



**CENTRUM VÝZKUMU
CHOROB SRDCE A CÉV**

**Oddělení vývojové kardiologie
Fyziologický ústav AV ČR**



**2. lékařská fakulta
Univerzita Karlova, Praha**

ONTOGENETICKÝ VÝVOJ MITOCHONDRIÍ SRDEČNÍHO SVALU A JEJICH ÚLOHA V ODOLNOSTI K NEDOSTATKU KYSLÍKU

Dizertační práce

MUDr. Libor Škárka

Praha 2006

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli Prof. MUDr. Bohuslavu Ošřádalovi, DrSc. za trpělivé odborné vedení v průběhu studia a pomoc při psaní této dizertační práce. Dále bych chtěl poděkovat MUDr. Ivaně Ošřádalové, CSc. a MUDr. Zuzaně Chvojkové za spolupráci na části zabývající se myokardem v neonatálním období. Chtěl bych také poděkovat všem pracovníkům Oddělení vývojové kardiologie Fyziologického ústavu Akademie věd ČR za vytvoření vynikajících pracovních podmínek během mého pobytu na tomto oddělení. MUDr. Janu Kopeckému, DrSc. a kolektivu Oddělení biologie tukové tkáně bych rád poděkoval za spolupráci na části věnující se vývoji mitochondriálních funkcí a Mgr. Petru Stávkovi, PhD. za pomoc při měření aktivity laktát dehydrogenázy. MUDr. Josefu Zichovi bych rád poděkoval za cenné rady při zpracování dizertační práce.

V neposlední řadě bych rád poděkoval všem, kteří přímo i nepřímo přispěli ke vzniku této dizertační práce.

OBSAH

ÚVOD	7
LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
Fylogenetický vývoj mitochondrií	9
Struktura mitochondrie	9
Ontogenetický vývoj mitochondrií v srdeční buňce	11
Mitochondriální funkce	12
Membránový potenciál mitochondrie a produkce ATP	12
Rozpřahovací proteiny (UCP)	14
Mitochondrie a vápníková homeostáza	15
„Mitochondrial permeability transition pore“ (MPT pór).....	16
Produkce kyslíkových radikálů	18
Role mitochondrií v procesu buněčné smrti.....	19
Citlivost nezralého srdce k nedostatku kyslíku	22
Odolnost srdce k hypoxii.....	22
Odolnost srdce k ischemii	23
Možné mechanismy vyšší odolnosti nezralého srdce.....	24
Mitochondrie při ischemii srdečního svalu	27
Úloha mitochondrií v mechanismu kardioprotekce	28
CÍLE PRÁCE	30
METODIKA	31
Experimentální model	31
Izolace mitochondrií	31
Měření membránového potenciálu mitochondrií	32
Stanovení mitochondriálního proteinu a cytochrom c oxidázy (COX)	33
Stanovení UCP3	34
Stanovení mRNA UCP2, UCP3, ANT1 a ANT2	34
Perfuzie dospělého srdce	35

Perfuze neonatálního srdce.....	36
Stanovení LDH.....	37
Stanovení NAD⁺	39
Extrakce NAD ⁺	40
Detekce NAD ⁺	40
STATISTICKÉ HODNOCENÍ.....	42
VÝSLEDKY	43
Mitochondriální membránový potenciál.....	43
Distribuce MMP	43
Ontogenetický vývoj MMP	46
Vývoj vybraných mitochondriálních proteinů	47
Cytochrom <i>c</i> oxidáza	47
Rozpřahovací proteiny.....	47
Adenin nukleotid translokáza	47
Vývoj citlivosti mitochondrií k nedostatku kyslíku.....	50
Úloha MPT póru v mechanismu ischemicko-reperfuzního poškození u mláďat a dospělých	51
Ovlivnění tvorby LDH	51
Ovlivnění NAD ⁺	54
Vztah mezi LDH a rozsahem ischemicko-reperfuzního poškození	55
Vztah mezi LDH a NAD ⁺	56
DISKUZE	57
Vývoj membránového potenciálu mitochondrií	57
Vývoj exprese některých genů a proteinů vnitřní mitochondriální membrány	60
Úloha mitochondrií v citlivosti srdce k nedostatku kyslíku.....	62
Závěry	64
SOUHRN.....	66
LITERATURA	68

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
ANT	adenin nukleotid translokáza
Apaf-1	anti-apoptotic factor, faktor aktivující apoptotické proteázy
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CoQ	koenzym Q
COX	cytochrom <i>c</i> oxidáza
CPT	karnitin-palmitoyl transferáza
DF	developed force, síla kontrakce
EDTA	ethylenediamine-tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol-bis[2- aminoethyl]- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
FAD ⁺	flavin adenin dinukleotid
FADH ₂	redukovaný flavin adenin dinukleotid
FAF-BSA	fatty acid free bovine serum albumin, hovězí sérový albumin bez volných mastných kyselin
FCCP	carbonyl cyanide <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazon
GTP	guanosintrifosfát
IFM	interfibrilární mitochondrie
ICHS	ischemická choroba srdeční
K _{ATP}	na ATP závislé draslíkových kanály
LDH	laktát dehydrogenáza
MAPKs	mitogen aktivované protein kinázy
mitoK _{ATP}	mitochondriální na ATP závislé draslíkové kanály
MK	mastné kyseliny
MMP	mitochondriální membránový potenciál
MPT	mitochondrial permeability transition, změna mitochondriální permeability
mtDNA	mitochondriální DNA
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid
NAD ⁺	nikotin amid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotin amid adenin dinukleotid (redukovaná forma)

NO	nitric oxide, oxid dusnatý
NOS	nitric oxide synthase, syntáza oxidu dusnatého
NP	populace s nízkým membránovým potenciálem
PKC	protein kináza C
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species, kyslíkové radikály
RT-PCR	real-time quantitative two-step polymerase chain reaction, kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SR	sarkoplazmatické retikulum
SSM	subsarkolemální mitochondrie
TES	<i>N</i> -tris[hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethan
TIC	time to ischemic contracture, doba nutná ke vzniku ischemické kontraktury
TRIS	tris[hydroxymethyl]-aminomethan
UCP	uncoupling protein, rozpřahovací protein
VDAC	voltage-dependent anion channel, napětově řízený aniontový kanál
VP	populace s vysokým membránovým potenciálem

ÚVOD

Jedním z nežádoucích projevů současného života v ekonomicky rozvinutých zemích je vysoká frekvence onemocnění kardiovaskulárního systému a s tím související nejčastější příčina úmrtí. V roce 2000 zemřelo v zemích bývalého „socialistického bloku“ na tyto choroby 2 846 429 lidí, což je 60 % všech úmrtí {WHO, 2004}. Zhruba polovina případů jde na vrub jedinému onemocnění, ICHS. Je proto pochopitelné, že úsilí klinických a experimentálních kardiologů je vedeno snahou tuto nepříznivou situaci pozitivně ovlivnit. Jde však o úkol nadmíru obtížný a lze předpokládat, že jeho splnění si vyžádá dlouholetý intenzivní výzkum, zahrnující oblasti „od molekuly až k lůžku pacienta“.

Podstatou ICHS je nepoměr mezi dodávkou a potřebou kyslíku a substrátů v srdeční buňce. Při ischemii však není narušena pouze dodávka živin, ale i odvod produktů a zplodin buněčného metabolismu. Převahu získává anaerobní zpracování živin, metabolity se hromadí v tkáni, dochází k poruše iontové a neurohumorální homeostázy a v konečném důsledku je narušena kontraktilní funkce srdečního svalu. Rozhodující roli v celém procesu hraje čas, vymezující hranici mezi reverzibilním a ireverzibilním poškozením: zatímco následky krátkodobé ischemie jsou prakticky plně reverzibilní, déletrvajícím omezením perfuze vede k trvalému ovlivnění základních funkcí srdečních buněk. Aktivací anaerobní glykolýzy dochází k hromadění laktátu a ostatních metabolitů, pH uvnitř buněk klesá a zásoby ATP se postupně vyčerpávají. Konečnou fází omezení perfuze je smrt a rozpad buňky, ať již cestou nekrotickou či apoptotickou; vyvíjí se infarkt myokardu. Jedinou možností, jak tomuto procesu předejít, či ho alespoň omezit, je včasné obnovení průtoku krve koronárním řečištěm a tím i obnovení dodávky kyslíku srdeční buňce.

Rozsah ischemicko-reperfuzního poškození srdečního svalu nezávisí pouze na intenzitě a délce trvání ischemického inzultu, ale také na odolnosti srdce k nedostatku kyslíku. Je známo, že odolnost se v průběhu ontogenetického vývoje mění: nejvyšší je těsně po narození a poté až do dospělosti postupně klesá. Existuje mnoho faktorů, které jsou schopny odolnost srdce k nedostatku kyslíku ovlivnit, jednoznačné vysvětlení mechanismu odolnosti však dosud chybí. V posledních letech se do popředí zájmu dostala analýza úlohy mitochondrií při ischemicko-reperfuzním poškození a jejich potenciální účast v kardioprotektivních mechanismech v průběhu ontogenetického vývoje.

V dospělé srdeční buňce je cca 30 % objemu tvořeno mitochondriemi, které zpracovávají substrát cestou aerobní fosforylace. Jsou to právě mitochondrie, jež jsou schopny

krýt vysoký energetický obrat, vyžadovaný pracovními nároky srdečního svalu. Tato skutečnost má však své výhody i nevýhody: za přítomnosti kyslíku je efektivita přeměny energie v srdci díky mitochondriím vysoká, za hypoxie se z výhody stává nedostatek. Buňka je nucena spolehnout se na produkci ATP cestou omezeného a neefektivního anaerobního zpracování glukózy, které jen s obtížemi pokrývá požadavky myokardu.

Když Peter Mitchell obdržel Nobelovu cenu za formulaci „Chemiosmotické teorie oxidativní fosforylace“, považovala vědecká společnost otázku mitochondrií za vyřešenou {Mitchell a Moyle, 1967} – předpokládalo se, že jejich jedinou úlohou je tvorba ATP pro potřeby buněk. V posledních letech se však ukazuje, že mitochondrie zasahují také do procesů, které s energetickým metabolismem přímo nesouvisí. Kromě své tradiční úlohy, produkce ATP, zastávají mitochondrie v srdeční buňce ještě řadu dalších funkcí, a to jak za fyziologických, tak patologických podmínek - zasahují především do regulace vápníkové homeostázy, produkce kyslíkových radikálů a procesu buněčné smrti. Těsný vztah mitochondrií a buněčného metabolismu pak nutně vede k otázce, zda jejich funkce nějakým způsobem nesouvisí s mechanismem odolnosti srdce k nedostatku kyslíku.

Úkolem této dizertační práce je přispět k objasnění úlohy mitochondrií v mechanismu odolnosti srdce k nedostatku kyslíku v průběhu ontogenetického vývoje.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

FYLOGENETICKÝ VÝVOJ MITOCHONDRIÍ

Mitochondrie jsou semiautonorní buněčné organely, které od doby svého objevu Köllikerem v roce 1857 přitahují stále více pozornosti vědecké veřejnosti. Na základě mnoha experimentů se postupně odkrývá jejich obrovský význam v buněčném cyklu života a smrti.

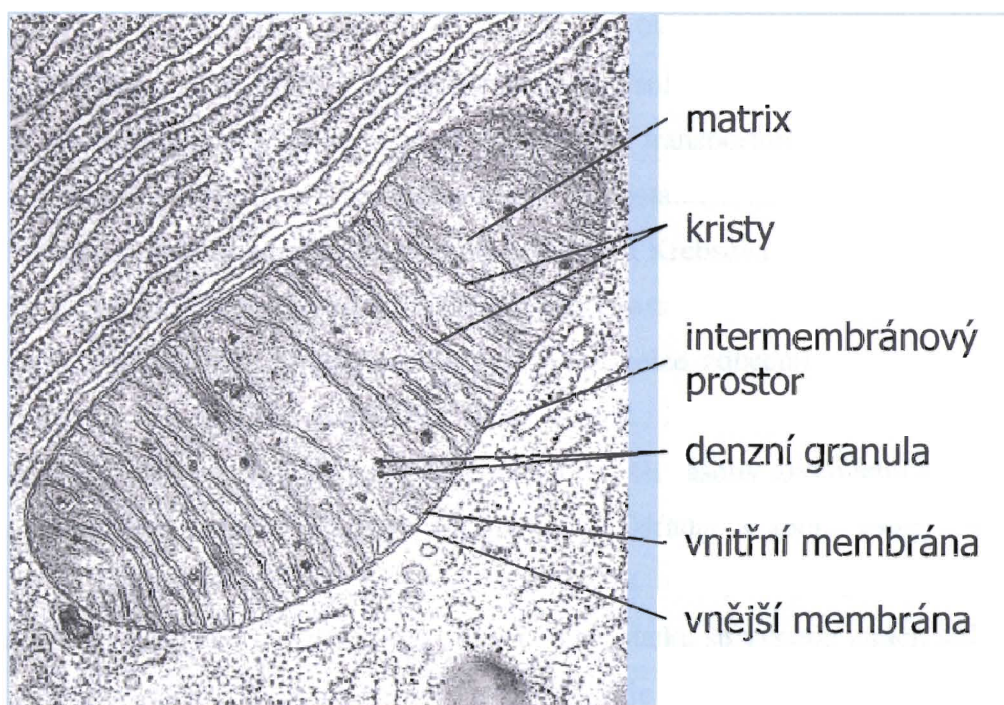
Proces zkoumání mitochondriálního genomu vedl od několika vývojových předchůdců mitochondrií k úzké skupině α -proteobaktérií, rickettsiím, jejichž hlavními představiteli jsou obligátní intracelulární parazité rodů *Rickettsia*, *Anaplasma* a *Ehrlichia*. Ty jsou dnes považovány za nejbližší eubakteriální příbuzné mitochondrií {Gray a spol., 1999}. Tito prapůvodci mitochondrií pronikli zhruba před půldruhou miliardou let do nitra eukaryotických hostitelů a poskytli jim své oxidační schopnosti. Umožnili tak původně anaerobním organismům efektivnější přežití za přítomnosti kyslíku, který byl pro většinu organismů, žijících v té době, toxický. V průběhu vývoje endosymbiotické prokaryotické buňky velkou část svého genomu redukovaly: některé části byly inkorporovány přímo do genomu hostitelské buňky a mnoho funkcí již byla schopna zajistit hostitelská buňka. Původní intracelulární parazité tak začali žít s hostitelským organismem v symbióze a postupně se specializovali do podoby současné mitochondrie.

Schopnost oxidovat organické substráty skýtá mnohem efektivnější využití energie než jejich zpracování bez využití kyslíku. Tato vlastnost mitochondrií je pro buněčný energetický metabolismus nejdůležitější – 90-95 % celkového množství ATP v organismu vzniká v mitochondriích v procesu oxidativní fosforylace {Skulachev, 1999}.

STRUKTURA MITOCHONDRIE

Mitochondrie jsou organely oválného tvaru s variabilní velikostí v řádu jednotek mikrometrů. V buňkách jsou často organizovány do složitě se větvících retikulárních sítí, vykazujících značnou fluiditu, zvláště u dělících se buněk {Bereiter-Hahn, 1990; Bereiter-Hahn a Voth, 1994}. Uložení mitochondrie v dospělých buňkách rozhodně není chaotické, u diferencovaných buněk byla pozorována distribuce do specifických regionů cytoplazmy {Porter a Bonneville, 1973}. Tvar a organizace mitochondrií se mohou v průběhu určitých onemocnění měnit {Nishino a spol., 1998; Arbustini a spol., 1998}.

Struktura mitochondrie je maximálně uzpůsobená hlavní funkci – produkci ATP. Od cytoplazmatického okolí je oddělena dvojitou membránou: vnější, která je propustná pro proteiny do velikosti 5000 Da, a vnitřní, která vymezuje prostor pro mitochondriální matrix a je propustná pouze prostřednictvím specifických transportních proteinů (obr. 1). Vnitřní membrána, na které se nacházejí především enzymy oxidativní fosforylace, je tvořena kristami, které zvětšují efektivní povrch pro energetickou přeměnu. Tvar a počet krist je různý a odpovídá intenzitě oxidativního metabolismu v dané buňce – například mitochondrie srdečního svalu mají kristaci mnohem hustší než mitochondrie pocházející z jiných tkání {Nicholls a Ferguson, 1992}. Mitochondriální matrix je charakterizována především obsahem mtDNA, RNA, enzymy Krebsova cyklu a β -oxidace mastných kyselin. MtDNA obsahuje celkem 13 genů, které kódují některé proteiny oxidativní fosforylace, geny ostatních součástí respiračního řetězce jsou součástí genomu buňky. Vnější a vnitřní membrána vymezují intermembránový prostor, který obsahuje především proteiny účastnící se apoptotické kaskády (prokaspázy a cytochrom *c*) {Weiss a spol., 2003}.

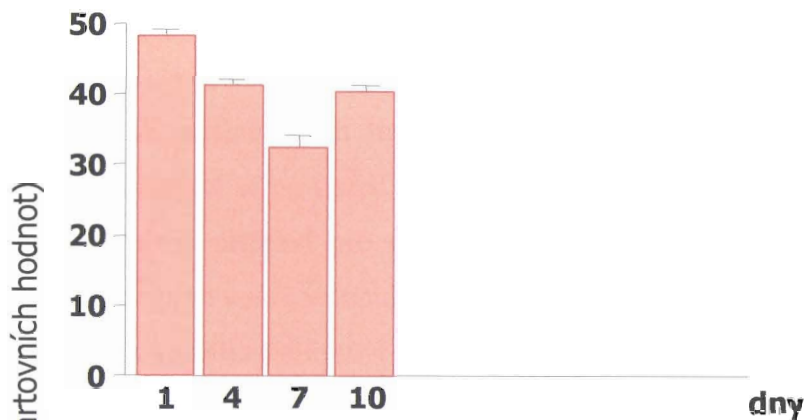


Obrázek 1: Struktura mitochondrie

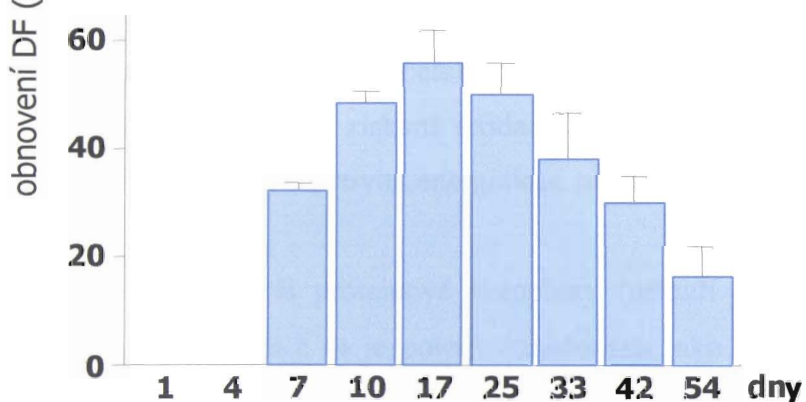
ONTOGENETICKÝ VÝVOJ MITOCHONDRÍÍ V SRDEČNÍ BUŇCE

V raném postnatálním období je uspořádání organel v srdeční buňce dosti chaotické; to se však v průběhu vývoje mění. Mitochondrie se postupně organizují do dvou hlavních populací: subsarkolemální a interfibrilární {Palmer a spol., 1977}; interfibrilární populace (IFM) se nachází mezi myofibrilami, subsarkolemální (SSM) pak pod plazmatickou membránou a v okolí buněčného jádra. Obě populace se od sebe liší i z biochemického hlediska (IFM má vyšší obsah i aktivitu oxidativních enzymů) a odlišně se chovají za různých patologických situací (vápníkové přetížení, ischemie, stárnutí, kardiomyopatie) {Palmer a spol., 1986; Piper a spol., 1985}. Jasný strukturální ukazatel, který by umožnil obě populace v srdeční buňce odlišit, však zatím nalezen nebyl {Škárka a Ošťádal, 2002}.

V průběhu ontogenetického vývoje se významně mění charakter metabolismu srdečního svalu. V raném postnatálním období v srdci převažuje anaerobně-glykolytické zpracování živin, postupně se však začíná uplatňovat oxidativní typ metabolismu a dospělé srdce je téměř ze 100 % závislé na vysoce efektivní produkci ATP cestou aerobní fosforylace, přičemž hlavním substrátem se stávají mastné kyseliny (MK) (tvoří 60-70 % substrátů oxidativního metabolismu {Van der Vusse a de Groot, 1992}, zbytek pokryjí glukóza, laktát a ketolátky {Jeffrey a spol., 1995}). Závislost nezralého srdce na glykolýze lze vysvětlit nižší kapacitou pro zpracování MK, která je dána nezralostí transportních systémů MK (zejména karnitin-palmitoyl transferáza) a pravděpodobně i nedostatkem karnitinu {Warshaw, 1970 a 1972}. Podobně i některé enzymy respiračního řetězce a Krebsova cyklu, některé cytochromy a karnitin mají v nezralém myokardu nižší aktivitu {Bass a spol., 2001; Dowel a Fu, 1998; Veerkamp a spol., 1985}. Uvedené informace však nelze zobecňovat, protože postnatální maturace enzymů je druhově specifická {Bass a spol., 2001}. S orientací nezralé srdeční buňky na glykolytický metabolismus jsou spojeny i vyšší zásoby glykogenu a aminokyselin; to může v průběhu hypoxie představovat výhodu {Ošťádal a spol., 1999}. V dospělém myokardu je sice energetická přeměna díky větší schopnosti zpracovávat substráty v přítomnosti kyslíku efektivnější, avšak při jeho nedostatku se výhoda ztrácí: srdce mláďete, které je naproti tomu méně závislé na dodávce kyslíku, je k jeho nedostatku výrazně odolnější {Ošťádal a spol., 1999; Ošťádalová a spol., 1998; Riva a Hearse, 1991b}{obr. 2}.



Ošťádalová a spol., 1998



Riva a Hearse, 1991

Obrázek 2: Ontogenetický vývoj citlivosti srdce k ischemii u potkana {Ošťádalová a spol., 1998, Riva a Hearse, 1991b}

MITOCHONDRIÁLNÍ FUNKCE

Membránový potenciál mitochondrie a produkce ATP

V průběhu zpracování potravy organismus využívá dva hlavní substráty – glukózu a MK. V cytoplazmě je glukóza v procesu anaerobní glykolýzy štěpena za vzniku pyruvátu a dvou molekul ATP. Po transportu pyruvátu do mitochondrie dojde za účasti enzymatického komplexu pyruvát dehydrogenázy k jeho přeměně na acetyl koenzym A (acetyl-CoA), vstupní substrát Krebsova cyklu. V mitochondriích je pak z pyruvátu za pomoci kyslíku získáno dalších 30 molekul ATP, což je 15 x více než v glykolytickém procesu bez účasti kyslíku. V Krebsově cyklu je acetyl-CoA pomocí elektronových přenašečů FAD^+ a NAD^+ postupně

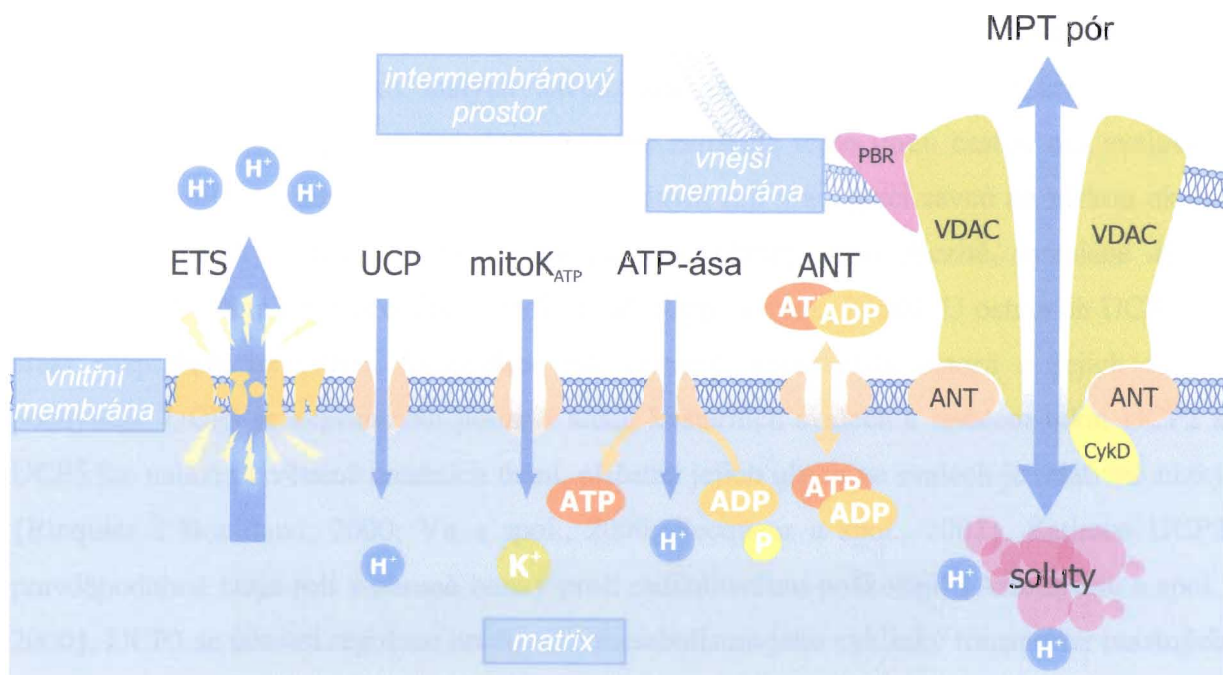
oxidován na oxid uhličitý. Produkty Krebsova cyklu jsou tedy redukované formy FAD^+ (FADH_2) a NAD^+ (NADH), 1 molekula GTP a jako odpadní produkt 2 molekuly CO_2 .

