

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů



Úloha mitochondrií v kardioprotektivním působení hypoxie u potkana

Bakalářská práce

Matouš Lomnický

Praha 2010

Školitel: RNDr. Jitka Žurmanová, PhD.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně, na základě uvedené literatury.

V Praze dne 2010

.....

Matouš Lomnický

Na tomto místě děkuji RNDr. Jitce Žurmanové, PhD. za čas, který mi věnovala a za cenné odborné rady a připomínky, které přispěly ke vzniku této bakalářské práce.

1 Abstrakt

K udržení homeostázy potřebuje aerobní organismus dostatečný přísun kyslíku. Často jsou však tyto organismy přirozeně vystavovány hypoxickému prostředí a stejně tak dochází k hypoxickým stavům za různých patologických podmínek. Již pře více jak 30-ti lety vědci objevili kardioprotektivní působení chronické hypoxie a později objevili i kardioprotektivní působení tzv. „ischemického preconditioningu“. Dlouhodobé vystavení středně silné hypoxii aktivuje kardioprotektivní mechanismy snižující následky krátkodobé ischemie myokardu a průběh dalších zdravotních komplikací. Podstata protektivních mechanismů není dosud zcela objasněna. Tato práce pojednává o úloze mitochondrií v adaptaci organismu vedoucí ke kardioprotekci během středně silné hypoxie. Popisuje fyziologické adaptivní procesy vybraných živočichů na přirozené hypoxické prostředí i molekulární mechanismy studované na experimentálních modelech. Dosud zjištěné molekulární mechanismy vzniku kardioprotektivního účinku ukazují převážně na signální dráhy protein kinázy C přes tyrozinové kinázy a mitogeny aktivované kinázy na aktivaci sarkolemálních a mitochondriálních K^+ kanálů závislých na ATP. Otevření těchto kanálů může chránit mitochondrie před vápníkovým přetížením, nebo jejich otevření vede ke zvětšení objemu mitochondrií, které je patrně součástí intracelulární komunikace mezi organelami. Též se uvádí jejich významná funkce v zamezení otevření mitochondriálního permeabilního póru (mPTP), což předchází buněčné smrti. Adaptace buněk na hypoxické stimuly je též realizována na úrovni restrukturalizace mitochondriálního uspořádání, jehož podstata tkví v dynamickým splýváním a dělením těchto organel, podle akutních energetických požadavků buňky.

Klíčová slova

Hypoxie, preconditioning, mitochondrie, kardioprotekce, fusion, fission, sarc K_{ATP} -kanály, mito K_{ATP} -kanály

The abstract

Aerobic organisms need sufficient oxygen supply to maintain homeostasis. These organisms are frequently exposed in hypoxic environments naturally, and also occur in hypoxic states in various pathological conditions. Cardioprotective effect of hypoxia had been recognised more than 30 years ago; and later on, cardioprotective effects of ischemic preconditioning were discovered. Long term exposure to hypobaric hypoxia activates cardioprotective mechanisms, which lower the aftermaths of short term ischemia of myocardia and the effects of further health complications. The core of protective mechanisms has not yet been fully clarified. This work deals with the significance of mitochondria on cardioprotection during hypobaric hypoxia adaptation. This work describes physiological adaptive processes on selected animals on natural hypoxic conditions and also molecular mechanisms, examined on experimental models. Molecular mechanisms of the origins of cardioprotective effects discovered so far, mainly indicate PKC signal pathways through tyrosine kinase and mitogenes of activated kinase and also indicate an activation of sarcK_{ATP}-channels and mitoK_{ATP}-channels. Opening of these channels can protect mitochondria against a Ca²⁺ overload, or can lead to an increase in mitochondrial capacity which is possibly connected with intracellular communication between organelles. Moreover, it can also inhibit the opening of mPTP, and thus prevent the cell from dying. Cellular adaptation upon hypoxic conditions is also realised by means of restructuring mitochondrial organisation, the basics of which is dynamic fusion and fission of these organelles, in response to acute cellular energy demands.

The key words

Hypoxia, preconditioning, mitochondrion, cardioprotection, fusion, fission, sarcK_{ATP}-channel, mitoK_{ATP}-channel

Obsah:

1	Abstrakt	3
2	Seznam zkratek	6
3	Úvod – Hypoxie v srdci	7
4	Adaptace na chronickou hypoxii	10
4.1	Hypoxie u studenokrevných živočichů	10
5	Mitochondrie jako senzory pO ₂	14
6	Kardioprotektivní úlohy mitochondrie.....	15
7	Využití srdečních paliv.....	17
8	Biogeneze mitochondrií	19
8.1	Fusion and Fission.....	20
9	K _{ATP} kanály srdečního svalu během normoxických podmínek.....	23
9.1	Účast sarcK _{ATP} kanálů na IPC.....	24
9.2	Účast mitoK _{ATP} kanálů na IPC	25
9.3	Adenosine-enhanced ischemic preconditioning	28
10	Závěr.....	30
11	Použitá literatura	31

2 Seznam zkratek

AP	akční potenciál
APC	adenosinem indukovaný ischemický preconditioning
ATP	adenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECC	spřažení excitace a kontrakce (excitation-contraction coupling)
HR1	heptapeptid na N-terminální části Mfn1/2
HR2	heptapeptid na C-terminální části Mfn1/2
IPC	ischemický preconditioning
K _{ATP} – kanál	ATP-senzitivní draslíkový kanál
Mfn1	mitofusin 1 (protein)
Mfn2	mitofusin 2 (protein)
mitoK _{ATP} – kanál	K _{ATP} – kanál na mitochondriální membráně
mtDNA	mitochondriální DNA
mPTP	mitochondriální „permeability transition“ pór
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
OPA1	protein procesu fusion
PC	preconditioning
PKC	protein kináza C
PPAR α	peroxisome proliferator-activated receptor α
ROS	volné radikály kyslíku (reactive oxygen species) ()
sarcK _{ATP} – kanál	K _{ATP} – kanál na sarcoplasmě

3 Úvod – Hypoxie v srdci

Stálý přísun kyslíku je nezbytný pro udržení života, a proto si živočichové vyvinuli nejrůznější obranné mechanismy, které zajišťují udržování rovnováhy mezi požadavkem a přísunem kyslíku. I přesto, musí organismus často čelit narušování této rovnováhy, kdy je přísun kyslíku částečně nebo zcela zamezen. Jeho reakce záleží pak na tom, jak vážnou hypoxii organismus prochází. V případě, že je organismus vystaven silné a intenzivní hypoxii, může to vést až k odumírání buněk a k srdečnímu selhání s následnou smrtí organismu. Ale středně těžká chronická hypoxie může naopak u organismu vyvolat změny, které vedou k posílení obranných mechanismů tím, že spustí určité regulační dráhy.

Hypoxie myokardu je výsledek disproporce mezi dodávkou kyslíku a požadavky na jeho spotřebu. Vzhledem k velké arteriovenózní diferenci, tkáň myokardu není schopna zlepšit dodávku kyslíku zvýšenou extrakcí, ale pouze zvýšením průtoku v koronárních tepnách (Obr.1.). Existují čtyři nejběžnější mechanismy vzniku hypoxie v myokardu. (i) Ischemická hypoxie, běžně popisována jako ischemie myokardu, je indukována snížením nebo přerušením průtoku v koronárních tepnách. (ii) Systémová (hypoxická) hypoxie, též srdeční hypoxie, je způsobena poklesem pO_2 v arteriální krvi při dostatečném průtoku. (iii) Anemická hypoxie je pokles transportní kapacity krve pro kyslík při normálním průtoku a (iv) histotoxická hypoxie vychází ze snížené intracelulárního využití kyslíku při dostatečné saturaci kyslíkem krve i průtoku (to může být způsobeno inhibicí oxidativních enzymů, např. kyanidem).

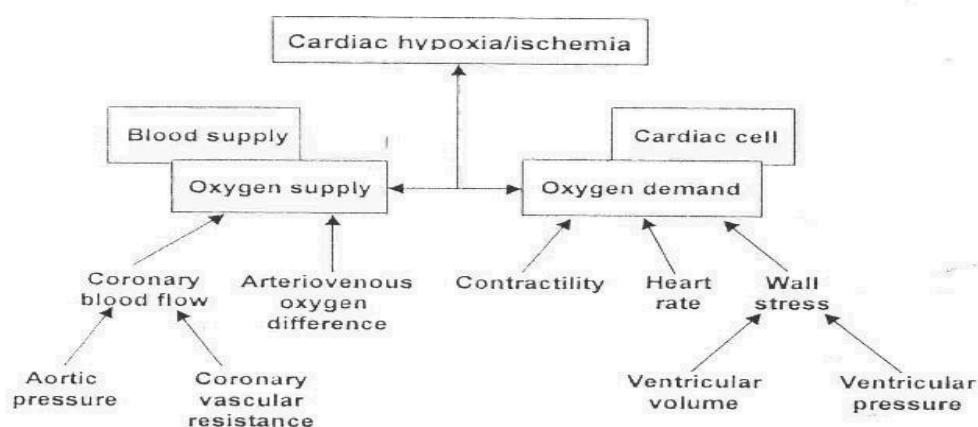


Figure 1
Factors influencing myocardial oxygen supply and demand.

Obr.1. Faktory ovlivňující dodávku a spotřebu kyslíku v myokardu (převzato Ošťádal a Kolář, 1999)

Termín ischemie v pravém slova smyslu znamená nedostatek krve. Avšak většina odborníků dává přednost jeho použití ve smyslu nedostatku kyslíku a substrátu vůči požadavkům tkáně, který vede k anaerobnímu metabolismu a nedostatečnosti kontraktilní funkce (Verdouw et al., 1998; podle Ostadal et al., 1999). Hearse et al. (1994) doporučují rozlišovat „biochemickou“ a fyziologickou ischemii: biochemická ischemie může být jednoduše definována jako nedostatečný průtok, jehož následkem je ztráta ustáleného stavu (steady-state) metabolismu. Zde je nutné zdůraznit, že zahrnuje též fyziologické ischemie, kdy je neadekvátní průtok (perfúze) krve, který nemůže pokrýt fyziologické požadavky tkáně v celém rozsahu její fyziologické aktivity. Je nezbytné si uvědomit, že ischemie zahrnuje kromě nedostatečné dodávky kyslíku a substrátů též nedostatečný odvod zplodin metabolismu. S tím souvisí pokles pH, akumulace produktů glykolýzy a snížení kontraktilní funkce. Na rozdíl od systémové hypoxie, kde je dostatečně odmýván veškerý substrát metabolismu (pro přehled Ostadal a Kolar, 1999; Opie, 1998).

