

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie**



**Josefína Selingerová**

**Reaktivní formy kyslíku a jejich úloha při poškození myokardu**

**Reactive oxygen species and their role in myocard injury**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Školitel: Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.**

**Praha, 2015**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, srpen 2015

Podpis

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Martinovi Kalousovi, CSc. za pomoc, čas a trpělivost při psaní této práce.

Zároveň bych chtěla poděkovat Davidovi Rittsteinovi, Johaně Paloušové a Matyášovi Rejtharovi, kteří mi pomohli v těch nejtěžších chvílích.

Ludmile Selingerové bych ráda poděkovala za stylistické a jazykové úpravy.

## **Abstrakt**

Srdeční tkáň je velmi citlivá k nedostatku kyslíku. Ischemie a následující reperfuze jsou zdrojem metabolických a strukturních změn, vedoucích k nezvratnému poškození tkáně a buněčné smrti. Za těchto podmínek je klíčová zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). ROS jsou vysoce reaktivní molekuly, obsahující nejméně jeden nepárový elektron. V organismu vznikají jako přirozené meziprodukty aerobního metabolismu. Za fyziologických podmínek k ochraně proti ROS přispívají mitochondrie v díky svým antioxidačním systémům a inhibitoru ATP syntázy. Za patologických podmínek jsou oproti tomu jedním z největších zdrojů ROS a jsou zodpovědné za buněčnou smrt. Tato práce pojednává o změnách v buňkách při ischemii a následné reperfuzi. O tom jakým způsobem je ovlivněna iontová homeostaze a koncentrace ATP, ale především proč dochází ke snížení aktivity jednotlivých komplexů elektron-transportního řetězce.

Klíčová slova:

Ischemie, reperfuze, reaktivní formy kyslíku, mitochondrie, elektron-transportní řetězec

## **Abstract**

Cardiac tissue is very sensitive to oxygen deprivation. Ischemia and subsequent reperfusion are the source of metabolic and structural changes. They lead to irreversible tissue damage and cell death. Under this conditions the increased production of reactive oxygen species (ROS) is crucial. ROS are highly reactive molecules, which contains at least one unpaired electron. They are formed in organism as a natural by-products of aerobic metabolism. Under physiological conditions mitochondria protect cells against ROS through antioxidants sweeper systems and ATP synthase inhibitor. However, under pathological conditions mitochondria are one of the largest sources of ROS and they are responsible for initiation of cell death. This thesis discusses the changes in cells during the ischemia and following reperfusion. How is ion homeostasis and ATP concentration affected and why the activities of individual complexes of electron-transport chain are decreased.

Key words:

Ischemia, reperfusion, reactive oxygen species, mitochondria, electron-transport chain

## Seznam použitých zkratek

ADP - adenosin-5'-difosfát

AIF - apoptózu indukující faktor

AMP - adenosin-5'-monofosfát

ANT - adenin nukleotid translokáza

AP1 - aktivační protein 1

ATP - adenosin-5'-trifosfát

CoQ - koenzym Q

CP - kreatin fosfát

Cu/Zn SOD - měď - zinková superoxid dismutáza

CyPD - cyclophilin D

Cyt c - cytochrom c

DHA - kyselina dehydroaskorbová

DNA - deoxyribonukleová kyselina

Endo G - endonukleáza G

ETC - elektron-transportní řetězec

FAD - flavinadenindinukleotid

FMN - flavinmononukleotid

GLUT - glukózový transportér

GPx - glutation peroxidáza

GSH - glutation

GSSG - oxidovaný glutation

GTP - guanosintrifosfát

HS-CoA- koenzym A

I/R - ischemie a reperfuze

IF<sub>1</sub> - inhibitor faktor 1

IMS - intermembránový prostor

IκB - inhibitor NF-κB

MeSOX - metionin sulfoxid reduktáza

mGPDH - mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza

Mn SOD - manganová superoxid dismutáza

MPT - změna propustnosti mitochondriální membrány

MPTP - mitochondriální pór přechodné propustnosti  
mtRNA - mitochondriální RNA  
NAD(P)H - redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát  
NAD<sup>+</sup> - nikotinamidadeninukleotid  
NADH - redukovaný nikotinamidadeninukleotid  
NF-κB - transkripční faktor (nuclear factor kappa B)  
OSCP - oligomycin senzitivní protein  
OXFOS - mitochondriální oxidativní fosforylace  
ROS - reaktivní formy kyslíku  
SCS - sukcinyl CoA syntetáza  
Se-SG- adukt selen sulfidu s glutationem  
SOD - superoxid dismutáza  
SVCT - sodíkově závislé transportéry vitamínu C (sodium-dependent vitamin C transporters)  
TGF-β1 - růstový transformační faktor beta 1 (transforming growth factor beta 1)  
Txn - thioredoxin  
Txnrd - thioredoxin reduktáza  
VDAC - napětově řízený aniontový kanál  
α-KGDH - α-ketoglutarát dehydrogenáza

## Obsah

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | ÚVOD .....  | 9  |
| 2.     | REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU .....   | 10 |
| 2.1.   | VZNIK REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU .....   | 10 |
| 2.2.   | ZDROJE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU .....  | 11 |
| 2.2.1. | DÝCHACÍ ŘETĚZEC .....   | 11 |
| 2.3.   | VLIV REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU NA BUNĚČNÉ PROCESY ...                               | 14 |
| 2.3.1. | POZITIVNÍ ÚČINKY .....  | 14 |
| 2.3.2. | NEGATIVNÍ ÚČINKY .....  | 15 |
| 2.4.   | OXIDATIVNÍ STRES A ONEMOCNĚNÍ .....   | 16 |
| 2.5.   | OCHRANA PROTI ROS A ANTIOXIDANTY .....  | 16 |
| 2.5.1. | NEENZYMATICKÉ ANTIOXIDANTY .....  | 17 |
| 2.5.2. | ENZYMATICKÉ ANTIOXIDANTY .....  | 17 |
| 3.     | SRDCE A JEHO ENERGETICKÝ METABOLISMUS .....   | 19 |
| 3.1.   | ZDROJ ENERGIE .....   | 19 |
| 3.2.   | ÚLOHA REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU V SRDCI .....                                       | 21 |
| 4.     | ISCHEMIE A REPERFUZE .....  | 21 |
| 4.1.   | TVORBA REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU PŘI ISCHEMII A<br>REPERFUZI V MITOCHONDRIÍCH ..... | 22 |
| 4.2.   | DŮSLEDKY ISCHEMIE A REPERFUZE .....   | 23 |
| 4.2.1. | ZMĚNA KONCENTRACÍ IONTŮ .....   | 23 |
| 4.2.2. | VLIV ISCHEMIE A REPERFUZE NA KONCENTRACI ATP .....                                  | 24 |
| 4.3.   | ISCHEMIE, REPERFUZE A MITOCHONDRIE .....  | 25 |
| 4.3.1. | KOMPLEX I .....   | 25 |
| 4.3.2. | KOMPLEX II a III .....  | 25 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 4.3.3. | KOMPLEX IV .....                                 | 25 |
| 4.3.4. | ATP SYNTÁZA .....                                | 26 |
| 4.3.5. | MITOCHONDRIÁLNÍ PÓR PŘECHODNÉ PROPUSTNOSTI ..... | 27 |
| 5.     | ZÁVĚR.....                                       | 28 |
| 6.     | POUŽITÁ LITERATURA.....                          | 29 |

## 1. ÚVOD

Reaktivní formy kyslíku jsou předmětem zkoumání už dlouhá léta. Jako první je v roce 1900 popsal Moses Gomberg (**Gomberg 1900**). Dlouhou dobu se předpokládalo, že mají pouze negativní účinky a jsou zdrojem řady nemocí a příčinou stárnutí organismu. Později byl objeven první protektivní enzym, který úplně změnil pohled na ROS a ukázalo se, že jsou nezbytnou součástí organismu. Reaktivní formy kyslíku jsou produkovány nejrůznějšími zdroji, z nichž jeden z nejdůležitějších je mitochondriální elektron-transportní řetězec.

ROS reagují téměř se všemi biomakromolekulami, čímž poškozují DNA, lipidy i proteiny. Se zmíněnými negativními vlivy se tělo vypořádává pomocí antioxidačních systémů. Mezi nejdůležitější patří superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza, glutathion a thioredoxin.

Reaktivní formy kyslíku hrají důležitou roli v řadě srdečních patofyziologií. Jejich tvorba je spojena s aterosklerózou a kardiomyopatií, ale i s infarktem.

Také v průběhu ischemie a reperfuze je produkováno velké množství reaktivních forem kyslíku, což má za následek poškození jednotlivých komplexů elektron-transportního řetězce mitochondrií a může vést i k buněčné smrti.

## 2. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU

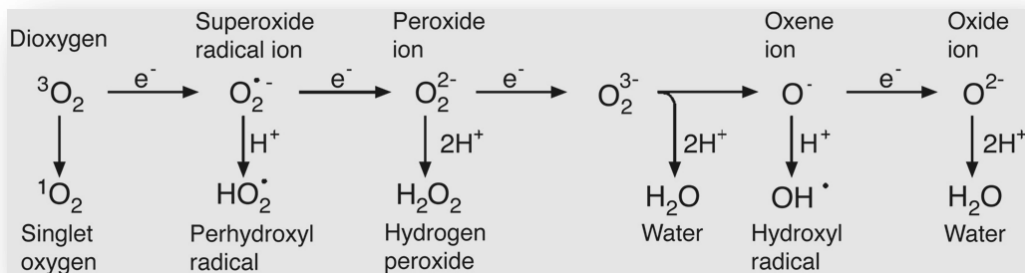
Volné radikály byly v živých organismech objeveny roku 1950 (**Lushchak 2014 podle Barry Commoner, Jonathan Townsed and George E. Pake 1954**). V té době se předpokládalo, že mají pouze negativní vliv a jsou příčinou nejrůznějších onemocnění, mutací, stárnutí a rakoviny. V roce 1969 Joe M. Cord a Irwin Fridovich objevili a popsali první protektivní enzym superoxid dismutázu (**McCord and Fridovich 1969**), který se přirozeně nachází v buňkách a chrání před negativními vlivy ROS. Po roce 1970 byly objeveny skutečnosti, které pohled na reaktivní formy kyslíku změnil. Postupem času byly nalezeny důkazy o jejich příznivých účincích jako je například spolupráce s imunitním systémem či účast v řadě signálních drah (**Lushchak 2014**).

### 2.1. VZNIK REAKTIVNÍCH FORM KYSLÍKU

Reaktivní formy kyslíku jsou chemické látky na bázi kyslíku, které mají minimálně jeden nepárový elektron. Celkově pojem ROS zahrnuje jak volné radikály, superoxidový anion a hydroxylový radikál, tak i další různé molekuly, jako je např. peroxid vodíku (**Karihtala and Soini 2007**).

Molekulární kyslík je biradikál. Obsahuje dva nepárové elektrony se shodným spinem a tím je relativně málo reaktivní. Redukcí jednoho elektronu dochází k tvorbě superoxidového radikálu, který je poměrně stabilní a slouží jako prekurzor pro ostatní ROS (**Samoylenko et al. 2013**).

U aerobních organismů je v mitochondriích většina spotřebovaného kyslíku přímo redukována na vodu. Reakce se účastní cytochrom oxidáza, ta přenáší čtyři elektrony na kyslík, za vzniku vody. Ovšem velmi malé množství, okolo 1-2%, je redukováno přes univalentní dráhu, během níž dochází k tvorbě ROS (**Lushchak 2014; Becker 2004; Turrens 1997**). Nicméně se začínají objevovat důkazy, že ve skutečnosti je k tvorbě ROS využito jen 0,15% kyslíku (**St-Pierre et al. 2002**).