Proces oxidace MK začíná jejich transportem do mitochondrie. Enzym acyl-CoA syntáza (thiokináza), nacházející se na vnější mitochondriální membráně, esterifikuje MK na acyl-CoA, čímž je aktivuje a připraví pro několikastupňový transport do mitochondriální matrix. Aktivované MK nejprve volně vstupují do mezimembránového prostoru, kde jsou pak za účasti karnitinu a dvou karnitin-palmitoyl transferáz (CPT I a CPT II) transportovány do matrix. V cyklickém procesu beta-oxidace jsou MK postupně štěpeny, vzniká acetyl-CoA a redukované formy FAD^+ (FADH_2) a NAD^+ (NADH). Elektronové přenašeče FAD^+ a NAD^+ přenášejí vysokoenergetické elektrony, pocházející jak z beta-oxidace MK, tak z Krebsova cyklu, na komplex respiračních enzymů neboli elektronový transportní systém, klíčový prvek aerobního zpracování substrátu. Energie získaná oxidací živin se převádí do makroergních vazeb ATP téměř se 40 % účinností; efektivita energetické přeměny v mitochondriích je tedy poměrně vysoká.

Respirační řetězec tvoří čtyři proteinové komplexy (někteří autoři zahrnují mezi respirační komplexy i ATP syntázu a ta je potom označována jako V. komplex), jejichž úkolem je přenos elektronů z FADH_2 a NADH na konečný akceptor - kyslík; to by nebylo možné bez přítomnosti tzv. prostetických skupin respiračních komplexů (hem, flavin, Fe-S centra, ionty kovů). Transport elektronů začíná na komplexu I (NADH-CoQ reduktáze) oxidací NADH , kde dochází k přenosu elektronů na koenzym Q. Ten, jako jediný neproteinový přenašeč elektronů v respiračním řetězci, akceptuje elektrony jak z komplexu I, tak z komplexu II (sukcinát-CoQ reduktázy) a předává je na komplex III (QH_2 -cytochrom *c* (oxido) reduktázu). Horizontální transport elektronů (v rovině membrány) dále pokračuje na cytochrom *c*, kde jsou elektrony v procesu oxidace cytochromu *c* enzymatickým komplexem IV (COX) přeneseny na molekulární kyslík. Sloučením elektronů s kyslíkem a vodíkovými ionty vzniká jako konečný produkt oxidace voda (a v Krebsově cyklu CO_2).

V průběhu horizontálního transportu elektronů na kyslík pumpují respirační komplexy I, III a IV protony z matrix přes vnitřní membránu do mezimembránového prostoru a na membráně tak vzniká negativní protonový gradient (-150 až -180 mV). Ten je spolu s pH gradientem hlavní součástí MMP, jehož velikost charakterizuje energetický stav mitochondrie (obr. 3). Protonový gradient je hybnou silou ATP syntázy při fosforylaci ADP na ATP. Nezbytným prvkem v procesu tvorby ATP je ANT, která podle momentálních metabolických potřeb zajišťuje transport ATP a ADP do cytoplazmy a zpět. Produkce ATP v mitochondrii

probíhá na principu elektrochemického spřažení; tento fenomén popsal Mitchell {1961}, za což v roce 1978 obdržel Nobelovu cenu.



Obrázek 3: Struktura vnitřní mitochondriální membrány. H^+ - vodík, K^+ - draslík, P – fosfát, ATP – adenosintrifosfát, ADP – adenosindifosfát, ETS – elektronový transportní systém, UCP – „uncoupling“ protein, $mitoK_{ATP}$ – mitochondriální na ATP závislé draslíkové kanály, MPT pór – „mitochondrial permeability transition“ pór, VDAC – napětově řízený aniontový kanál, ANT – adenin nukleotid translokáza, CykD – cyklofilin D, PBR - periferní benzodiazepinový receptor

Rozpřahovací proteiny (UCP)

Rozpřahovací proteiny tvoří homologní podskupinu mitochondriálních transportních proteinů a jsou pravděpodobně odvozeny z protonových/aniontových kanálů. Nacházejí se v různých tkáních, kde ovlivňují produkci ATP, poměr NAD/NADH a zasahují do regulace různých metabolických procesů. V neposlední řadě se uplatňují v mechanismu tvorby ROS a buněčné antioxidační obrany.

Hlavní funkcí UCP je přeměna energie, získané oxidací substrátů, na teplo. UCP se nacházejí na vnitřní mitochondriální membráně, kde umožňují protonům volný průstup ve směru elektrochemického gradientu zpět do mitochondriální matrix. Tím snižují MMP, který

využívá ATP syntáza při fosforylaci ADP na ATP. Lze tedy říci, že přítomnost UCP zvyšuje protonovou vodivost vnitřní mitochondriální membrány a snižuje efektivitu tvorby ATP; tento efekt se nazývá rozpřažení oxidativní fosforylace a zmíněné proteiny jsou proto označovány jako „rozpřahovací“.

V současné době je známo 5 podtypů UCP – UCP1-UCP5 {Erlanson-Albertsson, 2003}, přičemž jejich distribuce a úloha v tkáních se liší. Jako první byl před 30 lety objeven UCP1, a to v hnědém tuku malých savců, kde je jeho hlavní úlohou tzv. netřesová termogeneze – proces, při kterém si organizmus zajišťuje teplo jinou cestou než svalovým třesem {Nicholls a Locke, 1984}. UCP1 hraje hlavní roli v adaptaci savců na nízkou okolní teplotu {Enerback a spol., 1997} a v mechanismu obrany proti obezitě, vyvolané dietou s vysokým obsahem tuku {Portillo a spol., 1998; Rippe a spol., 2000}. U ostatních UCP není efekt rozpřažení oxidativní fosforylace tak výrazný, proto řada autorů o jejich funkci pochybuje. UCP3 je exprimován pouze v srdci, kosterních svalech a hnědém tuku; UCP2 a UCP5 lze nalézt ve většině ostatních tkání, přičemž jejich obsah ve svalech je relativně nízký {Ricquier a Bouillaud, 2000; Yu a spol., 2000; Pecqueur a spol., 2001}. Zatímco UCP2 pravděpodobně hraje roli v obraně buňky proti radikálovému poškození {Arsenijevic a spol., 2000}, UCP3 se účastní regulace lipidového metabolismu jako cyklický transportér mastných kyselin; jeho zvýšená exprese byla prokázána u hladovějících organismů {Cadenas a spol., 1999; Hildebrandt a Neuffer, 2000}. U obou uvedených rozpřahovacích proteinů byl pozorován i určitý vliv na bazální metabolismus {Bouchard a spol., 1997}.

Mitochondrie a vápníková homeostáza

Klíčovými regulátory hladiny vápníku v srdeční buňce jsou především sarkoplazmatické retikulum, sarkolema a regulační proteiny; na regulaci buněčné hladiny vápníku se však podílejí také mitochondrie {Duchen, 1999; Gunter a spol., 2004}. Mitochondrie přijímají vápník díky existenci MMP; za normální situace je vápník transportován do matrix; při poklesu MMP, např. v průběhu ischemie, se sekvestrace kalcia mitochondrií snižuje.

Přenos vápníku přes vnitřní mitochondriální membránu zajišťují čtyři transportní mechanismy: dva pro přenos do mitochondrií a dva pro přenos ven {Gunter a spol., 2004}. Za přestup kalcia do mitochondrie je odpovědný jednak Ca^{2+} přenašeč (uniporter), který pracuje na principu elektrogenního transportu, jednak mechanismus označovaný jako RaM („rapid mode“). Ten je charakteristický především vysokou rychlostí transportu, avšak principiálně

jej od uniporteru nelze odlišit. O transport vápníku přes vnitřní membránu směrem z mitochondrie se starají dva elektroneutrální výměníky: na sodíku závislý $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a na sodíku nezávislý $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ výměník. I když na transportu kalcia z mitochondrie se podílejí oba, v srdeční mitochondrii má dominantní postavení typ výměníku závislý na sodíku.

Akumulací vápníku ovlivňují mitochondrie aktivitu oxidativní fosforylace a MPT póru (a tím i proces apoptózy). Již mírné zvýšení cytosolického vápníku má výrazný vliv na aktivitu tří dehydrogenázových komplexů Krebsova cyklu v mitochondriální matrix: pyruvát dehydrogenázy, NAD^+ -izocitrát dehydrogenázy a 2-oxoglutarát dehydrogenázy {Denton a McCormack, 1980}. To vede k signifikantnímu zvýšení poměru NADH/NAD^+ {Pralong a spol., 1992; Duchen a Biscoe, 1992} a v konečném důsledku ke zvýšení výkonu oxidativní fosforylace v buňce. Odpověď mitochondrie na zvýšení cytoplazmatické hladiny vápníku je velmi rychlá, stejně jako zpětné vyplavení vápníku z matrix ven. Tím se mitochondrie pravděpodobně brání vlastnímu poškození a případné aktivaci MPT póru (jedním z faktorů regulujících aktivitu póru je koncentrace vápníku), zároveň však poskytuje velmi rychlou odpověď na buněčnou vápníkovou signalizaci. Tento fenomén se v srdci uplatňuje v procesu spřažení excitace-kontrakce, a to jak za fyziologických podmínek {Trollinger a spol., 1997; Bowser a spol., 1998}, tak za patologických stavů, charakterizovaných přetížením buňky vápníkem {Ishide a spol., 1990; Lopez a spol., 1995}.

Účast mitochondrií na regulaci vápníku je nesporná; zatím se však nepodařilo uspokojivě vysvětlit jejich dvojí úlohu: snížení následků vápníkového přetížení a obnovení fyziologické činnosti buňky akumulací kalcia kontrastuje s faktem, že takto vzniklá vysoká hladina intramitochondriálního vápníku je jedním z faktorů aktivace mitochondriálního MPT póru, který se klíčovým způsobem podílí na spuštění apoptotického procesu (a tím na buněčné smrti).

„Mitochondrial permeability transition pore“ (MPT pór)

Za určitých okolností se mezi mitochondriální matrix a cytoplazmou může vytvořit velký komplex proteinů vnitřní a vnější membrány, který otevírá cestu pro výměnu solutů mezi oběma systémy. Protože hlavním znakem tohoto jevu je vysoká permeabilita mitochondriální membrány, označuje se tento proteinový komplex jako „permeability transition pore“ (MPT pore) {Crompton, 1999}.

Struktura MPT póru není zatím zcela jasná, ale předpokládá se, že sestává z mitochondriálních membránových proteinů, a to především z porinu (VDAC) a ANT

{Zamzami a Kroemer, 2001}. VDAC se za normálních okolností nachází na vnější mitochondriální membráně a je propustný pro molekuly o velikosti do 5000 Da. Zajišťuje tak volnou výměnu respiračních substrátů, jako např. NADH, FADH₂, ATP a ADP mezi cytoplazmou a intermembránovým prostorem. Vnitřní mitochondriální membrána je naproti tomu prakticky nepropustná. Dojde-li k aktivaci kanálu, v oblasti kontaktních míst obou membrán (místa, kde je vnitřní membrána nejbližší vnější) se vytvoří spojením VDAC a ANT velký pór a propojí matrix s cytoplazmou. Bylo zjištěno, že faktory, zvyšující pravděpodobnost otevření MPT póru, jsou především nízká hladina ATP, vysoká intramitochondriální koncentrace vápníku a změna pH {Halestrap a spol., 2004}. V srdečním svalu se MPT otevírá především v průběhu ischemicko-reperfučního poškození. Otevřený pór umožňuje volnou výměnu vody a solutů do velikosti 1500 Da mezi mitochondriální matrix a cytoplazmou buňky; pro mitochondrii to znamená vážné narušení vnitřního prostředí, dochází k rozvratu metabolické rovnováhy. V důsledku rychlého poklesu potenciálu na vnitřní membráně dochází záhy k rozpázení oxidativní fosforylace (tj. k přerušení přeměny energie, získané oxidací, na ATP), produkce ATP ustává; někdy dokonce ATP-syntáza v reverzním chodu štěpí ATP ve snaze zachovat membránový potenciál. ATP je v buňce rychle spotřebován, přičemž syntéza nového nefunguje, většina metabolických procesů buňky je narušena. Dalším důsledkem otevřeného MPT póru je zvýšená produkce ROS; poškození se tím potencuje a otevírají se další MPT póry. Díky volnému proudění vody a solutů mezi mitochondriální matrix a cytoplazmou dochází k narušení iontové rovnováhy, mitochondrie bobtná, kristy postupně mizejí a vnější membrána se rozpadá. Z mezimembránového prostoru se do cytoplazmy uvolňuje cytochrom c, který v souhrně s Apaf-1 a prokaspázou 9 (prekurzor enzymu ze skupiny cysteinových proteáz, které po aktivaci vedou k rozpadu buňky) vytváří tzv. apoptosom, který může nastartovat proces buněčné smrti.

Klíčovou součástí aktivace MPT póru se zdá být cyklofilin D, malý mitochondriální protein, který byl pojmenován díky své schopnosti vázat se na imunostatikum cyklosporin A. Cyklosporin A inhibuje jeho navázání na ANT, čímž výrazně omezuje aktivitu MPT póru. U myší, postrádajících gen pro cyklofilin D, byla pozorována vysoká odolnost k nekrotickému poškození buněk následkem oxidativního stresu a vápníkového přetížení {Baines a spol., 2005; Nakagawa a spol., 2005}. Podobný efekt byl rovněž pozorován v pokusech, kdy se k bloádě MPT póru používají inhibitory cyklofilinu D {Di Lisa a spol., 2001; Clarke a spol., 2002}.

O tom, zda se buňka vydá cestou apoptotické či nekrotické smrti, rozhoduje několik faktorů. Apoptotický proces je charakteristický především závislostí na dodávce ATP,

zatímco nekrotický proces je spíše vyvrcholením kompletního metabolického a energetického kolapsu. V nejnovějších pracích se ukazuje, že MPT pór se uplatňuje především v nekrotickém typu buněčné smrti, kde je aktivován oxidativním stresem a vysokou hladinou vápníku {Baines a spol., 2005; Nakagawa a spol., 2005}. Naopak úloze póru v apoptotickém procesu se již nepřisuzuje takový význam, jako původně. U myší postrádajících gen pro cyklofilin D nebylo pozorováno narušení apoptotické kaskády vyvolané cestou Bcl-2 proteinů ani řadou dalších proapoptotických stimulů {Nakagawa a spol., 2005}. Podobně Li a spol. {2004} pozorovali u neuronálních buněk, které tvořily velké množství cyklofilinu D, zvýšenou odolnost vůči apoptóze. Přesto nelze možnost účasti MPT póru v apoptóze zcela zavrhnout; je možné, že se zde uplatňuje právě jeho přechodné otevření {Halestrap a spol., 2004}.

Produkce kyslíkových radikálů

Mitochondrie jsou hlavními konzumenty kyslíku v buňce; není proto překvapivé, že hlavní zdroj produkce kyslíkových radikálů je třeba hledat právě zde. V průběhu respirace probíhají v mitochondriích, vedle normálních enzymatických reakcí, v nichž cytochrom *c* oxidáza redukuje O_2 na H_2O za účasti čtyř elektronů, i neenzymatické jednoelektronové redukce O_2 na superoxid ($O_2^{\cdot-}$); za normální respirace jsou takto převedena cca 2-4 % elektronů (34, 35). Existence těchto „parazitických“ reakcí je pravděpodobně nutná z důvodu negativního redox potenciálu vysoce reaktivních elektronových přenašečů ve specifických místech oxidativního řetězce (flavin a ubichinon). Tyto elektronové přenašeče mají v podmínkách aktivní respirace krátkou životnost, avšak v klidovém stavu mitochondrie, kdy je úroveň respirace limitována dostupností ADP, jejich životnost roste; stupeň produkce kyslíkových radikálů tedy stoupá zejména při nedostatku ADP {Skulachev, 1999}. Většina autorů se shoduje v tom, že produkce kyslíkových radikálů je odpovědná za poškození myokardu v průběhu ischemie/reperfuze; omezování jejich produkce by proto mělo být jedním z nejdůležitějších obranných mechanismů buňky proti ischemicko-reperfučnímu poškození.

Mitochondrie jsou hlavním zdrojem produkce ROS, ale obsahují také mechanismy, které ROS likvidují či jejich tvorbu omezují. Obrana proti radikálovému poškození buňky má pak několik stupňů: první linii zajišťují mitochondriální antioxidantní enzymatické systémy – mitochondriální superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza a mitochondriální kataláza {Radi a spol., 1991}. Jejich úkolem je enzymatická likvidace kyslíkových radikálů a jejich

meziproduktů na neškodné látky. Alternativním mechanismem, který na rozdíl od antioxidantů tvorbu kyslíkových radikálů omezuje, je tzv. „mild uncoupling“. Při nedostatku ADP pracuje respirační řetězec takřikajíc „naprázdno“, energie ve formě protonového gradientu není ATP syntázou transformována do makroergních vazeb ATP, MMP dosahuje svých maximálních hodnot a produkce ROS stoupá. Skulachev {1999} předpokládá, že v této fázi vstupují do hry rozpráhovací proteiny, a to tak, že mírně zvyšují vodivost vnitřní membrány pro protony a tím snižují MMP (mild uncoupling). Experimentálně bylo prokázáno, že mírné snížení MMP (cca o 15 %) v srdeční buňce, kdy ještě není ovlivněna tvorba ATP, desetinásobně redukuje produkci H_2O_2 {Korshunov a spol., 1998}. V průběhu déletrvajícího oxidačního stresu, např. v průběhu ischemicko-reperfuzního poškození srdečního svalu, dochází k aktivaci dalšího stupně antioxidační ochrany buňky – otevření MPT póru. To vede především k výraznému poklesu membránového potenciálu a k rozprážení oxidativní fosforylace. Syntéza ATP je v takové mitochondrii kompletně zastavena. Následkem otevření póru dojde k narušení mitochondriální funkce, bobtnání a rozpadu mitochondrie, která je za velké množství kyslíkových radikálů odpovědná. V případě, že je zasaženo více mitochondrií, zvyšuje se i možnost aktivace apoptotického procesu; smrt buňky produkující radikály pak představuje nejvyšší stupeň obrany proti oxidačnímu poškození (obr. 4).

Role mitochondrií v procesu buněčné smrti

Obecně se soudí, že mitochondrie se na buněčné smrti mohou podílet třemi hlavními mechanismy (které se navzájem částečně překrývají): (i) rozvratem elektronového transportu, oxidativní fosforylace a produkce ATP, (ii) produkcí proteinů, aktivujících kaspázový systém proteáz a (iii) zásahem do buněčného redox potenciálu {Green a Reed, 1998}.

i) Rozvrat elektronového transportu

Narušení elektronového transportu znamená narušení podstaty energetického metabolismu: energie, získaná oxidací živin, nemůže tak být v mitochondrii převedena do makroergních fosfátových vazeb ATP a většina klíčových enzymatických reakcí buněčného metabolismu se zastaví. Pro mitochondrii je proto z hlediska zachování základní funkce – oxidativní fosforylace – důležité udržovat MMP. Proto jakákoliv porucha elektronového transportního systému (nedostatek kyslíku, nedostatek substrátů, blokátory jednotlivých oxidativních komplexů, vady genů oxidativních komplexů) vede okamžitě k poklesu

membránového potenciálu s možnou zástavou produkce ATP. Nejzávažnější důsledky narušení elektronového transportu lze proto očekávat ve tkáních s vysokým energetickým obratem a tedy nízkou odolností k nedostatku kyslíku, např. v mozku a srdci.

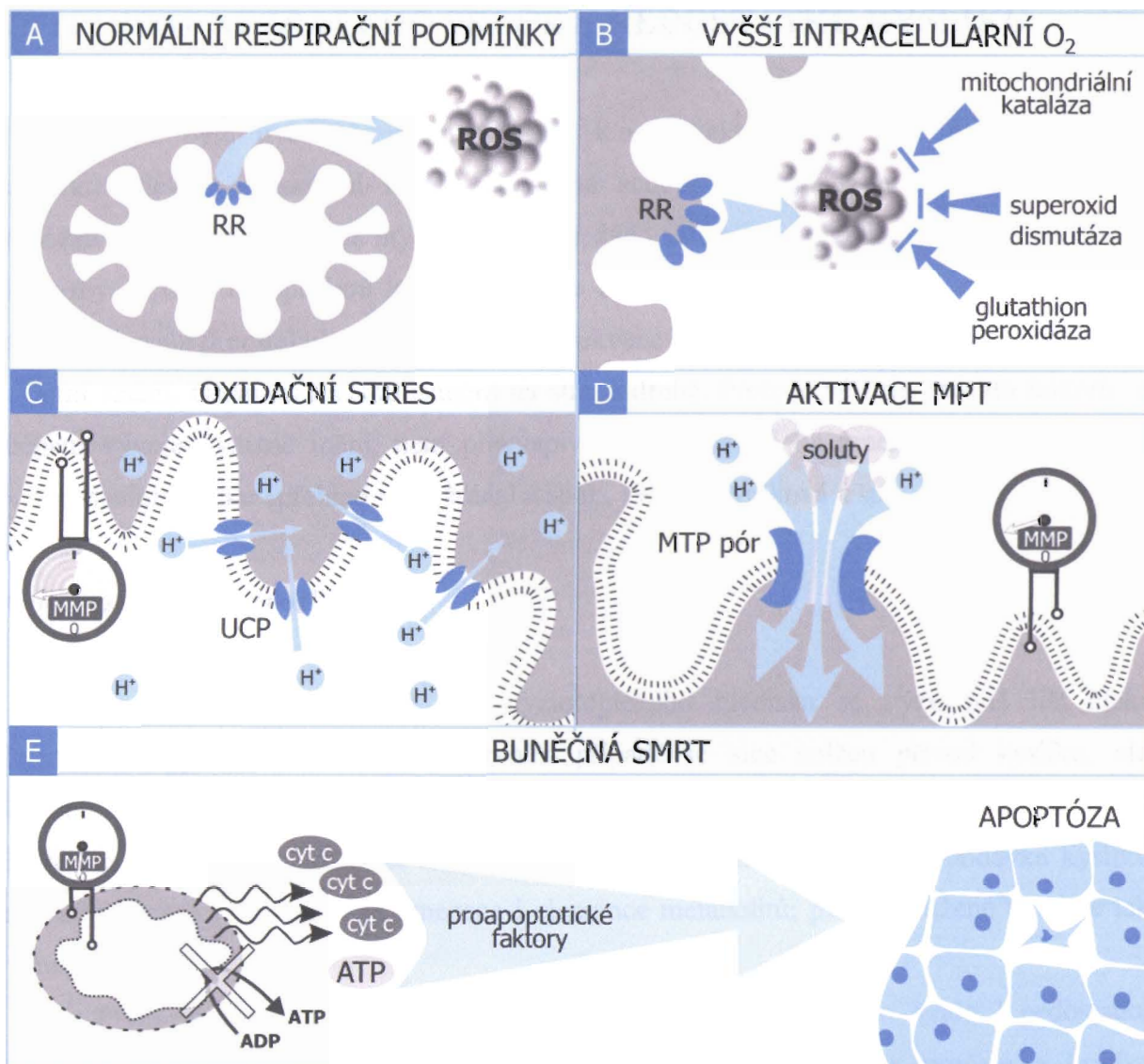
ii) Kaspázový systém a apoptóza

Obecně se soudí, že rozhodující úlohu při samotném poškození buňky v apoptotickém procesu hrají cysteinové proteázy, které se řadí mezi tzv. kaspázy. Jde o systém enzymů, jenž se řetězově aktivuje na složitou apoptotickou signalizaci, charakterizovanou porušením mitochondriální membrány s následným uvolněním cytochromu *c*, prokaspázy 9 a Apaf-1. Aktivace kaspázového systému vede v konečném důsledku k narušení řady buněčných procesů a rozpadu buňky apoptotickou cestou.

Apoptóza představuje komplikovaný proces, do jehož řízení je zapojena celá řada mechanismů; v konečném důsledku jde o altruistický způsob buněčné smrti – dochází k odstranění vybrané buňky bez negativního vlivu na okolní tkáň. Aktivace tohoto procesu může mít celou řadu příčin, ale zdá se, že klíčovou roli zde hraje mitochondrie a v ní především MPT pór; ukázalo se, že blokátory MPT póru (cyklosporin A, sanglifehrin A, kyselina bongkreková) lze apoptózu experimentálně kompletně zablokovat {Zamzami a spol., 1996; Di Lisa a spol., 2001; Halestrap a spol., 2004}. I když práce Nakagawy {a spol., 2005} a Bainse {a spol., 2005} jsou s předchozím tvrzením v rozporu a nepřisuzují MPT póru v apoptóze klíčovou roli, jeho role v mechanismu ischemicko-reperfuzního poškození je velmi pravděpodobná {Di Lisa a Bernardi, 2006}.

iii) Zásah do buněčného redox potenciálu

Jak již bylo uvedeno, mitochondrie jsou hlavním zdrojem kyslíkových radikálů v buňce a při jejich nadměrné produkci dochází k vážnému poškození všech buněčných systémů s možností buněčné smrti {Von Harsdorf a spol., 1999}.