Následkem těchto omezení tedy dochází k ischemickému poškození srdeční tkáně. Rozsah ischemického poškození srdce nezávisí jen na intenzitě a trvání hypoxického stimulu, ale také na stupni odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku. Dalším aspektem je ischemicko-reperfúzní poškození tkáně po obnovení přísunu kyslíku ke tkáním, které je způsobeno obrovským nárůstem volných radikálů kyslíku (ROS).

V dnešní době se tak do popředí výzkumu dostává studium účinných kardioprotektivních fenoménů, které jsou vyvolávány dlouhodobou adaptací na hypoxii a krátkodobým vystavením ischemii, tzv. „ischemic preconditioning“ (IPC). IPC je rychlá adaptivní odpověď myokardu na krátkodobou ischemii, která oddálí nástup buněčné smrti v průběhu následující dlouhodobé ischemie. První práce, které provedl Murry a kol. v roce 1986 (Murry et al., 1986; podle Gross a Peart, 2003) ukázaly snížení velikosti infarktu myokardu o 75% ve srovnání s kontrolními daty.

Uchopit zkratku IPC jazykem českým je podstatně složitější, než dvouslovný anglický překlad „ischemic preconditioning“. Ve své podstatě se jedná o speciální přípravnou fázi, která se skládá z krátkých intervalů, během kterých je tkáň vystavována subletální ischemii, což by mělo mít za následek, buď prodlení, nebo redukci závažných nekrotických důsledků dlouhotrvající ischemie (Jovanovic et al., 1998; podle Gross a Peart, 2003). Po působení krátkých, ischemických epizod nastávají dvě fáze odpovědi na IPC, které mají protektivní charakter: první, nebo-li časná fáze, trvající 1-3 hodiny ihned po skončení působení podnětů a druhá, nebo-li opožděná, fáze (také nazývána „second window“), která začíná mezi 18-24 hodinou po skončení působení stimulů a dále trvající 24-72 hodin. Odpověď

organismu v první fázi se dá přirovnat k buněčné odpovědi na stres (např. otevřením K_{ATP} kanálů) a druhá fáze velmi pravděpodobně souvisí se změnami na úrovni genové exprese, resp. posttranslační modifikace proteinů (Baines et al., 2001; podle Gross a Peart, 2003). Tyto odpovědi ovlivňují velikost nekrotické oblasti po vyvolání infarktu myokardu, výskyt srdečních arytmí a postischemickou obnovu kontraktilních funkcí. Jako hlavní ukazatel posuzování efektivity IPC je právě rozsah poškození po navození infarktu a výskyt srdečních arytmí, který je však přímo vázaný na živočišné druhy. Možnými spouštěči jsou adenosin, katecholaminy, bradykinin, oxid dusnatý (NO) a další látky, které jsou uvolňovány během stimulů PC (preconditioning). Schopnost těchto látek vyvolat IPC také závisí na živočišném druhu, na délce trvání a intenzitě stimulů PC (Gross a Fryer, 1999; podle Gross a Peart, 2003). Signální dráhy, které zajišťují kontinuální průběh již spuštěného IPC jsou například Src tyrosin kináza, protein kináza C (PKC), fosfotidylinositol-3 kináza, p38 mitogen-aktivující protein kináza (MAPK) a JAK/STAT cesty (Baines et al., 2001; podle Gross a Peart, 2003).

4 Adaptace na chronickou hypoxii

Adaptace na hypoxii obecně zahrnují zvýšenou tvorbu erytrocytů a zároveň rozvoj angiogeneze, zvyšující dodávku kyslíku a dále a metabolickou přestavbu, která v srdci zvyšuje využití efektivnějšího palivového substrátů vzhledem ke spotřebě kyslíku, jako jsou sacharidy (pro přehled Essop, 2007). Adaptační mechanismy existují na více úrovních – v literatuře se setkáváme s krátkodobou adaptací, již zmiňovaným „preconditioningem“. Dlouhodobé adaptační mechanismy též vykazují kardioprotektivní působení s dlouhodobějším účinkem. Vystavení chronické hypoxii snižuje všechny hlavní projevy ischemicko-reperfúzního poškození jako je velikost infarktu, postischemická kontraktilní dysfunkce či ischemické a reperfúzní komorové arytmie (pro přehled Essop, 2007). Dále působí jako prevence různých jiných onemocnění jako je např. hypertenze (Hurtado, 1960; podle Essop, 2007).

Shrnuto a podtrženo, v organismu, který je vystaven hypoxii, dochází k adaptačním mechanismům, které reagují přímo na aktuální nižší přísun kyslíku a spouští kaskádu reakcí, které při snížené dostupnosti kyslíku v delší časové perspektivě vedou k metabolické i strukturální re-modelaci srdce. Tyto změny zahrnují posun k lepšímu využití sacharidů (tzv. fetální genový program) a zvýšenou mitochondriální respirační funkci pro udržení a zvýšené efektivnosti výroby energie v mitochondriích, čímž se zachovává kontraktilní funkce.

4.1 Hypoxie u studenokrevných živočichů

Není žádnou výjimkou, že se obratlovci přirozeně vyskytují v hypoxickém prostředí, ba naopak se některé druhy do těchto podmínek dostávají poměrně často a s železnou pravidelností. Různé skupiny živočichů mají odlišné strategie, jak přežít v hypoxických podmínkách. Celý tento proces závisí na mnoha vnitřních a vnějších faktorech. Dobrým příkladem jsou kaprovité ryby (*Cyprinidae*), nebo sladkovodní želvy (*Testudines*) přezimující v zamrzlém rybníku, který se vlivem zalednění, a při nedostatku světla pro fotosyntézu, stává postupně velmi hypoxickým (pro přehled Stecyk et al., 2008). Karasi obecní (*Carassius carassius*, L.) i želvy se dostávají do hypoxického prostředí přirozeně za podmínek nízkých teplot, kdy ryby snižují svoji aktivitu, přestávají přijímat potravu a ukládají se do uložišť.

Tito reprezentanti dvou živočišných tříd: paprskoploutvích (*Actinopterygii*) a plazů (*Reptilia*) patří mezi tzv. studenokrevné živočichy, a proto je třeba mít na paměti, že mají rozdílnou anatomickou morfologickou stavbu těla a tedy i mírně odlišnou fyziologii, než

teplokrevní, zvláště jedná-li se o savce (*Mammalia*). Dále, že teplota mění kinetickou energii molekul. Tím se také ovlivňuje rychlost chemických reakcí a se změnou rychlosti chemických reakcí ve studenokrevném organismu se mění i jeho celková rychlost metabolismu. Proto u studenokrevných živočichů aktivita jejich metabolismu přímo závisí na teplotě prostředí, ve kterém se právě vyskytují.

Z elektrofyziologického pohledu je dobré mít na zřeteli morfologii kardiomyocytů želv, potažmo všech studenokrevných obratlovců; pro připomenutí se jedna o velmi dlouhé, větvenovité útvary s nedostatkem T-tubulů s velkým poměrem povrchu ku objemu (cca 18:1), kde celkový objem buňky odpovídá ~ 2 pl (Galli et al., 2006; podle Stecyk et al., 2008). Z experimentů vyplývá, že hlavní roli při kontrakci hrají kationty Ca^{2+} , které se transferují přes L- Ca^{2+} kanály. Velkou měrou přes NCX ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) a poměrně nízkým podílem přes sarkoplasmatickou membránu (Galli et al., 2006; podle Stecyk et al., 2008). Nicméně, ukázalo se, že efekt dlouhotrvající anoxie na elektrofyziologické parametry a na akční potenciál byl minimální (Stecyk et al., 2007), kdy nárůst doby trvání a změna průběhu akčního potenciálu byly úměrné redukci přirozené tepové frekvence (Stecyk and Farrell, 2007; podle Stecyk et al., 2008). Bylo zjištěno, že tok I_{K1} (inward rectifier K^+ current) klesne o 18-33%, což sníží vodivost vnitřních K^+ kanálů o 45%. Ionty K^+ mají význam při repolarizaci membrán během akčního potenciálu a depolarizaci vyvolává Na^+ přes I_{Na} (voltage-gated Na^+ current). Depolarizace však též závisí na tocích vyvolávajících repolarizaci a tedy i na I_{K1} . Pokud na začátku akčního potenciálu tok I_{K1} překrývá napěťové rozpětí toku I_{Na} tak se snižuje potřebná síť depolarizačních toků (Golod et al., 1998; podle Stecyk et al., 2008). A proto snížení hustoty I_{K1} a vodivosti během anoxie, znamená nižší hladinu Na^+ potřebnou ke spuštění akčního potenciálu. Snížení hustoty I_{K1} a vodivosti snižuje požadavek na Na^+/K^+ -ATPázy pro přesun K^+ přes sarkolemu během chronické anoxie (Roden et al., 2002; podle Stecyk et al., 2008).

To jsou sice podstatné rozdíly mezi studenokrevnými organismy a teplokrevnými živočichy, ale pro stručný úvod do fyziologických mechanismů, které se uplatňují během srdeční hypoxie a pro uvědomění si základních překážek, kterým musí každý organismus čelit během hypoxie, zde předkládám jejich strategie pro přežití v hypoxickém prostředí.

Přežití nejen studenokrevných živočichů během hypoxie je podmíněno úspěšným udržením rovnováhy mezi produkcí a spotřebou buněčného ATP (adenosintrifosfát); (pro připomenutí z 1 mol glukózy se získá 29 mol ATP při aerobním metabolismu, zatímco při anaerobní glykolýze získá asi 1/14 ATP zisku aerobní fosforylace); (Sofrova et al., 2005). Druhý důležitý mechanismus ochrany organismu je zaměřen proti zvyšování produktů

z anaerobního metabolismu (vodík - H^+ , laktát), které by zvyšovaly kyselost vnitřního prostředí a dále ovlivňovaly (snižovaly) sílu srdeční kontrakce a mohly tak navodit až vážné srdeční arytmie (pro přehled Stecyk et al., 2008).

Pro zajištění přežití v anoxických podmínkách volí sladkovodní želvy a karasi obecní rozdílné strategie. Chladné prostředí výrazně snižuje srdeční frekvenci, systémový, srdeční výkon a jeho sílu u sladkovodních želv, tím se stávají pasivní a rychlost jejich metabolismu klesne až pod 10% normoxického metabolického obratu, čímž sníží požadavek ATP na mechanickou práci pod hranici výnosu ATP z anaerobní glykolýzy. Během tohoto procesu klesá hustota toku sarkolemálních iontů v srdci želv, tím je snížena aktivita Na^+/K^+ -ATPázy, čímž dochází k dalšímu šetření energie. Do této kompenzace želvy nezapojují autonomní, srdeční ovladač, ale přesto je organismem regulována, nicméně na změnách v organismu se vyšší mírou podílí vliv chladného prostředí. Organismus dokáže aktivně regulovat funkčnost L-typ Ca^{2+} kanálů.

