec une fixation sur la CsA cytosolique [34].

La CsA, en se fixant sur la CypD, empêche l'ouverture du mPTP et ses conséquences néfastes : gonflement de la mitochondrie par entrée d'eau, inhibition de la chaîne

respiratoire, libération dans le cytosol de  $\text{Ca}^{2+}$  et de facteurs proapoptotiques dont le cytochrome c [35].

Considérant l'implication des mitochondries dans de nombreux processus, dont la production d'ATP, il n'est pas surprenant que ces organites soient intimement liés au syndrome de reperfusion.

### Phénomènes inflammatoires

Certains travaux ont montré l'importance du phénomène inflammatoire durant la reperfusion : activation du complément provoquant la cytotoxicité des leucocytes neutrophiles. Rappelons que ces cellules de défense agissent non seulement en déversant des protéases, mais aussi des ERO, et que la myéloperoxydase, abondante dans les neutrophiles, est une source d'ERO particulièrement agressives. Des lapins déficients génétiquement en protéines du complément montrent une nette réduction de la taille de l'infarctus consécutif à des manœuvres d'ischémie–reperfusion [36].

L'ischémie–reperfusion provoque l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales, augmentant le phénomène de *no-reflow*. Cette tendance à l'adhésion est potentialisée par le TNF $\alpha$  en provenance des lymphocytes T [37], durant les syndromes inflammatoires. La conséquence est une dysfonction endothéliale avec hyperperméabilité et recrutement de cellules inflammatoires. L'importance des leucocytes neutrophiles dans la taille de l'infarctus fut d'abord démontrée histologiquement, la gravité de l'infarctus étant proportionnelle à l'accumulation de ces cellules inflammatoires [38] ; comme on peut s'y attendre, la neutropénie et l'inhibition de l'adhésion des neutrophiles jouent également un rôle favorable [39]. Enfin, d'autres composants du processus inflammatoire comme les *toll-like receptors* (TLR) participent à la pathogénie de l'ischémie–reperfusion.

### Hypothèse mitochondriale et syndrome de répercussion

En 2004, Petrosillo et al. ont suggéré le mécanisme suivant pour décrire la cascade de phénomènes menant à l'apoptose cellulaire au cours de l'ischémie–reperfusion. De nombreux travaux vinrent confirmer l'importance de la dysfonction mitochondriale [40,41].

#### Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire

Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire aboutissant à une chute de production d'ATP, avec majoration de la production d'ERO.

On constate d'abord une altération du fonctionnement du complexe I (CoI) dans les 10 à 20 premières minutes de l'ischémie, avec atteinte des cardiolipines [41] ; puis la

production d'ATP s'effondre [42,43]. Le dysfonctionnement de CoI entraîne, par diminution du nombre d'électrons transportés, une hausse temporaire des ERO. Le CoIII est lésé par atteinte des protéines à Fe-S ; dans les mitochondries de cœur de rat, l'ischémie–reperfusion provoque une nette diminution de l'activité du CoIII, tandis qu'une chute en cardiolipine est constatée, provoquée par lipopéroxydation [44].

#### Modifications ioniques

Ils sont dus à des dysfonctionnements des canaux transporteurs d'ions, tant dans la membrane cellulaire extérieure que dans les membranes des mitochondries, avec une surcharge calcique.

#### Ouverture du mPTP

L'ouverture du mPTP [45–48] avec libération du cytochrome c dans le cytosol et stimulation des processus apoptotiques représente le phénomène majeur physiopathologique de l'ischémie–reperfusion [49]. On a découvert qu'un des agents enzymatiques impliqués dans cette ouverture, durant l'ischémie–reperfusion cardiaque, était l'aldose réductase [49].

### Conclusion

Depuis sa description initiale, la compréhension de la pathogénie de l'ischémie–reperfusion a fait de considérables progrès permettant de mieux comprendre les enjeux pathologiques et le développement de nouvelles orientations thérapeutiques. Les conséquences de l'ischémie–reperfusion reflètent la mise en jeu de nombreux processus biochimiques et cellulaires : l'accumulation calcique, la production d'ERO, le métabolisme du NO, la dysfonction mitochondriale et le processus inflammatoire. Dans l'ensemble de ces processus, l'altération de la fonction et de la biogénèse mitochondriale a sans aucun doute un rôle majeur. La meilleure compréhension de ces mécanismes a permis la mise en place de nouveaux axes de réflexion thérapeutiques pour une pathologie qui reste aujourd'hui un des véritables problèmes de santé publique à travers le monde.