Obr. 1: Tvorba reaktivních forem kyslíku přenosem energie nebo sekvenční univalentní redukcí tripletového kyslíku (převzato z Rusty Rodriguez, and Regina Redman, 2005).

Jednoelektronovou redukcí kyslíku dochází k tvorbě superoxidu, který je základním volným radikálem a slouží jako prekurzor pro tvorbu dalších ROS. Superoxid je následně rychle dismutován, a to spontánně, nebo je reakce katalyzovaná superoxid dismutázou a dochází k tvorbě peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ten je toxický pouze při vysoké koncentraci.  $\text{H}_2\text{O}_2$  může být následně redukován na vodu, v jiném případě je částečnou redukcí přeměněn za přítomnosti  $\text{Fe}^{2+}$  či  $\text{Cu}^+$  na hydroxylový radikál ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), jeden z nejsilnějších oxidantů.  $\text{OH}^{\bullet}$  je velmi reaktivní a přímo poškozuje biomakromolekuly, jako jsou proteiny, buněčné membrány, či způsobuje peroxidaci lipidů (Turrens 2003; Becker 2004).

## 2.2. ZDROJE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU

Ve všech živých organismech může docházet k tvorbě superoxidu dvěma způsoby, enzymaticky a neenzymaticky (Turrens 2003). Během enzymatické dráhy jsou reakce katalyzovány nejrůznějšími enzymy, mezi nejdůležitější patří NAD(P)H oxidáza, xantin oxidáza, lipoxygenáza, cyclooxygenáza, cytochromoxygenáza, či cytochrom p450 monooxygenáza, kdy superoxid vzniká z nejrůznějších substrátů. Neenzymatická dráha zahrnuje přímý přenos elektronu na kyslík redukcí koenzymu či prostetické skupiny. Ve většině tkání je hlavním zdrojem superoxidu elektron-transportní řetězec, který se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně (Taverne et al. 2013; Sorescu and Griendling 2002).

### 2.2.1. DÝCHACÍ ŘETĚZEC

Největším zdrojem ROS, vzniklých jako meziprodukt, je dýchací řetězec, jež se nachází ve vnitřní membráně mitochondrií. Hlavními producenty superoxidu jsou komplex I (NADH- CoQ reduktáza) a komplex III (ubiquinol cytochrom c reduktáza).

Komplex I je místem, kde elektrony z NADH vstupují do dýchacího řetězce. Flavinmononukleotid (FMN) je kofaktor, přijímající elektrony z NADH a přes Fe-S centra jsou vázány na CoQ redukčního místa. K tvorbě ROS dochází reakcí  $O_2$  a zcela redukovaného FMN, s tím, že podíl redukovaného FMN závisí na poměru  $NADH/NAD^+$ . Pokud tedy dojde k inhibici ETC, nahromadí se NADH, zvýší se poměr  $NADH/NAD^+$ , což vede k tvorbě ROS. K produkci dochází i díky tzv. reverzibilnímu elektronovému transportu, kde elektron doplňuje redukovaný CoQ "pool" a může redukovat  $NAD^+$  na NADH v místě FMN (Pitkanen and Robinson 1996).

V komplexu III dochází k transportu elektronů z CoQ na cytochrom c. Produkuje velké množství superoxidu v reakci  $O_2$  s ubisemiquinonem vázaným v místě  $Q_o$ , dojde-li k inhibici  $Q_i$  místa antimycinem. Pokud není přítomen antimycin, komplex III vyprodukuje téměř zanedbatelné množství ROS v porovnání s komplexem I (M. P. Murphy 2009).

Úlohou komplexu II (sukcinát dehydrogenáza) je oxidovat sukcinát na fumarát v citrátovém cyklu a redukovat ubichinon v dýchacím řetězci. Navzdory původním předpokladům, že komplex II nepatří mezi důležité zdroje ROS, bylo zjištěno, že inhibice komplexu I a III způsobuje zvýšenou tvorbu ROS sukcinát dehydrogenázou. V tomto procesu nedochází k reoxidaci ubichinonu. Komplex II je tvořen čtyřmi podjednotkami. SDHA je flavoprotein, který má v aktivním místě kovalentně navázaný FAD, SDHB se skládá ze tří Fe-S center, SDHC a SDHD jsou dvě transmembránové podjednotky cytochromu b. K tvorbě ROS dochází v místě  $II_F$ , které se nachází na SDHA podjednotce, pokud je flavin částečně nebo úplně redukovaný a není obsazen substrátem (Quinlan et al. 2012).

V mitochondriích je dalším zdrojem ROS komplex  $\alpha$ -ketoglutarát dehydrogenáza ( $\alpha$ -KGDH), důležitý enzym Krebsova cyklu, jenž katalyzuje reakci  $\alpha$ -KGDH+HS-CoA+NAD<sup>+</sup>→Sukcinyl-CoA+CO<sub>2</sub>+NADH. Skládá se ze tří podjednotek: E1 (tiaminpyrofosfát dependentní dehydrogenáza), E2 (dihydrolipoamid sukcinyl transferáza) a E3 (dihydrolipoyl dehydrogenáza). K tvorbě ROS s největší pravděpodobností dochází na třetí podjednotce. Je tvořena flavoproteinem, jelikož při reakcích katalyzovaných flavoproteinem může docházet k redukcí kyslíku na superoxid, či peroxid vodíku. K tvorbě ROS dochází v reakci  $\alpha$ -KGDH s HS-CoA, po přidání  $\alpha$ -ketoglutarátu v nepřítomnosti  $NAD^+$ , což naznačuje, že  $NAD^+$  zabraňuje tvorbě peroxidu vodíku. Ovšem k produkci ROS  $\alpha$ -KGDH může docházet i prostřednictvím NADH a v tomto případě není potřeba ani  $\alpha$ -ketoglutarát a ani HS-CoA. Důležitou roli hraje i poměr  $NADH/NAD^+$  a to pokud jsou přítomny všechny

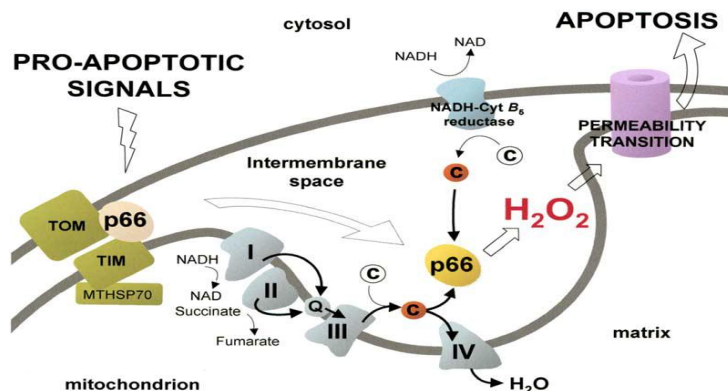
kofaktory i substráty. Čím je větší poměr NADH/NAD<sup>+</sup> tím rychleji probíhá tvorba. E3 podjednotka se nachází nejenom u  $\alpha$ -KGDH, ale i u pyruvátdehydrogenázy u níž byla také prokázána účast na produkci ROS (**Tretter and Adam-Vizi 2004**).

Mitochondriální Glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (mGPDH) je dalším místem tvorby ROS. Tento enzym oxiduje glycerol-3-fosfát a zároveň zprostředkovává přenos redukčních ekvivalentů do mitochondriálního elektron-transportního řetězce. Zdá se, že hlavním producentem ROS je Q-vazebná kapsa, jelikož na každé straně vnitřní mitochondriální membrány dochází k tvorbě přibližně stejného množství superoxidu. Oxidace glycerol-3-fosfátu mGPDH je spojená s tvorbou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Během ní může docházet k přenosu elektronů dvěma směry: jednak z ubiquinonu, přes komplex III a cytochrom c na komplex IV a také v opačném směru z ubiquinonu na komplex I a NAD<sup>+</sup>. Právě proto jsou ROS produkovány na různých místech jako je mGPDH, komplex I, III, atd. Dříve se vědci domnívali, že mGPDH produkuje daleko větší množství reaktivních forem kyslíku, ale posléze se zjistilo, že část je tvořena tokem elektronu přes ubiquinon „pool“ v komplexu II (**Orr et al. 2012**).

Mezi dehydrogenázy produkující ROS v mitochondriích můžeme zařadit i dihydroorotát dehydrogenázu, nacházející se na vnější straně vnitřní mitochondriální membráně. Tento enzym se účastní biosyntézy pyrimidinu, který je nezbytný pro proliferaci buněk. Produkce pyrimidinu se skládá ze šesti reakcí, z nichž pět probíhá v cytosolu a šestá v mitochondriích, během ní dihydroorotát dehydrogenáza katalyzuje oxidaci dihydroorotátu na orotát. Dihydroorotát dehydrogenáza obsahuje dvě aktivní místa, v chinon vazebném místě se nachází ubiquinon, který přijímá elektrony a právě zde dochází k tvorbě ROS během oxidace. Druhým aktivním místem je flavinmononukleotid prostetická skupina přijímající dva elektrony z dihydroorotátu (**Hey-Mogensen et al. 2014**).

Protein p66<sup>Shc</sup> je redoxní enzym, patřící mezi Shc proteiny. Existují tři izoformy p46<sup>Shc</sup>, p52<sup>Shc</sup> a p66<sup>Shc</sup> (**Migliaccio et al. 1997**). P46<sup>Shc</sup> a p52<sup>Shc</sup> se podílejí na přenosu signálu z aktivovaných tyrozin kináz na Ras. P66<sup>Shc</sup> má stejnou strukturu jako p46<sup>Shc</sup> a p52<sup>Shc</sup> (SH2-CH1-PTB) a k tomu obsahuje unikátní N-terminální oblast (CH2). P66<sup>Shc</sup> se nepodílí na regulaci Ras, ale má funkci v intracelulárních drahách. Reguluje hladinu reaktivních forem kyslíku a zároveň produkuje molekuly ROS, jako signály vedoucí k apoptóze. Za fyziologických podmínek se nachází v inaktivovaném stavu a je aktivován prostřednictvím proapoptických signálů. P66<sup>Shc</sup> produkuje ROS při oxidaci cytochromu c. Při této reakci katalyzuje částečnou redukci molekulárního kyslíku elektrony získanými z ETC. Následně

jsou otevřeny MPTP, čímž je spuštěná apoptóza. Mitochondrie hrají klíčovou roli v apoptóze, jelikož obsahují několik proapoptických faktorů jako jsou AIF, Smac/DIABLO, Endo G a cytochrom c. Zdá se, že ROS jsou klíčovými intracelulárními regulátory apoptózy, neboť jejich působením dochází k narušení integrity organely a uvolnění proapoptických faktorů do cytosolu (M. Giorgio et al. 2005).



Obr. 2 Model redoxní aktivity p66<sup>Shc</sup> v průběhu apoptózy: proapoptický signál uvolní p66<sup>Shc</sup> inhibičního komplexu. Aktivovaný p66<sup>Shc</sup> oxiduje redukováný cyt c a katalyzuje redukci O<sub>2</sub> na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peroxid vodíku otevře MPTP, dojde k nabobtnání mitochondrií a následně k apoptóze (M. Giorgio et al. 2005).