Naproti tomu karasové zůstávají při dlouhotrvající hypoxii aktivní, leč na akutní hypoxii reagují, stejně jako želvy, bradykardií. Ze začátku se rychlost jejich metabolismu sníží cca na 1/3 normoxických hodnot a energetická produkce ATP klesne na 30 - 40% běžné produkce. Ovšem již po 48 hodinách strávených v hypoxickém prostředí při 8 °C, se jejich srdeční výkon, srdeční frekvence a síla srdečního výkonu navrací na úroveň řízení při normoxických podmínkách. Tento jev naznačuje schopnost udržování běžné srdeční činnosti pod úrovní výnosu energie ATP z anaerobního metabolismu, jak při hypoxických, tak ale i při normoxických podmínkách, a to kvůli nízké síle srdečního výkonu a tomu odpovídajícímu nižšímu, arteriálnímu, krevnímu tlaku. Jejich nervový řídicí systém zůstává funkční, a to jak autonomní řízení srdeční činnosti, tak mozková aktivita. Z počátku tkví tedy hlavní snížení požadavku na ATP v bradykardii, která je vyvolána reflexní reakcí na anoxii a která je navozována v chladném prostředí (pro přehled Stecyk et al., 2008). Protože se zdá, že ryby dokáží udržet požadavek metabolismu na ATP při normoxických podmínkách pod úrovní zisku energie z anaerobního metabolismu, o hlavním významu bradykardie u ryb během počátku hypoxie se stále vedou diskuse. Může za to hlavně nestabilní dodávka kyslíku do srdce a schopnost ryb významně zvýšit objem srdeční komory před jeho úderem. Může se jednat o prodloužení diastolické fáze, které by zajistilo delší čas pro difúzi kyslíku, čímž by byla zlepšena srdeční stažitelnost. Dále se může jednat o snížení síly srdečního výkonu. Smělá hypotéza tvrdí, že by odstranění bradykardie mohlo u ryb vyvolat možnost „vzdušného“ dýchání (Lutz, 2007).

Při dlouhodobé anoxii se začínají kumulovat škodlivé látky, jakožto výsledek anaerobního metabolismu. Na tento jev reagují želvy tím, že uvolňují Ca^{2+} , Mg^{2+} a Na^+ uhličitany z kostí a krunýře a naopak do nich izolují laktát a H^+ , čímž kosti a krunýř působí, jako „nárazová zóna“. Naproti tomu karasi obecní přeměňují laktát na ethanol a CO_2 a tyto produkty uvolňují do okolní vody. Rozložením laktátu dále obnovují poměr NAD^+/NADH , což ovšem nijak nezmění ztrátový, chemický potenciál k prostředí. I přesto, že želvy i karasi účelově reagují na vyšší hladinu laktátu a H^+ , nepodaří se jim eliminovat veškeré škodlivé produkty anaerobního metabolismu. To má za následek pokles pH krevní plasmy u želv na hodnotu 7,0 - 6,7, vzhledem k nárůstu koncentrace laktátu v plazmě až na 200 mM. U karasů je pokles hodnoty pH ze 7,7 na 7,4 a zvýšení koncentrace laktátu v plazmě dosahuje 8-10 mM. Během acidózy při anoxii musí být pH řízeno vzhledem k nebezpečí oslabení síly srdečního svalu a změně v průběhu srdečního akčního potenciálu. Toto snížení pH má za následek i nižší intracelulární pH a tím se ovlivňuje sprážením excitace a kontrakce (ECC). Studenokrevní živočichové se chrání proti acidóze také humorálně. Positivní, inotropní efekt adrenalinu může chránit srdeční svalovinu před škodlivými efekty hypoxie a před zatížením při acidóze (pro přehled Stecyk et al., 2008).

5 Mitochondrie jako senzory pO₂

Reakce organismu na snížení parciálního tlaku kyslíku (pO₂) v okolním prostředí je podmíněna přítomností senzorů pro snímání změny pO₂ v krvi. Tyto senzory monitorují v různých tkáních různé hladiny kyslíku a zahajují intracelulární signální reakce v důsledku změny pO₂ (Acker et al., 2006; podle Essop, 2007). Enzym NADPH-oxidáza a komponenty dýchacího řetězce (komplex III a IV) se zdají být vhodnými kandidáty na senzory změny pO₂ v srdci (pro přehled Essop, 2007). Mitochondriálním signálním produktem, v roli druhého posla, jsou reaktivní formy kyslíku (ROS), (Shah a Sauer, 2006; podle Essop, 2007), které produkují za hypoxických podmínek a tím stimulují vnitrobuněčné odpovědi. Na druhé straně jsou mitochondrie považovány za největší producenty ROS, jako je superoxid (O₂⁻) či hydroxylový radikál (OH[•]), a jsou právě ony vystaveny škodlivým vlivům vyšší hladiny ROS nejvíce. Vyšší koncentrace ROS může způsobit oxidaci fosfolipidových membrán, proteinů a dokonce narušení DNA (McCord, 1985; podle Tsutsui, 2006), což vede k poškození buněčných struktur a k degeneraci tkání. Pokud je organismus vystaven oxidačnímu stresu, ke kterému dochází např. v hypoxii, zvyšuje se hladina ROS (Sawyer a Colucci, 2000; podle Tsutsui, 2006), což vede ke zvýšení tkáňového, tím pádem i srdečního, poškození (pro přehled Tsutsui, 2006). V srdci toto poškození může vést k hypertrofii, apoptóze buněk a intersticiální fibrose (Siwik et al., 1999; podle Tsutsui, 2006). Hlavní poškození u mitochondrií nastává v mtDNA, což silně ovlivňuje životaschopnost a funkci mitochondrie (Ide et al., 2001; podle Tsutsui, 2006). Za běžných fyziologických podmínek má ROS „přirozené predátory“, kteří udržují jejich koncentraci na nízké hladině. Jsou to antioxidační enzymy superoxid dismutáza (SOD), nebo glutathion peroxidáza (GSHPx), různé neenzymatické antioxidy (Toussaint et al., 1993; podle Tsutsui, 2006) a obranný antioxidační mechanismus zprostředkovaný mitochondriálním transkripčním faktorem A (TFAM). TFAM je kódován v buněčném jádře, váže se na mtDNA, tím jí stabilizuje, brání její degradaci a umožňuje její transkripci a replikaci mtDNA (Scarpulla, 2002; podle Tsutsui, 2006). Tímto TFAM se podporuje funkce dýchacího řetězce a přispívá ke snížení účinků oxidačních stresů na myokard.

6 Kardioprotektivní úlohy mitochondrie

Mitochondrie, kromě své důležité funkce produkce energie, působí na integraci různých signálních drah v reakci na stresory. Četné molekuly (např. ROS, Ca^{2+}), jsou považovány za důležité mediátory intramitochondriálních fyziologických a patofyziologických signálních kaskád (pro přehled Essop, 2007). Mitochondrie za fyziologických podmínek produkuje ROS přes dýchací komplex I a III (Chandel a Schumacker, 2000; podle Essop, 2007). Hladina ROS může regulovat transkripci genů dýchacího řetězce tak, že během mírné chronické hypoxie moduluje Ca^{2+} signalizaci a transkripční metabolické dráhy, a tím rozšiřuje srdeční, mitochondriální, bioenergetické kapacity, což zabraňuje buněčné smrti. Tuto domněnku podporuje i zjištění, že s vyšší hladinou H_2O_2 se zvyšuje exprese genů PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α), což je hlavní regulátor mitochondriální biogeneze (Hashimoto et al., 2007; podle Essop, 2007). V reakci na hypobarickou chronickou hypoxii bylo sledováno množení menších mitochondrií. Menší mitochondrie mají větší poměr povrchu, pro absorpci kyslíku, ke svému celkovému objemu (Friedman et al. 1973; podle Essop, 2007). Předchozí studie také ukázaly zvýšenou mitochondriální respirační funkci a syntézu ATP u zvířat vystavených mírné chronické hypoxii (pro přehled Essop, 2007). Rozšířená činnost dýchacích enzymů a koenzymů byla také nalezena v reakci na vysokou nadmořskou výšku, nebo v pokusech simulujících tento stav (pro přehled Essop, 2007). Důležitou úlohu v tomto procesu může také hrát signalizace Ca^{2+} iontů protože jejich vstup do mitochondrie aktivuje činnost enzymů Krebsova cyklu (Graier et al., 2007; podle Essop, 2007), s vyšší aktivitou enzymů Krebsova cyklu roste i produkce ATP v mitochondriích. Jako odpověď na hypoxické prostředí se zdá i výroba vysoce energetických fosfátů, což také vede k vyšší, mitochondriální, bioenergetické kapacitě. Bylo totiž prokázáno vyšší rychlost syntézy fosfokreatinu (Novel-Chate et al., 1995; podle Essop, 2007) a vyšší aktivity srdeční ATPázy (Tappan et al., 1957; podle Essop, 2007) v reakci na chronickou hypoxii. Vystavení mírné chronické hypoxii předchází také přetížení Ca^{2+} ionty a apoptóze, což vede k další kardioprotekci tím, že se sníží pravděpodobnost otevření mPTP (mitochondrial permeability transition pore), (Zhu et al., 2006; podle Essop, 2007). S aktivitou mPTP je dále spojována izoforma protein kinázy C (PKC ϵ), která také snižuje jejich prostupnost v reakci na chronickou hypoxii. Mimo to, PKC ϵ navíc zachovává mitochondriální funkce v srdeční tkáni v reakci na vysoký nedostatek kyslíku (McCarthy et al., 2005; podle Essop, 2007) a vykazuje

zvýšení mitochondriální, bioenergetické kapacity spojené s trvalou srdeční kontraktilní činností u myši vystavených chronické hypobarické hypoxii (McCarthy, 2006; podle Essop, 2007). Aktivace PKC byla pozorována v srdci potkana, které bylo vystaveno hypobarické hypoxii (pro přehled Ošťádal a Kolář, 2007).

K opačné reakci, tj. oslabení mitochondriální respirační funkce, dochází při silné hypoxii. Bylo zjištěno, že oxidační potenciál ve svalové tkáni byl nižší u lidských jedinců vystavených vyšší úrovni hypobarické hypoxie (Green et al., 1989; podle Essop, 2007), a i mitochondriální produkce byla nižší v silně hypoxickém prostředí (Cervos-Navarro et al., 1999; podle Essop, 2007).

