

TALLINNA ÜLIKOOL

Loodus- ja Tervisteaduste Instituut

Molekulaarne Biokeemia ja Ökoloogia õppekava

Aivar Uus

ENERGIAÜLEKANDE VÕRGUSTIKU PROFIILI
ARENGULISED JA VANANEMISEGA SEOTUD
MUUTUSED KARDIOMÜOTSÜÜTIDES

Magistritöö

Juhendaja: Tepp, Kersti, PhD

Tammoja, Kairi, MSc

Tallinn 2016

Autorideklaratsioon

Mina, Aivar Uus, kinnitan, et olen käesoleva lõputöö teinud iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmiseks esitatud. Kõigi teiste autorite uurimistööde ja mujalt pärinevate andmete kasutamisel on allikale viidatud. Annan Tallinna Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) oma lõputöö säilitamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Ülikooli Akadeemilise Raamatukogu repositooriumis. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Töö autor: _____

Kuupäev, allkiri

Kaitsmisele lubatud

Peajuhendaja: _____

Kuupäev

nimi

allkiri

Kaasjuhendaja: _____

Kuupäev

nimi

allkiri

Õppekava juht: _____

Kuupäev

nimi

allkiri

Käesolev bakalaureusetöö/magistritöö on koostatud osana TLÜ LTI õppetööst. Selle hindamine positiivse hindegaga ei tähenda, et LTI vastutab töös kasutatud meetodite, saadud tulemuste ja tehtud järelduste eest.

Lühikokkuvõte

Aivar Uus, „Energiaülekanne võrgustiku profiili arengulised ja vananemisega seotud muutused kardiomüotsüütides.“

Töö eesmärgiks on määrata südamerakkude energiaülekanne võrgustike profiili muutus postnataalsest perioodist kuni vananemiseni. Selleks mõõdeti erineva vanuserühma rottide südamekoe lüsaadist kreatiinkinaasi (CK), adenülaatkinaasi (AK) ja heksokinaasi (HK) aktiivsused ning südamerakkudest hingamise kineetika parameetreid: näiline Michaelis-Menteni konstant eksogeense ADP suhtes ning kreatiini (Cr), adenosiinmonofosfaadi (AMP) ja glükoosi aktivatsiooni koefitsient.

Sünnijärgsed muutused avaldusid CK ja AK aktiivsuste suurenemises. AK aktiivsus saavutab täiskasvanuga võrdse taseme juba ühe kuu vanusel rotil. CK aktiivsus jätkab kasvamist, kuni saavutab kolme kuu vanuselt täiskasvanu taseme. Vananemise käigus väheneb ühe aastasel (keskealisel) rotil kõige olulisemal määral CK süsteemi töö, mis väljendub nii vähenenud CK aktiivsuses kui Cr aktivatsioonis. AK aktiivsus vananedes ei vähene ja AMP aktivatsiooni langus on vaid 20%, mis oluliselt väiksem kui muutus Cr aktivatsioonis. Glükoosi aktivatsioon suureneb vananedes oluliselt, jõudes kahe aastasel rotil 9%-ni. Vananedes omandavad AK ja glükolüütiline süsteem kompensatoorse rolli. Saadud tulemusi saab kasutada südamelihase energiadefitsiidiga seotud patoloogiate varase diagnoosi markerite väljatöötamiseks.

Märksõnad: bioenergeetika, energeetiline ühik, kardiomüotsüüt, areng, vananemine, mitokonder, oksüdatiivne fosforüülimine

SISUKORD

Lühikokkuvõte	3
SISUKORD	4
Lühendid.....	5
Sissejuhatus	7
1. Teoreetiline ülevaade	9
1.1. Energiametabolism.....	9
1.1.1 Glükoosi ja lipiidide katabolism tsütosoolis	10
1.1.2. Püruvaadi ja lipiidide katabolism mitokondris.....	12
1.1.3. Elektronkandjad	13
1.1.4. Oksüdatiivne fosforüülimine mitokondri sisemembraanil	15
1.2. Südame ja kardiomüotsüütide kirjeldus	18
1.2.1. Südame anatoomia, põhifunktsioon	18
1.2.2. Kardiomüotsüüdid.....	19
1.3. Rakusisene energeetiline ühik	22
1.3.1. Energiaülekanne võrgustik kardiomüotsüüdis	23
1.3.2. Mitokondriaalne interaktosoom	25
1.4. Kardiomüotsüütide areng	28
1.5. Patoloogilised ja vananemisega seotud muutused.	31
2. Materjal ja metoodika.....	34
2.1. Proovimaterjali ettevalmistus	34
2.2. Ensüümaktiivsuse määramine	35
2.4. Valgu kontsentratsiooni määramine	38
3. Tulemused	39
4. Arutelu.....	45
Kokkuvõte	49
Summary	51
Allikate loetelu	52