Dalším a velmi důležitým zdrojem ROS je tzv. oxidativní vzplanutí, neboli zvýšená spotřeba kyslíku za vzniku reaktivních forem kyslíku (Avendaño et al. 2008). K oxidativnímu vzplanutí dochází ve fagocytárních buňkách prostřednictvím NADPH oxidázy. Tento fenomén se značným způsobem podílí na ochraně hostitele před velkým množstvím vnějších i vnitřních patogenů. Během oxidativního vzplanutí dochází k redukci molekulárního kyslíku NADPH oxidázou a k tvorbě intermediátů OH<sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, které mají baktericidní účinky (Avendaño et al. 2008; Hiraoka et al. 1998).

## 2.3. VLIV REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU NA BUNĚČNÉ PROCESY

### 2.3.1. POZITIVNÍ ÚČINKY

Reaktivní formy kyslíku nemají jen negativní účinky, jak se dlouho předpokládalo, ale přirozeně se vyskytují v organismu a účastní se řady buněčných aktivit, signálních drah, ovlivňují genovou expresi a pomáhají v boji proti patogenům, jak už bylo zmíněno u oxidativního vzplanutí.

Existuje celá řada důkazů, že ROS fungují jako intracelulární signální molekuly a mohou ovlivňovat různé signální dráhy (**Kulich and Chu 2003**). Reaktivní formy kyslíku se jako druzí poslové také podílejí na regulaci aktivity transkripčních faktorů, jako je AP1 nebo NF- $\kappa$ B.

NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) je transkripční faktor, regulující geny důležité pro reakci na buněčný stres, zánětlivou odpověď a imunitní odpověď. Za normálních podmínek je inaktivovaný, pomocí inhibitoru I $\kappa$ B (**Hirovani et al. 2002**). Pokud dojde ke stimulaci buňky pomocí interleukinu-1 $\beta$ , je I $\kappa$ B fosforylován I $\kappa$ B kinázou a následně degradován. V některých buňkách jsou ROS dokonce nezbytné pro odbourání tohoto inhibitoru, např. v buňkách lymfoidních. Když je inhibitor odbourán, NF- $\kappa$ B je translokován do jádra, kde se naváže na DNA a spustí transkripci specifických genů (**Bonizzi et al. 1999; Hirovani et al. 2002**).

### 2.3.2. NEGATIVNÍ ÚČINKY

Reaktivní formy kyslíku jsou asi nejvíce spojovány s pojmem oxidativní stres, který je definován, jako porušení rovnováhy oxidantů a antioxidantů. Tento koncept byl poprvé použit v roce 1985 Helmutem Siesem v jeho knize Oxidative stress (**Sies 1985**).

Oxidativní stres je spojen s mnoha poruchami. Když množství ROS překročí kapacitu antioxidantů, mohou reagovat přímo s lipidy, proteiny nebo DNA a to vede k poškození buněk, popřípadě k jejich smrti.

Jedním z hlavních indikátorů oxidativního stresu je peroxidace lipidů, tzv. lipoperoxidace, během níž dochází k oxidaci nenasycených mastných kyselin a k poškození jak cytoplazmatické membrány buněk, tak membrány organel (**Dutta et al. 2012**).

ROS způsobují modifikace proteinů, mění jejich strukturu a mohou zabránit správnému sbalení proteinu. Některé změny jsou ireverzibilní a inaktivují řadu proteinů. ROS jsou schopné reagovat přímo s aminokyselinovými zbytky proteinů. Velmi citlivé k oxidaci jsou síru obsahující AK, cystein a metionin. Cysteinové zbytky jsou přeměněny na disulfidy a metioninové na metionin sulfoxidy. Tyto modifikace jsou reverzibilní díky disulfid reduktáze a MeSOX reduktáze, které navrátí aminokyselinové zbytky do nemodifikované podoby (**Levine et al. 1996**). Reaktivní formy kyslíku oxidují také lysin, arginin, treonin a prolin za vzniku karbonylových derivátů. Kromě toho mohou být karbonylové skupiny vpraveny do proteinu s reaktivními karbonylovými deriváty, produkovanými při redukci cukrů, nebo reakcí s aldehydy, které vznikly při lipoperoxidaci. (**Berlett and Stadtman 1997**).

ROS reagují téměř se všemi biomolekulami a denně probíhá v každé lidské buňce až 10 000 oxidačních reakcí, které způsobují poškození DNA. Reaktivní formy kyslíku způsobují jednořetězcové i dvouřetězcové zlomy, zejména hydroxylový radikál reaguje se všemi složkami DNA a poškozuje jak purinové tak i pyrimidinové báze, ale i deoxyribózu (Valko et al. 2007; Hemnani and Parihar 1998). Způsobují také poškození mitochondriální DNA, což má za následek snížení transkripce mtRNA (Suematsu et al. 2003).

#### 2.4. OXIDATIVNÍ STRES A ONEMOCNĚNÍ

Oxidativní stres je spojován s řadou patofyziologických stavů, mezi ně můžeme řadit onemocnění ledvin, rakovinu, neurodegenerativní onemocnění a různé vaskulopatie jako je ateroskleróza (Griendling and FitzGerald 2003). Mnoho studií poukazuje na to, že oxidativní stres je zodpovědný za diabetes a problémy s cévami. Tyto problémy nastávají později, jelikož dochází ke zvýšené produkci ROS v endoteliálních buňkách cév i srdce. Oxidativní stres je jedním z faktorů způsobující inzulinovou rezistenci neboli sníženou účinnost inzulinu. Jedním z hlavních zdrojů produkce ROS a tudíž i oxidativního stresu v diabetu je hyperglykémie (Pandey, Mishra, and Rizvi 2010). Za fyziologických podmínek jsou elektrony přenášeny mezi komplexy I, III a IV, čímž se tvoří protonový gradient, který je využíván pro tvorbu ATP. V buňkách u pacientů s diabetem je vysoká hladina glukózy a tedy i vysoká koncentrace pyruvátu. Tímto do elektron-transportního řetězce vstupuje větší množství redukčních ekvivalentů a ROS jsou produkovány přes mitochondriální hyperpolarizaci. Dýchací řetězec pumpuje protony přes vnitřní mitochondriální membránu a vytváří proton-motivní sílu. Za fyziologických podmínek oxidativní fosforylace probíhá rychleji než při hyperglykémii, čímž snižuje membránový potenciál a tvorbu ROS. V průběhu hyperglykémie je pravděpodobně rozpojen mitochondriální řetězec. Tím dochází k hyperpolarizaci mitochondrií a k zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (Tiwari et al. 2014; Yu, Robotham, and Yoon 2006).

#### 2.5. OCHRANA PROTI ROS A ANTIOXIDANTY

Antioxidanty, jsou sloučeniny, které ať už přímo nebo nepřímo, chrání buňku před nepříznivými účinky látek způsobujících oxidační stres, jako jsou například léky, cizorodé látky, karcinogeny či reaktivní formy kyslíku (Puppo and Halliwell 1988). Vyskytují se v nižší koncentraci než substráty, které jsou oxidovány a oxidací těchto substrátů zpomalují nebo jí úplně inhibují. Můžeme je rozdělit na enzymatické a neenzymatické (H. Sies 1997).

### 2.5.1. NEENZYMATICKÉ ANTIOXIDANTY

Mezi neenzymatické antioxidanty řadíme intracelulární molekuly zahrnující vitamín E, C,  $\beta$  karoten, jenž je prekurzorem pro vitamín A, ubichinol, nacházející se v membránách, ale i urát, bilirubin a glutation (**Giordano 2005**). Vitamín C jako antioxidant, chrání tkáň před oxidativním poškozením. Zabraňuje Fas-indukované apoptóze a buněčné smrti způsobené ROS. Do buňky je transportován SVCT (sodium-dependent vitamin C transporters). Nicméně ve většině buněk je přenášen v jeho oxidované formě kyselině dehydroaskorbové (DHA) přes glukózový transportér (GLUT), konkrétně přes GLUT1. Ke vzniku DHA dochází při interakci kyseliny askorbové s ROS. Uvnitř buňky je DHA redukována zpět na kyselinu askorbovou (**Kc, Cárcamo, and Golde 2005**). Vitamin E se nachází v membránách a lipoproteinech a přijímá atom  $H^+$  z peroxylového radikálu, čímž je zastavena peroxidace dalších lipidů (**Kagan et al. 1992**). Mnohé z těchto látek můžeme získat z potravin, především z ovoce a zeleniny. Bylo zjištěno, že antioxidanty získané z potravin snižují riziko degenerativních onemocnění a také se podílejí na zpomalení nádorového bujení. U lidí s nižším příjmem ovoce a zeleniny nádory rostou až 2x rychleji (**Ames, Shigenaga, and Hagen 1993**). V boji proti rakovině antioxidanty působí ve dvou fázích. Ta první zahrnuje omezení oxidativního poškození DNA a druhá fáze zabraňuje dělení buněk. Kyselina askorbová (vitamín C), tokoferol (vitamín E) a  $\beta$  karoten zabraňují kardiovaskulárním onemocněním, pokud jsou v plazmě zastoupeny v dostatečném množství (**Giordano 2005; Ames, Shigenaga, and Hagen 1993**).

### 2.5.2. ENZYMATICKÉ ANTIOXIDANTY

Mezi nejznámější enzymatické antioxidanty patří superoxid dismutáza, kataláza a glutation peroxidáza. Organismy si během evoluce vyvinuly mnoho obranných mechanismů, aby byly schopny snižovat množství reaktivních forem kyslíku. Poškozená DNA je opravovaná řadou glykosyláz a každá báze má přiřazenou specifickou glykosylázu. Oxidované proteiny jsou zase degradovány proteázami a hydroperoxydy lipidů jsou odbourávány pomocí glutation peroxidázy (**Ames, Shigenaga, and Hagen 1993**).

Jako první z protektivních enzymů byla objevena superoxid dismutáza (SOD), vyskytující se v buňkách savců ve třech formách: Mn SOD, Cu/Zn SOD a extracelulární Cu/Zn SOD. SOD katalyzuje dismutaci superoxidového radikálu za vzniku peroxidu vodíku a molekulárního kyslíku. Mn SOD se nachází výhradně v mitochondriích a je pro život esenciální. Oproti tomu Cu/Zn SOD je cytoplazmatický enzym. Během reakce katalyzované

SOD dochází k tvorbě  $H_2O_2$  a molekulárního kyslíku ze dvou molekul  $O_2^-$  (**Keller et al. 1991; Nordberg a Arnér 2001**).

Dalším důležitým enzymem je kataláza. Tento enzym se nachází převážně v cytoplasmě a v peroxizomech, byl však nalezen i v mitochondriích (**Nordberg and Arnér 2001**) a katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Důležitou funkcí katalázy je zabránění Fentonovy reakce, během které dochází k tvorbě  $OH^-$  z peroxidu vodíku. Tato reakce je zprostředkována ionty železa, či mědi (**Bai and Cederbaum 2001; Nordberg and Arnér 2001**).