Je důležité poznamenat, že ochranný systém mitochondrií a regulátory zprostředkovávající výše popsané a jiné kardioprotektivní procesy jsou komplexní a zahrnují několik molekulárních a biochemických modulátorů (např. oxid dusnatý, mitochondriální K_{ATP} kanály, antioxidační systémy organismu).

7 Využití srdečních paliv

Využití srdečních paliv je dynamické a může být změněno v závislosti na převládajících fyziologických i patofyziologických prostředí (Stanley et al., 2005; podle Essop, 2007). Když organismus zaznamená, že je vystaven hypoxickému prostředí, může dojít k vyššímu využití glukózy, jako energetického paliva, protože glukóza je efektivnější substrát pro výrobu energie ve formě ATP, než mastné kyseliny, co do spotřeby kyslíku. Například, populace žijící ve vysoké nadmořské výšce, jako himálajští šerповé a andští Quechuas, vykazují větší vychytávání glukózy (Holden et al., 1995; podle Essop, 2007). Vyšší absorpci glukózy vykazovaly i laboratorní pokusná zvířata (krysy), které byly vystaveny hypobarické hypoxii (pro přehled Essop, 2007). Po přechodu od využívání mastných kyselin, jako paliva pro tvorbu ATP, k využívání glukózy, vzroste účinnost produkce ATP o 12% - 14%. Dále mediátory mastných kyselin, které se odpojují během oxidativní fosforylace v mitochondriích, snižují mitochondriální produkci ATP v závislosti na rychlosti spotřebě kyslíku (Wojtczak a Wieckowski, 1999; podle Essop, 2007). Například, mírné zvýšení volných mastných kyselin zvyšovalo absorpci kyslíku v izolovaných srdcích potkanů ~ 33% (Boehm et al., 2001; podle Essop, 2007). Přejchod mezi substráty, mj. ovlivňuje také hladina cirkulujícího laktátu. Zvýšený obsah arteriálního laktátu byl například pozorován u obyvatel vysokých nadmořských výšek (Moret, 1971/72; podle Essop, 2007). Předpokládá se, že srdeční laktátový mechanismus je rozdělen na oxidaci exogenního laktátu v mitochondriích a na glykolytické sloučeniny odvozené od laktátu, které jsou transportovány z buňky (Chatham et al., 2001; podle Essop, 2007). Toto rozdělení podporuje objevení laktát dehydrogenázy a laktátových transportérů v srdci (Brooks et al., 1999; podle Essop, 2007), což poskytuje přijatelný mechanismus mitochondriální oxidace laktátu. Zvýšená aktivita laktátových transportérů byla pozorována v reakci na hypoxické prostředí (pro přehled Essop, 2007), konkrétně se jednalo o laktátový monokarbylátový transportér (MCT 4), který zprostředkovává odtok laktátu. Také na podporu domněnky, že hladina laktátu ovlivňuje přechod mezi palivy, dřívější studie ukazují klesající hladinu neesterifikovaných mastných kyselin v reakci na zvyšující se hladiny laktátu (Corbett et al., 2004; podle Essop, 2007).

In vitro studie zjistily, že savčí buňky zvyšují glykolytickou kapacitu v reakci na hypobarickou chronickou hypoxii zvýšením exprese genů regulujících absorpci glukózy a glykolýzy (pro přehled Essop, 2007). V dalších studiích, které byly zaměřeny na geny zprostředkovávající regulaci při hypoxii, byly pravá a levá komora odděleně zkoumány

v důsledku působení vnějších vlivů, protože pouze pravá komora je během hypoxie zatížena vlivem plicní hypertenze. Při pozorování genové exprese v hypoxickém prostředí v průběhu několika týdnů, bylo zaznamenáno brzké přepnutí na fetální program exprese genů* v pravé komoře srdeční (Sharma et al., 2004). Úroveň transkripce pyruvátdehydrogenázy-kinázy 4 (PDK-4), která zpomaluje oxidaci glukózy a pyruvátdehydrogenázy, byla redukována, zatímco exprese srdečních glukózových transportérů (GLUT1, GLUT4) se nezměnila. Nicméně, hladina exprese může být u GLUT1 vyšší v závislosti na fyzickém zatížení (Sivitz et al., 1992; podle Essop, 2007). Naopak v reakci na hypoxii byly shledány nižší hladiny enzymů CPT1 (carnitine palmitoyltransferase 1) a β -hydroxy-acyl-CoA dehydrogenáza (enzym β -oxidace mastných kyselin), (pro přehled Essop, 2007). Avšak genová exprese PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α), což je klíčový transkripční modulátor mnoha genů metabolismu mastných kyselin a MCAD (medium-chain acyl-CoA dehydrogenáza), se výrazněji neměnila během hypoxie (Sharma et al., 2004). PPAR α a exprese jeho cílových genů CPT1 a MCAD byla snížena (down-regulated) po 1.týdnu, kdy byly vystaveny hypoxickém prostředí. Mimo to byl snížen i promotor genu MCAD (Ngumbela et al., 2003; podle Essop, 2007).

* Fetální program genové exprese: Během zárodečného vývoje a krátce po něm, jsou sarkomery srdečních myocytů tvořeny α -aktinem kosterního svalstva (gen ACTA**) a během vývoje jsou „nahrazeny“ α -aktinem srdeční svaloviny (gen ACTC1**) stejně tak jako těžké řetězce myosinu beta (MyHC beta) nahrazeny MyHC α . Během hypertrofie dochází v srdci k znovu tvoření α -aktinu kosterního svalstva v reakci na vyšší zátěž. Dochází i k obnově exprese dalších genů, jejichž exprese byla po porodu potlačena. (pro přehled Izumo et al., 1988, **<http://rgd.mcw.edu/rgdweb/search/genes.html>).

8 Biogeneze mitochondrií

Během hypoxie dochází k zatížení srdečního svalu a vzniku plicní hypertenze, která následně vede k hypertrofii pravé komory. Fyzická námaha může vyvolat hypertrofii levé komory. Hypertrofie je růst tkáně vlivem zvyšování objemu buněk. V současné době je otázkou do diskuse, zdali navození buněčné hypertrofie a tedy možné navození biogeneze mitochondrií v buňkách, je či není přímý důsledek fyzické zátěže, potažmo hypoxie, popřípadě za jakých okolností se hypertrofie spouští. Stejně tak není vyřešen problém, zda během hypertrofie je či není zvýšen oxidativní metabolismus, i přes hypoxické prostředí. Přes všechny různé výsledky se zdá, že biogeneze mitochondrií je závislá na aktuálním energetickém, požadavku organismu. Po vystavení pokusných zvířat hypoxii se po určitém kompenzačním období všechny fyziologické srdeční parametry vrátily na původní úroveň, kromě doposud všeobecně akceptovaného faktu, že dochází k trvalému posunu k vyššímu využití glukózy, jako zdroje energie v neprospěch lipidů. Ovšem i tento fakt je v současné době přezkoumáván v závislosti na různých stimulech. Tendence návratu srdečních projevů k původním hodnotám přináší, při dlouhodobém působení abnormálních podmínek, chronické srdeční komplikace, jako hypertenzi, nedomykavost chlopní, nebo infarkt myokardu (Rimbaud et al., 2009).

Biogeneze mitochondrií je definovaná jako plánovaná událost vedoucí k růstu a následnému dělení organel (Rimbaud et al., 2009). Bylo napsáno již výše, že mitochondrie mají vlastní, částečný genom. A tento genom jim umožňuje také jejich binární dělení. Když dochází k zmnožení mitochondrií je potřeba dále zkoordinovat produkci a transport proteinů, které jsou kódovány v jaderné DNA. Kromě toho, mitochondriální biogeneze je závislá také na schopnosti mitochondrií vyvolat štěpení a následnou fúzi, což vede k zajištění vhodné organizace na vnitřní mitochondriální membráně. V neposlední řadě transkripční kontrola biogeneze mitochondrií je zajišťována množstvím regulačních mechanismů (Rimbaud et al., 2009), které zhrnují dva základní děje: “fusion a fission“, tedy dělení a vzájemné splývání.

8.1 Fusion and Fission

Kdo by si byl, před pár lety pomyslel, že v samotné buňce mohou probíhat velmi dynamické procesy na úrovni změny samotné morfologie, vedoucí jak k udržení buněčných funkcí, tak i prostého buněčného života. Ovšem, tyto buněčné procesy se lidskému oku začínají v poslední době odhalovat s mohutným rozvojem mikroskopické techniky. K těmto dynamickým procesům patří i procesy „fusion“ a „fission“ mitochondrií. Když tyto výrazy přeložíme „otrocky“ do češtiny, ledacos to napoví; fusion = fúze či splynutí a fission = štěpení.

Mitochondriální dynamika úzce souvisí s fyziologií organismu. Mitochondrie zdravých buněk se kontinuálně dělí a vzájemně fúzují. Mitochondriální dělení usnadňuje redistribuci mitochondrií jako odpověď na zvýšený požadavek ATP, zatímco jejich fúze umožňuje výměnu mtDNA a dalších komponent. Nerovnost mezi procesy fusion a fission vyvolává změny v buněčné morfologii a celkově zasahují do buněčné funkčnosti. Narušení fusion mitochondrií způsobí fragmentaci mitochondriální tubulární sítě na malé částičky (pro přehled Chen et al., 2005) a naopak narušení mitochondriálního fission způsobí vytvoření protáhlých, vzájemně propojených tubulů, které se shromáždí perinukleárně (pro přehled Chen et al., 2005).