Lühendid

ADP – adenosindifosfaat

ACC - atsetüül-CoA karboksülaas

AK – adenülaatkinaas

AMP – adenosinmonofosfaat

AMPK – AMP kinaas

ANT – adeniinnukleotiidtranslokaas

Ap5a – P1,P5-Di(adenosiin-5') pentafosfaat

ATP – adenosintrifosfaat

BCA – bikinkoniinhape

CK – kreatiinkinaas

CoA – koensüüm A

Cr – kreatiin

Cyt C – tsütokroom C

DTT – dithiotreitol

EGTA – etüleenglükooltetraatseethape

EÜ – energeetiline ühik

FAD – flaviin adeniin dinukleotiid

FAT – rasvhappe translokaas

G6PDH – glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaas

GLUT – glükoosi transporter

HK – heksokinaas

MI – mitokondriaalne interaktosoom

MP - membraanipotentsiaal

mtCK – mitokondriaalne kreatiinkinaasi isovorm

NAD – nikotiinamiid adeniin dinkunleotiid

OxPhos – oksüdatiivne fosforüülimine

PCr – fosfokreatiin

PEP – fosfoenoolpüruvaat

PGA - fosfoglütseraat

PGAL – fosfoglütseraldehüüd

PiC –fosfaadi kandja

PK – püruvaatkinaas

ROS – reaktiivsed hapnikumolekulid

SR – sarkoplasmaatiline võrgustik

VDAC – pingest sõltuv anioonkanal

Sissejuhatus

Bioenergeetikas on üheks paremaks mudeliks südamelihase rakud, kuna nende energiavajadus on pidev ja varieerub samas suures ulatuses. Täiskasvanud kardiomüotsüüdid kasutavad oma energiavajaduse rahuldamiseks 90% ulatuses mitokondriaalset oksüdatiivset fosforüülimist. Lõplikult on lahendamata ka küsimus, kuidas metaboolse homeostaasi tingimustes (Balaban et al., 2002) toimub mitokondri töö reguleerimine vastavalt energiavajaduse muutumisele ning mil viisil tagatakse efektiivne energia ülekanne mitokondritest ATPaasideni raku erinevatel arenguetappidel.

Selle küsimuse lahendamise üheks võimaluseks on uurida südamerakke sünnijärgse arengu käigus perioodil, kus toimub prenataalse, valdavalt glükolüüsil põhineva energiametabolismi ümberlülitumine oksüdatiivsele fosforüülimisele. Samuti annavad olulist informatsiooni vananemise käigus toimuvad muutused, võimaldades kaardistada, millised süsteemid täiskasvanud südameraku efektiivsest energia ülekandevõrgustikus degenerereeruvad esmajärjekorras ning millised on võimalikud kompensatoorsed asendused. Antud uuring annab võimaluse aru saada ka patoloogiliste muutuste, nagu infarkt ja isheemiline kahjustus, etioloogiast.

Kasutades süsteemibioloogilist lähenemist on täiskasvanud kardiomüotsüüdi mudeli baasil loodud energeetilise ühiku kontseptsioon mis väidab, et mitokondrid koos teiste rakukomponentidega moodustavad ühtse struktuurse ja funktsionaalse terviku. Arengu käigus paigutuvad eraldiseisvad mitokondrid ATPaaside lähedusse, moodustades korrapärase mustri ja tekib ka spetsiifiline energia ülekandevõrgustik. On näidatud, et kardiomüotsüütides toimub fosforüülrühma ülekanne valdavalt üle kreatiinkinaasi (CK) süsteemi, millele olulisuselt teisena lisandub adenülaatkinaasi (AK) süsteem.

Töö eesmärk on analüüsida energia ülekandevõrgustike profiili muutust postnataalsest perioodist kuni vananemiseni. Selle täitmiseks mõõdetakse energiaülekanne vahendavate ensüümide aktiivsused ja antud ensüümi aktivatsiooniga seotud muutused hapniku tarbimise kiiruses.

Töös on kaks eksperimentaalset osa. Esiteks mõõdetakse kineetilise meetodiga CK, AK ja glükolüütilise süsteemi võtmeensüümide, vastavalt CK, AK ja heksokinaasi (HK) aktiivsust. Saamaks ülevaadet nii arengu kui vananemise kohta, analüüsitakse erinevates vanuserühmades (1 päev, 3 päeva, 7 päeva, 18 päeva, 30 päeva, täiskasvanu, 1 aasta, 1,5 aastat ja 2 aastat) Wistari liini rottide südamekoe lüsaati.

Teiseks mõõdetakse, kasutades kõrgresolutsiooni oksügraafiat, roti kardiomüotsüütide hingamise kineetika parameetreid, mis on otseselt seotud energiaülekande võrgustikuga. Kuna postnataalse arengu käigus on vastavad mõõtmised juba teostatud (Tiia Anmann et al., 2013), oli antud töö eesmärgiks vaadelda hingamisparameetreid keskealisuse ja vananemise mudelile vastavates rühmades (rotid vanuserühmades 1a, 1,5a ja 2a). Parameetritena määratakse näiline $K_m(\text{ADP})$, kreatiini (Cr), adenosinmonofosfoadi (AMP) ja glükoosi aktivatsiooni koefitsiendid.

1. Teoreetiline ülevaade

1.1. Energiametabolism

Organismis kasutatakse pemise energia vahendajana adenosintrifosfaati (ATP), mille fosfaatsideme lõhkumine annab energiat erinevateks protsessideks, mida võib laialt jaotada liikumiseks ja anabolismiks. Molekulaarne energia toodetakse katabolismi teel, kus energiarohkeid toitaineid nagu süsivesikuid ja lipiide lagundatakse. Teatud määral saadakse energiat ka aminohapete oksüdatsioonil, kuid need ei sobi peamiseks energiaallikaks. Esiteks on aminohapetel organismis muud, olulisemad funktsioonid ja teiseks tekib nende metabolismi käigus tekib ammoniaak, mida keha on võimeline eemaldama vaid teatud piirides.

Ehkki glükolüüs võimaldab energiat toota ka anaeroobselt, on kõrgemates eukarüootides suurem valdav oksüdatiivne fosforüülimine (OxPhos). Aeroobne ainevahetus on efektiivsem, andes molekuli glükoosi kohta energeetilist kasumit kokku 30 ATP, samas kui anaeroobne glükolüüs annab puhaskasu vaid 2 ATP.