Glutation peroxidáza (GPx) je selenoprotein, redukující peroxid vodíku pomocí glutationu jako ko-substrátu na vodu a molekulární kyslík. U savců jsou známy 4 typy GPx a všechny obsahují selenocystein. GPx 1 a 4 jsou typické pro celou řadu tkání. Přítomnost GPx 1 byla prokázána především v srdci, plicích, ledvinách, játrech a mozku (**Haan et al. 1998**), zatímco GPx 2 a 3 se nacházejí pouze v gastrointestinálním traktu a ledvinách. Během reakce dochází k oxidaci aktivního místa selenolátu a vzniká kyselina selenová, následně po přidání jedné molekuly glutationu vzniká adukt selen sulfidu s glutationem (Se-SG). Ten je regenerován na aktivní selenolát a oxidovaný glutation (GSSG) po přidání druhé molekuly GSH. Vzniklý glutation disulfid může být následně redukován glutation reduktázou (**Epp, Ladenstein, and Wendel 1983; Nordberg and Arnér 2001**).

Glutation (GSH) neboli  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin je nejrozšířenějším intracelulárním neenzymatickým antioxidantem. Vyskytuje se v jádře, mitochondriích a endoplazmatickém retikulu všech typech buněk. Tento tripeptid má dvě formy, redukovanou (GSH), vyskytující se v buňce ve větším množství za fyziologických podmínek a oxidovanou (GSSG), jež je též nazývána jako glutation disulfid. Glutation může odstraňovat ROS přímo, ale také může sloužit jako substrát pro glutation peroxidázu či glutation S transferázu (**Masella et al. 2005**). GSH vzniká redukcí GSSG nebo může být syntetizován i de novo a to ve dvou ATP-dependentních reakcích, které jsou katalyzovány  $\gamma$ -glutamylcystein syntetázou a glutation syntetázou v  $\gamma$ -glutamyllovém cyklu (**Oppenheimer et al. 1979; Yan and Meister 1990**). Během oxidačního stresu dochází ke snížení koncentrace GSH zatímco koncentrace GSSG roste, to buňce umožňuje vylučovat glutation disulfid a díky tomu dochází k syntéze nového glutationu nebo může být redukován pomocí glutation reduktázy zpět na GSH (**Masella et al. 2005**). Glutation reduktáza je homodimerický enzym, jehož doposud jedinou známou funkcí je redukce glutation disulfidu na glutation (**Rogers et al. 2004**).

Thioredoxin (Txn) se také podílí na ochraně organismu proti ROS. Txn je protein s nízkou molekulovou hmotností. Skládá se z pěti  $\beta$ -struktur a čtyř  $\alpha$ -helixů. Tyto  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -listy mohou být rozděleny na N ( $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$ ) a C ( $\beta_4\beta_5\alpha_4$ ) terminální motiv, propojené  $\alpha_3$ -helixem.  $\beta$ -listy z N-terminálního konce probíhají paralelně, zatímco z C-terminálního konce antiparalelně a tato struktura je typická pro Txn (**Holmgren et al. 1975; Martin 1995**). U člověka jsou známy tři formy Txn1, 2, 3 a k nim příslušné reduktázy Txnrd1, 2 a 3. Txn1 a Txnrd1 se převážně nacházejí v cytosolu. V mnoha studiích bylo prokázáno, že snižují rozsah infarktu a také postischemickou apoptózu. Txn2 se vyskytuje v mitochondriích kardiomyocytů. Jednou z hlavních funkcí je kontrola hypertrofie srdce, právě ta je způsobena  $O_2^-$  nebo  $H_2O_2$ . **Horstkotte et al. (2011)** dokázali, že příslušná reduktáza Txnrd2 se účastní kontroly ischemicko-reperfuzního poškození srdce a také našli vyšší frekvenci u srdce s Txnrd2 deficitem. Poslední formou je Txn3, která je exprimovaná hlavně ve varlotech. (**Horstkotte et al. 2011**)

### 3. SRDCE A JEHO ENERGETICKÝ METABOLISMUS

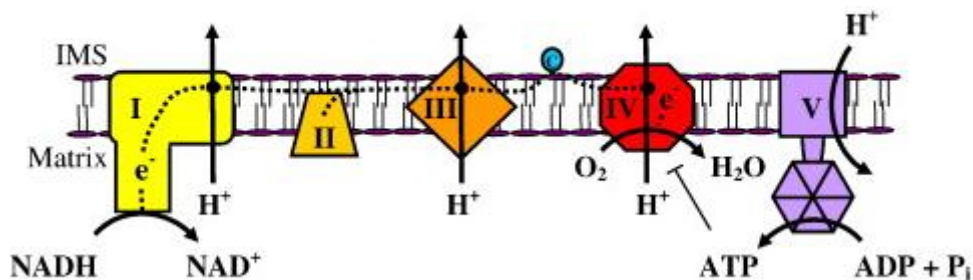
Srdce savců provede během 24 hodin až 100 000 kontrakcí, a aby bylo schopno zvládnout takovou pracovní zátěž, obsahuje velké množství myoglobinu a mitochondrií, které poskytují dostatek energie. Ta představuje až 15% denního energetického výdeje celého těla. Kyslík je získáván z krve v koronárních tepnách, proto je velmi úzké a důležité propojení mezi mitochondriemi a jejím respiračním řetězcem, průtokem krve a pracovní zátěží srdce (**Balaban 2012**).

#### 3.1. ZDROJ ENERGIE

Zdrojem energie pro správnou funkci srdce je ATP, neboli adenosintrifosfát. Za normálních okolností je 96 % ATP produkováno v mitochondriích během oxidativní fosforylace. Mitochondriální oxidativní fosforylace (oxfos) propojuje transport elektronů s buněčným dýcháním a syntézou ATP. Oxfos zahrnuje ETC, skládající se ze čtyř komplexů. Většina elektronů v ETC pochází z NADH a vstupují přes komplex I. Elektrony jsou přenášeny přes komplexy ETC na kyslík a zároveň je tvořen membránový potenciál pumpováním protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Protonový gradient je následně použit ATP syntázou, která propojuje zpětný tok protonů s tvorbou ATP (**Hüttemann et al. 2007**). ATPáza je tvořena dvěma částmi  $F_o$  a  $F_1$ .  $F_o$  část je zabudována do vnitřní mitochondriální membrány a na ni je napojena  $F_1$  část, směřující do matrix. Protony vstupují

do půlkanálu a začnou se otáčet c podjednotky  $F_o$  spolu s podjednotkami  $F_1$ :  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ .  $\gamma$  podjednotka interaguje s  $\alpha\beta$  hexamerem a tím mechanicky umožňuje syntézu ATP. Na rozhraní  $\alpha\beta$  podjednotek se nacházejí katalycká místa. Podle interakce s  $\gamma$  podjednotkou mají tři různé konformace (Jonckheere, Smeitink, and Rodenburg 2012).

1. v aktivním místě je navázáno ATP
2. aktivní místo je prázdné
3. v aktivním místě je navázáno ADP + anorganický fosfát



Obr. 3 Schéma oxidativní fosforylace (Hüttemann et al. 2007)

Molekula ATP (GTP) je také syntetizovaná sukcinyl-CoA syntetázou (SCS) v Krebsově cyklu. SCS katalyzuje rozklad sukcinyl-CoA na sukcinát a koenzym A. Zároveň je syntetizováno ATP z ADP a  $P_i$  (Kaufman et al. 1953). U savců existují dvě izoformy. Enzym se skládá z  $\alpha$  podjednotky a  $\beta$  podjednotky, která je specifická buď pro ATP anebo GTP. Expres SCS specifické pro ATP je nejsilnější v tkáních, které jsou závislé na oxidativním metabolismu, jako je například mozek či srdce. Oproti tomu exprese SCS specifické pro GTP je silnější v tkáních účastnících se biosyntézy (syntéza sacharidů) (Johnson et al. 1998).

Dalším zdrojem ATP je anaerobní glykolýza, během té je pyruvát přeměněn na laktát. Původně se předpokládalo, že k tvorbě laktátu dochází pouze v důsledku anaerobního metabolismu. Nedávné studie prokázaly, že pokud je glykolýza rychlejší než oxidativní fosforylace, zvyšuje se tvorba pyruvátu a tím také koncentrace laktátu. Přeměna pyruvátu na laktát během mléčného kvašení, je katalyzovaná laktát dehydrogenázou za účasti  $NADH+H^+$ . Tento laktát je zároveň reoxidován pro glykolýzu (Krasnow et al. 1962; Chatham 2002).

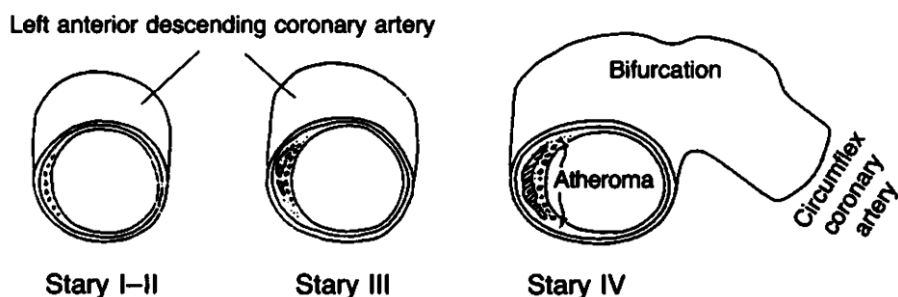
### 3.2. ÚLOHA REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU V SRDCI

Zdá se, že ROS hrají důležitou roli v otázce života a smrti buňky. Bylo už mnohokrát prokázáno, že se účastní řady signálních kaskád. K produkci reaktivních forem kyslíku dochází po stimulaci receptorů nacházejících se na buněčném povrchu. Při aktivaci cytokinových receptorů dochází k tvorbě ROS, které se účastní kontroly apoptické dráhy. Naopak ROS produkované při aktivaci receptorů spřažených s G-proteiny spouští proliferaci a hypertrofii kardiomyocytů (**Kevin, Novalija, and Stowe 2005**).  $H_2O_2$  produkovaný po aktivaci růstového faktoru TGF- $\beta$ 1 přímo reguluje  $G_1$  fázi. **Shibanuma, Kuroki, and Nose (1991)** prokázali, že  $H_2O_2$  v přechodné  $G_0$ - $G_1$  fázi indukuje syntézu DNA a naopak, že v pozdní  $G_1$  fázi spolu s TGF- $\beta$ 1 tuto syntézu inhibují.

Zdá se, že ROS mají nezbytnou úlohu v embryogenezi. Studie **Sauer et al. (1999)** prokázala, že v přítomnosti vyšší koncentrace  $H_2O_2$  je i zvýšená diferenciace kmenových buněk na kardiomyocyty.

### 4. ISCHEMIE A REPERFUZE

Pojem ischemie obecně označuje děj, při kterém nedochází k dostatečnému prokrvování tkáně, v tomto případě myokardu. K ischemii dochází nejčastěji v důsledku aterosklerózy. Ateroskleróza je chronické onemocnění cévních stěn, kdy dochází k hromadění lipidů pod endotelem. V postižené cévní stěně se ukládá také cholesterol, monocyty, vápník a různé buněčné nečistoty. Dlouhodobější ukládání vápníku vytváří v tunice intima aterosklerotické pláty. Tyto pláty zužují průsvit cév a snižují okysličení kardiomyocytů. V krajním případě může dojít i infarktu myokardu, pokud je plát roztržen, vytvoří se sraženina, která ucpe cévu (**Fuster et al. 1992; Cunnane et al. 2015**). Po ischemii následuje reperfuze, neboli obnovení krevního průtoku ischemickou tkání.



Obr. 4 Počáteční vývoj spontánní aterosklerózy (**Fuster et al. 1992**).