Obrázek 4: Mitochondriální obrana proti oxidačnímu stresu. **A:** za normálních respiračních podmínek respirační řetězec (RR) produkuje cca 2-4 % kyslíkových radikálů (ROS). **B:** Vyšší koncentrace kyslíku v buňce a vysoký MMP zvyšují produkci kyslíkových radikálů. Prvním stupněm mitochondriální obrany proti radikálům jsou antioxidační enzymy. **C:** Další stupeň obrany spočívá v mírném zvýšení vodivosti vnitřní mitochondriální membrány pomocí protonoforických proteinů (UCP). Zatímco produkce radikálů se výrazně sníží, tvorba ATP zůstává prakticky beze změn. **D:** Pokud dojde ke kritickému snížení MMP, může dojít k přechodné aktivaci MPT póru. **E:** Protrahovaný oxidační stres vede k trvalému otevření MPT póru, poklesu MMP a rozpřažení oxidační fosforylace. Ve snaze zachovat MMP může docházet i ke štěpení ATP činností ATP syntázy v reverzním chodu. V konečné fázi dojde ke smrti buňky buď nekrotickou či apoptotickou cestou (v případě dostatečného množství ATP). Odstranění buňky produkující oxidační radikály pak představuje poslední stupeň obrany proti radikálovému poškození tkáně.

CITLIVOST NEZRALÉHO SRDCE K NEDOSTATKU KYSLÍKU

Jak již bylo uvedeno, odolnost srdce k nedostatku kyslíku se v průběhu vývoje charakteristickým způsobem mění. Závisí na schopnosti organismu zajistit dostatečné množství kyslíku pracujícímu myokardu, což je dáno souhrou mnoha faktorů, např. průtokem krve myokardem a kapacitou krve pro přenos kyslíku na straně jedné a funkčním stavem srdečního svalu (kontraktilní funkcí, tepovou frekvencí, systolickým napětím stěny myokardu, externí zátěží, bazálním metabolismem) na straně druhé. Protože většina z těchto faktorů se během vývoje výrazně mění, není překvapivé, že dochází i ke změnám odolnosti srdce k nedostatku kyslíku {přehled viz Ošťádal a spol., 1999; Chvojková a spol., 2006}.

Odolnost srdce k hypoxii

Je třeba konstatovat, že z patofyziologického hlediska se významně liší efekt hypoxické hypoxie a ischemie. V prvním případě je sice snížen přívod kyslíku, ale odstraňování (clearance) metabolitů je zachováno, takže změny pH jsou minimální. U ischemie, vznikající snížením či zástavou průtoku koronárními cévami, je dodávka kyslíku rovněž snížena, avšak navíc je omezena i clearance metabolitů; pH v postižené tkáni se tak výrazně snižuje.

První informace o vývojových změnách odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku přinesly práce studující doby přežití potkana, kočky, psa, morčete a králíka v anoxických podmínkách {Fazekas a spol., 1941}. Bylo prokázáno, že u každého druhu je doba přežití nepřímo úměrná zralosti novorozence. Schopnost novorozenců odolávat hypoxii byla v té době přisuzována vysokému obsahu glykogenu v srdci a játrech. Tyto studie však byly prováděny na intaktních zvířatech a výsledek mohl být nepřímo ovlivněn účinkem hypoxie na centrální nervový systém {Trojan, 1978} a acido-bazickou rovnováhu. Koncepce vyšší tolerance neonatálního srdce byla podpořena studiemi, které později provedli Su a Friedman {1973} a Jarmakani a spol. {1978a,b, 1982}. Na modelu perfundovaného myokardu ukázali, že 30ti minutová anoxie (perfuzát ekvilibrován se směsí 95 % N₂ a 5 % CO₂) měla u novorozeného králíka (stáří 0-2 dny) a psa (0-9 dní) minimální efekt na kontraktilní funkci; u obou druhů byl negativní vliv hypoxie úměrný věku. U novorozenců byla proti dospělým značně zvýšená produkce laktátu, což naznačuje, že novorozenci jsou schopni udržovat v myokardu dospělé hladiny ATP. Další studie na novorozeneckém srdci

ukázaly, že některé protektivní parametry, jako změny v transportu vápenatých iontů {Jarmakani a spol., 1979; Nakanishi a spol., 1982} a mitochondriálních funkcí {Young a spol., 1983} po hypoxii ve srovnání s dospělými přetrvávají déle. Podobná věková závislost odolnosti k hypoxii byla pozorována i u potkanů {Ošťádal a spol., 1982}; tolerance izolované pravé komory, vyjádřená jako obnovení kontraktility po 20ti minutové dusíkové anoxii, byla signifikantně vyšší u novorozených samců než u dospělých jedinců. Ontogenetický vývoj vykazoval bifázický profil: relativně vysoká odolnost srdce při narození stoupala až do věku 30 dní (to znamená do konce doby odstavu) jak u samců, tak u samic. Avšak u samců od 30. do 60. dne odolnost klesala, zatímco u samic se nezměnila; dospělý samičí myokard tak byl k hypoxii významně odolnější. Lze tedy shrnout, že citlivost srdce k nedostatku kyslíku se během ontogenetického vývoje signifikantně mění a že časový průběh změn je u samců a samic odlišný.

Odolnost srdce k ischemii

Stejně jako k hypoxii je nezralý myokard relativně odolný i k ischemii, a to u králíka {Baker a spol., 1988}, prasete {Baker a spol., 1990}, psa {Julia a spol., 1990, I a II} a potkana {Riva a Hearse, 1991a a 1993; Yano a spol., 1987}. Riva a Hearse {1993} pozorovali, že časově závislé změny odolnosti ke globální ischemii u izolovaného srdce samce potkana (vyjádřené jako obnovení systolického napětí po ischemii) vykazují bifázický profil, se vzrůstem odolnosti od konce prvního postnatálního týdne do doby odstavu a následným poklesem do doby dospělosti. Tento časový průběh je podobný tomu, který lze pozorovat u odolnosti srdce k hypoxii (viz výše). Detailní analýza tolerance izolovaného srdce potkana ke globální ischemii během prvního týdne života ukázala významný pokles od prvního do sedmého dne, naznačující možný trifázický profil ontogenetického vývoje citlivosti srdce k ischemii, alespoň u potkana {Ošťádalová a spol., 1998} (obr. 2). Citlivost neonatálního myokardu k ischemii může být druhově specifická: srdce neonatálního prasete je k ischemii citlivější než srdce neonatálního králíka {Baker a spol., 1995}.

V tomto kontextu je však nutné zmínit i práce, které ukazují, že nezralé srdce může být k ischemickému poškození citlivější než srdce dospělé {Chiu a spol., 1987; Wittnich a spol., 1987}. Dle Quantze a spol. {1992} se shora uvedené výsledky liší díky rozdílným parametrům, použitým ke stanovení tolerance. Tito autoři totiž sledovali „dobu nutnou ke vzniku ischemické kontraktury“ (TIC), jež byla u neonatálních srdcí potkana kratší; uzavřeli proto, že nezralá srdce jsou k ischemickému poškození citlivější. Naproti tomu v ostatních

studiích autoři hodnotili obnovení funkce komor v reperfuzi: u nezralých srdcí došlo po ischemii k lepšímu obnovení funkce, což ukazuje, že jsou k ischemickým zásahům odolnější. Vznik ischemické kontraktury je pokládán za počáteční známku ireverzibilního poškození a odpovídá vyčerpání zásob vysokoenergetických fosfátů. Nevypovídá však nic o situaci v reperfuzi a nesvědčí o nezvratném poškození ventrikulární funkce; TIC tedy není dobrým ukazatelem ischemického poškození. Navíc hodnocení stupně funkčního obnovení kontraktility po ischemickém inzultu je mnohem blíže klinickým situacím, ke kterým dochází např. v kardiologii a kardiochirurgii.

Možné mechanismy vyšší odolnosti nezralého srdce

Mechanismy odpovědné za vyšší odolnost nezralého srdce k nedostatku kyslíku dosud nebyly uspokojivě objasněny {Ošťádal a spol., 1999} (tab. 1). Lze spekulovat, zda vysvětlení tohoto fenoménu lze nalézt v nižších energetických požadavcích, vyšší anaerobní glykolytické kapacitě a větších zásobách glykogenu v nezralém srdci {Hoerter, 1976}. Odolnost nezralého srdce k ischemii může rovněž souviset s lepší schopností využívat aminokyseliny transaminací {Julia a spol., 1990}. Během vývoje se mění též míra utilizace ATP {Hohl, 1997}: ve zralém srdci dojde rychleji k vyčerpání jeho zásob. Naproti tomu v nezralém srdci se během ischemie akumuluje AMP, což umožňuje rychlé doplnění ATP v reperfuzi; v dospělém srdci je potřebná syntéza *de novo*. Tato pozorování naznačují, že nezralý myokard je lépe připraven pro syntézu ATP, což je výhodné v podmínkách nízké dostupnosti substrátů.

Dalším faktorem, který se může podílet na zvýšené odolnosti nezralého srdce, jsou vývojové změny v transportu Ca^{2+} {Nijjar a Dhalla, 1997}. Homeostáza kalcia je v úzkém vztahu k metabolismu buňky a je obecně přijatou determinantou tkáňového poškození jak při nedostatku, tak při obnovení dodávky kyslíku. Transport Ca^{2+} se u novorozenců a dospělých liší (obr. 5): je známo, že kontrakce myokardu u savců je závislá jak na přestupu Ca^{2+} přes sarkolemu, tak na uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula {Fabiato, 1983}. Během vývoje se však výrazně mění vzájemný poměr těchto mechanismů. Kontrakce neonatálního myokardu, ve kterém není sarkoplazmatické retikulum plně vyvinuto, je ve velké míře závislá na toku vápníku přes sarkolemu, především $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníkem. Během dalšího vývoje se zvyšuje schopnost sarkoplazmatického retikula akumulovat vápenaté ionty, mění se rovněž distribuce vápníkových kanálů a postupně dozrává schopnost uvolňovat Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula {Tanaka a Shigenobu, 1989}. Podobně se zvyšuje citlivost

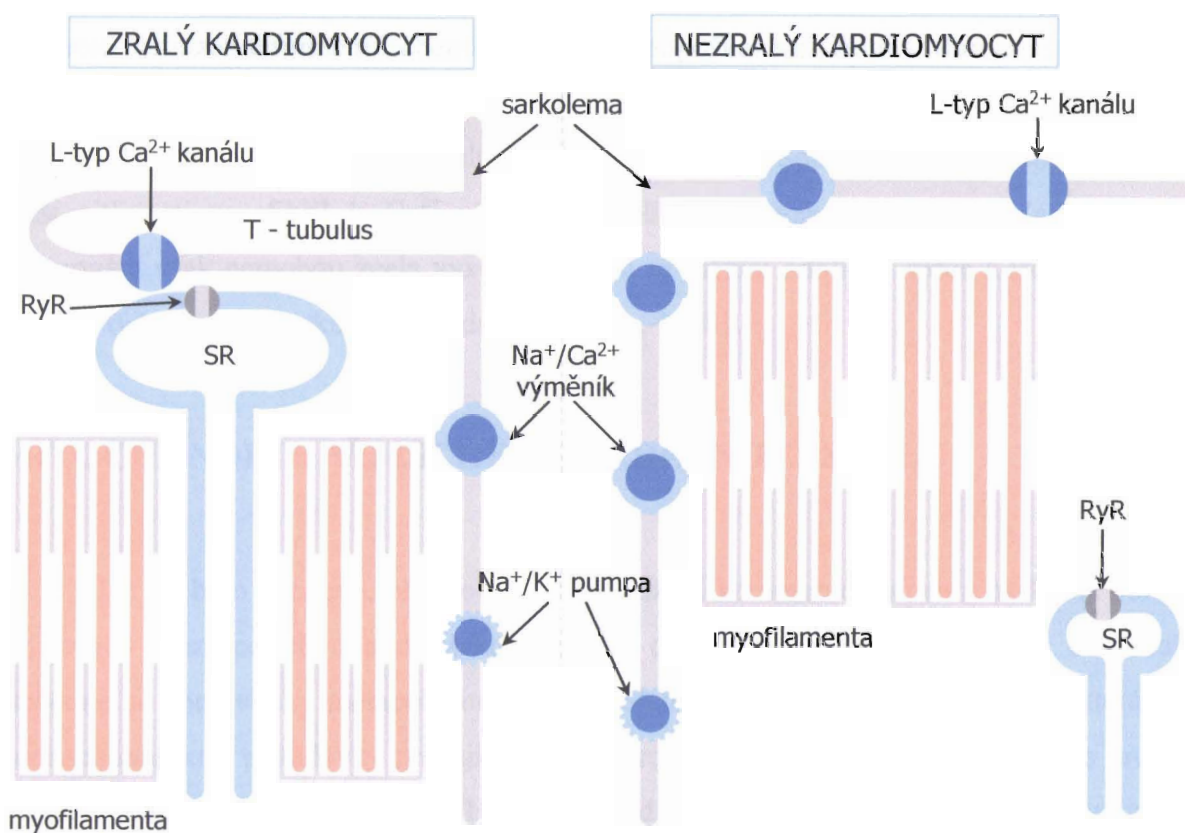
srdečních myofilament k Ca^{2+} ; u potkana dosáhne dospělých hodnot po dvou týdnech postnatálního života {Vornanen, 1997}.

Tabulka 1: Možné příčiny vyšší odolnosti nezralého myokardu k ischemicko/reperfuznímu poškození {převzato z Ošťádal a Kolář, 1999}

↓ Energetické nároky
↑ Glykolytická kapacita
↑ Zásoby glykogenu
↓ Vychytávání volných mastných kyselin
Modifikace katabolických drah pro ATP
↓ Produkce volných kyslíkových radikálů
↓ Citlivost k acidóze
↓ Citlivost k vápníkovému přetížení

Nezralé srdce je díky méně rozvinutému sarkoplazmatickému retikulu relativně více závislé na transsarkolemálním vstupu Ca^{2+} a je citlivější k negativně inotropnímu účinku antagonistů vápníkových kanálů, jako je verapamil, nifedipin a diltiazem. Dávky, které u dospělých zvířat vyvolaly jen malý negativně inotropní efekt, u novorozených srdcí kontrakci zastavily {Boucek a spol., 1984; Škovránek a spol., 1986; Kolář a spol., 1990}. Tato pozorování lze označit za překvapivá, protože vstup vápníku přes membránu zajišťuje v nezralém srdci především Na/Ca^{2+} výměník, který není antagonisty vápníku přímo ovlivněn. Zdánlivý rozpor lze vysvětlit zkrácením akčního potenciálu, ke kterému vlivem inhibice vápníkových kanálů dochází {Artman a spol., 2002}. Vývojové rozdíly v účinku vápníkových antagonistů tedy nejsou zřejmě výsledkem změn v hustotě a afinitě L-typu vápníkových kanálů {Ošťádal a Kolář, 1999}, neboť tyto parametry v srdci potkana dosahují dospělých hodnot již během prvního týdne života. Podobně se v srdci novorozených a dospělých králíků zásadně neliší vazebné vlastnosti vápníkových kanálů. Byly však popsány významné vývojové rozdíly v subcelulární lokalizaci těchto kanálů; během zrání jsou soustředěny v junkčních oblastech vznikajících T-tubulů, které jsou spjaty se sarkoplazmatickým retikulem {Wibo a spol., 1991}. Tento průběh, spolu se vzrůstající funkční úlohou uvolňování

Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula, může vysvětlovat klesající citlivost k negativně inotropnímu působení vápníkových antagonistů během vývoje. Navzdory významným mezidruhovým rozdílům je však zřejmé, že ontogenetické změny v citlivosti k vápníkovým antagonistům existují u všech savců, včetně člověka, a závisejí na časovém průběhu zrání systémů, jež ovlivňují transport Ca^{2+} v srdci a cévách. Klinické použití antagonistů kalcia je proto u dětských pacientů značně limitováno {Artman, 1992; Artman a spol., 2002; Ošťádal a spol., 1989,1999}.



Obrázek 5: Transport vápníku ve zralém a nezralém kardiomyocyty. Ve zralém kardiomyocyty otvírá depolarizace membrány napětově závislé Ca^{2+} kanály (L-tyt). Přestup extracelulárního Ca^{2+} do buňky vyvolá uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula (SR) specifickými (RyR) Ca^{2+} kanály (calcium-induced calcium release). V nezralém kardiomyocyty chybí T-tubuly, SR není dostatečně vyvinuté; buňky jsou více závislé na přestupu Ca^{2+} sarkolemou cestou $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníku (upraveno z Artman a spol., 2002).

Dalším faktorem, který se podílí na tkáňovém poškození, jsou volné kyslíkové radikály. Dle Southwortha a spol. {1997} produkuje nezralé srdce v reperfuzi méně volných radikálů; největší rozdíl pozorovali po 20 minutách ischemie, kdy zralé srdce vytvořilo čtyřikrát více volných radikálů než srdce nezralé. Jelikož hlavním zdrojem kyslíkových radikálů je u tohoto modelu xantin-oxidázový systém, lze vývojové změny schopnosti tvořit volné radikály v reperfuzi vysvětlit stimulací zmíněného systému během ischemie. Není však jasné, zda se za vývoje objevují podobné změny i v dalších systémech tvořící volné radikály. Dále zůstává nejasný přesný vztah mezi produkcí volných radikálů a obnovou kontraktilních funkcí v reperfuzi. Zdá se však, že rozhodující roli hraje předchozí ischemické poškození (délka ischemického insultu) {Ošťádal a Kolář, 1999}; termín reperfuzní poškození by měl být proto nahrazen termínem ischemicko-reperfuzní poškození {Bolli a Marban, 1999}.

Důležitou roli může také hrát acidóza: negativně inotropní efekt nízkého pH byl překvapivě nižší u neonatálních králíků, což může být dle Solara a spol. {1988} vysvětleno nižší citlivostí myofibril k Ca^{2+} při nízkém pH v této věkové skupině. Žádná z těchto pozorování však nemohou zcela vysvětlit rychle se měnící odolnost srdce k ischemii během prvního týdne života potkana {Ošťádalová a spol., 1998}.

MITOCHONDRIE PŘI ISCHEMII SRDEČNÍHO SVALU

Jak již bylo uvedeno, příčinou ICHS je zúžení koronárních tepen a následná porucha rovnováhy mezi potřebou a dodávkou kyslíku do srdeční buňky. V průběhu déletrvající ischemie se energetický metabolismus musí spolehnout na anaerobní glykolýzu, která však není schopna krýt požadavky pracujícího myokardu. Díky tomu se v srdeční buňce hromadí škodlivé produkty, zejména laktát a H^+ ionty. Hladina ATP rychle klesá, a to ze dvou důvodů: jednak proto, že jeho tvorba je zastavena pro nefunkční oxidativní fosforylaci, jednak proto, že ATP syntáza ve snaze udržet MMP začíná ATP štěpit {Jennings a spol., 1991}. Tento obranný mechanismus funguje jako prevence proti selhání mitochondriálního metabolismu, avšak v případě déletrvajícího nedostatku kyslíku urychluje energetický kolaps buňky. V průběhu ischemie se v respiračním řetězci na vnitřní mitochondriální membráně hromadí částečně redukované meziprodukty ubisemichinonu; ty po obnovení průtoku krve reagují s kyslíkem a produkují obrovské množství superoxidu {Vanden Hoek a spol., 1997}. Za normálních okolností je superoxid přeměněn na relativně málo škodlivý peroxid vodíku enzymatickým komplexem superoxid dizmutázy, nacházející se v matrix mitochondrie. Avšak

za ischemie nejsou enzymatické antioxidační systémy již schopny zabránit vzniku velkého množství H_2O_2 , které je v přítomnosti redukováných atomů železa (Fe-S skupiny respiračního řetězce, akonitáza, ferritin) zdrojem vysoce nebezpečných hydroxylových radikálů {Biamond a spol., 1984}. Po vyčerpání veškerých obranných antioxidačních mechanismů buňky dochází k radikálovému poškození enzymů oxidativního řetězce (místa největšího poškození jsou totožná s místy největší produkce radikálů) a mitochondrie pak není schopna obnovit membránový potenciál a zahájit produkci ATP; obnova dodávky kyslíku pak nemusí vést k reparaci srdečních funkcí. V případě déletrvající ischemie dochází k ireverzibilnímu poškození: mitochondrie se rozpadají, veškerá energie je vyčerpána, dojde k narušení iontové a metabolické rovnováhy v cytoplazmě a srdeční buňka podléhá nekróze či apoptóze {Fliss a Gattinger, 1996; Akiyama a spol., 1997}.

ÚLOHA MITOCHONDRIÍ V MECHANIZMU KARDIOPROTEKCE

Jak jsme již uvedli, stupeň ischemického poškození závisí nejen na intenzitě a trvání ischemického stimulu, ale také na stupni odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku. Toleranci myokardu k ischemii lze zvýšit např. adaptací na chronickou hypoxii {Ošťádal a spol., 1999} a „ischemickým preconditioningem“ {Murry a spol., 1986}. Molekulární mechanismy protektivního působení těchto fenoménů zahrnují (i) signální dráhy aktivace na ATP závislých draslíkových kanálů sarkolemy (sarkolemální K_{ATP}) a mitochondrií (mitochondriální K_{ATP}), (ii) ROS jako součást této signalizační kaskády, (iii) NO, NOS a peroxynitritu, (iv) protein kinázy (PKC, MAPKs) a další {Neckář a spol., 2002; Kolář a spol., 2002; Asemu a spol., 1999; Fitzpatrick a spol., 2005; Ošťádalová a spol., 2002}. I přes velké množství publikovaných prací, týkající se této problematiky, nebyly molekulární mechanismy protektivního působení těchto fenoménů doposud uspokojivě vyřešeny {Kolář a Ošťádal, 2004}.

Mechanismus účinku mito K_{ATP} kanálů, jejichž aktivita je ovlivňována především koncentrací ATP, spočívá v regulaci hladiny draslíku v mitochondrii. Jejich otevření umožní vstup draslíku do mitochondrie ve směru elektrochemického gradientu, což v konečném důsledku vede cestou K^+/H^+ výměníku k částečnému rozprážení MMP (o 5-10 mV) a ke snížení produkce ATP. Následkem osmotické aktivity draslíku dochází za spoluúčasti vody k mírnému bobtnání mitochondrií. Snížení MMP nepovažuje Garland {2000} za významné; protektivní působení mito K_{ATP} vysvětluje zachováním funkčního spřažení mezi

mitochondriální kreatin kinázou, ANT a interakcí porinu vnější membrány – což je místo, kterým je za normálních okolností ADP transportováno do mitochondrie. Toto funkční spojení je závislé především na objemu intermembránového prostoru; v případě vysokých metabolických nároků, způsobujících pokles MMP, a při zavřených mitoK_{ATP} kanálech, matrix se smršťuje (pokles MMP snižuje elektrogenně vstup K⁺ do mitochondriální matrix, prostup K⁺ a vody je tak omezen), což vede k rozpojení funkčního celku právě ve chvíli velkého energetického obratu. Otevření mitoK_{ATP} vede k bobtnání mitochondriální matrix, což zachová kritickou vzdálenost obou membrán pro efektivní transport ADP. Holmuhamedov a spol. {1999} poukazují na další možný efekt otevřených mitoK_{ATP} kanálů, kterým je větší odolnost srdeční buňky k vápníkovému přetížení.

Agonistou mitoK_{ATP} kanálů, diazoxidem, resp. specifickým blokátorem mitoK_{ATP} kanálů, 5-hydroxydekanoátem, se podařilo vyvolat, resp. eliminovat kardioprotektivní efekt právě přímým otevřením, resp. zavřením mitoK_{ATP} kanálu {Oldenburg a spol., 2002}. Nadále zůstává otevřena otázka, zda mitoK_{ATP} kanály hrají v kardioprotekci roli zprostředkovatele nebo konečného vykonavatele. Složitý vztah mitoK_{ATP} kanálů ke kardioprotekci ukazují práce, které se zabývají úlohou ROS v signalizační kaskádě protektivního mechanismu. V práci Forbese a spol. {2001} byl protektivní efekt diazoxidu zablokován scavengerem ROS N-acetylcysteinen {Oldenburg a spol., 2002}; ukazuje se tedy, že ROS v nízkých koncentracích hrají zřejmě důležitou signalizační roli v mechanismu kardioprotekce.

Z uvedeného vyplývá, jak málo bylo zatím věnováno možné úloze mitochondrií v ontogenetickém vývoji odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku.

CÍLE PRÁCE

Na základě detailní analýzy dostupných literárních dat byly stanoveny dva hlavní cíle dizertační práce:

1. zmapovat ontogenetický vývoj vybraných mitochondriálních funkcí v srdečním svalu
2. analyzovat úlohu mitochondrií v odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku v průběhu vývoje

Tato studie by tak mohla přispět k ověření hypotézy, zda vývojové změny mitochondriálních funkcí souvisejí s vývojem odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku.

METODIKA

Všechny pokusy byly prováděny po schválení etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR a v souladu s pravidly *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publikované US National Institute of Health (NIH číslo 85-23, 1996).

EXPERIMENTÁLNÍ MODEL

K experimentům jsme použili samce potkana kmene Wistar v následujících vývojových stádiích: 20. prenatalní den (dva dny před porodem) a 1., 2., 5., 10. (období nejdramatičtějších změn vývoje odolnosti srdce k nedostatku kyslíku {Ošťádalová a spol., 1998, 2002}, 20., 28. (období odstavu), 60. a 90. postnatální den (pohlavní zralost); prenatalní stadium bylo stanoveno metodou vaginálních výtěrů. Výběr jednotlivých period respektuje poznatky o ontogenetickém vývoji morfologických, biochemických a funkčních parametrů srdečního svalu. Zvířata byla chována za standardních podmínek v plastických akváriích a měla volný přístup k vodě a standardní laboratorní dietě; mláďata byla odstavena 28. den. V místnosti byla udržována stálá teplota 22 ± 2 °C a osvětlení s 12ti hodinovým režimem střídání světla a tmy.