Děje fusion a fission jsou výsledkem činnosti několika proteinů. Pro průběh mitochondriálního fusion jsou nezbytné proteiny mitofusin 1 a 2 (Mfn1, Mfn2) a OPA1 (pro přehled Chen et al., 2005). Mitofusiny obsahují velkou konzervovanou doménu s GTPázovou aktivitou lokalizovanou ve vnější mitochondriální membráně (pro přehled Chan, 2006), a u savců jsou Mfn1 a Mfn2 těsně spojeny. Zbylé N- a C- terminální části vyčnívají z vnější mitochondriální membrány do cytosolu a dávají tak dobrou možnost spojení dvou mitochondrií (pro přehled Chan, 2006). Celý protein má tvar U, je atypicky dlouhý s množstvím nabitých aminokyselinových zbytků. Na obou koncích jsou pak hydrofobní strukturní motivy opakujících se sedmi aminokyselinových zbytků tzv. „heptads“, konkrétně na N-terminální části je to HR1 a na C-terminální části se jedná o HR2. Jejich úloha byla zkoumána na myších s cílenými mutacemi (Chen et al., 2003; podle Chan, 2006). Buňky, které mají nedostatek Mfn1, nebo Mfn2 trpí nižší fúzí mitochondrií (pro přehled Chen et al., 2005) zapříčiněnou mitochondriální fission. Při nedostatku obou proteinů (Mfn1 a zároveň Mfn2), buňky nevykazují jakoukoliv mitochondriální fúzní aktivitu, a tento stav vede k úplnému rozštěpení mitochondriálních tubulů a tím pádem k silné inhibici mitochondriální

funkce (Chen et al., 2005). Je tedy zřejmé, že oba dva proteiny jsou potřebné k rovnovážnému stavu mitochondriální sítě, též se uvažuje o podobné úloze Mfn1 a Mfn2 při splývání mitochondrií. Ukázalo se, že buňka, která postrádala Mfn1, mohla být uzdravena vyšší expresí proteinu Mfn2 a naopak. Navíc, buňka, která postrádala oba proteiny, také mohla být plně uzdravena vyšší expresí jednoho z těchto dvou proteinů. Navíc, oba proteiny pracují nezávisle na cytoskeletu. Což evokuje závěr, že i biochemická aktivita Mfn1 a Mfn2 je podobná. Objevily se i odlišnosti těchto dvou proteinů. Bylo pozorováno, že Mfn1 mělo silnější úlohu v kultuře fibroblastů (Chen et al., 2005), protože jeho nedostatkem došlo k závažnějšímu roztržení mitochondrií a i residuální mitochondriální fusion byla nižší, než při nedostatku Mfn2. Na druhou stranu, poškození exprese genu pro Mfn2 vede k brzké mozkové příhodě a dalším zdravotním komplikacím (obezita). Dále bylo zjištěno, že funkce mitochondriálního proteinu OPA1 je závislá na Mfn1, ale nikoliv na Mfn2 (Cipolat et al., 2004; podle Chan, 2006). OPA1 je lokalizován v mezimembránovém prostoru mitochondrie, kde je asociován s vnitřní membránou (pro přehled Chan, 2006). V buňkách, které jej ztratily, dochází k mitochondriální fragmentaci, která je způsobena ztrátou schopnosti mitochondriální fusion (pro přehled Chan, 2006) a mimoto, dochází k zhroucení architektury krist (pro přehled Chan, 2006). Zjištění jeho přesné funkce je komplikované, protože navozené důsledky jsou ovlivněny užitím různých experimentálních systémů (pro přehled Chan, 2006).

Děj fission mitochondrií byl poprvé popsán u kvasinek (pro přehled Chan, 2006). Pro průběh mitochondriální fission jsou nezbytné dynamin-related protein 1 (Drp1) a Fis1 (pro přehled Chan, 2006). Drp1 se vykytuje velkou měrou v cytosolovém poolu a malá část je nalezena lokálně na mitochondriích (Smirnova et al., 2001; podle Chen et al., 2005); skládá se z několika domén typických pro dynaminové rodiny GTPás, které zahrnují GTPásové domény na N-terminální části, centrální domény a GTPásové efektorové domény (GED) na C-terminální části. Inhibice Drp1 vede k prodloužení a většímu vnitřnímu spojení mitochondriálních tubulů, což vede k utlumením rozštěpení (pro přehled Chan 2006). Fis 1 je malý protein, který je rozmístěn rovnoměrně na povrchu vnější membrány mitochondrií prostřednictvím jedné C-terminální transmembránové části, přičemž větší část Fis1 se nachází v cytosolu. Cytosolová část proteinu je složena ze šesti antiparalelních helikáz, jenž tvoří helikální svazek (pro přehled Chan, 2006). Čtyři, centrální helikázy jsou dále složeny ze dvou tandemů TPR (tetratricopeptide repeat) a z motivu helix-turn-helix. Do fusion a fission zasahují též další molekuly, jakou je např. endophilin B1, který je zapleten do fission (Karbowski et al., 2004; podle Chan, 2006).

Podstata obou dějů je zatím velmi nejasná. Mechanismus, kterým probíhá mitochondriálního fission, je v současné době stále zahalen rouškou tajemství. Nicméně, o mechanismu mitochondriálního fusion lze pár obecných věcí napsat. Za prvé, specifčnost membránové fúze je zajištěna utvořením specifických proteinových komplexů v „trans“ poloze mezi membránovým donorem a akceptorem, tj. na jedné mitochondrii existuje receptorová část, na kterou je navázána signální, specifická částice druhé mitochondrie. Toto spojení končí těsným přiblížením dvou membránových kompartmentů k sobě. Za druhé, sloučení obou jednotek je řízeno utvořením vysoce stabilního, helikálního svazku (pro přehled Chan 2006). Bylo prokázáno, že pro tyto děje jsou zapotřebí geny Mfn1 a Mfn2 a to tak, že C-terminální část Mfn1, obsahující hydrofobní HR2, je oligomerizována se svým analogem HR2 na C-terminální části Mfn2 a vzniká spojení „coiled coil“ (Koshiba et al., 2004; podle Chan, 2006), tím se k sobě přiblíží dvě mitochondrie, ale na těsné spojení, které je popsáno ve druhém bodu výše, to ještě nestačí, což naznačuje, že tento proces vede k zřetězení mitochondrií, ale ne k samotné fusion (Ishihara et al., 2004; podle Chan, 2006). K navození skutečné fusion je zapotřebí změna konformace vedoucí ještě k těsnějšímu splynutí, což může být vyvoláno následnou na nukleotidu závislou konformační změnou na GTPásové doméně, nebo dalšími proteiny. Po přiblížení membrán těsně k sobě nastává další část fusion a to je promíchání obsahu matrix. To samo o sobě potřebuje splynutí vnějších a vnitřních membrán, což naznačuje velmi náročný a přesně koordinovaný mechanismus. Ačkoliv byly provedeny studie tohoto jevu, jeho podstata není přesně známa. Předpokládá se, že v tomto procesu má svojí úlohu protein OPA1 (pro přehled Chan, 2006).

Nedá se jednoznačně říci, že by efekt fusion a fission byl reakcí pouze na hypoxické podmínky. Úloha těchto dějů je komplexní pro buňku za jakýchkoliv stresových podmínek. Stav mitochondriální populace uvnitř buňky ukazuje různorodost membránového potenciálu a spotřeby kyslíku. Dalo by se tedy napsat, že stav mitochondriální populace v buňce, ovlivňuje parametry související se spotřebou kyslíku, s velikostí membránového potenciálu, počtem kopií mtDNA v „mitochondrii“, ochranou mtDNA před mutacemi (způsobené např. vyšší hladinou ROS), s rychlostí růstu, atd. Mitochondriální fusion je též významná ve vzájemné spolupráci mitochondrií (Chen et al., 2003).

9 K_{ATP} kanály srdečního svalu během normoxických podmínek

V roce 1983 se začaly psát mnohé, nové kapitoly lidského vědění. Kromě jiných, důležitých, a pro znalosti-milující lidi, i krásných kapitol, se začala psát dnes již téměř samostatná kniha o K_{ATP} kanálech. Jako první, kdo vyryl nesmazatelně a nezpochybnitelně tento výraz do historie lidského poznání, byl A. Noma (Noma, 1983; podle Gross a Peart, 2003). A hned z počátku navrhnul, aby jejich účel byl spojen s činností ochraňující srdce proti různým stresovým situacím, včetně hypoxie (někteří autoři uvádí, že se tento názor poprvé objevil až v práci Murry et al.); (Murry et al., 1986; podle Toyoda et al., 2000). Nomova domněnka byla podpořena publikovanými daty, které nejenže potvrzovaly ochranné účinky u mnoha studovaných modelů, ale i naznačovaly, že K_{ATP} kanály mohou hrát hlavní úlohu právě při úkazu zvaném „ischemic preconditioning“ (IPC).

K_{ATP} kanály, nebo-li ATP-senzitivní draslíkové kanály, byly poprvé popsány na membránových terčících, které byly připraveny z izolovaných komorových myocytů morčete domácího (*Cavia aperea*); (Noma, 1983; podle Gross a Peart, 2003). Od té doby, jako by se s nimi roztrhl pytel, byly pozorovány i v dalších tkáních. S postupem času a techniky bylo zjištěno, že pro každou tkáň mající K_{ATP} kanály existují specifické typy těchto kanálů a že tyto kanály se mezi sebou liší podjednotkami v závislosti nejen na specifitě tkáně, ve které se nalézají, ale i na organické struktuře dané tkáně.

Z hlediska struktury, K_{ATP} kanály obsahují dva odlišné proteiny: vnitřní, draslíkem regulovaný kanál (K_{ir}) a „sulfonylurea“ receptor (SUR). Podjednotka SUR má regulující úlohu a kromě toho ovlivňuje citlivost kanálu vůči ATP a dalším látkám, jako např. farmakologickým agonistům (Yokoshiki et al., 1998; podle Gross a Peart, 2003).

K_{ATP} kanály buněk srdečního svalu můžeme dělit z hlediska jejich umístění buď na sarkolémální (sarc K_{ATP} kanál), které se vyskytují v sarkolemě, nebo na mitochondriální (mito K_{ATP} kanál) vyskytující se ve vnitřní membráně mitochondrie. První jmenovaný je oktamer, jak již bylo uvedeno výše, strukturálně složen ze dvou podjednotek: Kir6.2 odpovídající K_{ir} a podjednotky SUR2A, přičemž se každá podjednotka vyskytuje čtyřikrát v jednom kanálu. Naproti tomu, o detailní struktuře K_{ATP} kanálů vyskytujících se na vnitřní mitochondriální membráně se zatím mnoho neví. Je podstatné zmínit, že za normálních podmínek jsou tyto kanály uzavřené vlivem volného, intracelulárního ATP (Gross a Peart, 2003)