Aeroobne energiatootmine ehk OxPhos toimub mitokondrites. Mitokondrid on peaaegu kõigis rakkudes olevad kahe membraaniga organellid. Need on olulised paljudes raku funktsioonides nagu Ca signaalide vahendamine, raku kasv, reaktiivsete hapniku molekulide (ROS) tootmine, diferentseerumine, rakutsükel, apoptoos ja ka OxPhos. (Osellame et al., 2012; Valdur Saks et al., 2014) Mitokondrid on võimelised raku energiavajadusele adapteeruma: need võivad poolduda, pikemaks kasvada ja suurendada sisemembraani funktsionaalset pinda (Osellame et al., 2012; Enríquez, 2015). Nende välismembraan on selektiivse läbilaskvusega, ning selles asuvate kanalite läbitavus on omakorda reguleeritav raku tsütoskeleti valkude poolt (Anmann et al., 2013). Sisemembraan on enamusele ainetele, sealhulgas prootonitele läbimatu ja transport läbi mitokondri sisemembraani on rangelt reguleeritud. OxPhos süsteemi olulisemateks komponentideks loetakse elektronkandjad, hingamisahelat ja ATP süntaasi. OxPhos käigus toimub hingamisahela komplekside poolt mitokondri sisemembraanile tekitatud prootongradiendi kasutamine omakorda adenosindifosfaadi (ADP) fosforüülimiseks ehk ATP tootmiseks. (Enríquez, 2015)

Cr on inimese metabolismis oluline molekul, mis funktsioneerib rakus ATP taset säilitava puhvrina. See võib endaga siduda fosfaatrühma, muutudes fosfokreatiiniks (PCr). Taasakaalureaktsiooni $ATP + Cr \leftrightarrow ADP + PCr$ vahendab kreatiinkinaas (CK). (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000) Cr peamine roll on aidata ATPaaside lähedal lokaalselt ATP-d taastada. Puhkuse ajal kantakse ATP energiarohked fosfaatsidemed üle Cr-le, tootes energiarohke PCr reservi. Seda reservi saab pingutuse ajal kasutada ATP taastamiseks tarbimispaigas. (Rizzo, 2010) Häired ensüümides mis katalüüsivad kas Cr sünteesi või rakendamist on seotud erinevate raskete haigustega. PCr ja tsüklokreatiin on näiteks võimelised kaitsma kude isheemilise kahjustuse eest, lisaks on Cr analoogidel vähivastane toime. (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000)

1.1.1 Glükoosi ja lipiidide katabolism tsütosoolis

Nii glükoosi kui lipiidide rakku transportimine on rangelt reguleeritud. Glükoosi transport rakku sõltub seda vahendava glükoosi transporteri (GLUT) perekonna kandjavalgu hulgest membraanil. GLUT4 kandja hulka membraanil mõjutavad väliselt insuliin ja rakusiselt adenosiinmonofosfaadi (AMP) tasemest sõltuv AMP kinaasi (AMPK) aktiivsus. (Artner, 2002; Ishiki & Klip, 2005)

Tsütosoolis aktiveerivad glükolüüsi elektronkandja nikotiinamiid adeniin diunkleotiid (NAD) oksüdeeritud vormi ja ADP ülekaal (Ishiki & Klip, 2005). Tsütoplasmas glükoos aktiveeritakse ehk fosforüülitakse glükoos-6-fosfaadiks. Seda reaktsiooni viivad läbi heksokinaasi (HK) isoensüümid. Protsess kasutab ATP-d, kulutades seega energiat. (Rizzo, 2010) Produktina toodetud ADP ja glükoos-6-fosfaat inhibeervad HK isoensüüme, välja arvatud glükokinaas (Gerbitz et al., 1996). HK leidub nii vabalt tsütoplasmas kui seotuna mitokondri välismembraanil asuva pingest sõltuva anioonkanaliga (VDAC). HK kinnitumine mitokondrile seostub paljudel juhtudel patoloogiatega. See võib nii glükolüüsi kui OxPhos intensiivistada, andes HK-le regulatoorse rolli. Mitokondritele kinnitunud HK suunab ADP otse mitokondrisse, mille tagajärjel ei inhibeeri ADP kui produkt enam HK tööd, vaid suunatakse otse mitokondrisse. (Roosimaa et al., 2013)

Glükolüüsi teise, vahetult järgneva sammuna muudetakse glükoos-6-fosfaat fruktoos-6-fosfaadiks. Sellele järgnev samm kulutab teise ATP molekuli, katalüüsides fruktoos-6-fosfaadi fosforüülimist. Reaktsiooni tulemusena saadakse 6-süsinikuline suhkur kahe fosfaatrühmaga. See lüüsitakse kaheks fosfoglütseraldehüüd (PGAL) molekuliks, kus mõlemal on 3-süsinikuline põhiahel ja üks fosfaatrühm. Järgnevad glükolüüsi ATP-d tootvad sammud. Neljandas sammus oksüdeeritakse mõlemad PGAL-d, moodustades fosfoglütseraadi (PGA). Oksüdeerimise käigus kantakse elektronid elektronkandjale NADH, mis hakkab energiat tootma hingamisahela kaudu. Järgnevad reaktsioonid lüüsivad PGA püruvaadiks, tootes selle käigus ühe glükoosimolekuli kohta tsütosoolis 4 ATP. (Rizzo, 2010)