Zvířata byla usmrcena dekapitací, srdce byla vyjmuto, zbaveno síní a velkých cév a u postnatálních stadií rozdělena na pravou a levou komoru a septum. K vlastním pokusům pak byla použita pouze volná část levé komory; u prenatalních srdcí byly k pokusům použity obě komory včetně septa.

IZOLACE MITOCHONDRÍÍ

Mitochondrie byly izolovány modifikovanou metodou dle Bustamante a spol. {1977} vždy spojením levých komor několika srdcí stejného věku do jednoho vzorku: v případě prenatalních zvířat celkem 10 celých srdcí, pro věk od 1-10 dní 5-6 levých komor a pro věk 20-90 dní 3 levé komory. Srdeční tkáň byla homogenizována při 0 °C ve skleněném homogenizátoru s teflonovým válcem po dobu 60 s v izolačním médium I, obsahujícím 250 mM sacharózy, 5 mM *N*-tris[hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethane (TES), 2 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), pH 7,3 v poměru 100 mg tkáň/ml média. Suspenze byla poté centrifugována při 800 g_{AV} po dobu 10 min a supernatant pak při 5200

g_{AV} po dobu 15 min. Sediment byl resuspendován v polovině původního objemu izolačního média a byl znovu $2\times$ centrifugován při $5200 g_{AV}$ po dobu 10 min. Výsledný mitochondriální sediment byl resuspendován na konečnou koncentraci 20-30 mg/ml izolačního média. Izolace mitochondrií byla prováděna na ledu až do doby vlastního měření.

Pro odlišení subsarkolemálních a interfibrilárních mitochondrií v dospělé srdeční buňce byla provedena alternativní izolace za použití proteázy nagarsy {Palmer a spol., 1977; Iossa a spol., 2001}. Srdeční tkáň levé komory z 60ti denních zvířat byla homogenizována ve skleněném homogenizátoru s teflonovým válcem po dobu 60 s při $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ v médiu II obsahujícím 100 mM KCl, 50 mM tris[hydroxymethyl]-aminomethane (TRIS), 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 5 mM ethylene glycol-bis[2- aminoethyl]-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), pH 7,4 v poměru 100 mg tkáň/ml média. Suspenze byla poté centrifugována při $800 g_{AV}$ po dobu 10 min a výsledný sediment byl použit pro izolaci IFM. Supernatant byl centrifugován při $5200 g_{AV}$ po dobu 15 min a sediment obsahující subsarkolemální mitochondrie byl znovu $2\times$ centrifugován při $5200 g_{AV}$ po dobu 10 min a resuspendován do konečné koncentrace 20-30 mg/ml izolačního média I. Sediment obsahující IFM byl resuspendován v malém množství izolačního média II a byl inkubován s nagarsou (E.C. 3.4.231.62; Sigma) v koncentraci 9 U/mg tkáň při $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Suspenze byla homogenizována a centrifugována při $5200 g_{AV}$ po dobu 10 min. Sediment byl resuspendován a znovu centrifugován při $800 g_{AV}$ po dobu 15 min. Supernatant, obsahující IFM, byl centrifugován při $5200 g_{AV}$ po dobu 10 min a sediment byl ještě jednou stejným způsobem centrifugován. Výsledný sediment byl resuspendován v izolačním médiu I v poměru 20-30 mg /ml.

MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU MITOCHONDRÍÍ

Měření velikosti MMP ($\Delta\psi_m$) jsme prováděli pomocí fluorescenční sondy Rhodamin 123 a intenzitu fluorescence izolovaných mitochondrií jsme zjišťovali průtokovým cytometrem FACSsort (Becton Dickinson, San Jose, USA) pro měření fluorescence jednotlivých mitochondrií {Petit a spol., 1990} resp. spektrofluorimetrem Perkin Elmer LS-50B (Norwalk, Connecticut, USA) pro sledování časových změn intenzity fluorescence.

Na průtokovém cytometru jsme rhodamin 123 excitovali při vlnové délce 488 nm (v pásmu 42 nm) a detekovali intenzitu fluorescence 585 nm filtrem v kanále FL2 s fotonásobičem nastaveným na hodnotu 999 V. Inkubační médium obsahovalo 100 mM KCl, 10 mM TRIS 2 mM MgCl_2 , 4 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA a pH bylo upraveno na 7,4. Tři

minuty před vlastním měřením byl do inkubačního média s malým množstvím mitochondrií (upraveno na snímací rychlost 800-1200 jednotek/s) přidán rhodamin 123 (o finální koncentraci 30 nM) a respirační substrát sukcinát (o finální koncentraci 10 mM). V některých případech byl do inkubačního média přidán rozpřahovač FCCP (carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone) ve finální koncentraci 2 μ M a poté jsme měřili charakter fluorescence u kompletně rozpřažených mitochondrií pro získání referenčních hodnot. Pro omezení vlivu některých rozpřahovačů jsme ve specifických případech přidali do média hovězí sérový albumin bez volných mastných kyselin (FAF-BSA) v koncentraci 0,5 mg/ml. Cytometrie probíhala rychlostí 800-1200 jednotek/s vždy po dobu 1-1,5 min, což představovalo 40.000 mitochondrií; každé měření bylo provedeno nejméně 3 \times . Data byla zaznamenávána PC typu Mac vybaveným softwarem CellQuest. Konečná analýza byla provedena na PC softwarem WinMDI verze 2.8.

Na spektrofluorimetru byly mitochondrie měřeny v 2 ml kyvetě za stálého míchání magnetickým míchadlem ve stejném inkubačním médiu jako v případě průtokového cytometru. Do média byly navíc přidány sukcinát do celkové koncentrace 4 mM a rhodamin 123 do celkové koncentrace 0,2 μ M. V případě potřeby byly mitochondrie rozpřaženy přidáním FCCP do celkové koncentrace 2 μ M v médiu. Rhodamin 123 byl excitován při vlnové délce 480 nm a fluorescence byla monitorována při 520 nm.

STANOVENÍ MITOCHONDRIÁLNÍHO PROTEINU A CYTOCHROM C OXIDÁZY (COX)

Koncentraci proteinu jsme stanovili metodou s použitím bicinchoninátu {Smith a spol., 1985} s hovězím sérovým albuminem (BSA) jako standardem.

Mitochondriální frakce byla rozpuštěna za přítomnosti 2 % *n*-dodecyl β -D-maltosidu (Sigma, St Louis, MO) a použita pro stanovení mitochondriálních cytochromů pomocí „pseudodual-wavelength“ spektrofotometrie {Baumruk a spol., 1999}. Koncentraci mitochondriální COX jsme zjišťovali pomocí měření hladiny cytochromů *a+a₃* pseudo-dual-wavelength spektrofotometrií. Cytochromy *a+a₃* jsou integrální součástí enzymového komplexu COX a jejich měření umožňuje kvantifikovat koncentraci COX s vysokou přesností.

STANOVENÍ UCP3

Obsah UCP3 byl stanoven pomocí imunoblotů dle dříve popsané metody {Baumruk a spol., 1999} za použití nitrocelulóзовé membrány (HybondTM-C extra, cat. RPN 303E, Amersham, Uppsala, Sweden). Roztok pro vysycení nespecifických vazebných míst membrán obsahoval 5 % odstředěné mléko a 0,05 % Tween® 20 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) ve fosfátovém pufru PBS, pH 7,4. Jako primární protilátka bylo použito polyklonální králičí anti-mouse/rat UCP3 antisérum v ředění 1:1 000 (cat. PA1-055; Affinity BioReagents, Inc., Golden, CO, USA) a inkubace probíhala v PBS s 0,05 % Tween® 20 při pH 7,4 po dobu nejméně 12 h při teplotě 4 °C. Jako sekundární protilátka bylo použito kozí anti-rabbit IgG, navázané na křenovou peroxidázu v ředění 1:100 000 (cat. 170-6525; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Antigen byl vizualizován luminiscenční technikou (ECL Plus Western Blotting Detection System, cat. RPN 2132; Amersham) a následná kvantifikace probíhala na přístroji LAS-1000 (Luminiscence Analyzing System, Fuji, Tokyo, Japan). Pro porovnání obsahu UCP3 mezi různými imunobloty byly jako standard použity mitochondrie izolované z hnědého tuku chladově adaptovaných myší {Nedergaard a Cannon, 1979}.

STANOVENÍ mRNA UCP2, UCP3, ANT1 A ANT2

Transkript UCP2 mRNA v celkové RNA izolované ze srdcí jsme stanovili pomocí Northern blotů; pro porovnání a korekci vzorků jsme RNA na blotech obarvili methylenovou modří {Hodný a spol., 1998}. Pro stanovení hladiny transkriptů UCP2, UCP3, ANT1 a ANT2 jsme použili Real-time quantitative two-step RT-PCR a pro porovnání jsme vzorky korigovali na základě obsahu mRNA β -actinu {Rossmeisl a spol., 2002}. Primery použité pro RT-PCR analýzu jsou popsány v tabulce 2.

Tabulka 2. Sekvence PCR primerů

Gene	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')	GeneBank Accessio No. for cDNA
UCP2	GCCCGGGCTGGTGGTGGTC	CCCCGAAGGCAGAAGTGAAGTGG	U94593
UCP3	GCGTGCTCGGTACCATCCTGACTA	TTCTTCCCTGGCGATGGTTCTGTA	AB006614
ANT1	TTCGCCACCCAAGCTCTCAACT	CGGCTGTCACACTCTGGGCAATCA	D12770
ANT2	ACTTECCACCCAGGCTCTCAACT	GGCGAACCGTGTCAAAGGATAAG	D12771
β -actin	GAACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT	ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG	X03765

PERFUZE DOSPĚLÉHO SRDCE

Zvířata byla anestetizována intraperitoneálním podáním thiopentalu (50 mg/kg). Po fixaci na operační podložce byl otevřen hrudník, srdce rychle vyjmuto a upevněno na aortální kanylu v perfuzním aparátu.

Srdce bylo perfundováno za konstantního tlaku (100 cm H₂O) na perfuzním aparátu podle Langendorffa Krebs-Henseleitovým roztokem ve složení (mmol/l): NaCl 118, KCl 4,7, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,2 a glukóza 7. Roztok byl saturován karbogenem (95 % O₂ a 5 % CO₂), pH bylo upraveno na 7,4 (HCl) a roztok byl udržován při konstantní teplotě (37 °C). Čerstvý perfuzní roztok byl připravován každý den před začátkem pokusu. Srdce bylo elektricky stimulováno pravoúhlými pulsy s frekvencí 300 za minutu koaxiální elektrodou, přiloženou na bazi pravé komory. Délka pulzů byla nastavena na 2 ms a napětí převyšovalo prahovou hodnotu o 50 %.

Po 10ti minutové stabilizaci byla srdce perfundována perfuzním roztokem s obsahem 1 μM sanglifehrinu A (blokátor MPT póru, Novartis Pharma AG, Basel) nebo 3,38 mM roztokem alkoholu (kontrolní měření s rozpouštědlem) po dobu 10 min (obr. 6). Sanglifehrin A se váže na jednu z komponent MPT póru, čímž ho blokuje {Clarke a spol., 2002} a může tak ovlivnit rozsah ischemicko-reperfuzního poškození. Sanglifehrin A byl do perfuzátu přidáván ve formě zásobního alkoholového roztoku o koncentraci 5 mmol/l těsně před vlastním pokusem. Kontrolní skupina byla před ischemickou fází perfundována po dobu 20 minut nemodifikovaným perfuzním roztokem. Poté byla srdce vystavena 20ti minutové globální ischemii a 40ti minutové reperfuzi. Globální ischemie byla vyvolána uzavřením přítoku perfuzního roztoku do srdce. V průběhu ischemie byla srdce ponořena do Krebs-Henseleitova roztoku (37 °C, pH 7,4). V průběhu ischemické fáze nebylo srdce elektricky stimulováno.

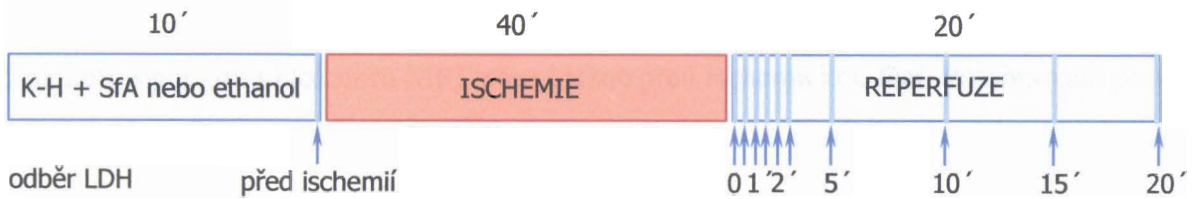
V průběhu reperfuzní fáze jsme odebírali vzorky koronárního efluentu pro stanovení LDH (obr. 6); po 40 minutách jsme srdce rychle zmrazili Wollenbergerovými kleštěmi, zchlazenými v tekutém dusíku. Srdce bylo poté ponořeno do tekutého dusíku a uschováno při teplotě -70 °C až do doby stanovení NAD⁺.

PERFUZE NEONATÁLNÍHO SRDCE

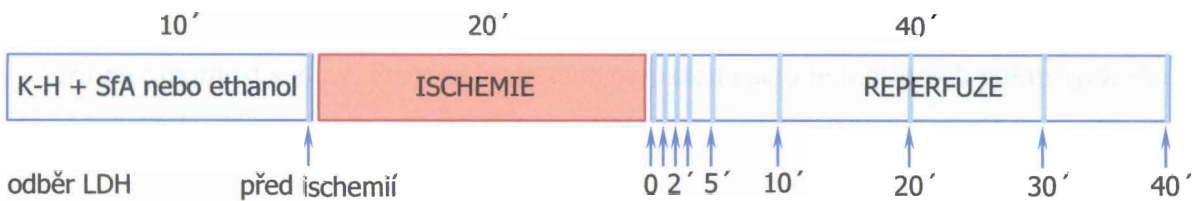
Mlád'ata ve stáří 10 dnů byla zvážena a usmrcena dekapitací. Hrudník byl rychle otevřen a aorta byla kanylována nerezovou kanylou s vnějším průměrem 0,8 mm. Srdce bylo izolováno, atria odstraněna a komory byly perfundovány dle Langendorffa za konstantního tlaku, který odpovídal střednímu arteriálnímu tlaku pro dané vývojové stadium {Litchfield, 1958; Zicha a spol., 1986}. Srdce byla perfundována Krebs-Henseleitovým roztokem, který obsahoval (v mmol/l): NaCl 118,0; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 1,2 a glukózu 7,0. Roztok byl saturován směsí 95 % O₂ a 5 % CO₂ (pH 7,4); teplota byla udržována na 37 °C. Srdce byla elektricky stimulována frekvencí 200 tepů za minutu pomocí stříbrných elektrod, přiložených na srdeční bazi. Stimulační pulsy měly střídavou polaritu, trvaly 1 ms a jejich voltáž byla proti prahové hodnotě zvýšena o 50 %. Klidové předpětí bylo pomocí mikrošroubu postupně zvyšováno až na takovou hodnotu, kdy síla kontrakce (developed force, DF) dosahuje 80 % maximální síly, jež by bylo dosaženo při odpovídajícím preloadu. DF izolovaného srdce byla měřena pomocí snímače síly kontrakce. Ten byl se srdečním hrotem propojen pomocí silonového úvazu, dvouramenné titanové páky a skleněného vlákna (obr. 7). DF byla (po zesílení signálu zesilovačem) automaticky vyhodnocena on-line připojeným počítačem {Ošťádalová a spol., 2002}.

Po stabilizaci (průměrně 10 minut) byla zaznamenána hodnota DF a srdce bylo následně 10 minut perfundováno roztokem obsahujícím sanglifehrin A (1 μM) nebo jeho rozpouštědlo ethanol (3,38 mM) (obr. 6). Poté bylo srdce vystaveno 40ti minutové globální ischemii, po které následovala 20ti minutová reperfuze. Míra obnovení DF po ischemii byla vyjádřena jako procento startovní hodnoty. Během reperfuze byly odebírány vzorky koronárního efluentu pro stanovení koncentrace LDH (obr. 6). Zbývající efluent byl využit pro stanovení koncentrace celkového LDH, vzniklého během reperfuze. Po odebrání posledního vzorku byla opět zaznamenána hodnota DF a srdce bylo (bez zastavení perfuze) rychle zmrazeno pomocí Wollenbergerových kleští a tekutého dusíku a až do doby stanovení NAD⁺ uloženo při teplotě -70 °C.

NEONATÁLNÍ SRDCE



DOSPĚLÉ SRDCE

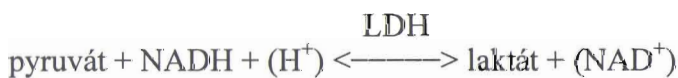


Obrázek 6: Experimentální protokol pro dospělé a neonatální srdce. Po 10ti minutové stabilizaci byla srdce perfundována roztokem sanglifehrinu A (SfA) nebo ethanolu po dobu 10 min. Poté byla vystavena globální ischemii (20 min v případě dospělých a 40 min v případě mlád'at), která byla následována reperfuzní fází (40 min v případě dospělých a 20 min v případě mlád'at). Na konci stabilizace, před ischemií a v průběhu reperfuze byly odebírány vzorky pro stanovení laktát dehydrogenázy (LDH), a to dle následujícího schématu: v případě dospělých 20 s v čase 0 a pak 10 s v čase 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min a 40 min; v případě mlád'at po dobu 30 s v čase 0 (na začátku reperfuze) a pak v čase 0,5 min, 1 min, 1,5 min, 2 min, 2,5 min, 5 min, 10 min, 15 min a 20 min.

STANOVENÍ LDH

K hodnocení rozsahu poškození srdce jsme použili metodu měření obsahu LDH v koronárním efluentu analyzátozem Roche/Hitachi 902 (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), za použití kitu LDH Roche/Hitachi.

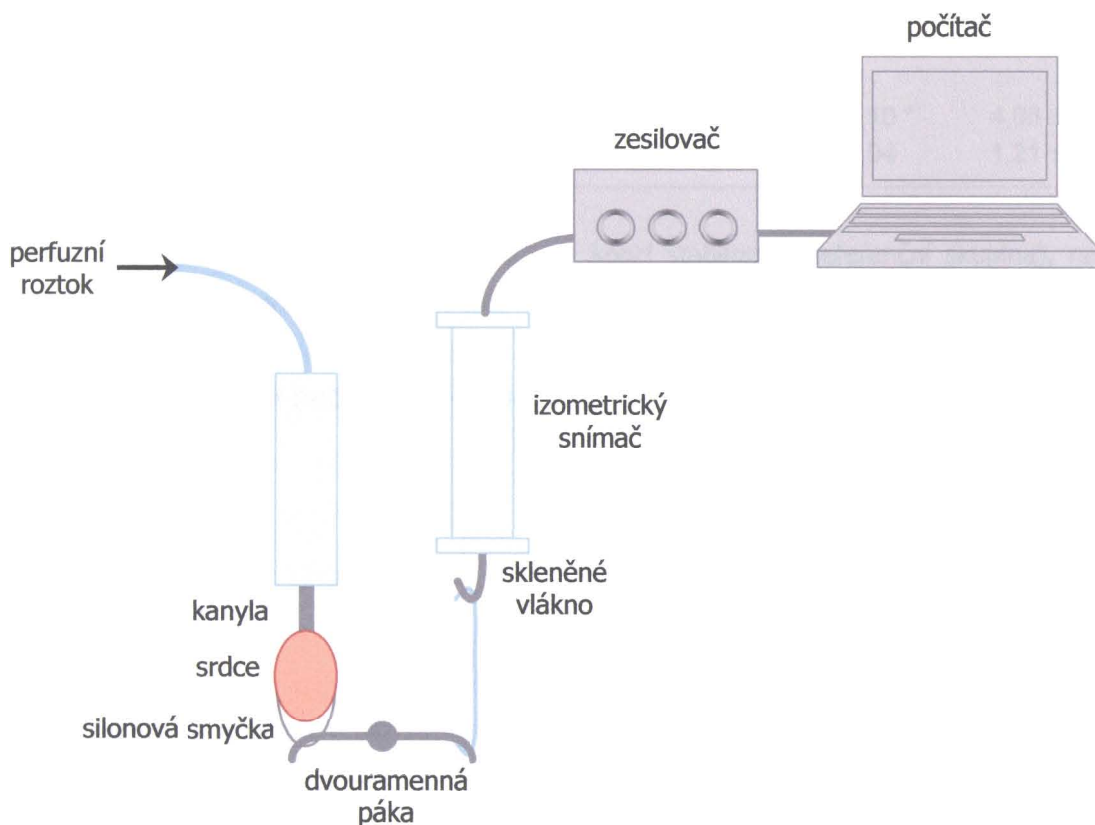
Princip stanovení:



{ viz Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie, 1972 }.

Vzorky efluentu jsme odebírali vždy po dobu 10 s a jejich hmotnost zjišťovali zvážením zkumavky před a po odběru. Odběr jsme prováděli na konci stabilizace a v případě protokolu s použitím blokátoru MPT póru i těsně před ischemickou fází. Po obnovení průtoku jsme vzorky efluentu odebírali podle schématu na obr. 6. Vzorky, určené k měření obsahu LDH, jsme po dobu experimentu udržovali na ledu a po ukončení pokusu při teplotě 4 °C až do doby měření LDH (do 15 hod po ukončení experimentu).

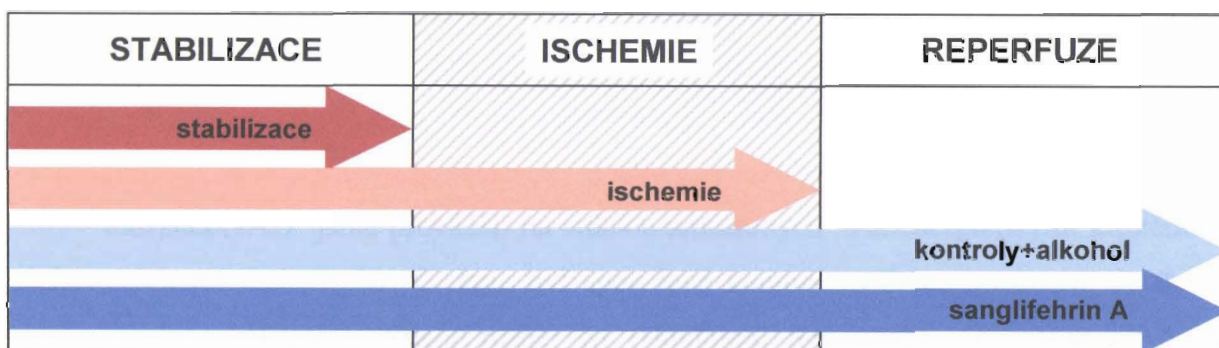
Data jsou vyjádřena jako množství LDH na hmotnost srdeční tkáně [nkat/g]. Vzhledem k nutnosti analyzovat v srdeční tkáni kromě LDH také NAD^+ jsme nemohli data vyjádřit na hmotnost sušiny. Protože hydratace myokardu se u jednotlivých pokusných skupin významně lišila, bylo nutné vytvořit postup, který by tuto skutečnost respektoval. Stanovili jsme proto tzv. koeficient hydratace a zjistili, jak se liší obsah vody v jednotlivých experimentálních skupinách (tab. 3). Jako referenční skupinu jsme zvolili ta srdce, která byla po vyjmutí z těla pouze dvacet minut perfundována Krebs-Henseleitovým roztokem a zmrazena Wollenbergerovými kleštěmi. Poté jsme zjistili průměrnou relativní hmotnost srdce každé skupiny (poměr hmotnosti srdce a těla $\times 100$) a stanovili tzv. koeficient hydratace, který je dán poměrem průměrné relativní hmotnosti srdce dané skupiny k hodnotě skupiny referenční (tab. 3).



Obrázek 7: Schéma měření kontraktility izolovaného neonatálního srdce dle Langendorffa

Tabulka 3: Relativní hmotnost srdce a koeficient hydratace 10ti denních a dospělých potkanů

a) schéma odběru srdcí:



b) experimentální data:

	stabilizace (ref. skupina)	ischemie	kontroly + alkohol	sanglifehrin A
10ti denní mláďata				
- relativní hm. srdce	8,88 ± 0,22	5,28 ± 0,11	7,84 ± 0,16 **	7,84 ± 0,21 **
- koeficient hydratace	-	0,59 ± 0,02	0,88 ± 0,03	0,88 ± 0,03
dospělí				
- relativní hm. srdce	3,38 ± 0,08	3,29 ± 0,08	3,71 ± 0,10 *	4,08 ± 0,15 **
- koeficient hydratace	-	0,97 ± 0,03	1,10 ± 0,04	1,21 ± 0,05

a) schéma odběru srdcí: srdce byla odebírána na konci stabilizace (referenční skupina), na konci ischemie a na konci reperfuze (do perfuzátu bylo přidáno rozpouštědlo alkohol (kontroly+alkohol) nebo sanglifehrin A)

b) experimentální data: * P<0,05, ** P<0,01, vs. referenční skupina. Data jsou vyjádřena jako průměr ± S.E.M.