9.1 Účast sarcK_{ATP} kanálů na IPC

Je známo, že antagonisté ke K_{ATP} kanálům blokují obranné efekty IPC snižující následky infarktu a že naopak jejich agonisté napodobují jejich obrannou činnost. Nebyl však s určitostí znám mechanismus, kterým se to děje. Nicméně, možný spouštěcí mechanismus ve své práci uvedl již Noma (Noma, 1983; podle Gross a Peart, 2003). Předpokládal, že otevření sarcK_{ATP} kanálů navozené hypoxií, ischemií či jinými farmakologickými otvírači způsobí zkracování délky trvání akčního potenciálu (AP) zrychlením třetí fáze repolarizace. Tato domněnka se ukázala jako pravdivá (Cole et al., 1991; podle Gross a Peart, 2003) a vyplývá z ní, že urychlení třetí fáze repolarizace a zkrácení délky AP způsobí inhibici vstupu Ca²⁺ do buňky přes L-typ kanály a zamezí možnosti přetížení Ca²⁺ poolu v buňce. Dále stejný následek má i zpomalení depolarizační fáze, což celkově vede k vyšší životaschopnosti buňky během ischemie a krátce po ní. Cole se svými spolupracovníky (Cole et al., 1991; podle Gross a Peart, 2003) aplikoval na srdeční tkáň z komory morčete glibenclamid, látku tlumící zkracování AP (neselektivní antagonist K_{ATP} kanálů), a pinacidil - agonistu, který podporuje otevírání K_{ATP} kanálů. Užitím glibenclamidu během ischemie narušil uzdravovací proces tkáně po delším časovém období. Užitím pinacidilu naopak zkrátil délku AP, což mělo také za následek narušení procesu vedoucího k uzdravení těsně po skončení ischemie. To, že IPC, nebo otevření K_{ATP} kanálů, zkracuje akční potenciál bylo prokázáno vícekrát (pro přehled Gross a Peart, 2003). A proto byla přijata hypotéza, že aktivace K_{ATP} kanálů během ischemie a následné zkrácení AP může poskytovat ochranu myokardu během ischemie. Navíc se prokázalo, že otevření K_{ATP} kanálů snižuje práh pro IPC, jako následek zvýšení rychlosti krácení AP (Yao a Gross, 1994; podle Gross a Peart, 2003). Nakonec Suzuki et al. (Suzuki et al., 2002; podle Gross a Peart, 2003) dokázal, že myš, která měla vypnutý gen pro Kir6.2, neměla pozitivní výsledky kardioprotekce, čímž dokázal provázanost sarcK_{ATP} kanálů s IPC, tedy alespoň u myši. Navíc je tato domněnka podpořena studií, která dokazuje, že myš s podobně vypnutým genem pro Kir6.2 nebyla senzitivní k IPC (Rajashree et al., 2002; podle Gross a Peart, 2003). Ačkoliv tyto studie demonstrují, že sarcK_{ATP} kanály mohou spouštět IPC, další studie tvrdí, že sarcK_{ATP} kanály spouští IPC „pouze“ se zpožděním (Gross a Peart, 2003).

Jak sarcK_{ATP} kanály jsou aktivovány během IPC a jak navodí ochranné účinky, není ještě zcela známo. Například se vyskytl zajímavý fakt, o kterém se podrobněji rozepíší v podkapitole 9.3, který ukázal, že krátkodobá ischemie, a může se jednat třeba i o sérii krátkých ischemií, zvyšují koncentraci adenosinu v buňce a tím aktivují adenosinové

receptory (Headrick, 1996; podle Gross a Peart, 2003). Tady se ukazuje možnost otevření sarcK_{ATP} kanálů působením jak vyšší hladiny adenosinu, tak i pomocí PKC (pro přehled Gross a Peart, 2003). Jelikož iniciační fáze IPC zvyšuje i hladinu NO v buňce skrze endoteliální NO syntázu (pro přehled Gross a Peart, 2003), zdála se jako další možnost, která způsobí aktivaci sarcK_{ATP} kanálů, působení NO, avšak bylo dokázáno, že nikoliv endoteliální, ale exoteliální NO aktivuje sarcK_{ATP} kanály a nikoliv řádně, ale předčasně (Bolli et al., 2001; podle Gross a Peart, 2003). S konečnou platností bylo potvrzeno, že sarcK_{ATP} kanály jsou aktivovány PKC (Obr.2.); (Light et al., 2001; podle Gross a Peart, 2003).

9.2 Účast mitoK_{ATP} kanálů na IPC

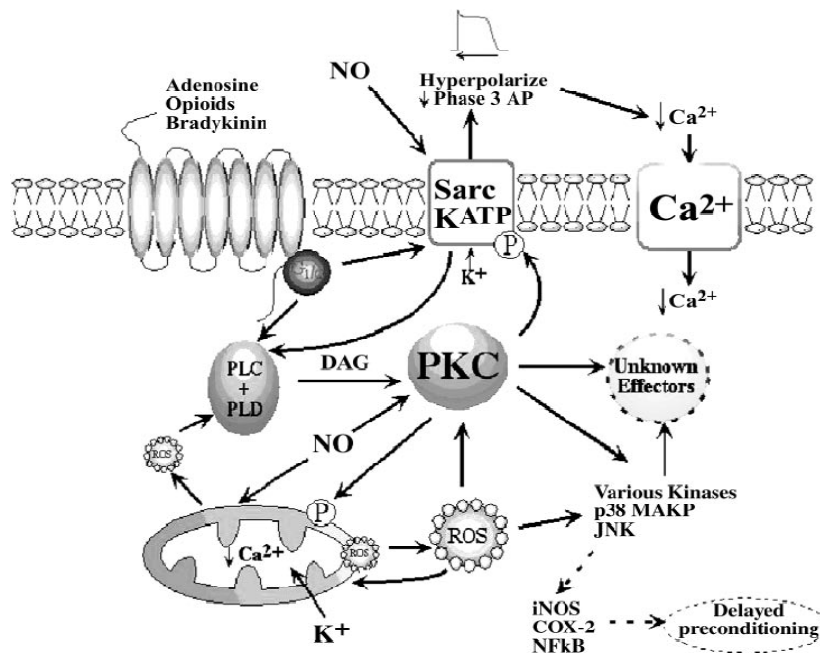
V roce 1994 Gross a Yao (Yao et al., 1994; podle Gross a Peart, 2003) zpochybnili dříve prezentovaný názor, že sarcK_{ATP} kanály působí jako konečný efektor v IPC, a vyslovili jiné tvrzení; že větší zkrácení AP, jako následek aktivace sarcK_{ATP} kanálů, není odpovědným mechanismem končící ochranou srdeční svaloviny. K tomuto poznání došli použitím bimakalimu, což je látka otvírající K_{ATP} kanály bez ohledu na jejich lokalizaci. Jednak použili nízkou dávku, která byla bez efektu na zkrácení AP, a za druhé užili silnější dávku s výrazně zkracujícím efektem na AP. V obou případech byly následky na kardioprotekci stejné, tedy že bimakalim snižuje riziko infarktu nezávisle na snížení AP, což vyvolalo námět k tomu, aby následek působení bimakalimu byl hledán na intracelulární úrovni. Další zprávy podpořily tvrzení, že délka AP nejde ruku v ruce s kardioprotektivními účinky (pro přehled Gross a Peart, 2003).

Garlid et al. ke svému experimentu zvolil látku zvanou diazoxid a to ve dvou koncentracích, kdy nižší dávka (cca 0,8 μmol/l) aktivuje vnitřní mitoK_{ATP} kanály a vyšší dávka (cca 800 μmol/l) je potřeba k otevření sarcK_{ATP} kanálů. Nižší dávka způsobila obranný srdeční efekt a po dlouhotrvající ischemii podporovala následné uzdravování (v porovnání se stejnou dávkou kromakalimu, který otvírá sarcK_{ATP} kanály); (Garlid et al., 1997; podle Gross a Peart, 2003). Tato hypotéza byla ještě později podpořena dalšími studiemi, ve kterých bylo použito farmakologické činidlo MCC-134, které způsobuje aktivaci selektivně sarcK_{ATP} kanálů, nikoliv však mitoK_{ATP} kanálů (Sasaki et al., 2003; podle Gross a Peart, 2003).

Spouštěcí mechanismus mitoK_{ATP} kanálů byl popsán za anoxických podmínek (Knopp et al., 1999; podle Gross a Peart, 2003), nebo během ischemie, kdy vyšší koncentrace H₂O₂ aktivuje mitochondriální kanály přes PKCε zprostředkované dráhy (Gaudette et al.,

2000; podle Groos a Peart, 2003) a tato tvrzení byla dále podporována dalšími výzkumy (Ohnuma et al., 2002; podle Gross a Peart, 2003).

Již výše byla zmíněna látka diazoxid a její účinky. Prokázalo se, že právě tato látka vyvolává produkci mitochondriálního ROS (Samavati et al., 2002; podle Gross a Peart, 2003) a dále, že diazoxid navozuje časnou a pozdější fázi PC přes NO-závislé dráhy (Ockaili et al., 1999; podle podle Gross a Peart, 2003). Dále v tomto směru byl dokázán fakt, že NO mění citlivost K_{ATP} kanálů vůči intracelulární koncentraci ATP (Shinbo a Iijima, 1997; podle Gross a Peart, 2003) a že NO aktivuje některé isoformy PKC (pro přehled Gross a Peart, 2003). Tedy shrnuto, aktivace mito K_{ATP} kanálů je vedena různými mechanismy během ischemie nebo PC (Obr.2.), dále tyto mechanismy vedou k aktivaci PKC a dalších kináz (p38MAPK, JNK, ERK1/2); (Gross a Peart, 2003). Zjistilo se, že k navození ochranných, srdečních účinků byla potřeba aktivace p38MAPK a otevření mito K_{ATP} kanálů a že tyto obranné mechanismy IPC byly potlačeny podáním SB-203580, což je látka inhibující p38MAPK, před PC stimuly (Carroll and Yellon, 2000; podle Gross a Peart, 2003), i podáním 5-HD (5-hydroxydekanooat), což je látka inaktivující mito K_{ATP} kanály. Po důkladné analýze zmiňovaných prací a dalších (pro přehled Gross a Peart, 2003) se došlo k závěru, že otevření mito K_{ATP} kanálů spouští kardioprotektivní efekt IPC.