Püruvaadi edasine katabolism võib jätkuda kahte võimalikku rada mööda. Kui hingamisahela oksüdeerimisvõime on liiga madal ja NADH ei saa elektrone sinna loovutada, peab see teisiti oksüdeeruma. Glükolüüsi käigus tekkinud NADH kannab sel juhul elektronid üle püruvaadile, redutseerides selle piimhappeks. NAD⁺ taastub ning uute glükoosimolekulide lüüs saab jätkuda, samas kui piimhape transporditakse lihasest välja. (Rizzo, 2010) Teine võimalus on püruvaadi transport mitokondrisse, kus see toidab tsitraaditsükli. Püruvaat transporditakse maatriksisse püruvaadi kandja poolt. See on antiporter, mis toob mitokondrist vastu OH⁻. (Berg et al., 2012)

Ka rasvhapped sisenevad rakku rakupinnal asuvate rasvhappe transporterite kaudu. Üks tuntumaid kandjavalke on rasvhappe translokaas (FAT). (Lopaschuk et al., 2010) FAT võimaldab lipiidide transporti läbi membraani vaid siis, kui on rakupinnal. Seda transporditakse rakupinnale insuliini signaali peale. (Koonen et al., 2005) FAT ekspressioon on proportsionaalne lihase rasvhapete tarbimisega, nt südamelihases ekspresseerub rohkem kui skeetilihastes (Holloway et al., 2008).

Sissetoodud lipiidid aktiveeritakse. Selleks on vaja vaba ATP-d (vabaneb AMP + PPi) ja vaba koensüüm A-d (CoA). AMP tootmise kaudu inhibeerib lipiidide aktiveerimine glükolüüsi (tõstes AMPK aktiivsust). (Holloway et al., 2008) Rasvhapped seotakse CoA rühmaga, saades produktiks pika ahelaline atsüül-CoA. Atsüül-CoA võib kasutada kas anaboolseteks

reaktsioonideks või transportida mitokondrisse, kus see läbib β -oksüdatsiooni ja tsitraaditsükli. (Lopaschuk et al., 2010)

Kui süsivesikuid on palju ja rasvhappeid vähe, sünteesib rakk uusi rasvhappeid maksimaalselt. Selle protsessi võtmeensüüm on atsetüül-CoA karboksülaas (ACC). ACC toodab produktina malonüül CoA-d, mis on rasvhapete biosünteesi vaheühend, kuid lisaks inhibeerib tugevalt rasvhapete transporti mitokondrisse. ACC on mitmekülgsest reguleeritud: AMPK, glükagoon ja adrenaliin inhibeerivad, samas kui insuliin ja tsitraat aktiveerivad. Tsitraadi tase tõuseb, kui ATP ja CoA on suuremas koguses, viidates nii vabale energiale kui vabale süsinikule. (Berg et al., 2012)

Atsüül-CoA katabolism energiatootmiseks vajab ühendi transporti mitokondrisse. Kuna atsüülrühm ei läbimitokondri sisemembraani, transporditakse see mitokondrisse, kasutades kandjana karnitiini. Atsüülrühm kantakse üle karnitiinile. Pika ahelaga atsüülkarnitiin kantakse mitokondri maatriksisse karnitiini translokaasi kaudu, kusjuures samaaegselt transporditakse maatriksis atsüülrühma loovutanud karnitiin mitokondrist välja. Mitokondri sisemembraanil tõstetakse atsüülrühm koheselt ümber CoA-le, genereerides mitokondri maatriksisse atsüül-CoA ja vabastades karnitiini välja transpordiks. (Lopaschuk et al., 2010)

1.1.2. Püruvaadi ja lipiidide katabolism mitokondris

Lipiidide metabolismist pärit pika ahelaga atsüül-CoA läbib mitokondris kataboolse protsessi nimega β -oksüdatsioon. Iga tsükkel koosneb nelja ensüümi poolt läbi viidavast protsessist, mis teevad atsüülahela kahe süsiniku võrra lühemaks, genereerivad kahest eemaldate süsinikust atsetüül-CoA ja toodavad protsessi käigus nii NADH kui flaviin adeniin dinukleotiidi (FADH_2). Protsessi lõpuks on redutseeritud võrdses vahekorras elektronkandjaid ja toodetud mitu atsetüül-CoA molekuli. Täpne elektronkandjate redutseerimisvõimekus ja atsetüül-CoA hulk sõltub rasvhappe pikkusest. Protsessi produktina järgi jääv atsetüül-CoA siseneb edasi tsitraaditsükklisse. Protsess võib siiski rasvhapest sõltuvalt varieeruda. Kui lagundatakse küllastamata või paaritu hulga süsinikega rasvhapet, kaasatakse lisaensüüme. (Lopaschuk et al., 2010)

Tsitraaditsükkel toimub täielikult mitokondris. Selle käigus suurendatakse mitokondri võimet hingamisahelat redutseerida, tootes summaarselt neli NADH, üks FADH₂ ja toodetakse ka GTP. Esimene, tsüklit käivitav reaktsioon kasutab substraadiks atsetüül-CoA-d. Mitokondris asuv CoA atsetüleeritakse kahel erineval viisil. Esimene võimalus on lipiidide metabolismis atsetüülrühma vastuvõtmine ja β -oksüdatsiooni läbimine, andes otse kasutatava atsetüül-CoA. Teine võimalus on glükolüüsi produkti, püruvaadi kasutamine CoA atsetüleerimiseks. Seda reaktsiooni katalüüsib maatriksis asuv PDH (püruvaadi dehüdrogenaas) ja reaktsiooni käigus vabaneb esimene CO₂ ja toodetakse NADH. (Berg et al., 2012)