STANOVENÍ NAD⁺

Pro sledování aktivity MPT póru jsme použili metodu měření NAD⁺ v srdeční tkáni {Di Lisa a spol., 2001}. Otevření MPT póru ovlivňuje řadu metabolických dějů spojených s energetickým metabolismem; k nim lze počítat i degradaci NAD⁺ enzymem NAD⁺-glykolhydrolázou, lokalizovanou vně mitochondriální matrix. V průběhu ischemie a reperfuze

se otevírá MPT pór, NAD^+ se díky tomu vyplaví z mitochondrie a dochází k jeho degradaci výše uvedeným enzymem. V důsledku ischemicko-reperfuzního poškození dochází tedy ke značnému úbytku NAD^+ v srdeční tkáni a tento efekt lze snížit použitím blokátorů MPT póru {Di Lisa a spol., 2001; Clarke a spol., 2002}.

Extrakce NAD^+

Extrakci NAD^+ jsme prováděli na srdcích zmrazených Wollebergerovými kleštěmi a uschovaných při teplotě $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Poté byl apex levé komory rozdrcen v tekutém dusíku a homogenizován přístrojem SilentCrusher M (Heidolph, Schwabach, Germany) v 0,5 M roztoku HClO_4 . Množství HClO_4 bylo přidáno v poměru 10 ml na 1 g tkáně a homogenizace byla provedena $3\times$ v délce 10 s s 20 s pauzami, vše jsme prováděli na ledu. Suspenze byla centrifugována $2\times$ 10 min při 1500 g_{AV} ($4\text{ }^\circ\text{C}$). Supernatant byl sbírán do zkumavek a sediment resuspendován ve stejném množství HClO_4 jako na počátku. Vzorby byly následně neutralizovány dvojnásobným množstvím 0,25 M roztoku KOH v 1 M fosfátovém pufru při pH 7,5, a to po dobu 15 min na ledu. V reakci vzniká silný oxidant KClO_4 , který sedimentuje na dně zkumavek a supernatant lze tak odebrat bez nutnosti centrifugace. V této fázi jsme zjišťovali velikost pH extraktů a odstranili jsme vzorky, jejichž pH se pohybovalo mimo oblast 7,3-7,4. Z každého vzorku byly uskladněny 2 ml extraktu při teplotě $-30\text{ }^\circ\text{C}$ až do doby vlastního stanovení NAD^+ .

Detekce NAD^+

K vlastnímu stanovení NAD^+ jsme použili modifikovanou metodu s použitím alkohol dehydrogenázy {Jacobson a Jacobson, 1976; Bernofsky a Swan, 1973}. V principu jde o enzymatickou cyklickou reakci oxidace alkoholu alkohol dehydrogenázou za současné redukce $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$. Konečnou redukci MTT tetrazolia dojde za účasti elektronového přenašeče phenazin ethosulfátu ke změně barvy ze žluté na hnědou až černou. Reakci inhibuje iodacetát.

Vzorby byly po rozmrazení znovu centrifugovány 10 min při 1500 g_{AV} pro odstranění precipitovaného KClO_4 a na základě předchozího testovacího měření byly dle potřeby naředěny. V detekčních zkumavkách bylo před zahájením reakce 0,5 ml vzorku a reagentie o celkovém objemu 0,6 ml v následujících koncentracích: Na-Bicin, 100 mM, pH=7,8, ethanol, 0,5 M, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT), 0,42 mM,

phenazin ethosulfát, 1,66 mM, EDTA, 4,16 mM, hovězí sérový albumin 0,83 mg/ml a 0,1 ml roztoku alkohol dehydrogenázy (0,3 mg/ml v 100 mM roztoku Na-Bicinu, pH=7,8). Jako standard jsme použili vzorky různé koncentrace připravené z NAD^+ (Sigma) v redestilované vodě. Reakce byla zahájena smícháním všech reagensů za sníženého osvětlení a přidáním 0,1 ml roztoku alkohol dehydrogenázy. Inkubace probíhala ve tmě při 30 °C po dobu 25 min, reakce byla zastavena přidáním 0,5 ml iodacetátu (12 mM roztok v redestilované vodě) do každé detekční zkumavky. Absorbanci jsme stanovili spektrofotometrem při 570 nm. Data jsou vyjádřena jako $\mu\text{mol NAD}^+$ na g srdeční tkáň. Každý extrakt byl změřen 2× a výsledná koncentrace je aritmetickým průměrem obou měření. Získané výsledky byly násobeny koeficientem hydratace (viz výše).

STATISTICKÉ HODNOCENÍ

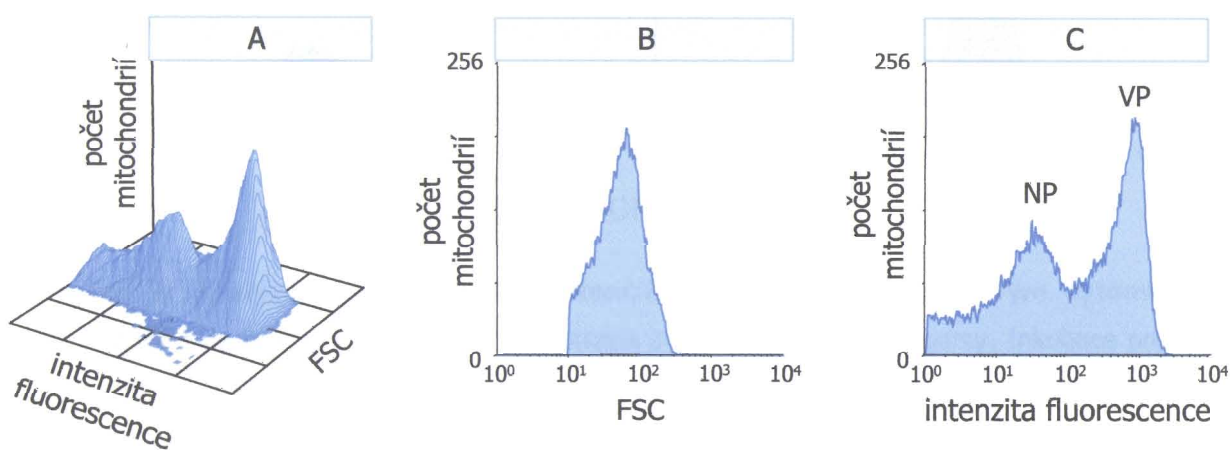
Naměřené výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty \pm střední chyby průměru (S.E.M.), v souborech s nenormálním rozdělením dat jako medián a rozmezí. ANOVA a následný Student-Newman-Keulsův test byly použity pro analýzu variance uvnitř skupin. Lineární regresní přímky byly hodnoceny analýzou kovariance (ANCOVA) Statistické rozdíly byly považovány za významné při $P < 0,5$. Ke statistickému a grafickému zpracování výsledků byl použit program GraphPad Prism 4.00.

VÝSLEDKY

MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL

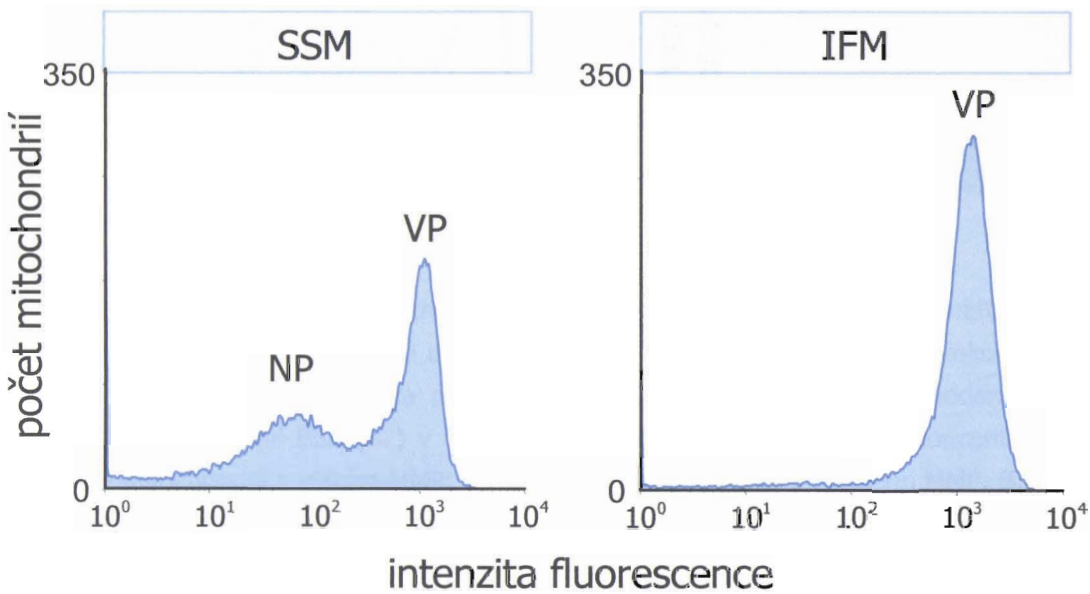
Distribuce MMP

Měření MMP ukázalo, že z hlediska velikosti jsou srdeční mitochondrie izolované ze srdce dospělého potkana homogenní (unimodální distribuce, obr. 8A, 8B). Velikost MMP však vykazuje distribuci bimodální - lze zřetelně odlišit dvě populace: populaci s vysokým (VP) a nízkým membránovým potenciálem (NP) (obr. 8C).



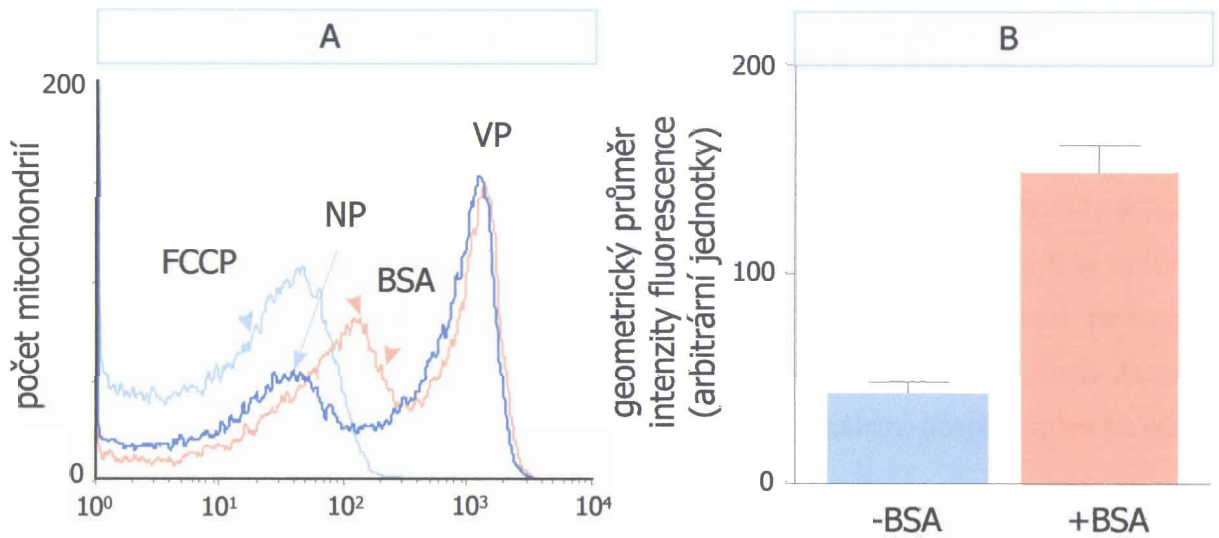
Obrázek 8: Analýza membránového potenciálu a velikosti mitochondrií průtokovým cytometrem. Mitochondrie byly izolovány z 60ti denního potkana a inkubovány za přítomnosti 10mM sukcinátu a 30 nM rhodaminu 123. Při měření mitochondrií na průtokovém cytometru odpovídá hodnota dopředného rozptylu (FSC) velikosti mitochondrií a intenzita fluorescence velikosti membránového potenciálu dané mitochondrie. **A:** třírozměrná distribuce velikosti membránového potenciálu (intenzita fluorescence) a velikosti (FSC) mitochondrií. **B:** dvojrozměrná distribuce velikosti mitochondrií. **C:** dvojrozměrná distribuce membránového potenciálu; populace mitochondrií s nízkým (NP) a vysokým (VP) membránovým potenciálem.

K analýze subsarkolemální a interfibrilární frakce mitochondrií jsme použili alternativní způsob izolace s pomocí proteázy nagarsy. SSM izolované ze srdce dospělého zvířete vykazují přítomnost jak populace s nízkým MMP, tak populace s vysokým MMP; IFM jsou charakterizovány přítomností pouze jediné populace a to s vysokým MMP (obr. 9).



Obrázek 9: Analýza membránového potenciálu SSM a IFM průtokovým cytometrem. Mitochondrie byly izolovány z 60ti denního potkana s použitím proteázy nagarsy. Inkubace probíhala za přítomnosti 10mM sukcinátu a 30 nM rhodaminu 123. Při měření mitochondrií na průtokovém cytometru odpovídá intenzita fluorescence velikosti MMP. SSM - subsarkolemální mitochondrie, IFM - interfibrilární mitochondrie, VP – populace s vysokým MMP, NP - populace s nízkým MMP.

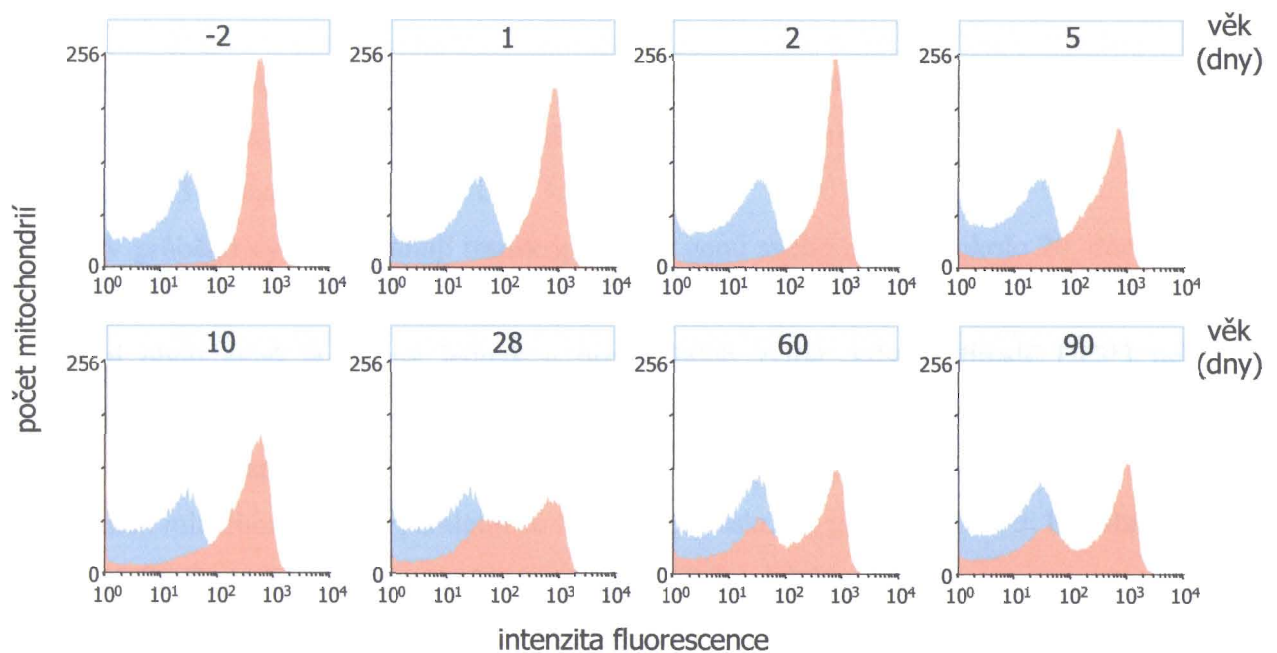
Distribuci jednotlivých populací lze ovlivnit přidáním FAF BSA do suspenze izolovaných mitochondrií: intenzita fluorescence populace s nízkým potenciálem se tak významným způsobem zvýšila (obr. 10), zatímco fluorescence populace s vysokým potenciálem zůstala nezměněna. Přidáním protonoforu FCCP získala křivka unimodální charakter (došlo k úplnému rozpražení všech populací) (obr. 10A). Geometrický průměr membránového potenciálu populace mitochondrií s nízkým potenciálem je v nepřítomnosti BSA prakticky stejný jako u zcela rozpražené populace. Odstraněním mastných kyselin (MK) pomocí BSA pak dojde ke zvýšení potenciálu, ovšem pouze u populace s nízkým potenciálem.



Obrázek 10: Vliv inkubačních podmínek na velikost MMP (intenzita fluorescence). Mitochondrie byly izolovány z 60ti denního potkana; měření probíhalo na průtokovém cytometru. **A:** mitochondrie byly inkubovány za přítomnosti 10mM sukcinátu a 30 nM rhodaminu 123 (—), po následném přidání FAF BSA (—) v koncentraci 0,5 mg/ml a FCCP (—) v koncentraci 200nM; NP – populace mitochondrií s nízkým MMP; VP - populace mitochondrií s vysokým MMP. **B:** Vliv FAF BSA na intenzitu fluorescence populace s nízkým potenciálem (NP). Hodnoty jsou vyjádřeny jako geometrické průměry ± S.E.M. (n=10; $P < 0,0001$).

Ontogenetický vývoj MMP

Membránový potenciál mitochondrií se v průběhu vývoje výrazným způsobem mění: zatímco u prenatalních a raně postnatálních zvířat má MMP srdečních mitochondrií unimodální distribuci, charakterizovanou jediným maximem fluorescence (obr. 11, dva dny před porodem (-2) a dále 1., 2., 5. a 10. den postnatálního života), koncem odstavu se objevuje druhé maximum v oblasti nízké fluorescence (obr. 11, 28. den). Na konci puberty a v dospělosti lze prokázat dvě zřetelně oddělená maxima (obr. 11, 60. a 90. den). Zatímco nezralé srdce tedy obsahuje jedinou populaci s vysokým potenciálem, dospělé srdce obsahuje populace dvě, a to jednak s nízkým, jednak s vysokým MMP.



Obrázek 11: Změny MMP srdečních mitochondrií potkana v průběhu ontogenetického vývoje. Mitochondrie byly izolovány z plodů dva dny před porodem (-2) a dále ze zvířat ve věku 1, 2, 5, 10, 28, 60 a 90 dní postnatálního života; měření probíhalo na průtokovém cytometru. Mitochondrie byly inkubovány v přítomnosti 10mM sukcinátu a 30 nM rhodaminu 123 (■) a po přidání FCCP (■) do celkové koncentrace 2 μ M.

VÝVOJ VYBRANÝCH MITOCHONDRIÁLNÍCH PROTEINŮ

Cytochrom *c* oxidáza

Pro sledování ontogenetických změn oxidativní fosforylace v srdečních mitochondriích jsme zjišťovali obsah terminálního enzymu respiračního řetězce COX.

Změny ve specifickém obsahu COX (v poměru k množství mitochondriálního proteinu) jsou charakterizovány přibližně dvojnásobným zvýšením v prvním měsíci života a poklesem v dospělosti (obr. 12A). Nejvyšší hladiny dosahuje okolo 30. dne života, což odpovídá konci období odstavu.

Rozpřahovací proteiny

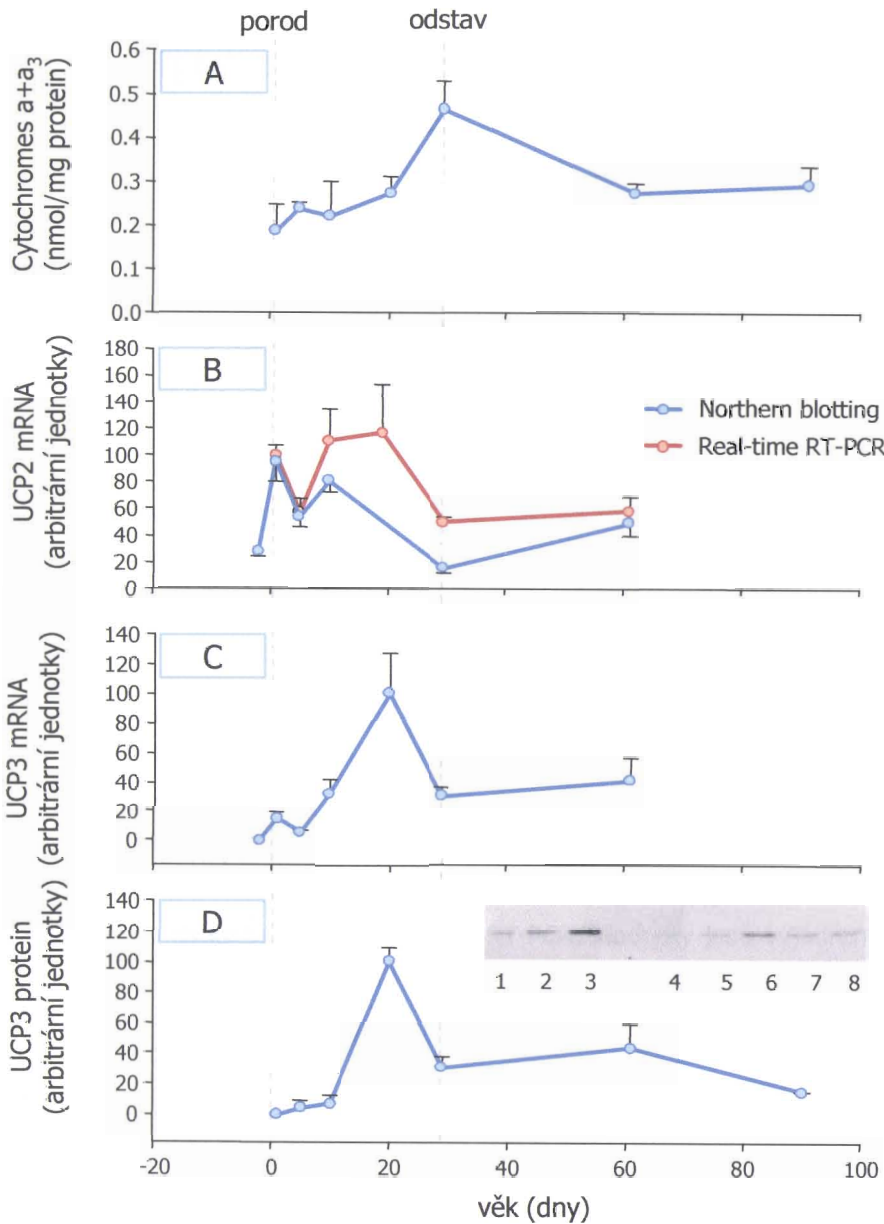
Rozpřahovací proteiny mohou rozpřahovat aerobní fosforylaci a tím ovlivnit efektivitu energetické přeměny v mitochondrii; v další fázi jsme proto stanovili hladinu transkriptů pro UCP2 a UCP3 a hladinu samotného UCP3.

V průběhu vývoje dosahují transkripty obou genů svého maxima okolo 20. dne života (obr. 12B,C), do 28. dne významně klesají a pak se až do dospělosti prakticky nemění. Rozdíl v expresi obou genů je patrný jednak u prenatalních zvířat, kdy v případě UCP3 nebyl transkript zjištěn vůbec, jednak v raném postnatálním období, kdy vývoj hladiny transkriptu UCP2 je charakterizován dvěma maximy. Průběh změn specifické koncentrace UCP3 v srdečních mitochondriích je paralelní se změnami transkriptu genu pro UCP3. Podobně jako v případě COX spadá maximum změn ve vývoji UCP do období odstavu.

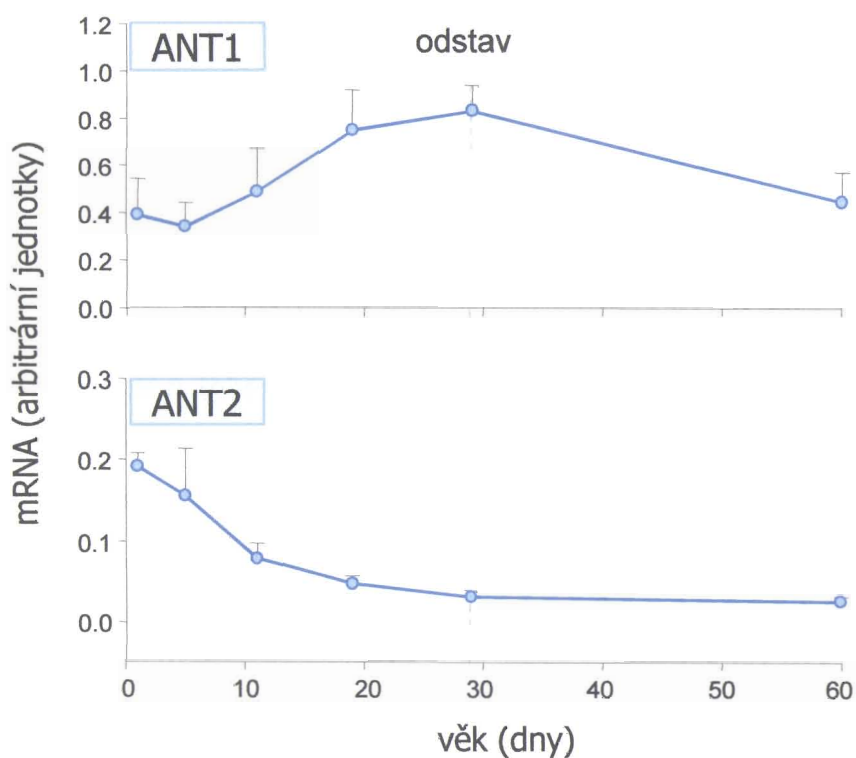
Adenin nukleotid translokáza

ANT je enzym odpovědný za výměnu ATP a ADP mezi mitochondrií a cytoplazmou. Protože ANT ovlivňuje koncentraci ATP v mitochondrii, může též ovlivnit i velikost MMP a tím efektivitu aerobní fosforylace.