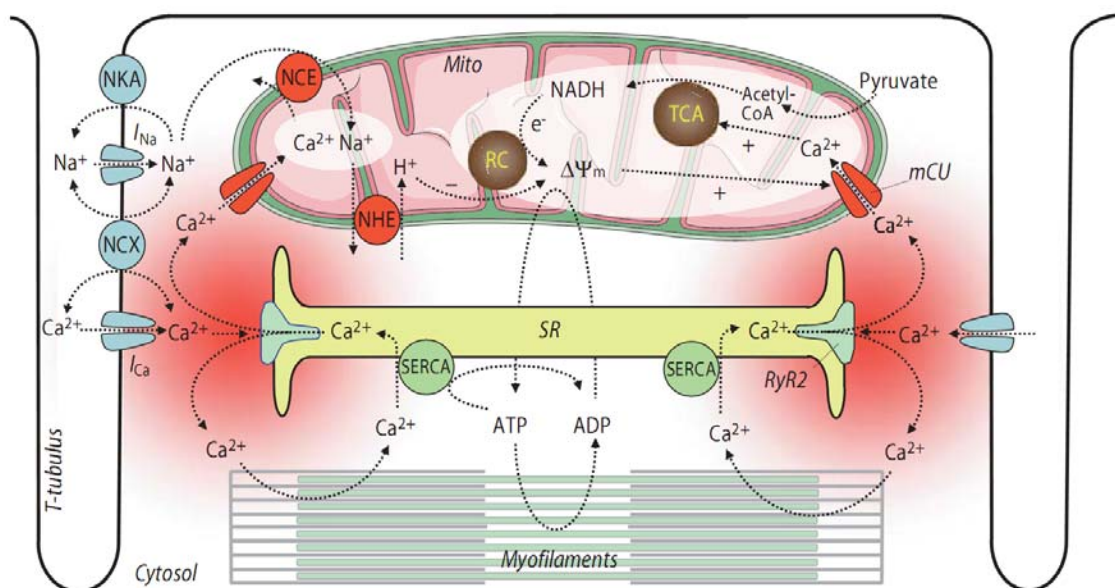
Obr.2. Schematický diagram nastiňující návrh, jak otevření sarc K_{ATP} kanálů a mito K_{ATP} kanálů vede ke kardioprotekci, NO-oxid dusnatý; DAG-diacylglycerol; PLC-phospholipase C; PLD-phospholipase D; PKC-protein kinase C; ROS-reactive oxygen species (převzato Gross a Peart, 2003)

Další studie uskutečněná skupinou kolem pana Wang a kolem roku 2001 (Wang et al., 2001; podle Gross a Peart, 2003) ukázala na tkáni izolované z králičích srdcí a pomocí látek: 5-HD (inhibující efekt diazoxidu), nifedipin (blokuje L-tyt Ca^{2+} kanály) a chelerythrin (inhibující PKC), jako spouštěč IPC vyšší koncentraci intracelulárního Ca^{2+} a PKC aktivitu, zatímco otevření $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ kanálů zprostředkovávalo ochranné mechanismy nezávisle na aktivitě PKC. Studie Wang ukázala na důležitý fakt týkající se udržení homeostáze Ca^{2+} .

Celkově to tedy znamená, že mitochondrie mají přímý vliv na přežití buňky během hypoxie, jednak zvýšením zásobního poolu kreatin fosfátu, pak udržením Ca^{2+} homeostázy a v neposlední řadě regulací množství mitochondrií v buňce.

Po skončení ischemie je buňka oslabována sníženou mitochondriální funkčností, která je zapříčiněna změnou membránového potenciálu, který v izolovaných tkáních vedl až k hyperpolarizaci a následnému přetížení Ca^{2+} poolu. Bylo ukázáno, že léčba diazoxidem stabilizuje membránový potenciál, tím se redukuje příliv Ca^{2+} iontů do buňky a zabrání se tím přetížení buňky a následného poškození srdeční svaloviny (Xu et al., 2001; podle Gross a Peart, 2003). Dále bylo prokázáno možné snížení koncentrace Ca^{2+} otevřením $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ kanálů (Wang a Ashraf, 1999; podle Gross a Peart, 2003).

Ca^{2+} ionty vstupují během ECC mj. do matrix mitochondrií přes mitochondriální Ca^{2+} uniporty. Z mitochondrií jsou vypuzovány přes $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník (3:1), Na^+ je dále vypuzováno z mitochondrií přes Na^+/H^+ výměník (1:1). Tedy H^+ ionty přecházejí do matrix a tím se snižuje membránový potenciál na vnitřní mitochondriální membráně, což má za následek utlumení činnosti ATP-syntázy. Dále Ca^{2+} podporují rychlost Krebsova cyklu přes aktivaci jeho dehydrogenáz (Obr.3.); (pro přehled Maack et al., 2007).



Obr.3. Přehled procesů ECC a energetiky mitochondrií, Mito-mitochondria; TCA-tricarboxylic acid cycle; RC-respiratory chain; ψ_m -mitochondrial membrane potential; NCE-mitochondrial Na⁺/Ca²⁺-exchanger; NHE-mitochondrial Na⁺/H⁺ -exchanger; NKA-sarcolemmal Na⁺/K⁺-ATPase; NCX-sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺-exchanger; RyR2-ryanodine receptor type 2; mCU-mitochondrial Ca²⁺ -uniporter; I_{Na} and I_{Ca}, currents of voltage-gated Na⁺ or Ca²⁺ -channels (převzato Maack et al., 2007)

9.3 Adenosine-enhanced ischemic preconditioning

Považují za důležité se zmínit o „adenosine-enhanced ischemic preconditioning“, (APC), který je vyvolán injikací adenosinu do buňky v průběhu IPC, (Toyoda et al., 2000). Autoři pracovali se třemi látkami: glibenclamid (Glb), který nespecificky blokuje všechny K_{ATP} kanály; dále se jednalo také o již zmíněném 5-hydroxydecanoat (5-HD), který blokuje mitoK_{ATP} kanály; a do třetice si vybrali látku HMR-1883 (HMR), která blokuje sarcK_{ATP} kanály. Zaměřili se na tři fáze, během kterých aplikovali tyto látky: (i) před ischemií (I); (ii) během „reperfuse“ (R), což je znovuobnovení průtoku krve po ischemii; a (iii) v průběhu obou dvou předešle zmiňovaných fází (IR). Aby těch klíčových trojek nebylo málo, do třetice napíši, co vlastně zkoumali. Věděli, že APC rozšiřuje ochranu produkovanou IPC (pro přehled Toyoda et al., 2000), a proto chtěli prozkoumat, kdy aplikovat jednotlivé antagonisty, aby nejvhodněji ovlivnili ochranu produkovanou IPC, tedy snížili riziko srdečního infarktu a zlepšili uzdravení po prodělání ischemie/hypoxie, a jakou roli v tom hrají mitochondriální, potažmo sarkolemální, ATP-senzitivní draselný kanály.

Zjistili, že rozšíření obranných vlivů IPC pomocí APC vskutku úzce souvisí s aktivací K_{ATP} kanálů. Užití Glb při APC zcela zablokovalo blahodárné účinky APC na efekty IPC. Tento výstup mj. podpořil i výsledky již výše zmiňované práce (pro přehled Toyoda et al.,

2000). Dále tyto výsledky naznačují, že zablokováním mitoK_{ATP} kanálů vzroste možnost ohrožení myokardu infarktem a to při aplikaci 5-HD před ischemií, naopak při aplikaci v průběhu postischemické rekonvalescence nenastává žádný negativní vliv vzhledem k ochraně proti infarktu, která je zprostředkovaná IPC. Logicky, při podání 5-HD v obou periodách, nastane stejný efekt, jako při aplikaci pouze před ischemií, tedy potlačení obranyschopnosti před infarktem. Co se týká uzdravovací fáze po prodělané ischemii, aplikace 5-HD v jakékoliv časové možnosti ovlivní uzdravování pouze dočasně. Naopak se zdá, že inhibicí aktivace sarcK_{ATP} kanálů klesne funkčnost ozdravovacího efektu vyvolaného IPC podpořeno APC po skončení ischemie a to tak, že jak podání specifického antagonisty HMR-1883 před ischemií, tak v průběhu postischemické rekonvalescence, částečně inhibuje tento efekt. Zajímavostí však je, že tento efekt není tak potlačen podáním HMR jak při ischemii, tak zároveň těsně po ní. Kdo teď hádá, že sarcK_{ATP} kanály nijak neovlivňují míru navození infarktu, má zcela pravdu.

Celkově se ukázalo, že je-li nějaký časový úsek, kdy lze ovlivnit riziko možného vzniku infarktu po prodělané ischemii, je to před jejím proděláním a jsou-li nějaké časové periody pro navození či potlačení postischemické rekonvalescence, je to jak před ischemií, tak i v následném období, kdy je srdce znovu uváděno v normální činnost - v reperfúzi. Dále se potvrdilo, že otevření K_{ATP} kanálů ochraňuje buňky před přetížením Ca²⁺ ionty, tím pádem před destabilizací mitochondriálních membrán, což by vedlo ke zhroucení celé energetiky buňky. Též že adenosinová injekce může zmírnit, nebo silně potlačit, následky na srdci po proděláním ischemie.

10 Závěr

Dostatečný přísun kyslíku je nezbytný pro udržení homeostáze celého organismu i jednotlivých orgánů. Přirozeně jsou živé organismy vystavovány hypoxickému prostředí ve vysokých nadmořských výškách a při vysokém výkonu při tělesné zátěži, stejně tak dochází k hypoxickým stavům za různých patologických podmínek, jako je ischemická choroba srdeční, infarkt myokardu a další. Již před více než 30 lety bylo známé kardioprotektivní působení chronické hypoxie a později objevené působení tzv. „ischemického preconditioningu“, vzbudilo zájem kardiologů o studium jeho mechanismů, které nejsou dosud zcela objasněny. Působení chronické hypoxie snižuje velikost infarktu u potkanů, zlepšuje postischemickou obnovu kontraktilních funkcí a působí antiarytmicky. Studium molekulárních mechanismů vzniku kardioprotektivního účinku adaptace na chronickou hypoxii ukazuje převážně na signální dráhy PKC přes tyrozinové kinázy a mitogeny aktivované kinázy a na ATP-závislé K⁺ kanály (K_{atp}-kanály). K_{atp}-kanály jsou lokalizovány na sarkolemě a na vnitřní mitochondriální membráně, jsou otevírány v případě poklesu poměru ATP/ADP. Mnoho publikovaných experimentů poukazuje na významnou úlohu mitochondriálních kanálů jako koncového činitele v oblasti protekce preconditioningem. Uvádí se, že otevření těchto kanálů může chránit mitochondrie před vápníkovým přetížením. Podle jiné představy vede otevření kanálu ke zvětšení objemu mitochondrií, což může mít význam v aktivaci signálních drah proteinovými interakcemi a na principu stabilizace struktur v intermembránovém prostoru, kde jsou lokalizovány důležité energetické enzymy a transportéry. Též se uvádí jeho významná funkce v zamezení otevření mitochondriálního permeabilního poru (mPTP) a předejití tak buněčné smrti. Dalším významným adaptačním mechanismem na úrovni mitochondrií je jejich schopnost reagovat na metabolické požadavky buňky a měnit své strukturální uspořádání aktivací procesů „fusion a fission“.