Tsitraaditsükli esimene samm on tsitraadi tootmine. Võtmeensüüm tsitraatsüntaas kannab atsetüül-CoA atsetüülrühma üle oksaloatsetaadile, tootes produktina 6-süsinikulist tsitraati. CoA vabaneb reaktsiooni käigus. Tsitraat muudetakse edasi isotsitraadiks. Selles sammus ei muutu süsinike arv ega ei toodeta energiat. Isotsitraat aga reageerib tsitraadi dehüdrogenaasiga, andes 5-süsinikulise alfa-ketoglutaraadi. Selle käigus saadakse nii vabanev CO₂ kui ka toodetakse NADH. Alfa-ketoglutaraat sarnaneb keemiliselt püruvaadile, olles alfa-ketohape. Sarnaselt püruvaadile oksüdeeritakse see dehüdrogenaasi poolt, tootes NADH, CO₂. Sarnaselt püruvaadile lisatakse seekord neljasüsinikne ahel CoA-le, saades produktiks suktsinüül-CoA. Suktsinüül-CoA rakendatakse GDP fosforüülimiseks, saades GTP-d ja produktiks suktsinaadi. Suktsinaati oksüdeerib hingamisahela II kompleks. See kannab kahe keskmise süsiniku elektronid FADH₂ vahendusel hingamisahelasse, tekitades produktina topeltsidemega fumaraadi. Fumaraadile lisatakse veemolekul. Ehkki see samm ei tooda otseselt energiat, on produkt hüdroksürühmaga malaat. Malaadi hüdroksürühm oksüdeeritakse, elektronid kantakse üle tsükli kolmandale NADH-le ja produktina saadakse oksaloatsetaat, mida saab uue atsetüülrühma lisamisel tsükklisse kaasata. (Berg et al., 2012)

1.1.3. Elektronkandjad

Raku elektronkandjate NADH ja FADH₂ ülesanne on transportida elektrone hingamisahelasse. Neile kantakse elektrone glükolüüsi, β -oksüdatsiooni ja tsitraaditsükli käigus, viies need redutseeritud olekusse. Edasi loovutavad elektronkandjad elektrone

omakorda mitokondri sisemembraanil asuval hingamisahelale, taandudes oksüdeeritud vormi ja saades võime eemaldada elektrone uutelt energiarikastelt süsinikuühenditelt.

Elektronkandjatel on kaks olulist indikaatorit. Üks on elektronkandjate oksüdatsiooniaset rakus, kuna see määrab nii oksüdeerimisvõime kui redutseerimisvõime. Näiteks oksüdeerimisvõime (elektronkandjad on redutseeritud olekus) ammendumisel on hingamisahel elektronidest küllastunud, elektronkandjad redutseeritud olekus ja energiat saab toota vaid anaeroobse glükolüüsi teel. Redutseerimisvõime vähenemine (elektronkandjad on oksüdeeritud olekus) aktiveerib toitainete rakku toomist ning ammendumine tähendab raku hingamise seiskumist. (Leverve et al., 2007)

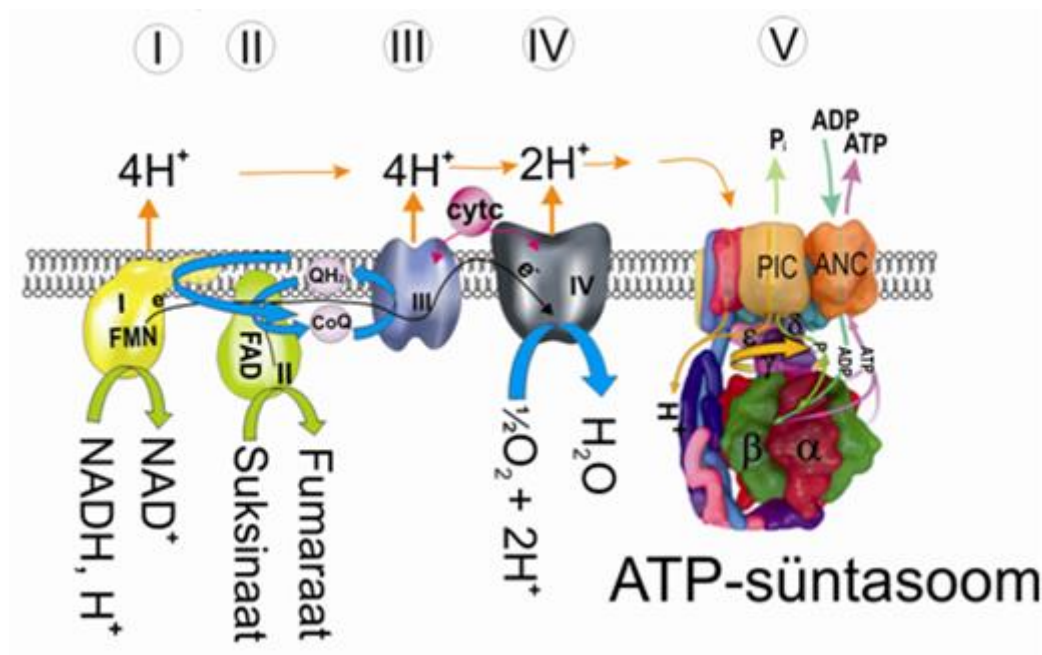
Teine oluline indikaator on erinevate elektronkandjate, NADH ja FADH_2 omavaheline vahekord. Need erinevad oma energeetilise panuse poolest. NADH annetas elektronid kolmpleksi I-le ning selle kasutegur on 10 väljapumbatud prootonit elektronpaari ehk ühe hapniku molekuli kohta. FADH_2 annetas elektronid kompleks II-le, millele järgnevalt pumbatakse kokkuvõttes välja vaid 6 prootonit. Seetõttu väheneb ATP tootmise efektiivsus 40%, kui substraadiks kasutatakse FADH_2 . Siinkohal on oluline seostada, et ehkki lipiidide ja glükoosi katabolism toodavad samu vaheühendeid, erineb toodetud elektronkandjate omavaheline vahekord. Ühe glükoosimolekuli täielikul katabolismil saadakse 10 NADH ja 2 FADH_2 (vahekord 5:1). Ühe 6-süsinikulise rasvhappe täielikul katabolismil saadakse 12 NADH ja 6 FADH_2 . (vahekord 2:1). Kuna rasvhapete oksüdatsioon toodab rohkem FADH_2 , on hapniku kulu kõrgem. (Leverve et al., 2007)