Srdce je schopno tolerovat krátkou ischemii, s níž se vyrovná pomocí různých mechanismů a předejde tak poškození tkáně. Spustí se anaerobní glykolýza, jako zdroje energie jsou využívány mastné kyseliny a sníží se kontraktilita myokardu. Pokud ovšem ischemie přetrvává, má to za následek nedostatek ATP, který je následován nevratným poškozením a buněčnou smrtí. Pro přežití buněk je důležitá reperfuze, i ta ovšem může vést k dalšímu poškození. Velmi záleží na tom, jak dlouho trvala ischemie a jak efektivní bylo obnovení krevního průtoku (**Budas, Churchill, and Mochly-Rosen 2007**).

#### **4.1. TVORBA REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU PŘI ISCHEMII A REPERFUZI V MITOCHONDRIÍCH**

V průběhu ischemie dochází ke kyslíkovému paradoxu (KP). Kyslíkovým paradoxem je nazýván děj, kdy v důsledku snížení koncentrace kyslíku, dochází ke zvýšené tvorbě  $O_2^-$ , k čemuž výrazně přispívá komplex III. Produkce ROS probíhá v místech  $Q_o$  a  $Q_i$ .  $O_2^-$  vyprodukovaný v místě  $Q_o$  se následně dostane do intermembránového prostoru a  $O_2^-$  z  $Q_i$  místa vstupuje do matrix. V matrix a intermembránovém prostoru dochází k reakci superoxidu a superoxid dismutázy. Část ROS, jež se dostala do mezimembránového prostoru, může také reagovat s oxidovaným cytochromem c za vzniku molekulárního kyslíku a redukovaného cyt c. ROS, u nichž neproběhla reakce s cyt c ani SOD následně pronikají do cytosolu ve formě  $H_2O_2$ , nebo pomocí napětově řízených aniontových kanálů (VDAC) (**Guzy et al. 2005; Han et al. 2003**).

Uvolnění cytochromu c (Cyt c) z mitochondrií je jedním z hlavních spouštěčů apoptózy, je účinný i v odstraňování superoxidu z intermembránového prostoru (IMS). Cytochrom c je v IMS navázán na kardiolipin, který je součástí vnitřní mitochondriální membrány a je nezbytný pro stabilizaci a aktivitu cytochrom oxidázy, a pro správnou funkci ETC. Cyt c může být prostřednictvím  $O_2^-$  redukován, následně je reoxidován cytochrom oxidázou na oxidovaný cyt c, který je schopen dále odstraňovat ROS. Při ischemii dochází k zvýšení koncentrace redukované formy cyt c. Zvyšující se koncentrace redukované formy cyt c je způsobena inhibicí a destabilizací cytochrom oxidázy. Nemůže doplňovat oxidovanou formu cyt c a tudíž vzrůstá i koncentrace ROS. Při ztrátě cyt c, dochází k narušení přenosu elektronů z  $cyt_1$  v komplexu III na cyt c (**Chen and Lesnefsky 2006**). Elektrony zůstávají na  $cyt_1$ . Pokud je  $cyt_1$  redukován je nepravděpodobné, že by docházelo k pohybu Rieskeho proteinu k  $cyt_1$ , čímž je i znemožněn přístup elektronům na  $Q_o$  místo komplexu III. (**Trumpower 2002**). Rieskeho protein patří mezi FeS proteiny, jeho součástí je  $Fe_2S_2$  klastr,

směřující k cytochromu  $c_1$  a přenáší elektrony z ubichinolu cytochromu  $c_1$  na cytochrom  $c$  (Zhang et al. 1998). Blokací  $Q_o$  je snížena tvorba ROS v komplexu III, ale v komplexu I je naopak zvýšená. Původní předpoklady poukazyvaly na to, že mechanismem uvolnění cyt  $c$  z mitochondrií by mohlo být pomocí mitochondriálního póru přechodné propustnosti (MPTP), jehož otevření je indukované ROS a zvýšenou koncentrací vápenatých iontů. V tomto případě k uvolnění cytochromu  $c$ , dochází v důsledku bobtnání matrix a prasknutí vnější mitochondriální membrány. Nejnovější studie však poukazují na  $O_2^-$  zprostředkované uvolnění cyt  $c$  selektivní permeabilizaci vnější mitochondriální membrány přímo spojenou s napěťově ovládanými aniontovými kanály (VDAC) (Petrosillo, Ruggiero, and Paradies 2003; Pasdois et al. 2011).

## 4.2. DŮSLEDKY ISCHEMIE A REPERFUZE

### 4.2.1. ZMĚNA KONCENTRACÍ IONTŮ

V průběhu ischemie dochází ke změnám činnosti iontových transportních systémů v membránách organel a sarkolemy, což způsobuje poruchy kontrakce. Nejdříve dochází ke ztrátě draselných iontů, která je nezávislá na sodno-draselné pumpě. Je to z důvodu snížené koncentrace ATP a také s větší pravděpodobností dojde ke zvýšení průtoku  $K^+$  z buňky ven, než aby se snížil transport do buňky. Jsou navrhovány dva modely, díky nimž by mohlo docházet k poklesu koncentrace draselných kationtů, buď se aktivuje ATP-senzitivní draslíkový kanál anebo probíhá kontrtransport draselných kationtů a laktátu spolu s anorganickým fosfátem (Wilde et al. 1990; Thandroyen et al. 1992). Thandroyen et al. (1992) ve své práci prokázali přímou spojitost mezi ztrátou draselných iontů a fosfátu. Ztráta  $K^+$  iontů v cytoplazmě, je doprovázená zvýšením koncentrace draselných iontů v mitochondriích. Akumulace draselných kationtů v mitochondriích probíhá v přítomnosti fosfátu, který pochází zejména v první hodině ischemie z degradace ATP. Při ischemii dochází také ke snížení celkové koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů. V prvních 10 - 15 minutách je však koncentrace volných kationtů zvýšená až 2,5x. Pravděpodobně je to důsledek snížené koncentrace ATP, se kterým původně  $Mg^{2+}$  kationty tvořily komplexy (E. Murphy et al. 1989). Zvýšení koncentrace  $Cl^-$  aniontů,  $Na^+$  kationtů a vody vede ke swellingu (otoku) buňky. V průběhu ischemie dochází i k narušení homeostázy  $Na^+$  a  $K^+$  kationtů. Nejdříve se zvýší hladina sodných iontů, tento jev probíhá prostřednictvím  $Na^+/Ca^{2+}$  výměníku, následně zvýší i koncentraci  $Ca^{2+}$ . Přetížení kardiomyocytů cytoplazmatickými  $Ca^{2+}$  ionty je

zodpovědné za ztrátu membránových fosfolipidů, k čemuž může docházet i pokud je narušená propustnost membrány pro vápenaté kationty (**Thandroyen et al. 1992**).

Reperfuze kardiomyocytů částečně vrací změny nastalé během ischemie a týká se to především iontů draslíku, sodíku, vápníku, fosforu, síry a chlóru v cytoplazmě, ale i v mitochondriích. V mitochondriích dochází ke snížení koncentrace iontů vápníku, což je spojeno se zpětným růstem koncentrace iontů sodíku a poklesu koncentrace iontů draslíku. Důležitý je co nejrychlejší návrat koncentrace iontů vápníku do standardních hodnot, na tom závisí schopnost buňky obnovit integritu membrány (**Thandroyen et al. 1992**).

#### **4.2.2. VLIV ISCHEMIE A REPERFUZE NA KONCENTRACI ATP**

V prvních 25 minutách ischemie dochází k výraznému poklesu koncentrace ATP, až na 50 % fyziologické koncentrace. Tento pokles je doprovázen zvýšením koncentrace ADP a AMP. Na začátku ischemie je zvýšená koncentrace ADP, která po 20 minutách začíná klesat, koncentrace AMP se zvyšuje 25 min a poté zůstává na vysokých hodnotách. V důsledku velkého množství AMP dochází k velké ztrátě ATP a ADP. Membrány buněk myokardu jsou pro ně propustné a následně se dostávají do žilního splavu. V reperfuzi, následující krátkou ischemií, je většina AMP a ADP přeměněna opět na ATP, ale pokud ischemie trvala déle než 25 minut, je jen malé množství fosforylováno zpět na ATP. Snížením koncentrace ATP se zvyšuje koncentrace nukleosidových prekurzorů, jako je adenosin, hypoxantin a inosin. Pro tyto metabolity je buněčná membrána myokardu permeabilní a proto jsou během reperfuze vymyty z ischemické tkáně do krevního řečiště. Ischemie způsobuje i snížení hladiny kreatin fosfátu (CP) a glykogenu. Hlavní metabolický produkt, jenž se akumuluje je laktát, spolu s cytosolickým  $\text{NADH}+\text{H}^+$ . Zvyšující množství laktátu je zodpovědné za zpomalení anaerobní produkce ATP a také inhibuje glykolýzu (**DeBoer et al. 1980; Neely and Grotyohann 1984**).

Celkově ischemie snižuje množství ATP, CP a glykogenu, naopak laktátu může být až 42x více. Reperfuze koncentrace ATP a CP částečně obnoví, koncentrace glykogenu zůstává stále nízká. Hladina laktátu je sice snižená, přesto je jeho koncentrace stále vyšší než ta fyziologická. Snížení, či úplná ztráta oxidativní produkce ATP a hromadění metabolických produktů, jenž nejsou následně oxidovány na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  nebo odstraněny z tkáně do krevního oběhu, spouští různé kaskády, způsobující metabolické a strukturní změny, vedoucí k ireverzibilnímu poškození tkáně (**Neely and Grotyohann 1984**).

### 4.3. ISCHEMIE, REPERFUZE A MITOCHONDRIE

#### 4.3.1. KOMPLEX I

Mnoha studii bylo prokázáno, že k poškození dýchacího řetězce dochází především v komplexu I. V průběhu ischemie je aktivita komplexu I snížena o 25% a při následné reperfuzi dokonce o 48%. To, že poškozen je hlavně tento komplex, bylo dokázáno na základě studie **Paradies et al. (2004)**. Pro správné fungování komplexu I je nezbytný kardiolipin. Je tedy možné, že pokud dojde k poškození kardiolipinu prostřednictvím ROS, může to mít za následek sníženou aktivitu komplexu. Snížené množství kardiolipinu by mohlo být způsobeno peroxidací, jelikož reaktivní formy kyslíku napadají dvojnásobné vazby mastných kyselin. Bylo také zjištěno, že při ischemii dochází k úbytku kardiolipinu a to až o 50%. Po fúzi mitochondrií s liposomem obsahující exogenní kardiolipin nebo kardiolipin a fosfatidylethanolamin, dochází téměř k úplnému obnovení aktivity komplexu I (**Paradies et al. 2004**).

#### 4.3.2. KOMPLEX II a III

Zdá se, že komplex II a III, jsou relativně rezistentní k ischemii a reperfuzi. U komplexu III dochází ke snížení aktivity daleko pomaleji než je tomu u komplexu I. **Veitch et al. (1992)** prokázali, že komplex III je citlivý k ischemickému poškození, ale k výraznějšímu snížení aktivity dochází až po 60 minutách. Nicméně při reperfuzi dochází k snížení už po 30 minutách. Toto naznačuje, že komplex III je daleko citlivější k poškození, způsobené v průběhu reoxidace. Ischemie a reperfuze také ovlivňuje mitochondriální cytochromy. U komplexu III dochází ke značné ztrátě cytochromu b a c<sub>1</sub> (**Veitch et al. 1992**). Aktivita komplexu III je v průběhu ischemie snížena o 22%, pokud následuje reperfuze, dochází ke snížení o 46%. Předpokládá se, že za snížení aktivity může opět kardiolipin a jeho peroxidace, jako u komplexu I (**Petrosillo et al. 2003**). **Abe, Hayashi, and Terada (1999)** zjistili, že pokud je srdce u myši vystaveno 20 minutové ischemii a reperfuzi dochází ke zhoršení aktivity i u komplexu II, která je způsobena ROS produkovanými myocyty.