Měřením úrovně exprese genu pro ANT1 a ANT2 izofomy jsme ukázali, že hladina transkriptů ANT1 genu od narození postupně stoupá, dosahuje maxima okolo 28. dne, tedy na konci odstavu, a s rostoucím věkem zvířat již pouze klesá. ANT2 dosahuje svého maxima naopak ihned po narození, klesá v prvním měsíci života a dále zůstává beze změn (obr. 13).



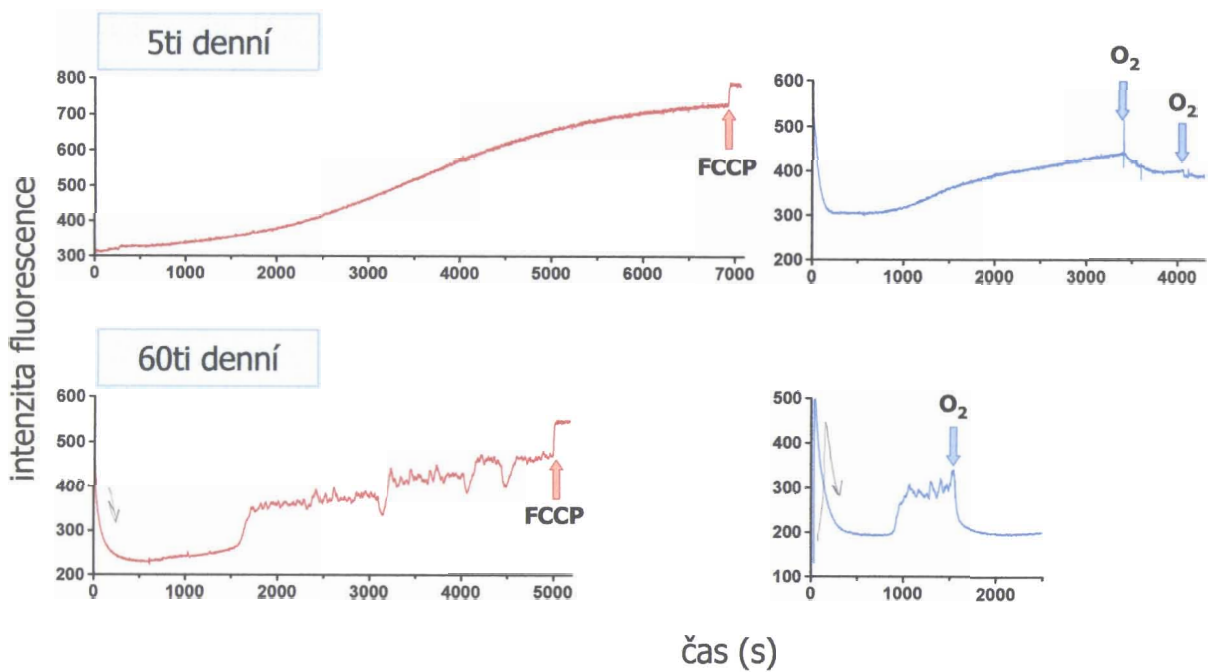
Obrázek 12: Vývojové změny obsahu mitochondriální COX a UCP3 a mRNA UCP2 a UCP3 v srdci potkana. Mitochondrie a celková mRNA byly izolovány z prenatálních srdcí dva dny před porodem a dále ve věku 1, 5, 10, 20, 28, 60 a 90 dní postnatálního života. **A:** hladina COX byla stanovena na základě kvantifikace mitochondriálních cytochromů *a + a₃* a je vyjádřena v poměru k množství mitochondriálního proteinu. **B:** mRNA UCP2 byla stanovena pomocí Northern blotů (modře) a „real-time“ RT-PCR (červeně). **C:** mRNA UCP3 byla stanovena pouze pomocí „real-time“ RT-PCR. **D:** hladina UCP3 byla stanovena imunoblottingem jeho antigenu a je vyjádřena v poměru k množství cytochromů *a + a₃* (viz A). Vložený blot: porovnání obsahu UCP3 antigenu mezi mitochondriemi z hnědého tuku (proužky 1-3, obsahující 1, 2 a 5 μg proteinu) a srdečními mitochondriemi (proužky 4-8 odpovídají věku 5, 10, 20, 60 a 90 dní života; každý vzorek obsahuje 15 μg proteinu; zobrazeny pouze ty vzorky, které byly stanoveny imunohistochemicky). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. (n=3-5).



Obrázek 13: Vývojové změny mRNA ANT1 a ANT2 v srdci potkana. Celková mRNA byla izolována ze srdcí zvířat ve věku 1, 5, 10, 20, 28 a 60 dní. Úroveň exprese transkriptů ANT1 a ANT2 byla stanovena technikou dvoustupňové „real-time“ RT-PCR. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M.

VÝVOJ CITLIVOSTI MITOCHONDRÍÍ K NEDOSTATKU KYSLÍKU

V dalších experimentech jsme sledovali chování izolovaných mitochondrií u dvou věkových skupin v podmínkách hypoxie. V průběhu aktivní respirace mitochondrií dochází k postupnému snižování koncentrace kyslíku v médiu, na což mitochondrie reagují poklesem MMP. U mitochondrií z 5ti denních zvířat je pokles MMP postupný a má sigmoidní charakter; mitochondrie z 60ti denních zvířat vykazují pokles bifázický s poměrně rychlým poklesem v první fázi (obr. 14). Druhá fáze je naopak pomalejší a má víceméně lineární charakter. Na rozdíl od 5ti denních mitochondrií lze pozorovat nehomogennost ve stabilitě MMP. Přidáním kyslíku do média došlo v případě dospělých k plné rekonstituci MMP, u mláďat pouze k přechodnému nevýraznému zvýšení. MMP mitochondrií izolovaných z dospělého srdce je v porovnání s mláďaty více závislý na koncentraci kyslíku v médiu.



Obrázek 14: Vliv hypoxie na velikost MMP; porovnání dospělých a mláďat. Mitochondrie byly izolovány z 5ti a 60ti denních potkanů; měření probíhalo na spektrofluorimetru, kde intenzita fluorescence je nepřímo úměrná velikosti MMP. Mitochondrie byly inkubovány za přítomnosti 10 mM sukcinátu a 300 nM rhodaminu v médiu s postupně klesající koncentrací kyslíku (červeně). Pro zjištění úrovně intenzity fluorescence rozpřažených mitochondrií bylo použito FCCP o koncentraci 200 nM. O₂ – přidání 100 % kyslíku do média skleněnou pipetou po dobu 10 s (modře).

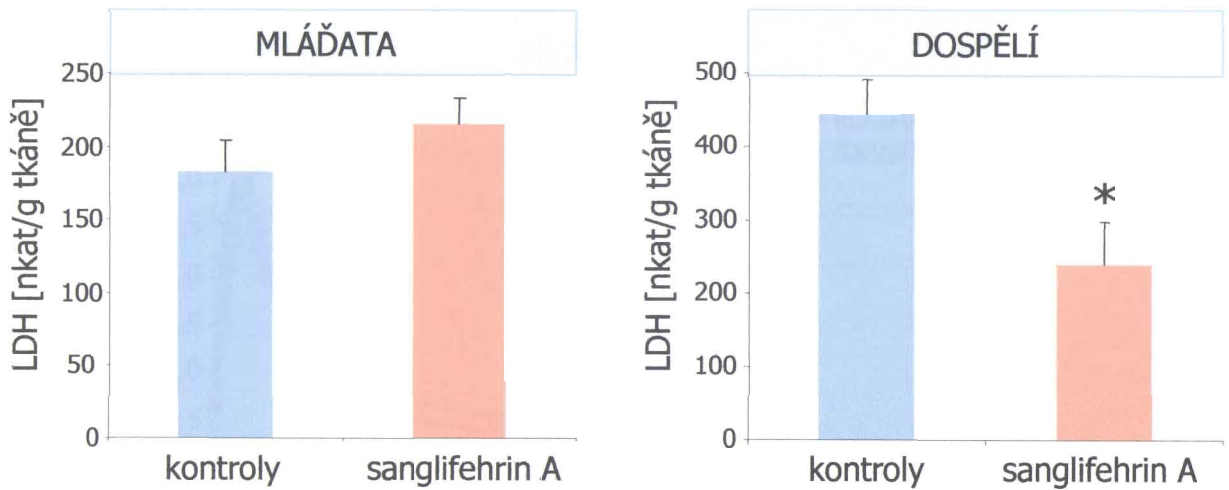
ÚLOHA MPT PÓRU V MECHANIZMU ISCHEMICKO-REPERFUZNÍHO POŠKOZENÍ U MLÁDĚT A DOSPĚLÝCH

Ovlivnění tvorby LDH

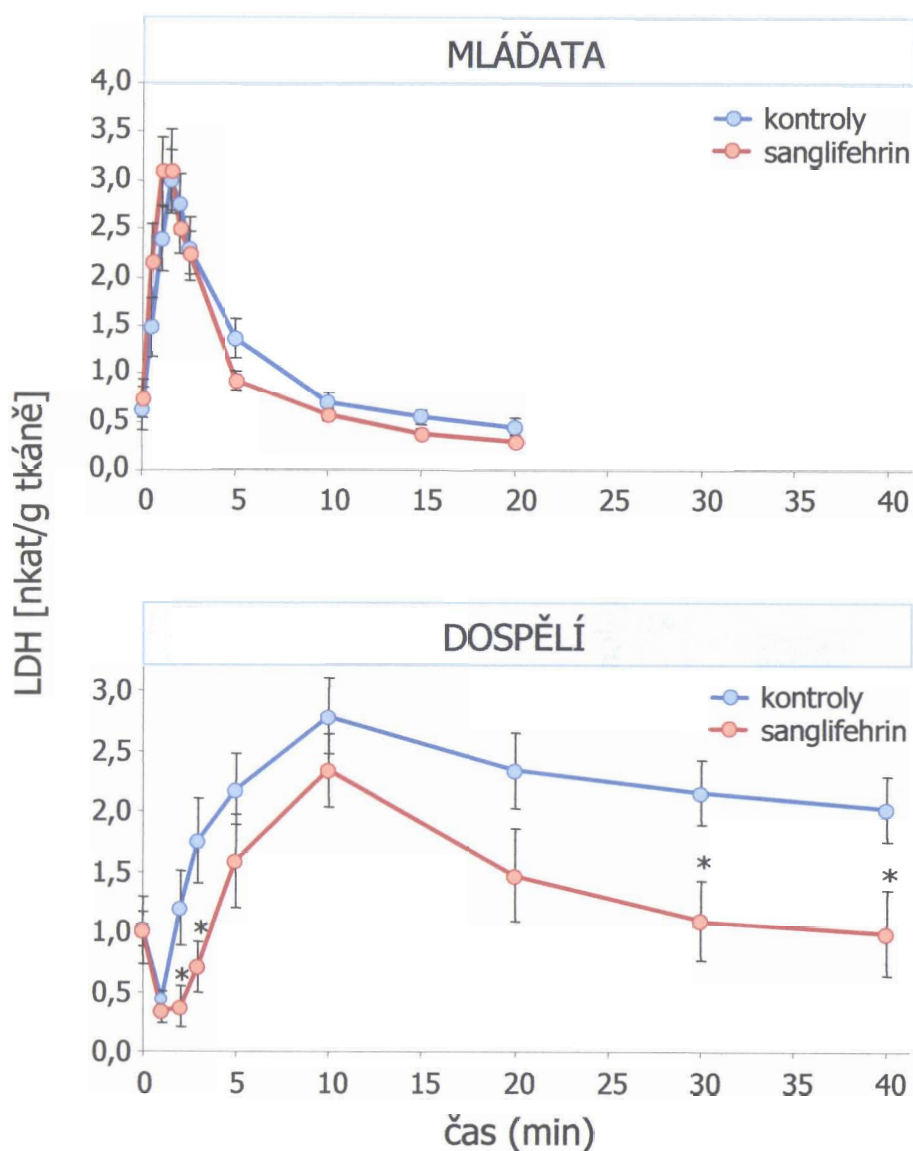
Na izolovaném perfundovaném srdci jsme sledovali vliv blokády MPT póru sanglifehrinem A na rozsah ischemicko-reperfuzního poškození. Rozsah poškození je vyjádřen jako množství celkové LDH vyplavené během postischemické reperfuze. Zatímco u 10ti denních mláďat nedošlo blokádou MPT póru ke statisticky významnému ovlivnění ztrát LDH v průběhu reperfuze, u dospělých došlo k významnému snížení rozsahu poškození (obr. 15).

Blokádou MPT póru došlo také k výraznému ovlivnění časového průběhu produkce LDH u dospělých zvířat. Po přidání sanglifehrinu A do perfuzátu v preischemické fázi došlo v porovnání s kontrolami ke snížení uvolňování LDH. U mláďat k významnému ovlivnění LDH nedošlo (obr. 16).

Časový průběh vyplavování LDH se u mláďat a dospělých významně lišil. U mláďat bylo maxima dosaženo po 2. min, u dospělých o 8 min později; návrat k počátečním hodnotám jsme u mláďat pozorovali po 15-20 min, u dospělých zvířat zůstaly hodnoty i po 40 min zvýšeny nad úroveň hodnot ze začátku reperfuze (obr. 16).



Obrázek 15: Vliv blokády MPT póru na ischemicko-reperfuzní poškození. Izolovaná perfundovaná srdce z 10ti denních mlád'at a dospělých potkanů. Rozsah poškození byl stanoven měřením celkové LDH uvolněné během reperfuze. Kontroly – do perfuzátu přidáno rozpouštědlo (alkohol), sangliferin A – do perfuzátu přidán sangliferin A. Data jsou korigována koeficientem hydratace a jsou vyjádřena na 1 g srdeční tkáně. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M. (mlád'ata: $n=17$, NS; dospělí: $n=14$,* $P<0,05$).

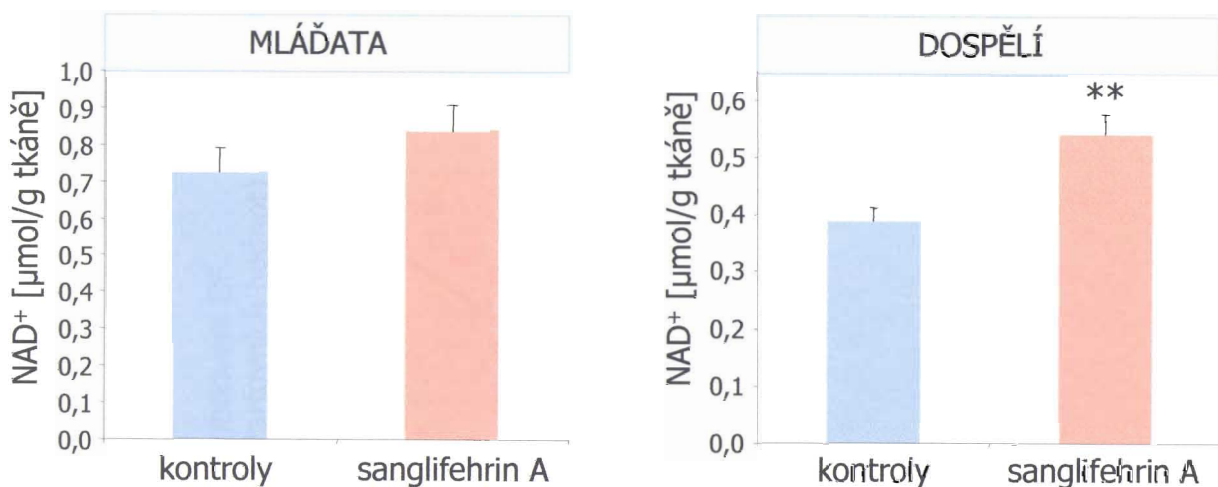


Obrázek 16: Vliv blokády MPT póru na ischemicko reperfuční poškození; časový průběh.

Izolovaná perfundovaná srdce z 10ti denních mláďat a dospělých potkanů. Časový průběh rozsahu poškození byl stanoven měřením LDH vyplavené během reperfuze ve sledovaných časových intervalech (délka odběru byla vždy 10 s). Kontroly – do perfuzátu přidáno rozpouštědlo (alkohol), sanglifehrin A – do perfuzátu přidán sanglifehrin A. Data jsou korigována koeficientem hydratace a jsou vyjádřena na 1 g srdeční tkáně. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M. (mláďata: $n=17$, NS; dospělí: $n=14$,* $P<0,05$).

Ovlivnění NAD⁺

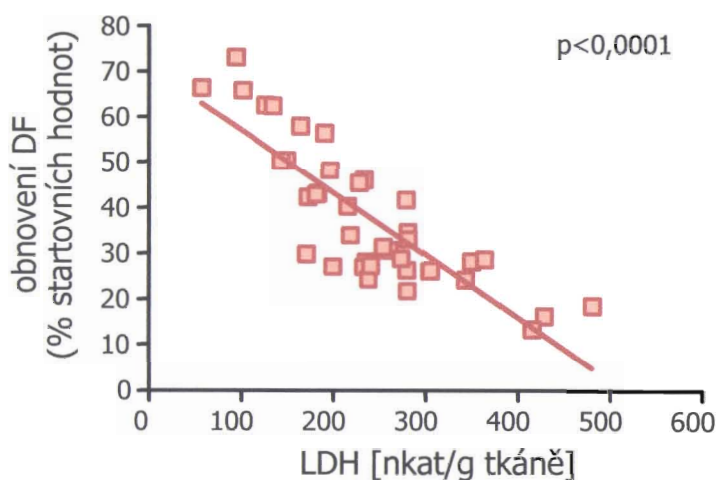
Pro ověření vlivu blokady MPT póru sanglifehrinem A na rozsah ischemicko-reperfuze jsme stanovili množství NAD⁺ v srdeční tkáni na konci reperfuze. U mláďat jsme nezaznamenali statisticky významné změny, naproti tomu u dospělých se vlivem blokady póru zachovalo v srdeční tkáni významně větší množství NAD⁺ (obr. 17).



Obrázek 17: Vliv blokady MPT póru na obsah NAD⁺ v srdeční tkáni v průběhu ischemie a reperfuze. Izolovaná perfundovaná srdce z 10ti denních mláďat a dospělých potkanů. Kontroly – do perfuzátu přidáno rozpouštědlo (alkohol), sangliferrin A – do perfuzátu přidán sangliferrin A. Data jsou korigována koeficientem hydratace a jsou vyjádřena na 1 g srdeční tkáně. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± S.E.M. (mláďata: n=17, NS; dospělí: n=14, ** P<0,002).

Vztah mezi LDH a rozsahem ischemicko-reperfuzního poškození

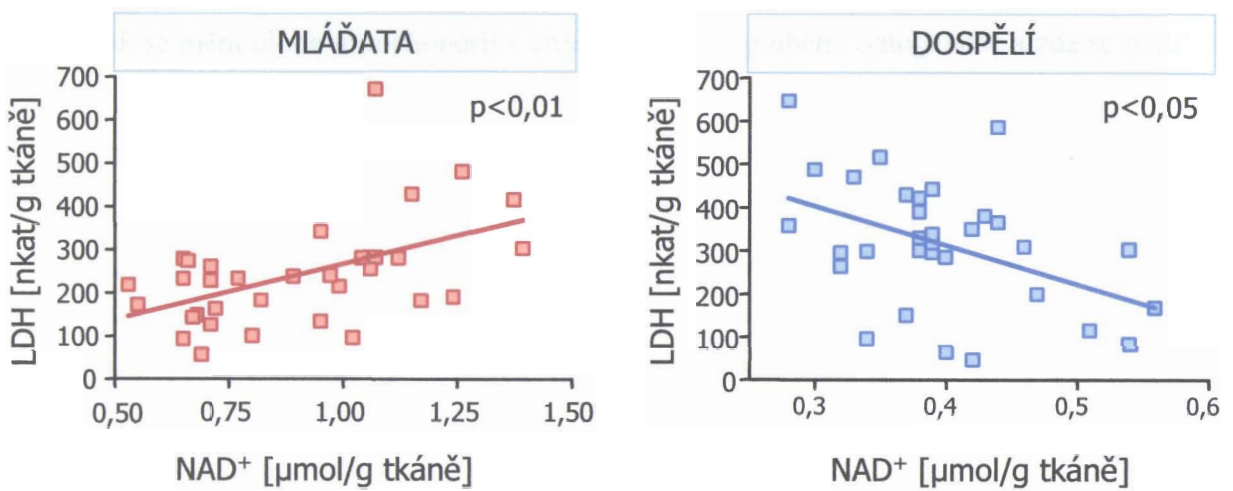
Ke stanovení míry ischemicko-reperfuzního poškození na izolovaném srdci jsme použili metodu měření aktivity LDH v koronárním efluentu. Ta se sice rutinně používá u dospělých, u mláďat však její spolehlivost zatím nebyla ověřena. Naše měření ukazují, že mezi mírou ischemicko-reperfuzního poškození, vyjádřené jako reparace kontraktility izolovaného srdce po ischemii, a množstvím produkovaného LDH existuje negativní korelace s vysokou signifikancí (obr. 18).



Obrázek 18: Vztah mezi reparací kontraktility a množstvím vyplavené LDH u 10ti denních mláďat

Vztah mezi LDH a NAD⁺

Pro sledování aktivity MPT póru jsme použili metodu měření NAD⁺ v srdeční tkáni: u které byl prokázán vztah mezi mírou otevření póru a úbytkem NAD⁺ v srdeční tkáni u dospělých. Tento vztah potvrzují i naše výsledky, které ukazují negativní korelaci mezi množstvím produkovaného LDH v eluátu (míra poškození) a NAD⁺ v srdeční tkáni na konci reperfuze u dospělého srdce (obr. 19). U nezralého srdce ukázala regresní analýza vztah právě opačný: s rostoucím poškozením, vyjádřeným jako množství uvolněného LDH, se zvyšuje hladina NAD⁺ v tkáni (obr. 19).



Obrázek 19: Vztah mezi celkovým množstvím vyplavené LDH a obsahem NAD⁺ v srdeční tkáni na konci reperfuze; porovnání dospělých srdcí a srdcí 10ti denních mláďat

DISKUZE

Odolnost srdce k nedostatku kyslíku se v průběhu vývoje výrazně mění: nejvyšší je těsně po narození a pak až do dospělosti klesá. Mechanizmy, odpovědné za vyšší odolnost nezralého srdce, dosud nebyly uspokojivě objasněny (viz Úvod); zdá se však, že významnou úlohu zde hraje měnící se funkce mitochondrií. Nezralá srdeční buňka se spoléhá na produkci ATP převážně cestou anaerobní glykolýzy; ta je sice neefektivní, avšak umožňuje nižší závislost na dodávce kyslíku. Naproti tomu dospělá srdeční buňka je prakticky plně závislá na vysoce efektivní produkci ATP aerobní cestou v mitochondriích; to ji ovšem v hypoxických podmínkách značně znevýhodňuje. Tato skutečnost by mohla být jedním z rozhodujících mechanismů určujících nižší odolnost srdce v dospělosti. Naším hlavním cílem tedy bylo zjistit, jak se mění úloha mitochondrií v srdeční buňce v průběhu ontogeneze a zda se podílejí na změnách srdeční odolnosti.

Naše pokusy ukázaly, že v průběhu ontogenetického vývoje dochází v mitochondriích ke změnám klíčového parametru aerobní fosforylace (MMP) a některých proteinů vnitřní membrány (COX, UCP, ANT), které tento parametr ovlivňují. Kritické pro tyto změny je především období odstavu, kdy v srdci dochází k zásadní změně v preferenci substrátů. V průběhu vývoje se zvyšuje citlivost izolovaných mitochondrií k nedostatku kyslíku; stabilita MMP je za hypoxie v nezralých srdcích ve srovnání s dospělým srdcem podstatně větší. Podobně se liší i úloha MPT póru v mechanismu ischemicko-reperfučního poškození: zatímco jeho blokáda v dospělém srdci snižuje rozsah poškození, v nezralém srdci je bez účinku. Zdá se tedy, že mitochondrie se uplatňují v mechanismu měnící se odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku v průběhu ontogenetického vývoje.

Podívejme se nyní na jednotlivé výsledky podrobněji.

VÝVOJ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU MITOCHODNRIÍ

Za jeden z klíčových parametrů mitochondriální funkce lze považovat MMP, který odpovídá za základní mitochondriální funkci – produkci ATP. MMP je dále součástí mnoha důležitých buněčných mechanismů, např. procesu apoptózy a mechanismu tvorby kyslíkových radikálů. Měření MMP vypovídá o energetickém stavu mitochondrií, úrovni respirace a umožňuje hodnotit aktivitu řady parametrů, především úroveň respirace a vliv faktorů regulujících elektrochemický gradient. Je zřejmé, že udržování MMP je esenciální jak

z hlediska mnoha buněčných funkcí, tak z hlediska zachování životaschopnosti buňky samotné {Skulachev, 1999}.