Kuna NADH ei läbi mitokondri membraane, peab tsütosoolne NADH elektronid mitokondrisse kandma spetsiaalsete süstikute abil. Selleks on kaks võimalust. Esiteks malaat-aspartaat süstik. See annab elektrone hingamisahela I kompleksile, pumbates maatriksist välja 10 prootonit. Kuna elektronid antakse I kompleksile, on selle süstiku kiirus negatiivselt reguleeritud prootongradiendi poolt. Teine võimalus on NADH elektrone mitokondrisse saada glütserool-3-fosfaat-dihüdroatsetoonfosfaatsüstiku abil. Ehkki tsütosoolselt pärinevad elektronid NADH-lt, lisatakse need süstiku poolt kompleks II-le. See protsess ei sõltu prootongradiendist, aga toodab vaid 6 prootonit hapniku kohta. Nende kahe süstiku suhteline aktiivsus on kontrollpunkt, kuna mõjutab otseselt mitokondri NADH/ FADH_2 suhet ja

hapniku kulutamise efektiivsust. Teadaolevalt avaldab nt türeoidhormoon oma toimet, tõstes FADH₂ süstiku kasutust. (Leverve et al., 2007)

1.1.4. Oksüdatiivne fosforüülimine mitokondri sisemembraanil

Aeroobset oksüdatsiooni viib läbi mitokondri sisemembraanil asuv neljast valgulisest kompleksist (kompleksid I–IV) ja kahest membraanis vabamalt liikuvast ja elektrone komplekside vahel transportivast ühendist: koensüüm Q10 ning tsütokroom C (cyt C) koosnev hingamisahel (joonis 1). Sisuliselt on hingamisahela roll oksüdeerida elektronkandjad NADH ja FADH₂, redutseerida lahustunud hapnik H₂O-ks ja pumbata sisemembraani ümber prootoneid, tekitades prootongradienti. Lisaks tekib paratamatult vabu radikaale. (Berg et al., 2012)



Joonis 1. Hingamisahela kompleksid. I, III ja IV kompleks tekitavad prootongradienti. ATP süntasoom, mis koosneb PIC, ANT ja ATP süntaasist, toodab ATP-d. Joonisel: NAD – nikotiinamiid adeniin dinukleotiid. FAD – flaviin adeniin dinukleotiid. PIC – fosfaadi kandja. ANC – adeniinnukleotiidi translokaas. (Käämbre & Varikmaa, 2013)

Kompleks I ehk NADH-Q oksidoreduktaas on vähemalt 32 polüpeptiidahelast koosnev ensüüm. See katalüüsib reaktsiooni $\text{NADH} + \text{Q} + 5\text{H}^+_{(\text{n})} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2 + 4\text{H}^+_{(\text{p})}$. NADH seotakse ning selle kaks kõrge potentsiaaliga elektroni juhitakse esmalt flaviin

mononukleotiidile ja sealt edasi läbi 4Fe-4S rõngaste koensüüm Q10-le. Selle käigus pumbatakse maatriksist välja 4 prootonit. (Berg et al., 2012) Kõik rajad, mis toodavad NADH, koonduvad kompleks I juures. Kuna see on nende elektronide ainus aktseptor, konkureerivad need omavahel. (Leverve et al., 2007)

Kompleks II ehk suksinaat-Q-reduktaas on Krebsi tsükli ensüüm, mis oksüdeerib suksinaati fumaraadiks, genereerides FADH_2 . FADH ei liigu maatriksis ega tsütosoolis vabalt, nagu NADH. Nende elektronid loovutatakse kohe läbi Fe-S klastrite hingamisahelasse koensüüm Q10-le, nagu kompleks I. Erinevalt kompleks I-st ei pumpa kompleks II prootoneid tsütosooli. (Berg et al., 2012)

Kompleks III ehk tsütokroomi reduktaas on prootonpump, mis saab elektrone redutseeritud Q10-lt, vahendades reaktsiooni $\text{QH}_2 + 2 \text{CytC}_{(\text{ox})} + 2\text{H}^+_{(\text{m})} \rightarrow \text{Q} + 2 \text{CytC}_{(\text{red})} + 4\text{H}^+_{(\text{c})}$. Ühe elektronpaari kohta pumbatakse välja 4 prootonit. Elektronide aktseptor on tsütokroom C, heemi sisaldav valk. Heemis sisalduv raud varieerub redutseeritud (laeng +2) ja oksüdeeritud (laeng +3) oleku vahel. (Berg et al., 2012)

Kompleks IV ehk tsütokroom c oksüdaas on hingamisahela viimane ensüüm. See kasutab elektronide ülekandeks vaske ning kahte heemi (heem a, heem a3), mille abil katalüüsib elektronide ülekannet redutseeritud tsütokroom c-lt hapnikule. Kui heem 3a redutseeritakse 2^+ olekusse, seob see hapniku. Hapnikule kantakse üle elektronid, katalüüsides hapniku redutseerumise H_2O -ks. Protsessist saadava energia abil pumbatakse maatriksist välja veel 4 prootonit. (Berg et al., 2012)