#### 4.3.3. KOMPLEX IV

Z práce **Veitch et al. (1992)** vyplývá, že pokud po 60 minutové ischemii následuje reperfuze, dochází ke snížení aktivity zhruba o 30%. V průběhu ischemie byla pozorována ztráta cytochromu c, který je zodpovědný za transport elektronů z komplexu III na komplex IV. Tím dochází i ke snížení toku elektronů přes komplex IV. To, že opravdu dochází ke

snížení množství cytochromu c, dokazuje, že se po I/R nacházel v srdečním perfuzátu. Součástí komplexu IV je také cytochrom aa<sub>3</sub> (**Solaini and Harris 2005**). Z jedné studie vyplývá, že u tohoto cytochromu ke změně množství nedochází, ale přesto katalytická kapacita cytochrom c oxidázy je snížena o 25% a po reperfuzi až o 51%. V tomto případě se vědci domnívají, že omezená aktivita je na základě sníženého množství tohoto enzymatického komplexu ve vnitřní mitochondriální membráně. Účinnost komplexu závisí mimo jiné i na složení lipidů mitochondriální membrány. Za podmínek I/R bylo celkové množství fosfolipidů zredukováno o 30% a největší úbytek byl pozorován u kardiolipinu (50%), jenž by mohl být důvodem snížené aktivity komplexu IV (**Paradies et al. 1999**). Jiný výzkum naznačuje, že by mohlo docházet ke zvýšení poměru oxidovaného aa<sub>3</sub>/ redukovaného aa<sub>3</sub> cytochromu. To by potvrzovalo domněnku, že je transport elektronů na komplex opravdu omezen (**Solaini and Harris 2005**).

#### 4.3.4. ATP SYNTÁZA

Na jeden úder srdce jsou v průměru spotřebována 2% celkového buněčného ATP. Toto ATP je doplňováno syntézou, která je z 96% zajištěna mitochondriální F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPázou. Za normálních podmínek ATP syntáza syntetizuje ATP, v průběhu ischemie ovšem dochází k narušení mitochondriálního elektrochemického gradientu, činnost ATPázy je proto obrácená, spotřebovává ATP pro udržení H<sup>+</sup> gradientu. Při nedostatku kyslíku, je hydrolýza ATP nezbytná, aby nedošlo ke kolapsu proton-motivní síly, která je za fyziologických podmínek produkovaná elektron-transportním řetězcem. Aby nedocházelo k vyčerpání ATP, musí dojít buď ke snížení protonové vodivosti mitochondriální membrány anebo k inhibici enzymu (**St-Pierre, Brand, and Boutilier 2000**). Odhaduje se, že 50-80% ATP (podle druhu) je spotřebováno během ischemie právě hydrolýzou. U živočichů s pomalou tepovou frekvencí, mezi něž můžeme řadit i člověka, je množství hydrolyzovaného ATP sníženo prostřednictvím IF<sub>1</sub> proteinu. IF<sub>1</sub> je reverzibilní nekompetitivní inhibitor. Váže se na F<sub>1</sub> subkomplex ATPázy, čímž zabraňuje hydrolýze ATP. Aby mohlo dojít k vazbě IF<sub>1</sub> na F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPázu musí docházet k hydrolýze ATP v nepřítomnosti elektrochemického gradientu a ideální pH pro tento protein je 6,7. Což jsou podmínky vyskytující se v srdečních mitochondriích při ischemii (**Grover et al. 2004; Green and Grover 2000**).

#### 4.3.5. MITOCHONDRIÁLNÍ PÓR PŘECHODNÉ PROPUSTNOSTI

V mitochondriích se nacházejí struktury, vytvářející velké póry ve vnitřní mitochondriální membráně, pokud se v matrix nachází vysoká koncentrace vápenatých iontů a  $P_i$ , při nízké koncentraci glukózy a ATP a při oxidačním stresu. Tato situace probíhá i v ischemickém srdci. Přechodná propustnost pórů (MPT) slouží k odstranění přebytečných vápenatých iontů. Podle některých autorů se MPT pór se skládá z porinu VDAC ve vnější mitochondriální membráně a z adenin-nukleotid translokázy (ANT), nacházející se ve vnitřní mitochondriální membráně. Součástí tohoto komplexu je i hexokináza, vázající se na VDAC a cyklofilin D (CyPD), ten se naopak váže na ANT (**Crompton, Virji, and Ward 1998; Baines et al. 2003**). Podle některých nálezů se však zdá, že MPTP mohl být tvořen z dimerů ATP syntázy, neboť bylo zjištěno, že cyklofilin D se váže na OSCP podjednotku ATP syntázy. Tuto představu podporuje zjištění, že CyPD se váže na stejné místo jako inhibitor ATPázy benzodiazepin 423, který inhibuje její aktivitu a zároveň podporuje tvorbu MPTP (**V. Giorgio et al. 2013**). Z jiné práce zase vyplývá, že MPTP je tvořen c podjednotkou  $F_0$  domény, protože při její absenci, došlo ke snížení aktivity pórů (**Bonora et al. 2013**). Po otevření MPT pórů dochází ke “swellingu” neboli bobtnání mitochondrií a následnému prasknutí vnější mitochondriální membrány, čímž se uvolní apoptogenní proteiny, mezi něž patří i cytochrom c. Na vnitřní mitochondriální membráně dochází ke kolapsu potenciálu, to má za následek přepnutí syntézy ATP na hydrolýzu. Snižuje se tedy koncentrace ATP. Aby buňka mohla opravit poškození způsobené hypoxií a oxidativním stresem, potřebuje k tomu velké množství ATP. Pokud buňka není schopna uzavřít tyto póry, může dojít až k její smrti (**Halestrap et al. 1998; Baines et al. 2003**). Z řady studií vyplývá, že k otevření MPT dochází až během reperfuze. Je velmi pravděpodobné, že k tomu samotná ischemie nestačí. Tato skutečnost je podpořena také faktem, že k buněčné smrti a k poruše kontraktility dochází také až po reperfuzi (**Borutaite et al. 2003**). **Baines et al. (2003)** prokázali, že v inhibici těchto pórů hraje důležitou roli protein kináza C. Tento protein je schopen interagovat s VDAC, následně ho fosforylovat a tím zabránit jeho otevření.

## 5. ZÁVĚR

Tato práce shrnuje doposud známé poznatky o reaktivních formách kyslíku, jejich vzniku a účincích. Po jejich objevení byla pozornost zaměřena především na jejich negativními účinky, ale postupem času se prokázalo, že v nízkých koncentracích jsou nezbytné pro život, účastní se různých signálních drah a podílejí se na regulaci transkripčních faktorů. Stále však převládají jejich negativní účinky, jelikož jsou pravděpodobně příčinou mnoha onemocnění. Organismy vyvinuly mechanismy, kterými jsou schopné přeměňovat ROS na méně reaktivní molekuly a tak se poškození důležitých informačních a strukturních buněčných biomolekul bránit.

Při ischemii a reperfuzi dochází ke zvýšení hladiny těchto volných radikálů, které poškozují mitochondrie a vedou k buněčné smrti. I/R způsobuje kyslíkový paradox, vedoucí ke zvýšené produkci ROS, zejména komplexem I. Hypoxie a následná reperfuze snižuje aktivitu jednotlivých komplexů v důsledku peroxidace kardiolipinu a ztrátou cytochromu c. Kromě toho dochází ke změnám v koncentracích řady iontů, ATP, laktátu a celé řady molekul. V poslední době je předmětem výzkumu tzv. ischemický preconditioning, chrání myokard a cévní endotel proti funkčnímu poškození, nekróze a snižuje velikost infarktu. Informace zjištěné v průběhu několika let, se stávají cennými i pro klinické využití.

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

- Abe, Kazutoyo, Naoyuki Hayashi, and Hiroshi Terada. 1999. "Effect of Endogenous Nitric Oxide on Energy Metabolism of Rat Heart Mitochondria during Ischemia and Reperfusion." *Free Radical Biology and Medicine* 26 (3–4): 379–87. doi:10.1016/S0891-5849(98)00222-6.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen. 1993. "Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (17): 7915–22.
- Avendaño, Ariadna, Irene Sales-Pardo, Lorena Marin, Pedro Marin, and Jordi Petriz. 2008. "Oxidative Burst Assessment and Neutrophil–platelet Complexes in Unlysed Whole Blood." *Journal of Immunological Methods* 339 (2): 124–31. doi:10.1016/j.jim.2008.09.003.
- Bai, Jingxiang, and Arthur I. Cederbaum. 2001. "Mitochondrial Catalase and Oxidative Injury." *Neurosignals* 10 (3-4): 189–99. doi:10.1159/000046887.
- Baines, Christopher P., Chang-Xu Song, Yu-Ting Zheng, Guang-Wu Wang, Jun Zhang, Ou-Li Wang, Yiru Guo, Roberto Bolli, Ernest M. Cardwell, and Peipei Ping. 2003. "Protein Kinase C $\epsilon$  Interacts With and Inhibits the Permeability Transition Pore in Cardiac Mitochondria." *Circulation Research* 92 (8): 873–80. doi:10.1161/01.RES.0000069215.36389.8D.
- Balaban, Robert S. 2012. "Metabolic Homeostasis of the Heart." *The Journal of General Physiology* 139 (6): 407–14. doi:10.1085/jgp.201210783.
- Baltacıoğlu, Esra, Ferda Alev Akalın, Ahmet Alver, Orhan Değer, and Erdem Karabulut. 2008. "Protein Carbonyl Levels in Serum and Gingival Crevicular Fluid in Patients with Chronic Periodontitis." *Archives of Oral Biology* 53 (8): 716–22. doi:10.1016/j.archoralbio.2008.02.002.
- Becker, Lance B. 2004. "New Concepts in Reactive Oxygen Species and Cardiovascular Reperfusion Physiology." *Cardiovascular Research* 61 (3): 461–70. doi:10.1016/j.cardiores.2003.10.025.
- Berlett, Barbara S., and Earl R. Stadtman. 1997. "Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress." *Journal of Biological Chemistry* 272 (33): 20313–16. doi:10.1074/jbc.272.33.20313.
- Bonizzi, Giuseppina, Jacques Piette, Sonia Schoonbroodt, Roland Greimers, Laurence Havard, Marie-Paule Merville, and Vincent Bours. 1999. "Reactive Oxygen Intermediate-Dependent NF- $\kappa$ B Activation by Interleukin-1 $\beta$  Requires 5-Lipoxygenase or NADPH Oxidase Activity." *Molecular and Cellular Biology* 19 (3): 1950–60.