11 Použitá literatura

- Acker T, Fandrey J, Acker H (2006): The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases. *Cardiovasc Res* 71, 195–207
- Baines CP, Pass JM, and Ping P (2001): Protein kinases and kinasemodulated effectors in the late phase of ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 96: 207–218
- Boehm EA, Jones BE, Radda GK, Veech RL, Clarke K (2001): Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in palmitate-perfused hyperthyroid rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H977–H983
- Bolli R (2001): Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1897–1918
- Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello JP, Butz CE (1999): Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1129–1134
- Carroll R, Yellon DM (2000): Delayed cardioprotection in a human cardiomyocyte-derived cell line: the role of adenosine, p38MAP kinase and mitochondrial KATP. *Basic Res Cardiol* 95: 243–249
- Cervos-Navarro J, Kunas RC, Sampaolo S, Mansmann U (1999): Heart mitochondria in rats submitted to chronic hypoxia. *Histol Histopathol* 14, 1045–1052
- Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L (2004): OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15927–15932
- Cole WC, McPherson CD, and Sontag D (1991): ATP-regulated K_v channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res* 69: 571–581
- Corbett J, Fallowfield JL, Sale C, Harris RC (2004): Relationship between plasma lactate concentration and fat oxidation. *Proceedings of the 9th Annu Congr Eur Coll Sports Sci.*, 107, P172
- Essop MF (2007): Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol* 584.3; 715–726
- Friedman I, Moravec J, Reichart E, Hatt PY (1973): Subacute myocardial hypoxia in the rat. An electron microscopic study of the left ventricular myocardium. *JMol Cell Cardiol* 5, 125–132

- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, and Grover GJ (1997): Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K_v channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 81: 1072–1082
- Gaudette GR, Krukenkamp IB, Saltman AE, Horimoto H, Levitsky S (2000): Preconditioning with PKC and the ATP-sensitive potassium channels: a codependent relationship. *Ann Thorac Surg* 70: 602–608
- Golod DA, Kumar R, Joyner RW (1998): Determinants of action potential initiation in isolated rabbit atrial and ventricular myocytes, *Am. J. Physiol.* 274, pp. H1902–H1913
- Graier WF, Frieden M, Malli R (2007): Mitochondria and Ca²⁺ signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch*; DOI: 10.1007/s00424-007-0296-1
- Green HJ, Sutton JR, Cymerman A, Young PM & Houston CS (1989): Operation Everest II: adaptations in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 66, 2454–2461
- Gross GJ, Peart JN (2003): KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H921–H930
- Gross GJ, Fryer RM (1999): Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K_v channels and myocardial preconditioning. *Circ Res* 84: 973–979
- Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA (2007): Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J* 21, 2602–2612
- Headrick JP (1996): Ischemic preconditioning: bioenergetic and metabolic changes and the role of endogenous adenosine. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1227–1240
- Hearse DJ (1994): Myocardial ischaemia: can we agree on a definition for the 21st century? *Cardiovasc.Res.* ;28: 1737-1744
- Holden JE, Stone CK, Clark CM, Brown WD, Nickles RJ, Stanley C & Hochachka PW (1995): Enhanced cardiac metabolism of plasma glucose in high-altitude natives: adaptation against chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 79, 222–228
- Hurtado A (1960): Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann InternMed* 53, 247–258
- Chan DC (2006): Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006. 22:79–99
- Chandel NS, Schumacker PT (2000): Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol* 88, 1880–1889

- Chatham JC, Des Rosiers C, Forder JR (2001): Evidence of separate pathways for lactate uptake and release by the perfused rat heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E794–E802
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003): Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160:189–200
- Chen H, Chan DC (2005): Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human Molecular Genetics*, Vol. 14, Review Issue 2 R283–R289
- Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, et al. (2001): Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 88: 529–535
- Ishihara N, Eura Y, Mihara K (2004): Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci.* 117:6535–46
- Jovanovic A, Jovanovic S, Lorenz E, Terzic A (1998): Recombinant cardiac ATP-sensitive K_v channel subunits confer resistance to chemical hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* 98: 1548–1555
- Karbowski M, Jeong SY, Youle RJ. (2004): Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* 166:1027–39
- Knopp A, Thierfelder S, Koopmann R, Biskup C, Bohle T, Benndorf K (1999): Anoxia generates rapid and massive opening of K_{ATP} channels in ventricular cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 41: 629–640
- Koshihara T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2004): Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305:858–62
- Light PE, Kanji HD, Fox JE, French RJ (2001): Distinct myoprotective roles of cardiac sarcolemmal and mitochondrial K_{ATP} channels during metabolic inhibition and recovery. *FASEB J* 15: 2586–2594
- Lutz PL (2007): A message from the heart – why hypoxic bradycardia in fishes? Published by The Company of Biologists. *The Journal of Experimental Biology* 210, 1715–1725
- Maack Ch, O'Rourke B (2007): Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol* 102:369–392
- McCarthy J (2006): PKC ϵ and cardioprotection: an exploration of putative mechanisms. PhD Thesis, University of Cape Town, Cape Town

- McCarthy J, McLeod CJ, Minners J, Essop MF, Ping P, Sack MN (2005): PKC ϵ activation augments cardiac mitochondrial respiratory post-anoxic reserve – a putative mechanism in PKC ϵ cardioprotection. *JMol Cell Cardiol* 38, 697–700
- McCord JM (1985): Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163
- Moret PR (1971/72): Myocardial metabolic changes in chronic hypoxia. *Cardiol* 56, 161–172.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986): Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124–1136
- Ngumbela KC, Sack MN, Essop MF (2003): Counterregulatory effects of incremental hypoxia on the transcription of a cardiac fatty acid oxidation enzyme-encoding gene. *Mol Cell Biochem* 250, 151–158
- Noma A (1983): ATP-regulated K $_+$ channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147–148
- Novel-Chate V, Aussedat J, Saks VA, Rossi A (1995): Adaptation to chronic hypoxia alters cardiac metabolic response to beta stimulation: novel face of phosphocreatine overshoot phenomenon. *JMol Cell Cardiol* 27, 1679–1687.
- Ockaili R, Emani VR, Okubo S, Brown M, Krottapalli K, Kukreja RC (1999): Opening of mitochondrial KATP channel induces early and delayed cardioprotective effect: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H2425–H2434
- Ohnuma Y, Miura T, Miki T, Kuno A, Shimamoto K (2002): Opening of mitochondrial KATP channels occurs downstream of PKC- ϵ activation in the mechanism of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 283: H440–H447
- Opie LH (1998): *The Heart. Physiology, From Cell to Circulation*. Philadelphia, New York: Lipponcott-Raven
- Ostadal B, Kolar F (2007): Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol*; DOI: 10.1016/j.resp.2007.03.005.
- Ostadal B, Kolar F (1999): *Cardiac Ischemia: From Injury to Protection* (eds.) ISBN: 0-7923-8642-6
- Rajashree R, Koster JC, Markova KP, Nichols CG, Hofmann PA (2002): Contractility and ischemic response of hearts from transgenic mice with altered sarcolemmal KATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H584–H590
- Rimbaud S, Garnier A, Ventura-Clapier R (2009): Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacological Reports*, 61, 131–138

- Roden DM, Balsler JR, George AL Jr., Anderson ME (2002): Cardiac ion channels, *Ann. Rev. Physiol.* 64, pp. 431–475.
- Samavati L, Monick MM, Sanlioglu S, Buettner GR, Oberley LW, Hunninghake GW (2002): Mitochondrial KATP channel openers activate the ERK kinase by an oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C273–C281
- Sasaki N, Murata M, Guo Y, Jo SH, Ohler A, Akao M, O'Rourke B, Xiao RP, Bolli R, Marban E (2003): MCC-134, a single pharmacophore, opens surface ATP-sensitive potassium channels, blocks mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, and suppresses preconditioning. *Circulation* 107: 1183– 1188
- Sawyer DB, Colucci WS (2000): Mitochondrial oxidative stress in heart failure: “oxygen wastage” revisited. *Circ Res* 86: 119-120
- Scarpulla RC (2002): Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1576: 1-14
- Shah AM, Sauer H (2006): Transmitting biological information using oxygen: reactive oxygen species as signalling molecules in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Res* 71, 191–194.
- Sharma S, Taegtmeier H, Adroque J, Razeghi P, Sen S, Ngumbela K, Essop MF (2004): Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H1185–H1192
- Shinbo A, Iijima T (1997): Potentiation by nitric oxide of the ATP-sensitive K_v current induced by K_v channel openers in guinea-pig ventricular cells. *Br J Pharmacol* 120: 1568–1574
- Sivitz WI, Lund DD, Yorek B, Grover-McKay M, Schmid PG (1992): Pretranslational regulation of two cardiac glucose transporters in rats exposed to hypobaric hypoxia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 263, E562–E569
- Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, et al. (1999): Inhibition of copperzinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res* 85: 147-153
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van Der Blik AM (2001): Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12:2245–56

- Sofrova D, Ticha M, Barthova J, Entlicher G, Stiborova M, Novak F, Hudecek J, Hladik J, Krajhanzl A (2005): Biochemie-zakladni kurz, Bioenergetika. Nakladatelstvi karolinum, 80-7184-936-7, 122-128
- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD (2005): Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85, 1093–1129
- Stecyk JAW, Galli GL, Shiels HA, Farrell AP (2008): Cardiac survival in anoxia-tolerant vertebrates: An electrophysiological perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. Volume 148, Issue 4, November 2008, Pages 339-354
- Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marban E, Nakaya H (2002): Role of sarcolemmal KATP channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest* 109: 509–516
- Tappan DV, Reynafarje B, Potter VR, Hurtado A (1957): Alterations in enzymes and metabolites resulting from adaptation to low oxygen tensions. *Am J Physiol* 190, 93–98
- Toussaint O, Houbion A, Remacle J (1993): Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity. *Toxicology* 81: 89-101
- Toyoda Y, Friehs I, Parker RA, Levitsky S, McCully JD (2000): Differential role of sarcolemmal and mitochondrial KATP channels in adenosine-enhanced ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 279; H2694–H2703
- Tsutsui H (2006): Mitochondrial Oxidative Stress and Heart Failure. *The Japanese Society of Internal Medicine*. DOI: 10.2169/internalmedicine.45.1765
- Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ (1998): Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc.Res*;39;121-135
- Wang S, Cone J, Liu Y (2001): Dual roles of mitochondrial KATP channels in diazoxide-mediated protection in isolated rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H246–H255
- Wang Y, Ashraf M (1999): Role of protein kinase C in mitochondrial KATP channel-mediated protection against Ca²⁺ overload injury in rat myocardium. *Circ Res* 84: 1156–1165
- Wojtczak L, Wieckowski MR (1999): The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 31, 447–455

- Xu M, Wang Y, Ayub A, Ashraf M (2001): Mitochondrial KATP channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1295–H1303
- Yao Z, Gross GJ (1994): Effects of the KATP channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation* 89: 1769–1775
- Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N (1998): ATP-sensitive K_v channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C25–C37
- Zhu WZ, Xie Y, Chen L, Yang HT, Zhou ZN (2006): Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 40, 96–106

Internetové zdroje:

<http://rgd.mcw.edu/rgdweb/search/genes.html>