Prootonite väljapumpamine tekitab sisemembraanil prootongradiendi, kus membraani sisemine pool välise suhtes on negatiivse laenguga ehk membraanipotentsiaaliga (MP). Potentsiaal tekitab prootoneid liikumapaneva jõu, tõmmates positiivselt laetud prootoneid negatiivse laenguga maatriksi poole. On arvatud, et 1 mool prootoneid annab 21,8 kJ energiat. (Berg et al., 2012)

Lisaks hingamisahelale läbib mitokondri sisemembraani ka ATP süntasoom. See koosneb kolmest valgust: ATP süntaas, fosfaadi kandja (PiC) ja adeniinnukleotiidi translokaas (ANT). Kõik valgud asetsevad üksteise lähedal, on omavahel seotud ja sõltuvad oma funktsioonid üksteisest. ATP süntaasil on ATPaasi struktuuriga F1 osa ja F0 osa, mis sisaldab prootonkanalit. Selle F1 osa ulatub mitokondri maatriksisse, kus seob ADP ja Pi ning katalüüsib reaktsiooni $\text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{ATP}$. F0-osa läbib membraani ning, kasutades prooton gradiendi energiat, määrab F1 osa reaktsiooni suuna ATP sünteesi kasuks. ANT ja PiC vahendavad vastavalt adeniinnukleotiidide ja Pi transporti läbi sisemembraani. ANT transpordib energiarohket ATP-d välja ning substraadina kasutatavat ADP-d sisse. (Chen & Chen, 2004)

Tavajuhul on mitokondri sisemembraan prootonitele läbimatu ja hingamisahela poolt toodetav prooton gradient otseselt sidustatud ATP sünteesiga. Kui mitokondri sisemembraan lekib, liigub osa prootoneid maatriksisse ilma ATP sünteesiks energiat andmata. Sel juhul eraldub kogu toodetud energia soojusena. Ehkki see ei võimalda ATPaaside tööd, on sellel funktsioonil puudus rasvkoos ja keha on võimeline leket esile kutsuma lahtisidestatusvalkudega. Sellisel lekkel on kolme tüüpi tagajärgi: redoksolekut mõjutavad (nt malaat-aspartaat süstiku aktiivsuse vähenemine), prooton gradienti mõjutavad ja ATP sünteesi mõjutavad. (Leverve et al., 2007) Lisaks suurendab lahtisidestatus tsütosoolset AMP kontsentratsiooni (Dzeja & Terzic, 2009).

Kuna metaboolsed rajad on üksteisega väga seotud ja üksteisest sõltuvad, võib reaktsioone paremini kontrollida supramolekulaarse paigutuse abil. Hingamisahela supramolekulaarset organisatsiooni nimetatakse respirasoomiks. Fluiidse mudeli järgi liiguvad kõik kompleksid membraanis vabalt. On olemas ka tahke mudel, mille kohaselt nad on üksteise suhtes fikseeritud jäika tervikkompleksi. Sellisele supramolekulaarsele paigutusele viitab näiteks avastus, et kompleks III omab rolli ka kompleks I, tsütokroom C ja kompleks IV kaitsmisel lagunemise vastu. Hiljutiste uuringute käigus on tuvastatud superkompleksi pakkiv valk ja mitokondri kuju määravate valkude roll superkomplekside funktsioonis. (Enríquez, 2015)

1.2. Südame ja kardiomüotsüütide kirjeldus

1.2.1. Südame anatoomia, põhifunktsioon

Süda on rinnakorvis, kopsude vahel asuv lihaseline pump, mis tagab vere liikumise mööda veresooni. Verega liiguvad hapnik, toitained ja hormoonid kudedeni ning ainevahetuse jäägid eemaldatakse kudedest, seega on südamelihase efektiivse kontraktsiooni tagamine äärmiselt tähtis. (Rizzo, 2010)

Süda on ümbritsetud kahekihilisest kaitsvast ja veresooni fikseerivast membraanist ehk perikardist. Süda koosneb neljast kambrist. Ülemised kaks on vasak ja parem koda, parem on vasakust veidi paksema seinaga. Alumised kaks kambrist ehk vasak ja parem vatsake on eraldatud koronaarlõhega. Kodade ja vatsakeste müokard on sidekoega eraldatud. Vatsakesed on paksemate seintega kui kodad, eriti vasakpoolne ning omavahel on need eraldatud interventrikulaarse septiga. Nende vahel on eesmine ja tagumine interventrikulaarne lõhe, kus asuvad koronarveresooned ja rasv. Histoloogiliselt on suurem osa südamekoest müokard: eriline tahteallumatu vöötlihaskude, mille kiud hargnevad. Välissein ehk epikard on jätkuv perikardi sisemise membraaniga. Sisesein ehk endokard sarnaneb veresooni vooderdavale endoteelile. (Rizzo, 2010)

Südame paremasse kotta voolab tume venoosne veri, mida juhivad sinna suubuvad ülemine ja alumine õõnesveen ning koronaarsiinus. Edasi surutakse venoosne veri läbi trikuspidalklapi paremasse vatsakesse. Parema vatsake alustab väikest vereringet, pumbates vere läbi pulmonaarse poolkuuklapi kopsuarterite kaudu kopsudesse hapnikuga rikastuma. Kopsudest naaseb hele arteriaalne veri südame vasakusse kotta. Kojast pumbatakse veri läbi bikuspidalklapi vasakusse vatsakesse. Vasaka vatsake kui südame kõige tugevam kammer alustab suurt vereringet, pumbates vere läbi aordi poolkuuklapi aorti ja sealt organismi laiali. (Rizzo, 2010)