**Conflit d'intérêt** : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

### Références

1. Turer AT, Hill JA (2010) Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol* 106:360–8

2. Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, et al (2009) Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 15: RA209–RA19
3. Kevin LG, Novalija E, Riess ML, et al (2003) Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth Analg* 96:949–55
4. Donzelli S, Espey MG, Thomas DD, et al (2006) Discriminating formation of HNO from other reactive nitrogen oxide species. *Free Radic Biol Med* 40:1056–66
5. Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95
6. Kevin LG, Novalija E, Stowe DF (2005) Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg* 101:1275–87
7. Zweier JL, Talukder MA (2006) The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 70:181–90
8. Hare JM, Stamler JS (2005) NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest* 115: 509–17
9. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2000) The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett* 466:323–6
10. Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G (2003) Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J* 17:2202–8
11. Casadei B, Sears CE (2003) Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses. *Prog Biophys Mol Biol* 82:67–80
12. Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, et al (2007) Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci* 81:779–93
13. Schulz R, Kelm M, Heusch G (2004) Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 61:402–13
14. Saraiva RM, Hare JM (2006) Nitric oxide signaling in the cardiovascular system: implications for heart failure. *Curr Opin Cardiol* 21:221–8
15. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315–424
16. Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, et al (2007) Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15081–6
17. Murphy E, Steenbergen C (2008) Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 88:581–609
18. Tong X, Evangelista A, Cohen RA (2010) Targeting the redox regulation of SERCA in vascular physiology and disease. *Curr Opin Pharmacol* 10:133–8
19. Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B (2010) Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* 396:95–100
20. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ (2006) Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H2024–34
21. Chen Q, Camara AK, Stowe DF, et al (2007) Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C137–C47
22. O'Rourke B (2004) Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 94:420–32
23. Oldenburg O, Qin Q, Krieg T, et al (2004) Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H468–H76
24. Quinlan CL, Costa AD, Costa CL, et al (2008) Conditioning the heart induces formation of signalosomes that interact with mitochondria to open mitoKATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H953–H61
25. Miura T, Miki T (2003) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers: old drugs with new clinical benefits for the heart. *Curr Vasc Pharmacol* 1:251–8
26. Xu W, Liu Y, Wang S, et al (2002) Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 298:1029–33
27. Nakamura TY, Iwata Y, Arai Y, et al (2008) Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 is sufficient to generate Ca<sup>2+</sup> signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 103:891–9
28. Halestrap AP (2009) Mitochondrial calcium in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1787:1289–90
29. Velours J, Dautant A, Salin B, et al (2009) Mitochondrial F1F0-ATP synthase and organellar internal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1783–9
30. Morin D, Assaly R, Paradis S, Berdeaux A (2009) Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection. *Curr Med Chem* 16:4382–98
31. Keith RJ, Bhatnagar A (2010) Cardioprotection and the mitochondrial permeability transition. *Minerva Cardioangiol* 58(2):241–51
32. Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ (2003) Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 3:527–35
33. Peng TI, Jou MJ (2010) Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci* 1201:183–8
34. Gomez L, Li B, Mewton N, et al (2009) Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients. *Cardiovasc Res* 83:226–33
35. Piot C, Croisille P, Staat P, et al (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 359:473–81
36. Yasojima K, Kilgore KS, Washington RA (1998) Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion. *Circ Res* 82:1224–30
37. Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, et al (2000) Postanoxic T lymphocyte-endothelial cell interactions induce tumor necrosis factor-alpha production and neutrophil adhesion: role of very late antigen-4/vascular cell adhesion molecule-1. *Circ Res* 86:1237–44
38. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, et al (1983) Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 67:1016–23
39. Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, et al (1988) Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. *Circ Res* 63:1070–9
40. Di Lisa F, Bernardi P (2006) Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res* 70:191–9
41. Petrosillo G, Di Venosa N, Pistolese M, et al (2006) Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia-reperfusion: role of cardiolipin. *FASEB J* 20:269–76
42. Lesnefsky EJ, Chen Q, Moghaddas S, et al (2004) Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria. *J Biol Chem* 279:47961–7
43. Lesnefsky EJ, Chen Q, Slabe TJ, et al (2004) Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H258–H67

44. Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, Paradies G (2003) Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J* 17:714–6
45. Di Lisa F, Canton M, Menabo R, et al (2003) Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition. *Basic Res Cardiol* 98:235–41
46. Hausenloy DJ, Yellon DM (2003) The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 35:339–41
47. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion: a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61:372–85
48. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P (2003) Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* 93:292–301
49. Ananthakrishnan R, Kaneko M, Hwang YC, et al (2009) Aldose reductase mediates myocardial ischemia-reperfusion injury in part by opening mitochondrial permeability transition pore. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H333–41