

#### 4. METODY

Izolace a permeabilizace svalových vláken

Izolace myofibril

Měření spotřeby kyslíku

Spojené enzymatické analýzy pro stanovení: ATP, ADP, PCr, kreatin, laktát,  
pyruvát a specifické CK aktivity

Stanovení obsahu proteinů a anorganického fosfátu

Specifické fluorescenční značení CK molekuly

Elektroforetické dělení proteinů (SDS-PAGE)

Detekce proteinů stříbrem a CBB

Konfokální mikroskopie

Elektronová mikroskopie

FLIP metoda pro detekci pohybu fluorescenčně značených molekul

#### 5. SOUHRN VÝSLEDKŮ

Výsledky disertační práce jsou obsaženy ve čtyřech následujících článcích, které jsou publikovány nebo přijaty k publikaci v odborných časopisech s IF.

##### **(1) Levels of energy-related metabolites in intact and isolated perfused-superfused rat skeletal muscles. (Štefl et al. 1994)**

Práce zavedla metody měření metabolitů PCr/CK systému a kvantifikovala energetický stav kosterního svalu potkana: i) izolovaného pomocí metody „freeze clamping“ ii) po vaskulární izolaci iii) po regeneraci, současně perfundovaného a superfundového médiem. Hladina makroergních fosfátů v anoxii i po perfuzi poklesla, avšak kreatinový náboj  $[PCr]/([PCr]+[Cr])$  dosáhl stejné hodnoty u perfundovaného-superfundovaného svalu vzhledem ke kontrole („freeze clamped“). Konstantní kreatinový náboj indikuje zachování rovnovážného energetického stavu u izolovaného perfundovaného-superfundového m. gracilis.

(2). Creatine kinase reaction in skinned rat psoas muscle fibres and their myofibrils. (Gregor et al. 1999).

Práce shrnuje experimentální data měření kreatinkinasové aktivity v různých připravených permeabilizovaných svalových vláknech (obr. 1) a izolovaných myofibrilách. Stanovování enzymatické aktivity v myofibrilární frakci bylo zaměřeno na fenomén přímého přenosu ATP mezi myofibrilární kreatinkinásou a myosinovou ATPasou, ke kvantitativnímu posouzení úniku ATP jako produktu kreatinkinasové reakce. Výsledky představují výchozí bod pro další studium PCr/CK systému a funkce kreatinkinasy na molekulární a biochemické úrovni v integritě svalového vlákna, respektive myofibrily.

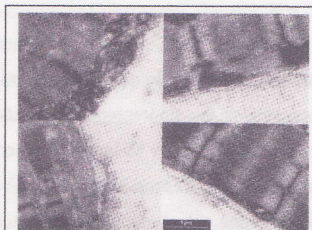
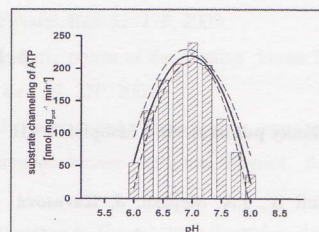


Fig.1 Snímek (TEM) permeabilizovaných vláken z m. psoas připravených různými metodami: vlevo nahoře - bezvápníkové medium, horní pravý roh - saponin, dolní levý roh - triton TX100 a intaktní vlákno v levém dolním rohu jako kontrola.

(3). Substrate channelling in a creatine kinase system of rat skeletal muscle under various pH. (Gregor et al. 2002)

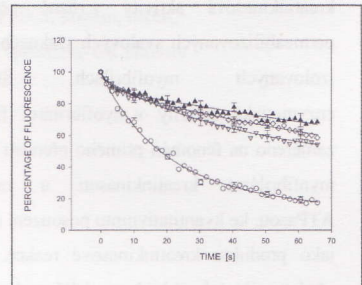
Hodnoty kreatinkinasové aktivity v myofibrilární frakci určují míru přímého přenosu ATP mezi CK vázanou v M-linii sarkomery a myosinovou ATPasou, publikované v prvním článku (Gregor et al. 1999). Stanovení závislosti rozsahu "substrate channelling" ATP na pH (obr. 2) ukazuje na možnost regulace podílu přímo přenášených substrátů *in vivo* tak, aby v buňce byla optimalizována distribuce energie do míst s největšími energetickými nároky.



Obr.2 Závislost substrate channellingu na pH je popsána kvadratickou funkcí (plná linie) s maximem v hodnotě pH 6,95. Přerušované line zobrazují interval ve kterém leží 95% hodnot.(Gregor et al. 2003)

(4) **Creatine kinase binds more firmly to the A-band of rabbit skeletal muscle myofibrils in the presence of its substrates.** (Žurmanová et al. 2007)

Čtvrtá část projektu se soustředila na interakci CK s izolovanými myofibrilami. Byla potvrzena vazba fluorescenčně značené CK v A-pruhu (dle lit. údajů v M-linii) sarkomery. Použitím konfokální mikroskopie s metodou FLIP byla zjištěna silná pH závislost, která je v interpretační shodě s výsledky přímého přenosu metabolitů mezi CK a myosinovu ATPasou (Gregor et al. 2002). Současně bylo prokázáno, že přítomnost CK substrátů posiluje vazbu CK v M-linii myofibrily (obr.3). Tato silná vazba je nezbytná k plnění strukturální funkce CK v M-linii sarkomery a velmi pravděpodobně i k realizaci přednostního metabolického toku mezi CK a ATPasou, tedy k řízení CK reakce v tomto kompartmentu.



**Obr. 3** Pokles intenzity fluorescence v M-linii sarkomery, který odpovídá výměně molekul CK-IAF v čase, měřený metodou FLIP. (●) a (○) reprezentují pokles int. fluorescence CK-IAF molekul s navázanými substráty, který se neliší od kontroly (neuvezeno) ( $P < 0,05$ ). (□) reprezentují pokles int. fluorescence CK bez substrátů, který se liší od CK-IAF se substráty ( $P < 0,05$ ). Uvedené hodnoty jsou průměry  $\pm$  S.E.M. ( $n=6$ )

## 6. PUBLIKACE

### Články publikované v časopisech s IF

- Šteřt B., J.A. Mejsnar, **J. Karasová**: Levels of energy-related metabolites in intact and isolated perfused-superfused rat skeletal muscles. *Physiol. Res.* 43: 175-180, 1994.
- Gregor M., J. Mejsnar, A. Janovská, **J. Žurmanová**, O. Benada, B.Mejsnarová: Creatine kinase reaction in skinned rat psoas muscle fibres and their myofibrils. *Physiol. Res.* 48: 27-35, 1999.