- Bonora, Massimo, Angela Bononi, Elena De Marchi, Carlotta Giorgi, Magdalena Lebiedzinska, Saverio Marchi, Simone Patergnani, et al. 2013. "Role of the c Subunit of the FO ATP Synthase in Mitochondrial Permeability Transition." *Cell Cycle* 12 (4): 674–83. doi:10.4161/cc.23599.
- Borutaite, Vilmante, Aiste Jekabsons, Ramune Morkuniene, and Guy C. Brown. 2003. "Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition Prevents Mitochondrial Dysfunction, Cytochrome c Release and Apoptosis Induced by Heart Ischemia." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35 (4): 357–66. doi:10.1016/S0022-2828(03)00005-1.
- Budas, Grant R., Eric N. Churchill, and Daria Mochly-Rosen. 2007. "Cardioprotective Mechanisms of PKC Isozyme-Selective Activators and Inhibitors in the Treatment of Ischemia-Reperfusion Injury." *Pharmacological Research, Emerging aspects on Protein Kinase C Therapeutics*, 55 (6): 523–36. doi:10.1016/j.phrs.2007.04.005.
- Chatham, John C. 2002. "Lactate – the Forgotten Fuel!" *The Journal of Physiology* 542 (Pt 2): 333. doi:10.1113/jphysiol.2002.020974.
- Chen, Qun, and Edward J. Lesnefsky. 2006. "Depletion of Cardiolipin and Cytochrome c during Ischemia Increases Hydrogen Peroxide Production from the Electron Transport Chain." *Free Radical Biology and Medicine* 40 (6): 976–82. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.043.
- Crompton, Martin, Sukaina Virji, and John M. Ward. 1998. "Cyclophilin-D Binds Strongly to Complexes of the Voltage-Dependent Anion Channel and the Adenine Nucleotide Translocase to Form the Permeability Transition Pore." *European Journal of Biochemistry* 258 (2): 729–35. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2580729.x.
- Cunnane, E. M., J. J. E. Mulvihill, H. E. Barrett, D. A. Healy, E. G. Kavanagh, S. R. Walsh, and M. T. Walsh. 2015. "Mechanical, Biological and Structural Characterization of Human Atherosclerotic Femoral Plaque Tissue." *Acta Biomaterialia* 11: 295–303. doi:10.1016/j.actbio.2014.09.024.
- DeBoer, Laurence WV, Joanne S. Ingwall, Robert A. Kloner, and Eugene Braunwald. 1980. "Prolonged Derangements of Canine Myocardial Purine Metabolism after a Brief Coronary Artery Occlusion Not Associated with Anatomic Evidence of Necrosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (9): 5471–75.
- Dutta, R. K., Bhavani P. Nenavathu, Mahesh K. Gangishetty, and A. V. R. Reddy. 2012. "Studies on Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticles by ROS Induced Lipid Peroxidation." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94: 143–50. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.046.

- Epp, Otto, Rudolf Ladenstein, and Albrecht Wendel. 1983. "The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0.2-Nm Resolution." *European Journal of Biochemistry* 133 (1): 51–69. doi:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07429.x.
- Fuster, Valentin, Lina Badimon, Juan J. Badimon, and James H. Chesebro. 1992. "The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes." *New England Journal of Medicine* 326 (4): 242–50. doi:10.1056/NEJM199201233260406.
- Giordano, Frank J. 2005. "Oxygen, Oxidative Stress, Hypoxia, and Heart Failure." *Journal of Clinical Investigation* 115 (3): 500–508. doi:10.1172/JCI24408.
- Giorgio, Marco, Enrica Migliaccio, Francesca Orsini, Demis Paolucci, Maurizio Moroni, Cristina Contursi, Giovanni Pelliccia, et al. 2005. "Electron Transfer between Cytochrome c and p66Shc Generates Reactive Oxygen Species That Trigger Mitochondrial Apoptosis." *Cell* 122 (2): 221–33. doi:10.1016/j.cell.2005.05.011.
- Giorgio, Valentina, Sophia von Stockum, Manuela Antoniel, Astrid Fabbro, Federico Fogolari, Michael Forte, Gary D. Glick, et al. 2013. "Dimers of Mitochondrial ATP Synthase Form the Permeability Transition Pore." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (15): 5887–92. doi:10.1073/pnas.1217823110.
- Gomberg, M. 1900. "AN INSTANCE OF TRIVALENT CARBON: TRIPHENYLMETHYL." *Journal of the American Chemical Society* 22 (11): 757–71. doi:10.1021/ja02049a006.
- Green, David W, and Gary J Grover. 2000. "The IF1 Inhibitor Protein of the Mitochondrial F1F0-ATPase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1458 (2–3): 343–55. doi:10.1016/S0005-2728(00)00085-2.
- Griendling, Kathy K., and Garret A. FitzGerald. 2003. "Oxidative Stress and Cardiovascular Injury Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS." *Circulation* 108 (16): 1912–16. doi:10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB.
- Grover, Gary J., Karnail S. Atwal, Paul G. Sleph, Feng-Li Wang, Hossain Monshizadegan, Thomas Monticello, and David W. Green. 2004. "Excessive ATP Hydrolysis in Ischemic Myocardium by Mitochondrial F1F0-ATPase: Effect of Selective Pharmacological Inhibition of Mitochondrial ATPase Hydrolase Activity." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 287 (4): H1747–55. doi:10.1152/ajpheart.01019.2003.
- Guzy, Robert D., Beatrice Hoyos, Emmanuel Robin, Hong Chen, Liping Liu, Kyle D. Mansfield, M. Celeste Simon, Ulrich Hammerling, and Paul T. Schumacker. 2005. "Mitochondrial Complex III Is Required for Hypoxia-Induced ROS Production and Cellular Oxygen Sensing." *Cell Metabolism* 1 (6): 401–8. doi:10.1016/j.cmet.2005.05.001.

- Haan, Judy B. de, Cécile Bladier, Peter Griffiths, Michael Kelner, Ross D. O'Shea, Nam Sang Cheung, R. T. Bronson, et al. 1998. "Mice with a Homozygous Null Mutation for the Most Abundant Glutathione Peroxidase, Gpx1, Show Increased Susceptibility to the Oxidative Stress-Inducing Agents Paraquat and Hydrogen Peroxide." *Journal of Biological Chemistry* 273 (35): 22528–36. doi:10.1074/jbc.273.35.22528.
- Halestrap, Andrew P., Paul M. Kerr, Sabzali Javadov, and K. -Y. Woodfield. 1998. "Elucidating the Molecular Mechanism of the Permeability Transition Pore and Its Role in Reperfusion Injury of the Heart." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1366 (1–2): 79–94. doi:10.1016/S0005-2728(98)00122-4.
- Han, Derick, Fernando Antunes, Raffaella Canali, Daniel Rettori, and Enrique Cadenas. 2003. "Voltage-Dependent Anion Channels Control the Release of the Superoxide Anion from Mitochondria to Cytosol." *Journal of Biological Chemistry* 278 (8): 5557–63. doi:10.1074/jbc.M210269200.
- Hemnani, T., and M. S. Parihar. 1998. "Reactive Oxygen Species and Oxidative DNA Damage." *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 42 (4): 440–52.
- Hey-Mogensen, Martin, Renata L. S. Goncalves, Adam L. Orr, and Martin D. Brand. 2014. "Production of superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Dihydroorotate Dehydrogenase in Rat Skeletal Muscle Mitochondria." *Free Radical Biology and Medicine* 72: 149–55. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.007.
- Hiraoka, W, N Vazquez, W Nieves-Neira, S J Chanock, and Y Pommier. 1998. "Role of Oxygen Radicals Generated by NADPH Oxidase in Apoptosis Induced in Human Leukemia Cells." *Journal of Clinical Investigation* 102 (11): 1961–68.
- Hirotsu, Shinichi, Kinya Otsu, Kazuhiko Nishida, Yoshiharu Higuchi, Takashi Morita, Hiroyuki Nakayama, Osamu Yamaguchi, et al. 2002. "Involvement of Nuclear Factor- $\kappa$ B and Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in G-Protein-Coupled Receptor Agonist-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy." *Circulation* 105 (4): 509–15. doi:10.1161/hc0402.102863.
- Holmgren, A, B O Söderberg, H Eklund, and C I Brändén. 1975. "Three-Dimensional Structure of Escherichia Coli Thioredoxin-S2 to 2.8 Å Resolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (6): 2305–9.
- Horstkotte, Jan, Tamara Perisic, Manuela Schneider, Philipp Lange, Melanie Schroeder, Claudia Kiermayer, Rabea Hinkel, et al. 2011. "Mitochondrial Thioredoxin Reductase Is Essential for Early Postischemic Myocardial Protection." *Circulation* 124 (25): 2892–2902. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.059253.
- Hüttemann, Maik, Icksoo Lee, Lobelia Samavati, Hong Yu, and Jeffrey W. Doan. 2007. "Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation through Cell Signaling." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773 (12): 1701–20. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.10.001.

- Johnson, James D., James G. Mehus, Kristin Tews, Barry I. Milavetz, and David O. Lambeth. 1998. "Genetic Evidence for the Expression of ATP- and GTP-Specific Succinyl-CoA Synthetases in Multicellular Eucaryotes." *Journal of Biological Chemistry* 273 (42): 27580–86. doi:10.1074/jbc.273.42.27580.
- Jonckheere, An I., Jan A. M. Smeitink, and Richard J. T. Rodenburg. 2012. "Mitochondrial ATP Synthase: Architecture, Function and Pathology." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 35 (2): 211–25. doi:10.1007/s10545-011-9382-9.
- Kagan, V. E., E. A. Serbinova, T. Forte, G. Scita, and L. Packer. 1992. "Recycling of Vitamin E in Human Low Density Lipoproteins." *Journal of Lipid Research* 33 (3): 385–97.
- Karihtala, Peeter, and Ylermi Soini. 2007. "Reactive Oxygen Species and Antioxidant Mechanisms in Human Tissues and Their Relation to Malignancies." *APMIS* 115 (2): 81–103. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_514.x.
- Kaufman, Seymour, Charles Gilvarg, Osvaldo Cori, and Severo Ochoa. 1953. "ENZYMATIC OXIDATION OF  $\alpha$ -KETOGLUTARATE AND COUPLED PHOSPHORYLATION." *Journal of Biological Chemistry* 203 (2): 869–88.
- Kc, Sagun, Juan M. Cárcamo, and David W. Golde. 2005. "Vitamin C Enters Mitochondria via Facilitative Glucose Transporter 1 (Glut1) and Confers Mitochondrial Protection against Oxidative Injury." *The FASEB Journal* 19 (12): 1657–67. doi:10.1096/fj.05-4107com.
- Keller, Gilbert-Andre, Thomas G. Warner, Kathelyn S. Steimer, and Robert A. Hallewell. 1991. "Cu,Zn Superoxide Dismutase Is a Peroxisomal Enzyme in Human Fibroblast and Hepatoma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16): 7381–85.
- Kevin, Leo G., Enis Novalija, and David F. Stowe. 2005. "Reactive Oxygen Species as Mediators of Cardiac Injury and Protection: The Relevance to Anesthesia Practice?" *Anesthesia & Analgesia* 101 (5): 1275–87. doi:10.1213/01.ANE.0000180999.81013.D0.
- Krasnow, Norman, William A. Neill, Joseph V. Messer, and Richard Gorlin. 1962. "MYOCARDIAL LACTATE AND PYRUVATE METABOLISM\*." *Journal of Clinical Investigation* 41 (11): 2075–85.
- Kulich, Scott M., and Charleen T Chu. 2003. "Role of Reactive Oxygen Species in Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Phosphorylation and 6-Hydroxydopamine Cytotoxicity." *Journal of Biosciences* 28 (1): 83–89.
- Levine, Rodney L., Laurent Mosoni, Barbara S. Berlett, and Earl R. Stadtman. 1996. "Methionine Residues as Endogenous Antioxidants in Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (26): 15036–40.