Měřením membránového potenciálu srdečních mitochondrií průtokovým cytometrem jsme zjistili, že neonatální a dospělé mitochondrie se výrazně liší. Zatímco srdeční buňky z neonatálních zvířat vykazují unimodální distribuci MMP (mají pouze jedinou populaci s vysokým MMP), v dospělých srdcích jsme identifikovali populace dvě – s vysokým a s nízkým MMP. Za snížený MMP druhé populace může být odpovědno několik faktorů: snížená aktivita struktur odpovědných za tvorbu elektrochemického gradientu na straně jedné (aktivita citrátového cyklu a řetězce oxidativních enzymů) a/nebo zvýšená aktivita struktur odpovědných za snižování gradientu na straně druhé (UCP, ANT, přítomnost mastných kyselin, MPT pór) {Simonyan a Skulachev, 1998; Echtay a spol., 2001}. Existence populace s nízkým potenciálem znamená v konečném důsledku pokles účinnosti tvorby ATP v buňce. Podle principu spřažení respirace a fosforylace je energie vznikající oxidací substrátů převáděna na membránový potenciál (elektrochemický gradient), který využívá ATP syntáza při tvorbě ATP. Proto jakékoliv snížení MMP (z různých důvodů), které nesouvisí s tvorbou ATP, lze považovat za pokles účinnosti aerobní fosforylace.

V této souvislosti bylo nutné si položit otázku, zda nízký MMP, který se v průběhu vývoje objevuje, není výsledkem poškození mitochondriální funkce, vzniklého v průběhu izolace. Pro ověření funkční zdatnosti populace s nízkým potenciálem jsme se pokusili zvýšit její MMP. Pokud jsme odstranili volné mastné kyseliny z média přidáním FAF BSA, došlo k selektivnímu zvýšení potenciálu u mitochondrií s nízkým potenciálem. To, že izolované mitochondrie s nízkým MMP je možno částečně spřáhnout a zvýšit tak jejich potenciál nad úroveň populace zcela rozpřažené chemickým rozpřahovačem, dokazuje, že v průběhu izolace nedochází k funkčnímu poškození mitochondrií. Podobné závěry rovněž potvrzují i elektron-mikroskopická pozorování, která jednoznačně prokázala, že v průběhu izolace nedochází k morfologickému poškození mitochondrií. Vliv odstranění volných mastných kyselin na velikost MMP lze vysvětlit jejich regulačním vlivem na aktivitu UCP a ANT, nacházející se na vnitřní mitochondriální membráně. K tomuto závěru dochází Baumruk a spol. {1999} na základě experimentů s UCP1 v hnědém tuku, kde se ukázalo, že UCP1 ve spolupráci s MK snižuje MMP. V našem případě je tedy tento efekt nejspíše způsoben vyvázáním MK albuminem, čímž dojde k ovlivnění rozpřahovacího efektu UCP a MMP se zvýší {Jabůrek a spol., 1999; Simonyan a Skulachev, 1998; Echtay a spol., 2001}.

Zajímavá je lokalizace mitochondrií s vysokým a nízkým MMP v srdeční buňce. Studie, zabývající se ultrastrukturálními změnami srdečního svalu v průběhu ontogeneze,

ukazují, že organizace mitochondrií spolu s myofibrilami je v neonatální srdeční buňce značně chaotická; v průběhu postnatálního vývoje se mitochondrie soustřeďují do dvou hlavních populací, lišících se svou lokalizací – subsarkolemální (SSM) a interfibrilární (IFM). Ty jsou typickou součástí dospělého kardiomyocytu a svého definitivního uspořádání dosahují na konci období odstavu {Ošťádal a Schiebler, 1971; Palmer a spol., 1977}. Obě populace se chovají odlišně za různých patologických situací, jako je vápníkové přetížení, kardiomyopatie, v průběhu ischemie a stárnutí {Palmer a spol., 1986; Hoppel a spol., 1982; Fannin a spol., 1999; Piper a spol., 1985}. Obě populace lze od sebe oddělit alternativní metodou izolace: v první fázi šetrnou homogenizací získáme subsarkolemální frakci (SSM). Druhá fáze izolace probíhá za účasti proteázy nagarsy: působením enzymu dochází k narušení struktury myofibril a lze tak získat populaci mitochondrií interfibrilárních (IFM) {Palmer a spol., 1977; Iossa a spol., 2001}. Použitím této metody jsme prokázali, že obě populace, se kromě své lokalizace, liší i velikostí MMP: zatímco SSM vykazovaly přítomnost populace jak s nízkým tak s vysokým potenciálem, v IFM jsme pozorovali pouze populaci s vysokým potenciálem. Na základě našich pokusů ovšem nemůžeme vyloučit, že přítomnost populace s vysokým potenciálem v subsarkolemální frakci není způsobena arteficiálně izolační technikou, neboť při separaci SSM může dojít ke kontaminaci frakcí IFM {Palmer a spol., 1977; Iossa a spol., 2001}. Avšak je nutné si uvědomit, že mezi oběma kompartmenty existuje přechodová oblast (vnější část svazku myofibril), kde se vyskytují mitochondrie z obou funkčních skupin.

Rozdílná velikost MMP v jednotlivých populacích je nejspíš dána různým obsahem protonoforických proteinů na vnitřní membráně a/nebo různou citlivostí k volným mastným kyselinám. Bohužel, zatím nebyl nalezen jasný strukturální ukazatel, který by tuto domněnku potvrdil či vyvrátil. Nižší MMP u SSM je výhodný z toho důvodu, že na mitochondrie v oblasti jádra a pod sarkoplazmatickou membránou jsou kladeny daleko nižší nároky z hlediska tvorby ATP než v případě IFM; nejvíce ROS vzniká právě v situaci tzv. „resting-state“, kdy mitochondrie respirují, ovšem fosforylace z různých důvodů neprobíhá {Ježek a spol., 2004}; pro buňku potom nemusí být žádoucí udržovat vysoký membránový potenciál u mitochondrií, které nejsou „pracovně vytíženy“ (nefosforylují kvůli nedostatku ADP).

VÝVOJ EXPRESE NĚKTERÝCH GENŮ A PROTEINŮ VNITŘNÍ MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNY

V další etapě naší práce jsme se zaměřili na ontogenetický vývoj struktur regulujících membránový potenciál, a to COX na straně jedné (potenciál generuje) a UCP a ANT na straně druhé (potenciál snižují). Naše výsledky ukazují, že maximální změny v expresi genů pro UCP2, UCP3, ANT1 a ANT2 se odehrávají v období odstavu, tj. ve vývojové fázi charakterizované měnícím se energetickým metabolismem. Hladina COX se bezprostředně po porodu až do období odstavu zvyšuje a do dospělosti pak klesá. Úroveň transkriptů UCP2 a UCP3 se v srdci potkana ihned po narození zvýší, po mírném poklesu pátý den pak dosáhne druhého maxima mezi 10. a 20. dnem postnatálního života a dále do dospělosti klesá. Exprese genů izoform ANT1 a ANT2 má opačný trend. Úroveň exprese ANT1 genu od narození postupně stoupá, dosahuje maxima okolo 28. dne, tedy na konci období odstavu, a s rostoucím věkem klesá. Naopak ANT2 dosahuje svého maxima ihned po narození, klesá v prvním měsíci života a dále zůstává beze změn. Podobně opačný trend ve vývoji exprese genů izoform ANT1 a ANT2 v průběhu postnatálního vývoje byl popsán také u králíků {Portman a spol., 1999} a myši {Levy a spol., 2000}, kde je rovněž těsně po porodu relativně vyšší exprese ANT1 oproti ANT2. Pro vysvětlení těchto vývojových změn je třeba vzít v úvahu skutečnost, že ANT1 je efektivnější v transportu ATP do cytoplazmy, zatímco ANT2 je schopná transportu ATP/ADP v obou směrech; lze předpokládat, že mitochondrie dospělého srdce s oxidativním metabolismem se bude více spoléhat na izoformu 1 (a tím lépe vyhovovat vysokým nárokům dospělého srdce na dodávku ATP z mitochondrií), zatímco srdce mláďátek s glykolytickým metabolismem více na izoformu 2.

Fyziologický význam bifázické aktivace genu UCP2 a UCP3 není jasný. Množství antigenu UCP2 v srdci dospělého potkana je navíc ve srovnání s některými jinými tkáněmi (slezina, bílá tuková tkáň) velice nízké {Pecqueur a spol., 2001; Medvedev a spol., 2001}. Lze předpokládat, že tyto vývojové změny mají výrazný vliv na vývoj energetického metabolismu srdečního svalu. Zdá se, že zvýšená exprese UCP2, UCP3 a ANT1 okolo 20. dne ontogenetického vývoje je odpovědná za pokles účinnosti energetické přeměny v srdečním svalu. Zvýšená exprese UCP3, prokázaná v hypoxickém kosterního svalu, stejně jako zvýšení ANT1 v srdcích s kardiomyopatií tuto domněnku podporuje {Zhou a spol., 2000; Dömer a Schultheiss, 2000}. Změny v hladinách těchto proteinů jsou tak spíše důsledkem větší poptávky po ATP než typickou součástí obrazu energetického selhání kardiomyocytů.

Skutečnost, že maximálních hodnot COX je dosaženo zhruba 10 dní po maximu rozpráhovacích proteinů (28. den ontogenetického vývoje), snižujících účinnost aerobní fosforylace, je zřejmě odpovědí buňky na pokles v účinnosti energetické přeměny. Naše výsledky ukazují, že 30ti denní potkani mají vyšší specifický obsah COX v srdečních mitochondriích ve srovnání s mladšími i staršími zvířaty. To naznačuje, že vývoj UCP3 může významně ovlivnit funkci mitochondrií v srdci, zejména v období přechodu metabolismu srdečních buněk na mastné kyseliny jako hlavní zdroj energie {Himms-Hagen a Harper, 2001; Echtay a spol., 2001}. Exprese UCP3 v kosterním svalu myši koreluje s intenzitou oxidace mastných kyselin. Ukázalo se, že UCP3 pak přímo napomáhá zvýšení jejich využití v energetickém metabolismu {Bezaire a spol., 2005}. Lze navíc předpokládat, že přímá souvislost těchto struktur s membránovým potenciálem by mohla vysvětlit vznik mitochondriální populace s nízkým potenciálem na konci odstavu.

V této souvislosti vyvstává otázka, zda vývoj proteinů vnitřní mitochondriální membrány bude rozdílný v interfibrilární a subsarkolemální frakci. Vzhledem k tomu, že tuto otázku jsme experimentálně neřešili, lze pouze vycházet z neúplných literárních údajů, srovnávajících hladiny UCP a ANT těchto dvou mitochondriálních populací v kosterním svalu. Při porovnání obsahu UCP3 v populacích SSM a IFM potkana nebyly nalezeny žádné rozdíly {Iossa a spol., 2001}, v případě ANT se ukázalo, že vyšší obsah ANT je v SSM {Roussel a spol., 2000}. Iossa a spol. {2001} dále ukázali, že dieta s vysokým obsahem tuku, podávaná hlodavcům, zvyšuje protonovou vodivost vnitřní membrány mitochondrií izolovaných z kosterního svalstva, a to opět pouze u SSM populace díky její větší citlivosti ke zvýšenému obsahu volných mastných kyselin v krevním oběhu.

Lze tedy uzavřít, že v průběhu postnatálního vývoje potkana se celková kapacita syntézy ATP srdečních mitochondrií výrazně zvyšuje. Tomu odpovídá i ontogenetický vývoj další významné součásti oxidativního řetězce - komplexu III {Wells a spol., 1972; Veerkamp a Van Moerkerk, 1985} spolu s výrazným zvýšením aktivity ostatních enzymů oxidativního metabolismu {Bass a spol., 2001}. Jak jsme uvedli výše, ve stejném období lze pozorovat i strukturální změny mitochondrií, jejichž velikost, denzita a krystalita se postupně zvyšuje; dospělý kardiomyocyt má v porovnání s neonatálními jedinci dvakrát větší objem mitochondrií {Legato, 1979; Olivetti a spol., 1980}. Uvedená fakta ukazují, že v průběhu ontogenetického vývoje dochází ke změnám účinnosti oxidativní fosforylace v jedné populaci srdečních mitochondrií (subsarkolemální mitochondrie s nízkým membránovým potenciálem). Toto snížení je zřejmě nezbytné k dosažení optimálních podmínek pro funkci oxidativní fosforylace při vyšší zátěži, která je typická pro dospělý myokard. Stejně tak však

může sloužit jako prevence vzniku nežádoucích metabolických produktů, jako jsou ROS {Stucki, 1980; Skulachev, 1999}. V této situaci lze i malým snížením MMP dosáhnout výrazného omezení produkce ROS; zde opět hrají klíčovou roli některé struktury vnitřní mitochondriální membrány s protonoforickou aktivitou {Ježek a spol., 2004}.

ÚLOHA MITOCHONDRIÍ V CITLIVOSTI SRDCE K NEDOSTATKU KYSLÍKU

Naše výsledky ukázaly, že vývojové rozdíly v odolnosti srdečního svalu k hypoxii se projevují již na úrovni samotných mitochondrií. Porovnání MMP dvou věkových skupin ukázalo, že zatímco 5ti denní zvířata reagují na nízkou hladinu kyslíku postupným poklesem MMP s typicky sigmoidním průběhem změn, MMP mitochondrií 60ti denních zvířat má bifázický charakter s poměrně rychlým poklesem v první fázi. Druhá fáze je naopak pomalejší a má víceméně lineární průběh, na rozdíl od 5ti denních mitochondrií je MMP nestabilní. Pokles u dospělých zvířat je rychlejší a při opětovném přidání kyslíku do média dojde k obnovení MMP na původní úroveň. Mitochondrie izolované z mláďat na přidání kyslíku do média prakticky nereagují. Tento experiment podporuje hypotézu o klíčové úloze mitochondrií v mechanismu odolnosti srdce k nedostatku kyslíku. Snažili jsme se proto zjistit, které mitochondriální struktury jsou za popsané vývojové rozdíly odpovědné.

V posledních letech se ukázalo, že rozhodující úlohu v ischemicko-reperfučním poškození dospělého srdce hraje MPT pór {Halestrap a spol., 2004; přehled viz Di Lisa a Bernardi, 2006}. Důkazem pro toto tvrzení jsou především výsledky ukazující, že blokáda otevření póru významně snižuje velikost infarktového ložiska. Příčinou otevření MPT póru jsou děje, ke kterým dochází na počátku reperfuze: vzestup hladiny vápníku, pokles membránového potenciálu mitochondrií, zvýšená hladina anorganického fosfátu, změny v pH, pokles hladiny makroergních fosfátů a zvýšení volných kyslíkových radikálů. Důsledkem otevření póru pak je kolaps membránového potenciálu mitochondrie, pokles úrovně oxidativního metabolismu, bobtnání mitochondrií, vedoucí k redukci krist a poškození vnější mitochondriální membrány, a konečně zánik mitochondrie se všemi negativními dopady na samotnou buňku. Inhibice otevření MPT póru sanglifehrinem A výrazně snižuje rozsah ischemicko-reperfučního poškození u dospělých srdcí.

Sledováním aktivity MPT póru jsme potvrdili jeho nezastupitelnou úlohu v procesu ischemicko-reperfučního poškození; u dospělých zvířat jeho inhibice sanglifehrinem A, ve

shodě s výše uvedenými pokusy, výrazně snížila rozsah ischemicko-reperfuzního poškození. Jeho úloha v nezralém srdci však zůstává stále nejasná; u mlád'at se inhibicí MPT póru nepodařilo rozsah poškození ovlivnit. Co může být za tuto vývojovou změnu odpovědné?

Ke stanovení míry ischemicko-reperfuzního poškození na izolovaném srdci jsme použili metodu měření aktivity LDH v koronárním efluentu, která se rutinně používá u dospělých; její použitelnost u mlád'at však nebyla doposud ověřena. Výsledky našich měření ukazují, že mezi reparací kontraktility (reciproční hodnota míry ischemicko-reperfuzního poškození) a množstvím produkovaného LDH existuje u 10ti denních mlád'at významná negativní korelace, tj., že se zvyšujícím se poškozením stoupá množství LDH v koronárním efluentu, podobně jako u zralých srdcí. K posouzení rozsahu ischemicko-reperfuzního poškození u 10ti denních mlád'at tedy lze metodu měření LDH použít.

Pro sledování aktivity samotného MPT póru jsme použili metodu měření NAD^+ v srdeční tkáni, založené na vztahu mezi mírou otevření póru a úbytkem NAD^+ , jak ji v dospělé srdeční tkáni popsali Di Lisa a spol. {2001}. Tento vztah potvrzují i naše výsledky, které ukazují negativní korelaci mezi množstvím produkovaného LDH v eluátu (míra poškození) a NAD^+ v srdeční tkáni na konci reperfuze u dospělého srdce. Tento vztah jsme však nepozorovali u nezralého srdce, kde regresní analýza prokázala přímou úměru mezi uvolněným LDH do eluátu a obsahem NAD^+ na konci reperfuze - s rostoucím poškozením se zvyšuje množství NAD^+ v tkáni. To znamená, že na rozdíl od srdce dospělého, vyšší poškození neonatálního srdce není provázeno snížením NAD^+ v myokardu. Metoda sledování aktivity MPT póru pomocí stanovení obsahu NAD^+ je proto v srdečním svalu nezralého potkana nepoužitelná. Důvodem je s největší pravděpodobností zcela odlišný metabolismus nezralého myokardu, který v situaci globální ischemie spoléhá na produkci ATP cestou anaerobní glykolýzy {Lopaschuk a spol., 1992; Bass a spol., 2001}. Při ní vzniká velké množství redukovaného $\text{NADH} + \text{H}^+$ a roste poměr NADH/NAD^+ , což je z hlediska řady enzymatických funkcí buňky nežádoucí (zejména pro samotnou glykolýzu). Proto se NAD^+ regeneruje prostřednictvím LDH v reakci pyruvát \rightarrow laktát (při dostatku kyslíku dochází k regeneraci NAD^+ na začátku dýchacího řetězce a laktát je oxidován na vodu a oxid uhličitý). Poté, co se v buňce spotřebuje glukóza, není již NAD^+ využíváno a díky tomu se jeho množství na konci ischemie zvyšuje. Lze tedy předpokládat, že v nezralé srdeční buňce bude v důsledku vyššího využití glukózy i vyšší hladina NAD^+ v cytoplazmě. Jeho uvolňování z mitochondrií může být proto z hlediska měření celkového obsahu NAD^+ v srdeční tkáni zanedbatelné (i s přihlednutím k faktu, že mitochondrií je v tomto věkovém období relativně málo). Naproti tomu v dospělé srdci převažuje NAD^+ mitochondriální a jeho uvolnění a

následnou degradaci NAD^+ -glykolhydrolázou lze spolehlivě změřit {Di Lisa a spol., 2001}. Ke sledování aktivity MPT póru u mláďat se proto zdá být vhodnější metodika měření bobtnání izolovaných mitochondrií {Balaska a spol., 2005}; stav póru je však možno hodnotit až za několik hodin po samotném pokusu. Izolace mitochondrií může znamenat nejen oddálení momentu měření póru, ale nelze vyloučit ani negativní vliv izolace na funkci mitochondrií.

Skutečnost, že se nám na rozdíl od dospělých nepodařilo prokázat protektivní vliv blokády MPT póru na poškození myokardu u mláďat, může mít několik vysvětlení: (i) sanglifehrin A nemusí fungovat v důsledku vývojových změn ve struktuře MPT póru, (ii) v neonatálních srdečních buňkách je tak malé množství MPT pórů, že nejsou schopny svou aktivitou chování srdeční buňky ovlivnit a (iii) množství mitochondrií v nezralé srdeční buňce je menší než v dospělých srdcích. To jednak snižuje možnost výrazněji ovlivnit buněčný metabolismus, jednak vypovídá o orientaci neonatálního srdce na extramitochondriální způsob získávání energie. Zdá se tedy, že mechanismus ischemicko-reperfuzního poškození v nezralém srdci není spojený s úlohou mitochondrií v takové míře, jako je tomu u dospělého srdce.

ZÁVĚRY

Funkce mitochondrií srdečního svalu se v průběhu ontogenetického vývoje zásadním způsobem mění: to se týká jak MMP, klíčového parametru oxidativní fosforylace, tak i proteinů vnitřní mitochondriální membrány, které jsou rozhodující pro regulaci účinnosti energetické přeměny. Uvedené změny mají u laboratorního potkana kritickou vývojovou periodu, kterou je období odstavu, tedy období, kdy v myokardu dochází k zásadní změně v preferenci substrátů.

V průběhu ontogenetického vývoje se významně mění odolnost srdečního svalu k nedostatku kyslíku. Tyto vývojové změny jsou doprovázeny jak měnícím se účinkem hypoxie na stabilitu MMP, tak měnící se úlohou MPT póru v ischemicko-reperfuzním poškození. To limituje i používání metod, rutinně používaných u dospělých srdcí, pro měření funkce MPT póru v nezralém myokardu.

Uvedené výsledky podporují hypotézu, že mitochondrie hrají klíčovou úlohu v ontogenetických změnách odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku. Lze říci, že klesající odolnost srdečního svalu k nedostatku kyslíku v průběhu ontogeneze je zřejmě

způsobena zvyšujícím se podílem mitochondriálních funkcí na energetickém metabolismu myokardu. Tento zásadní poznatek může být východiskem pro analýzu hypoxických stavů srdečního svalu v různých fázích ontogeneze jak u jedinců zdravých, tak u pacientů vystavených v časném vývoji různému stupni hypoxické zátěže. Z tohoto hlediska by naše výsledky mohly mít potenciální význam pro klinickou praxi, především pro dětskou kardiologii a kardiochirurgii.

Lze souhlasit s názorem Whitea {2004}, že mitochondrie se nejen znovu narodila, ale i plně dozrála do klíčové role kardiovaskulárního výzkumu v příštím letech.

SOUHRN

V naší práci byly dosaženy tyto prioritní výsledky:

1. Dospělý myokard laboratorního potkana obsahuje dvě populace mitochondrií, které se významně liší lokalizací a velikostí membránového potenciálu. Zatímco populace lokalizovaná interfibrilárně obsahuje pouze mitochondrie s vysokým membránovým potenciálem, populace subsarkolemálního kompartmentu je tvořena mitochondriemi jak s nízkým, tak s vysokým potenciálem.
2. Membránový potenciál srdečních mitochondrií, klíčový parametr oxidativní fosforylace, se v průběhu ontogenetického vývoje výrazným způsobem mění. V prenatálním a raně postnatálním období má charakter jediné populace (unimodální distribuce), na konci období odstavu (28. den) se objevuje populace druhá s maximem v oblasti nízkého potenciálu; 60. den postnatálního vývoje lze prokázat dvě zřetelně oddělená maxima.
3. V průběhu ontogenetického vývoje se rovněž zásadním způsobem mění hladiny některých proteinů vnitřní mitochondriální membrány. Tyto proteiny mohou výrazně ovlivňovat účinnost energetické přeměny v mitochondriích; jedná se jednak o klíčový enzym respiračního řetězce (cytochrom *c* oxidázu), rozpráhovací proteiny (UCP2 a 3) a izoformy adenin nukleotid translokázy (ANT1 a ANT2). Změny ve specifickém obsahu cytochrom *c* oxidázy jsou charakterizovány přibližně dvojnásobným zvýšením v prvním měsíci života s maximem okolo 28. dne a poklesem v dospělosti. Transkripty genů (v případě UCP3 i protein) UCP2 a 3 dosahují svého maxima okolo 20. dne života, do 28. dne významně klesají a pak až do dospělosti se prakticky nemění. Hladiny transkriptů obou izoform adenin nukleotid translokázy mají navzájem opačnou tendenci: v případě ANT1 genu hladina postupně stoupá, dosahuje maxima okolo 28. dne a s rostoucím věkem klesá, ANT2 dosahuje maxima ihned po narození, klesá v prvním měsíci života a dále zůstává beze změn. Kritickou periodou maximálních změn je pro všechny jmenované proteiny opět období odstavu.

4. Stabilita membránového potenciálu izolovaných mitochondrií nezralého myokardu je při hypoxii větší než u srdce dospělého. To ukazuje, že větší odolnost k nedostatku kyslíku mají mitochondrie izolované z neonatálního srdce.
5. Chování MPT póru, jehož otevření hraje výraznou roli v ischemicko-reperfuzním poškození, se v dospělém a neonatálním srdci významně liší. Zatímco v dospělém myokardu jsou blokátory MPT póru schopny snížit rozsah ischemicko-reperfuzního poškození, u mláďat nemají žádný efekt. To je zřejmě výsledkem vývojových rozdílů úlohy MPT póru v patogenezi ischemicko-reperfuzního poškození. Naše výsledky naznačují, že metoda měření aktivity MPT póru pomocí obsahu NAD^+ v srdeční tkáni, úspěšně využívaná u dospělých srdcí, je pro nezralý myokard nepoužitelná.