- Lushchak, Volodymyr I. 2014. "Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Its Classification." *Chemico-Biological Interactions* 224: 164–75. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016.
- Martin, Jennifer L. 1995. "Thioredoxin —a Fold for All Reasons." *Structure* 3 (3): 245–50. doi:10.1016/S0969-2126(01)00154-X.
- Masella, Roberta, Roberta Di Benedetto, Rosaria Vari, Carmela Filesi, and Claudio Giovannini. 2005. "Novel Mechanisms of Natural Antioxidant Compounds in Biological Systems: Involvement of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16 (10): 577–86. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
- McCord, Joe M., and Irwin Fridovich. 1969. "Superoxide Dismutase AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN)." *Journal of Biological Chemistry* 244 (22): 6049–55.
- Migliaccio, E, S Mele, A E Salcini, G Pelicci, K M Lai, G Superti-Furga, T Pawson, P P Di Fiore, L Lanfrancone, and P G Pelicci. 1997. "Opposite Effects of the p52shc/p46shc and p66shc Splicing Isoforms on the EGF Receptor-MAP Kinase-Fos Signalling Pathway." *The EMBO Journal* 16 (4): 706–16. doi:10.1093/emboj/16.4.706.
- Murphy, E., C. Steenbergen, L. A. Levy, B. Raju, and R. E. London. 1989. "Cytosolic Free Magnesium Levels in Ischemic Rat Heart." *Journal of Biological Chemistry* 264 (10): 5622–27.
- Murphy, Michael P. 2009. "How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species." *Biochemical Journal* 417 (Pt 1): 1–13. doi:10.1042/BJ20081386.
- Neely, J. R., and L. W. Grotyohann. 1984. "Role of Glycolytic Products in Damage to Ischemic Myocardium. Dissociation of Adenosine Triphosphate Levels and Recovery of Function of Reperfused Ischemic Hearts." *Circulation Research* 55 (6): 816–24. doi:10.1161/01.RES.55.6.816.
- Nordberg, Jonas, and Elias S. J. Arnér. 2001. "Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin system1." *Free Radical Biology and Medicine* 31 (11): 1287–1312. doi:10.1016/S0891-5849(01)00724-9.
- Oppenheimer, L., V. P. Wellner, O. W. Griffith, and A. Meister. 1979. "Glutathione Synthetase. Purification from Rat Kidney and Mapping of the Substrate Binding Sites." *Journal of Biological Chemistry* 254 (12): 5184–90.
- Orr, Adam L., Casey L. Quinlan, Irina V. Perevoshchikova, and Martin D. Brand. 2012. "A Refined Analysis of Superoxide Production by Mitochondrial Sn-Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (51): 42921–35. doi:10.1074/jbc.M112.397828.
- Pandey, Kanti Bhooshan, Neetu Mishra, and Syed Ibrahim Rizvi. 2010. "Protein Oxidation Biomarkers in Plasma of Type 2 Diabetic Patients." *Clinical Biochemistry* 43 (4–5): 508–11. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.11.011.

- Paradies, Giuseppe, Giuseppe Petrosillo, Marilva Pistolese, Nicola Di Venosa, Donato Serena, and Francesca M Ruggiero. 1999. "Lipid Peroxidation and Alterations to Oxidative Metabolism in Mitochondria Isolated from Rat Heart Subjected to Ischemia and Reperfusion." *Free Radical Biology and Medicine* 27 (1–2): 42–50. doi:10.1016/S0891-5849(99)00032-5.
- Paradies, Giuseppe, Giuseppe Petrosillo, Marilva Pistolese, Nicola Di Venosa, Antonio Federici, and Francesca Maria Ruggiero. 2004. "Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin." *Circulation Research* 94 (1): 53–59. doi:10.1161/01.RES.0000109416.56608.64.
- Pasdois, Philippe, Joanne E. Parker, Elinor J. Griffiths, and Andrew P. Halestrap. 2011. "The Role of Oxidized Cytochrome c in Regulating Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production and Its Perturbation in Ischaemia." *Biochemical Journal* 436 (Pt 2): 493–505. doi:10.1042/BJ20101957.
- Petrosillo, Giuseppe, Francesca M. Ruggiero, and Giuseppe Paradies. 2003. "Role of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin in the Release of Cytochrome c from Mitochondria." *The FASEB Journal* 17 (15): 2202–8. doi:10.1096/fj.03-0012com.
- Petrosillo, Giuseppe, Francesca M. Ruggiero, Nicola Di Venosa, and Giuseppe Paradies. 2003. "Decreased Complex III Activity in Mitochondria Isolated from Rat Heart Subjected to Ischemia and Reperfusion: Role of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin." *The FASEB Journal*, February. doi:10.1096/fj.02-0729fje.
- Pitkanen, S, and B H Robinson. 1996. "Mitochondrial Complex I Deficiency Leads to Increased Production of Superoxide Radicals and Induction of Superoxide Dismutase." *Journal of Clinical Investigation* 98 (2): 345–51. doi:10.1172/JCI118798.
- Puppo, A, and B Halliwell. 1988. "Formation of Hydroxyl Radicals from Hydrogen Peroxide in the Presence of Iron. Is Haemoglobin a Biological Fenton Reagent?" *Biochemical Journal* 249 (1): 185–90.
- Quinlan, Casey L., Adam L. Orr, Irina V. Perevoshchikova, Jason R. Treberg, Brian A. Ackrell, and Martin D. Brand. 2012. "Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse Reactions." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (32): 27255–64. doi:10.1074/jbc.M112.374629.
- Rogers, Lynette K., Toshiya Tamura, Bryan J. Rogers, Stephen E. Welty, Thomas N. Hansen, and Charles V. Smith. 2004. "Analyses of Glutathione Reductase Hypomorphic Mice Indicate a Genetic Knockout." *Toxicological Sciences* 82 (2): 367–73. doi:10.1093/toxsci/kfh268.

- Samoylenko, Anatoly, Jubayer Al Hossain, Daniela Mennerich, Sakari Kellokumpu, Jukka Kalervo Hiltunen, and Thomas Kietzmann. 2013. "Nutritional Countermeasures Targeting Reactive Oxygen Species in Cancer: From Mechanisms to Biomarkers and Clinical Evidence." *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (17): 2157–96. doi:10.1089/ars.2012.4662.
- Sauer, H., G. Rahimi, J. Hescheler, and M. Wartenberg. 1999. "Effects of Electrical Fields on Cardiomyocyte Differentiation of Embryonic Stem Cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 75 (4): 710–23.
- Shibanuma, M., T. Kuroki, and K. Nose. 1991. "Release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Phosphorylation of 30 Kilodalton Proteins as Early Responses of Cell Cycle-Dependent Inhibition of DNA Synthesis by Transforming Growth Factor Beta 1." *Cell Growth & Differentiation* 2 (11): 583.
- Sies, H. 1997. "Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants." *Experimental Physiology* 82 (2): 291–95.
- Sies, Helmut. 2013. *Oxidative Stress*. Elsevier.
- Solaini, Giancarlo, and David A. Harris. 2005. "Biochemical Dysfunction in Heart Mitochondria Exposed to Ischaemia and Reperfusion." *Biochemical Journal* 390 (Pt 2): 377–94. doi:10.1042/BJ20042006.
- Sorescu, Dan, and Kathy K. Griendling. 2002. "Reactive Oxygen Species, Mitochondria, and NAD(P)H Oxidases in the Development and Progression of Heart Failure." *Congestive Heart Failure* 8 (3): 132–40. doi:10.1111/j.1527-5299.2002.00717.x.
- St-Pierre, Julie, Martin D. Brand, and Robert G. Boutilier. 2000. "Mitochondria as ATP Consumers: Cellular Treason in Anoxia." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (15): 8670–74.
- St-Pierre, Julie, Julie A. Buckingham, Stephen J. Roebuck, and Martin D. Brand. 2002. "Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain." *Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 44784–90. doi:10.1074/jbc.M207217200.
- Suematsu, Nobuhiro, Hiroyuki Tsutsui, Jing Wen, Dongchon Kang, Masaki Ikeuchi, Tomomi Ide, Shunji Hayashidani, et al. 2003. "Oxidative Stress Mediates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction in Cardiac Myocytes." *Circulation* 107 (10): 1418–23. doi:10.1161/01.CIR.0000055318.09997.1F.
- Taverne, Yannick J. H. J., Ad J. J. C. Bogers, Dirk J. Duncker, and Daphne Merkus. 2013. "Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular System." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013. doi:10.1155/2013/862423.

- Thandroyen, F. T., D. Bellotto, A. Katayama, H. K. Hagler, J. T. Willerson, and L. M. Buja. 1992. "Subcellular Electrolyte Alterations during Progressive Hypoxia and Following Reoxygenation in Isolated Neonatal Rat Ventricular Myocytes." *Circulation Research* 71 (1): 106–19.
- Tiwari, Brahm Kumar, Kanti Bhooshan Pandey, Nidhi Jaiswal, A. B. Abidi, and Syed Ibrahim Rizvi. 2014. "Anti-Diabetic and Anti-Oxidative Effect of Composite Extract of Leaves of Some Indian Plants on Alloxan Induced Diabetic Wistar Rats." *Journal of Pharmaceutical Investigation* 44 (3): 205–11. doi:10.1007/s40005-014-0116-5.
- Tretter, Laszlo, and Vera Adam-Vizi. 2004. "Generation of Reactive Oxygen Species in the Reaction Catalyzed by  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase." *The Journal of Neuroscience* 24 (36): 7771–78. doi:10.1523/JNEUROSCI.1842-04.2004.
- Trumpower, Bernard L. 2002. "A Concerted, Alternating Sites Mechanism of Ubiquinol Oxidation by the Dimeric Cytochrome bc(1) Complex." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1555 (1-3): 166–73.
- Turrens, Julio F. 1997. "Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain." *Bioscience Reports* 17 (1): 3–8. doi:10.1023/A:1027374931887.
- Turrens, Julio F. 2003. "Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species." *The Journal of Physiology* 552 (Pt 2): 335–44. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478.
- Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T. D. Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser. 2007. "Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- Veitch, K, A Hombroeckx, D Caucheteux, H Pouleur, and L Hue. 1992. "Global Ischaemia Induces a Biphasic Response of the Mitochondrial Respiratory Chain. Anoxic Pre-Perfusion Protects against Ischaemic Damage." *Biochemical Journal* 281 (Pt 3): 709–15.
- Wilde, A. A., D. Escande, C. A. Schumacher, D. Thuringer, M. Mestre, J. W. Fiolet, and M. J. Janse. 1990. "Potassium Accumulation in the Globally Ischemic Mammalian Heart. A Role for the ATP-Sensitive Potassium Channel." *Circulation Research* 67 (4): 835–43. doi:10.1161/01.RES.67.4.835.
- Yan, N., and A. Meister. 1990. "Amino Acid Sequence of Rat Kidney Gamma-Glutamylcysteine Synthetase." *Journal of Biological Chemistry* 265 (3): 1588–93.
- Yu, Tianzheng, James L. Robotham, and Yisang Yoon. 2006. "Increased Production of Reactive Oxygen Species in Hyperglycemic Conditions Requires Dynamic Change of Mitochondrial Morphology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8): 2653–58. doi:10.1073/pnas.0511154103.
- Zhang, Z., L. Huang, V. M. Shulmeister, Y. I. Chi, K. K. Kim, L. W. Hung, A. R. Crofts, E. A. Berry, and S. H. Kim. 1998. "Electron Transfer by Domain Movement in Cytochrome bc1." *Nature* 392 (6677): 677–84. doi:10.1038/33612.