LITERATURA

- AKIYAMA K, GLUCKMAN T, TERHAKOPIUM A, JINADASA P, NARAYAN S, SINGASWANY S, MASSEY B, 3., BING RJ: Apoptosis in experimental myocardial infarction in situ and in the perfused heart in vitro. *Tissue Cell* **29**: 733-743, 1997.
- ARBUSTINI E, DIEGOLI M, FASANI R, GRASSO M, MORBINI P, BANCHIERI N, BELLINI O, DAL BELLO B, PILOTTO A, MAGRINI G, CAMPANA C, FORTINA P, GAVAZZI A, NARULA J, VIGANO M: Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol* **153**: 1501-1510, 1998.
- ARSENJEVIC D, ONUMA H, PECQUEUR C, RAIMBAULT S, MANNING BS, MIROUX B, COUPLAN E, ALVES-GUERRA MC, GOUBERN M, SURWIT R, BOUILLAUD F, RICHARD D, COLLINS S, RICQUIER D: Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* **26**: 435-439, 2000.
- ARTMAN M, MAHONY L, TEITEL DF: Neonatal Cardiology. New York, The McGraw-Hill, 272 s, 2002.
- ARTMAN M: Developmental changes in myocardial contractile responses to inotropic agents. *Cardiovasc Res* **26**: 3-13, 1992.
- ASEMU G, PAPOUŠEK F, OŠTÁDAL B, KOLÁŘ F: Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *J Mol Cell Cardiol* **31**: 1821-1831, 1999.
- BAINES CP, KAISER RA, PURCELL NH, BLAIR NS, OSINSKA H, HAMBLETON MA, BRUNSKILL EW, SAYEN MR, GOTTLIEB RA, DORN GW, ROBBINS J, MOLKENTIN JD: Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**: 658-662, 2005.
- BAKER EJ, BOERBOOM LE, OLINGER GN, BAKER JE: Tolerance of the developing heart to ischemia: impact of hypoxemia from birth. *Am J Physiol* **268**: H1165-H1173, 1995.

- BAKER JE, BOERBOOM LE, OLINGER GN: Age-related changes in the ability of hypothermia and cardioplegia to protect ischemic rabbit myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* **96**: 717-724, 1988.
- BAKER JE, BOERBOOM LE, OLINGER GN: Is protection of ischemic neonatal myocardium by cardioplegia species dependent. *J Thorac Cardiovasc Surg* **99**: 280-287, 1990.
- BALASKA D, HALESTRAP AP, SULEIMAN M-S, GRIFFITHS EJ: Increased susceptibility to pore-opening in heart mitochondria from neonatal compared with adult rats. (abstract). *J Mol Cell Cardiol* **38**: 1002, 2005.
- BASS A, STEJSKALOVÁ M, STIEGLEROVÁ A, OŠŤÁDAL B, SAMÁNEK M: Ontogenetic development of energy-supplying enzymes in rat and guinea-pig heart. *Physiol Res* **50**: 237-245, 2001.
- BAUMRUK F, FLACHS P, HORÁKOVÁ M, FLORYK D, KOPECKÝ J: Transgenic UCP1 in white adipocytes modulates mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* **444**: 206-210, 1999.
- BEREITER-HAHN J, VOTH M: Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* **27**: 198-219, 1994.
- BEREITER-HAHN J: Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* **122**: 1-63, 1990.
- BERNOFSKY C, SWAN M: An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal Biochem* **53**: 452-458, 1973.
- BEZAIRE V, SPRIET LL, CAMPBELL S, SABET N, GERRITS M, BONEN A, HARPER ME: Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *FASEB J* **19**: 977-979, 2005.
- BIEMOND P, VAN EIJK H, SWAAK A, KOSTER J: Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *J Clin Invest* **73**: 1576-1579, 1984.

- BOLLI R, MARBAN E: Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* **79**: 609-634, 1999.
- BOUCEK RJ, SHELTON M, ARTMAN M, MUSHLIN PS, STARNES VA, OLSON RD: Comparative effect of verapamil, nifedipine and diltiazem on contractile function in the isolated immature and adult rabbit heart. *Pediatr Res* **18**: 948-954, 1984.
- BOUCHARD C, PERUSSE L, CHAGNON YC, WARDEN C, RICQUIER D: Linkage between markers in the vicinity of the uncoupling protein 2 gene and resting metabolic rate in humans. *Hum Mol Genet* **6**: 1887-1889, 1997.
- BOWSER DN, MINAMIKAWA T, NAGLEY P, WILLIAMS DA: Role of mitochondria in calcium regulation of spontaneously contracting cardiac muscle cells. *Biophys J* **75**: 2004-2014, 1998.
- BUSTAMANTE E, SOPER JW, PEDERSEN PL: A high-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria. *Anal Biochem* **80**: 401-408, 1977.
- CADENAS S, BUCKINGHAM JA, SAMEC S, SEYDOUX J, DIN N, DULLOO AG, BRAND MD: UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett* **462**: 257-260, 1999.
- CLARKE SJ, McSTAY GP, HALESTRAP AP: Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* **277**: 34793-34799, 2002.
- CROMPTON M: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341**: 233-249, 1999.
- DENTON RM, MCCORMACK JG: On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Lett* **119**: 1-8, 1980.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE: Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. *Z Klin Chem Klin Biochem* **10**: 182-193, 1972.
- DI LISA F, BERNARDI P: Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. *Cardiovasc Res* **66**: 222-232, 2006.

- DI LISA F, MENABO R, CANTON M, BARILE M, BERNARDI P: Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* **276**: 2571-2575, 2001.
- DÖRNER A, SCHULTHEISS HP: The myocardial expression of the adenine nucleotide translocator isoforms is specifically altered in dilated cardiomyopathy. *Herz* **25**: 176-180, 2000.
- DOWELL RT, FU MC: Heterogeneous cellular expression of creatine kinase isoenzyme during normal rat heart development. *Mol Cell Biochem* **178**: 87-94, 1998.
- DUCHEN MR, BISCOE TJ: Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. *J Physiol* **450**: 13-31, 1992.
- DUCHEN MR: Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol* **516**: 1-17, 1999.
- ECHTAY KS, WINKLER E, FRISCHMUTH K, KLINGENBERG M: Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H⁽⁺⁾ transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1416-1421, 2001.
- ENERBACK S, JACOBSSON A, SIMPSON EM, GUERRA C, YAMASHITA H, HARPER ME, KOZAK LP: Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* **387**: 90-94, 1997.
- ERLANSON-ALBERTSSON C: The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand* **178**: 405-412, 2003.
- FABIATO A: Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* **245**: C1-C14, 1983.
- FANNIN SW, LESNEFSKY EJ, SLABE TJ, HASSAN MO, HOPPEL CL: Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **372**: 399-407, 1999.
- FAZEKAS JF, ALEANDER FAD, HIMWICH HE: Tolerance of the newborn to anoxia. *Am J Physiol* **134**: 281-285, 1941.

- FITZPATRICK CM, SHI Y, HUTCHINS WC, SU J, GROSS GJ, OŠTÁDAL B, TWEDDELL JS, BAKER JE: Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and KATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H62-68, 2005.
- FLISS H, GATTINGER D: Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* **79**: 949-956, 1996.
- FORBES RA, STEENBERGEN C, MURPHY E: Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* **88**: 802-809, 2001.
- GARLID KD: Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol* **95**: 275-279, 2000.
- GRAY MW, BURGER G, LANG BF: Mitochondrial evolution. *Science* **283**: 1476-1481, 1999.
- GREEN DR, REED JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312, 1998.
- GUNTER TE, YULE DI, GUNTER KK, ELISEEV RA, SALTER JD: Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* **567**: 96-102, 2004.
- HALESTRAP AP, CLARKE SJ, JAVADOV SA: Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**: 372-385, 2004.
- HILDEBRANDT AL, NEUFER PD: Exercise attenuates the fasting-induced transcriptional activation of metabolic genes in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**: E1078-1086, 2000.
- HIMMS-HAGEN J, HARPER ME: Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**: 78-84, 2001.
- HODNÝ Z, KOLÁŘOVÁ P, ROSSMEISL M, HORÁKOVÁ M, NIBBELINK M, PENICAUD L, CASTEILLA L, KOPECKÝ J: High expression of uncoupling protein 2 in foetal liver. *FEBS Lett* **425**: 185-190, 1998.

- HOERTER J: Change in the sensitivity to hypoxia and glucose deprivation in the isolated perfused rabbit heart during perinatal development. *Pflügers Arch* **363**: 1-6, 1976.
- HOHL CM: Effect of respiratory inhibition and ischemia on nucleotide metabolism in newborn swine cardiac myocyte. In: *The developing heart*, Ošťádal B, Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). Philadelphia, PA, Lippincott, 393-405, 1997.
- HOLMUHAMEDOV EL, WANG L, TERZIC A: ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol* **519**: 347-360, 1999.
- HOPPEL CL, TANDLER B, PARLAND W, TURKALY JS, ALBERS LD: Hamster cardiomyopathy. A defect in oxidative phosphorylation in the cardiac interfibrillar mitochondria. *J Biol Chem* **257**: 1540-1548, 1982.
- CHIU R, BINDON W: Why are newborn hearts vulnerable to ischemia? *Circulation* **76**: 146-149, 1987.
- CHVOJKOVÁ Z, OŠŤÁDALOVÁ I, OŠŤÁDAL B: Odolnost nezralého srdečního svalu k nedostatku kyslíku. *Cesk Fysiol* **55**: 4-13, 2006.
- IOSSA S, LIONETTI L, MOLLIKA MP, CRESCENZO R, BOTTA M, SAMEC S, DULLOO AG, LIVERINI G: Differences in proton leak kinetics, but not in UCP3 protein content, in subsarcolemmal and intermyofibrillar skeletal muscle mitochondria from fed and fasted rats. *FEBS Lett* **505**: 53-56, 2001.
- ISHIDE N, URAYAMA T, INOUE K, KOMARU T, TAKISHIMA T: Propagation and collision characteristics of calcium waves in rat myocytes. *Am J Physiol* **259**: H940-950, 1990.
- JABŮREK M, VARECHA M, GIMENO RE, DEMBSKI M, JEŽEK P, ZHANG M, BURN P, TARTAGLIA LA, GARLID KD: Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem* **274**: 26003-26007, 1999.
- JACOBSON EL, JACOBSON MK: Pyridine nucleotide levels as a function of growth in normal and transformed 3T3 cells. *Arch Biochem Biophys* **175**: 627-634, 1976.

- JARMAKANI JM, NAGAMOTO T, NAKAZAWA M, LANGER GA: Effect of hypoxia on myocardial high-energy phosphates in the neonatal mammalian heart. *Am J Physiol* **235**: H475-481, 1978b.
- JARMAKANI JM, NAGAMOTO T, NAKAZAWA M, LANGER GA: Effect of hypoxia on mechanical function in the neonatal mammalian heart. *Am J Physiol* **235**: H469-474, 1978a.
- JARMAKANI JM, NAKANISHI T, GEORGE BL, BERS D: Effect of extracellular calcium on myocardial mechanical function in the neonatal rabbit. *Dev Pharmacol Ther* **5**: 1-13, 1982.
- JARMAKANI JM, NAKANISHI T, JARMAKANI RN: Effect of hypoxia on calcium exchange in neonatal mammalian myocardium. *Am J Physiol* **237**: H612-619, 1979.
- JEFFREY FM, DICZKU V, SHERRY AD, MALLOY CR: Substrate selection in the isolated working rat heart: effects of reperfusion, afterload, and concentration. *Basic Res Cardiol* **90**: 388-396, 1995.
- JENNINGS R, REIMER K, STEENBERGEN C: Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **23**: 1383-1395, 1991.
- JEŽEK P, ŽÁČKOVÁ M, RŮŽIČKA M, ŠKOBISOVÁ E, JABŮREK M: Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies. *Physiol Res* **53 Suppl 1**: S199-211, 2004.
- JULIA P, KORFSKY ER, BUCKBERG GD, YOUNG HH, BUGYI HI: Studies of myocardial protection in the immature heart. I. Enhanced tolerance of immature versus adult myocardium to global ischemia with reference to metabolic differences. *J Thorac Cardiovasc Surg* **100**: 879-887, 1990.
- JULIA P, YOUNG PP, BUCKBERG GD, KORFSKY ER, BUGYI HI: Studies of myocardial protection in the immature heart. II. Evidence for importance of amino acid metabolism in tolerance to ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* **100**: 888-895, 1990.
- KOLÁŘ F, OŠŤÁDAL B, PAPOUŠEK F: Effect of verapamil on contractile function of the isolated perfused heart. *Basic Res Cardiol* **85**: 429-434, 1990.

- KOLÁŘ F, OŠTÁDAL B: Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* **53 Suppl 1**: S3-13, 2004.
- KOLÁŘ F, OŠTÁDALOVÁ I, OŠTÁDAL B, NECKÁŘ J, SZÁRSZOI O. Role of mitochondrial KATP channels in improved ischemic tolerance of chronically hypoxic adult and immature hearts. In: Dhalla NS et al. Ed. *Signal Transduction and Cardiac Hypertrophy*, Boston, Kluwer Academic Publishers, 69-83, 2002.
- KORSHUNOV SS, KORKINA OV, RUUGE EK, SKULACHEV VP, STARKOV AA: Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂⁻ and H₂O₂ by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett* **435**: 215-218, 1998.
- LEGATO MJ: Cellular mechanisms of normal growth in the mammalian heart. I. Qualitative and quantitative features of ventricular architecture in the dog from birth to five months of age. *Circ Res* **44**: 250-262, 1979.
- LEVY SE, CHEN YS, GRAHAM BH, WALLACE DC: Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes. *Gene* **254**: 57-66, 2000.
- LI Y, JOHNSON N, CAPANO M, EDWARDS M, CROMPTON M: Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochem J* **383**: 101-109, 2004.
- LITCHFIELD JB: Blood pressure in infant rats. *Physiol Zool* **31**: 1-6, 1958.
- LOPASCHUK GD, COLLINS-NAKAI RL, ITOI T: Developmental changes in energy substrate use by the heart. *Cardiovasc Res* **26**: 1172-1180, 1992.
- LOPEZ JR, JOVANOVIĆ A, TERZIC A: Spontaneous calcium waves without contraction in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **214**: 781-787, 1995.
- MEDVEDEV AV, SNEDDEN SK, RAIMBAULT S, RICQUIER D, COLLINS S: Transcriptional regulation of the mouse uncoupling protein-2 gene. Double E-box motif is required for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent activation. *J Biol Chem* **276**: 10817-10823, 2001.
- MITCHELL P, MOYLE J: Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* **213**: 137-139, 1967.

- MITCHELL P: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148, 1961.
- MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**: 1124-1136, 1986.
- NAKAGAWA T, SHIMIZU S, WATANABE T, YAMAGUCHI O, OTSU K, YAMAGATA H, INOHARA H, KUBO T, TSUJIMOTO Y: Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**: 652-658, 2005.
- NAKANISHI T, NISHIOKA K, JARMAKANI RN: Mechanism of tissue Ca²⁺ gain during reoxygenation after hypoxia in rabbit myocardium. *Am J Physiol* **242**: H437-449, 1982.
- NECKÁŘ J, SZÁRSZOI O, KOTEN L, PAPOUŠEK F, OŠŤÁDAL B, GROVER GJ, KOLÁŘ F: Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* **55**: 567-575, 2002.
- NEDERGAARD J, CANNON B: Overview-preparation and properties of mitochondria from different sources. In: *Methods in Enzymology*, Fleischer S, Packer L (eds). New York, Academic Press, 1-17, 1979.
- NICHOLLS DG, FERGUSON SJ: *Bioenergetics 2*. London, Academic Press, 255 s, 1992.
- NICHOLLS DG, LOCKE RM: Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* **64**: 1-64, 1984.
- NIJJAR MS, DHALLA NS: Biochemical basis of calcium handling in developing myocardium. In: *The developing heart*, Ošťádal B, Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). Philadelphia, PA, Lippincott, 189-217, 1997.
- NISHINO I, KOBAYASHI O, GOTO Y, KURIHARA M, KUMAGAI K, FUJITA T, HASHIMOTO K, HORAI S, NONAKA I: A new congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities. *Muscle Nerve* **21**: 40-47, 1998.
- OLDENBURG O, COHEN MV, YELLON DM, DOWNEY JM: Mitochondrial K(ATP) channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc Res* **55**: 429-437, 2002.

- OLIVETTI G, ANVERSA P, LOUD AV: Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. *Circ Res* **46**: 503-512, 1980.
- OŠŤÁDAL B, BEAMISH RE, BARWINSKI J, DHALLA NS: Ontogenetic development of cardiac sensitivity to catecholamines. *J Appl Cardiol* **4**: 467-486, 1989.
- OŠŤÁDAL B, KOLÁŘ F: Cardiac Ischemia: From Injury to Protection. London, Kluwer Academic Publishers, 173 s, 1999.
- OŠŤÁDAL B, OŠŤÁDALOVÁ I, DHALLA NS: Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev* **79**: 635-659, 1999.
- OŠŤÁDAL B, PROCHÁZKA J, JANATOVÁ T, PELOUCH V, KRAUSE EG: Developmental aspect of cardiac resistance to hypoxia. *Ber Humboldt Univ Berlin* **24**: 52-58, 1982.
- OŠŤÁDAL B, SCHIEBLER TH: [The development of the capillaries in the rat heart. An electron microscopic study.]. *Z Anat Entwicklungsgesch* **133**: 288-304, 1971.
- OŠŤÁDALOVÁ I, OŠŤÁDAL B, JARKOVSKÁ D, KOLÁŘ F: Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatr Res* **52**: 561-567, 2002.
- OŠŤÁDALOVÁ I, OŠŤÁDAL B, KOLÁŘ F, PARRAT JR, WILSON S: Tolerance to ischemia and ischaemic preconditioning in neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **30**: 857-865, 1998.
- PALMER JW, TANDLER B, HOPPEL CL: Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* **252**: 8731-8739, 1977.
- PALMER JW, TANDLER B, HOPPEL CL: Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol* **250**: H741-748, 1986.
- PECQUEUR C, ALVES-GUERRA MC, GELLY C, LEVI-MEYRUEIS C, COUPLAN E, COLLINS S, RICQUIER D, BOUILLAUD F, MIROUX B: Uncoupling protein 2: in vivo distribution, induction upon oxidative stress and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* **276**: 8705-8712, 2001.

- PETIT PX, O'CONNOR JE, GRUNWALD D, BROWN SC: Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. *Eur J Biochem* **194**: 389-397, 1990.
- PIPER HM, SEZER O, SCHLEYER M, SCHWARTZ P, HUTTER JF, SPIECKERMANN PG: Development of ischemia-induced damage in defined mitochondrial subpopulations. *J Mol Cell Cardiol* **17**: 885-896, 1985.
- PORTER KR, BONNEVILLE MA: Fine Structure of Cells and Tissues. Philadelphia, Lea & Febiger, 204 s, 1973.
- PORTILLO MP, SERRA F, SIMON E, DEL BARRIO AS, PALOU A: Energy restriction with high-fat diet enriched with coconut oil gives higher UCP1 and lower white fat in rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* **22**: 974-979, 1998.
- PORTMAN MA, CHEN SH, XIAO Y, NING XH: Maturation changes in gene expression for adenine nucleotide translocator isoforms and betaF1-ATPase in rabbit heart. *Mol Genet Metab* **66**: 75-79, 1999.
- PRALONG WF, HUNYADY L, VARNAI P, WOLLHEIM CB, SPAT A: Pyridine nucleotide redox state parallels production of aldosterone in potassium-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 132-136, 1992.
- QUANTZ M, TCHERVENKOV C, AND CHIU R C-J: Unique responses of immature hearts to ischemia. Functional recovery versus initiation of contracture. *J Thorac Cardiovasc Surg* **103**: 927-935, 1992.
- RADI R, TURRENS JF, CHANG LY, BUSH KM, CRAPO JD, FREEMAN BA: Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* **266**: 22028-22034, 1991.
- RICQUIER D, BOUILLAUD F: The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* **345**: 161-179, 2000.
- RIPPE C, BERGER K, BOIERS C, RICQUIER D, ERLANSON-ALBERTSSON C: Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E293-300, 2000.

- RIVA A, HEARSE DJ: Age-dependent changes in myocardial susceptibility to ischemic injury. *Cardioscience* **4**: 85-92, 1993.
- RIVA A, HEARSE DJ: Isolated, perfused neonatal rat heart preparation for studies of calcium and functional stability. *Ann Thorac Surg* **52**: 987-992, 1991a.
- RIVA E, HEARSE DJ: The Developing Myocardium. Mount Kisco, NY, Futura, 134 s, 1991b.
- ROSSMEISL M, BARBATELLI G, FLACHS P, BRAUNER P, ZINGARETTI MC, MARELLI M, JANOVSKÁ P, HORÁKOVÁ M, SYROVÝ I, CINTI S, KOPECKÝ J: Expression of the uncoupling protein 1 from the α 2 gene promoter stimulates mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo. *Eur J Biochem* **269**: 19-28, 2002.
- ROUSSEL D, CHAINIER F, ROUANET J, BARRÉ H: Increase in the adenine nucleotide translocase content of duckling subsarcolemmal mitochondria during cold acclimation. *FEBS Lett* **477**: 141-144, 2000.
- SIMONYAN RA, SKULACHEV VP: Thermoregulatory uncoupling in heart muscle mitochondria: involvement of the ATP/ADP antiporter and uncoupling protein. *FEBS Lett* **436**: 81-84, 1998.
- SKULACHEV VP: Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med* **20**: 139-184, 1999.
- SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85, 1985.
- SOLARO RJ, LEE JA, KENTISH JC, ALLEN DG: Effect of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. *Circ Res* **63**: 779-787, 1988.
- SOUTHWORTH R, SHATTOCK MJ, KELLY FJ: Age-related difference in the cardiac response to ischemia and free radical production on reperfusion. In: The developing heart, Ošťádal B, Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). Philadelphia, PA, Lippincott, 427-441, 1997.

- STUCKI JW: The optimal efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation. *Eur J Biochem* **109**: 269-283, 1980.
- SU JY, FRIEDMAN WF: Comparison of the responses of fetal and adult cardiac muscle to hypoxia. *Am J Physiol* **224**: 1249-1253, 1973.
- ŠKÁRKA L, OŠŤÁDAL B: Mitochondrial membrane potential in cardiac myocytes. *Physiol Res* **51**: 425-434, 2002.
- ŠKOVŘÁNEK J, OŠŤÁDAL B, PELOUCH V, PROCHÁZKA J: Ontogenetic differences in cardiac sensitivity to verapamil in rats. *Pediatr Cardiol* **7**: 25-29, 1986.
- TANAKA H, SHIGENOBU K: Effect of ryanodine on neonatal and adult rat heart: developmental increase in sarcoplasmic reticulum function. *J Mol Cell Cardiol* **21**: 1305-1313, 1989.
- TROJAN S: Adaptation of the central nervous system to oxygen deficiency during ontogenesis. *Acta Univ Carol Med Monograph* **85**: 5, 1978.
- TROLLINGER DR, CASCIO WE, LEMASTERS JJ: Selective loading of Rhod 2 into mitochondria shows mitochondrial Ca²⁺ transients during the contractile cycle in adult rabbit cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **236**: 738-742, 1997.
- VAN DER VUSSE GJ, DE GROOT MJ: Interrelationship between lactate and cardiac fatty acid metabolism. *Mol Cell Biochem* **116**: 11-17, 1992.
- VANDEN HOEK T, SHAO Z, LI C, SCHUMACKER P, BECKER L: Myocardial electron transport can be a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **29**: 2441-2450, 1997.
- VEERKAMP JH, GLATZ JFC, WAGENMAKERS AJM: Metabolic changes during cardiac maturation. *Basic Res Cardiol* **80 Suppl.**: S111-114, 1985..
- VEERKAMP JH, VAN MOERKERK HT: Effect of various agents and conditions on palmitate oxidation by homogenates of rat liver and rat and human skeletal muscle. *Int J Biochem* **17**: 1163-1169, 1985.

- VON HARSDORF R, LI PF, DIETZ R: Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* **99**: 2934-2941, 1999.
- VORNANEN M: Postnatal changes in cardiac calcium regulation. In: The developing heart, Ošťádal B, Nagano M, Takeda N, Dhalla NS (eds). Philadelphia, PA, Lippincott, 219-229, 1997.
- WARSHAW, JB: Cellular energy metabolism during fetal development. II. Fatty acid oxidation by the developing heart. *J Cell Biol* **44**: 354-360, 1970.
- WARSHAW, JB: Cellular energy metabolism during fetal development. *Dev Biol* **28**: 357-544, 1972.
- WEISS JN, KORGE P, HONDA HM, PING P: Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* **93**: 292-301, 2003.
- WELLS RJ, FRIEDMAN WF, SOBEL BE: Increased oxidative metabolism in the fetal and newborn lamb heart. *Am J Physiol* **222**: 1488-1493, 1972.
- WHITE RJ: A „radical“ idea comes of age: mitochondrial oxidant signaling in health and disease. *J Mol Cell Cardiol* **37**: 1115-1117, 2004.
- WIBO M, BRAVO G, GODFRAIND T: Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors. *Circ Res* **68**: 662-673, 1991.
- WITTNICH C, PENISTON C, IANUZZI D, ABEL JG, SALERNO TA: Relative vulnerability of neonatal and adult hearts to ischemic injury. *Circulation* **76**: 156-160, 1987.
- YANO Y, BRAIMBRIDGE MV, HEARSE DJ: Protection of the pediatric myocardium: differential susceptibility to ischemic injury of the neonatal rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* **94**: 887-896, 1987.
- YOUNG HH, SHIMIZU T, NISHIOKA K, NAKANISHI T, JARMAKANI JM: Effect of hypoxia and reoxygenation on mitochondrial function in neonatal myocardium. *Am J Physiol* **245**: H998-1006, 1983.

- YU XX, MAO W, ZHONG A, SCHOW P, BRUSH J, SHERWOOD SW, ADAMS SH, PAN G: Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *FASEB J* **14**: 1611-1618, 2000.
- ZAMZAMI N, KROEMER G: The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 67-71, 2001.
- ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M, HIRSCH T, SUSIN SA, MASSE B, KROEMER G: Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* **384**: 53-57, 1996.
- ZHOU M, LIN BZ, COUGHLIN S, VALLEGA G, PILCH PF: UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E622-629, 2000.
- ZICHA J, KUNEŠ J, JELÍNEK J: Experimental hypertension in young and adult animals. *Hypertension* **8**: 1096-1104, 1986.