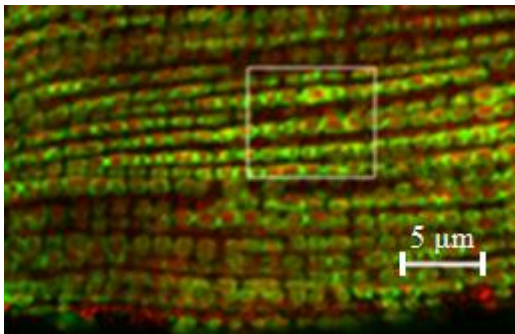
Südame kambrite töö koosneb kahest osast: diastol, mille ajal kambrid verrega täituvad ja süstol, mille ajal need kontraheeruvad. Ühes südamelöögis on nii kodade diastol ja süstol kui vatsakeste diastol ja süstol. Inimese süda lööb orienteeruvalt 72 korda minutis, jättes ühe tsükli jaoks aega 0,8 sekundit (skeletilihase kontraktsioon on 0,09 sekundit). Südamelihas ei allu taatele ja allub vaid osaliselt välisele regulatsioonile. Igat kontraktsiooni kontrolliv impulss algab siinusesõlmest, mis asub paremas kijas. Teised tegurid ei põhjusta otseselt kontraktsiooni vaid mõjutavad siinussõlme, reguleerides seeläbi löögisagedust. Nende tegurite alla käivad türeoidhormoon, adrenaliin ja autonoomne närvisüsteem: sümpaatilised impulsid kiirendavad ja parasümpaatilised aeglustavad. Kusjuures ühe kiu stimulatsioon stimuleerib ka kõrvalolevaid, tagades üheaegse kontraktsiooni. Kogu kontraktsiooni kiiruse määrab ära kiireim lihaskiud. (Rizzo, 2010)

Signaal levib siinussõlmest esmalt paremale ja vasakule kojale, indutseerides kontraktsiooni ning pumbates kodade sisu lõdvestunud vatsakestesse. See kestab umbes 0,1 sekund. Edasi liigub signaal parema koja all asuva atrio-ventrikulaarsõlmeni ja depolariseerib selle. Seal on signaaliedastamisel väike paus, kuni vatsakesed täituvad. Atrioventrikulaarsõlmest edasi liigub signaal His-kimpu pidi interventrikulaarse septi otsani, kus signaal hargneb kaheks ning levib vasakut ja paremat haru mööda septi seinasid pidi. Harudest, täpsemalt purkinje rakkudest edastatakse signaal vatsakestele. Indutseeritakse vatsakeste kontraktsioon, mis kestab umbes 0,3 sekundit ja mille algul vatsakeste klapid (semilunaarid) rõhu suurendamiseks suletud on. Viimased 0,4 sekundit süda puhkab, kõik klapid lahti, oodates uut signaali siinussõlmest. Enne lõdvestust ei saa uus kontraktsioon alata. (Rizzo, 2010)

1.2.2. Kardiomüotsüüdid

Südamelihas on spetsiaalne taatele mittealluv vöötlihaskude, mis koosneb kardiomüotsüütidest (KM). KM on silindrilise kujuga, koosnevad paralleelsetest müofibrillidest ja moodustavad pikuti lihaskiude. Osa rakkudest on otstest hargnevad, mis tagavad ühenduse mitme KM-ga. (Rizzo, 2010) Enamus rakke on ühetuumased (Anmann et al., 2013; Yang et al., 2014), ehkki leidub ka kahetuumseid (Rizzo, 2010).

KM struktuuris on väga range korrapära (joonis 2). Pikuti jaotuvad fibrillid korduvateks sarkomeerideks ehk kontraheeruvateks üksusteks, mis ulatuvad ühest Z-kettast järgmiseni. (Anmann et al., 2013) Kontraktsioon on KM põhiline funktsioon, mille käigus muundab lihas keemilist energiat (ATP) mehaaniliseks tööks, täiskasvanud KM kontraktsioonijõud on orienteeruvalt 45 mN/mm^2 (Yang et al., 2014). Kontraktsiooni eest vastutavad müofibrillid, mis koosnevad müosiini ja aktiini filamentidest. Filamentide mille kontaktala nimetatakse anisotroopseks (A) vöödiks. Aktiveerituna kasutab müosiini valk ATP energiat, ristsildasid moodustades aktiini filamentide vahele liikuda (nn libisevate filamentide teooria). Seeläbi tõmmatakse ka Z kettaid üksteisele lähemale. (Rizzo, 2010)



Joonis 2. Täiskasvanud südamelihaskiud. Konfokaalmikroskoobiga tehtud pilt täiskasvanud südamelihaskiust, kus on immunofluorestsentsmärgistusega tehtud nähtavaks VDAC (DyLight 488, roheline) ja β -II tubuliin (DyLight 549, punane). Skaala 5 μm . (Anmann et al., 2013)

Mitokondrite asetus sõltub lihastüübist. Iga sarkomeer on varustatud oma fikseeritud, vähese liikuvusega mitokondritega, suurendades nii energia transpordi efektiivsust. Lihaskoes võib leida kahte tüüpi mitokondreid: subsarkolemmaalseid ja müofibrillide juures asetsevaid mitokondreid, mis toodavad energiat kontraktsiooniks. Oksüdatiivses lihaskoes toodavad kontraktsiooniks energiat müofibrillide sisemuses leiduvad lipiiditilkadega mitokondreid, mis moodustavad sambaid ja I-kettaid ümbritsevad lühikesed ja paksud mitokondripaarid. (Ogata & Yamasaki, 1997) Kardiomüotsüütides asetsevad kontraktsiooniks energiat tootvat mitokondrid A-vöödil müofibrillidega kohakuti filamentide kontaktalal. Täiskasvanud KM ruumalast moodustavad mitokondrid 20–40%. (Yang et al., 2014)

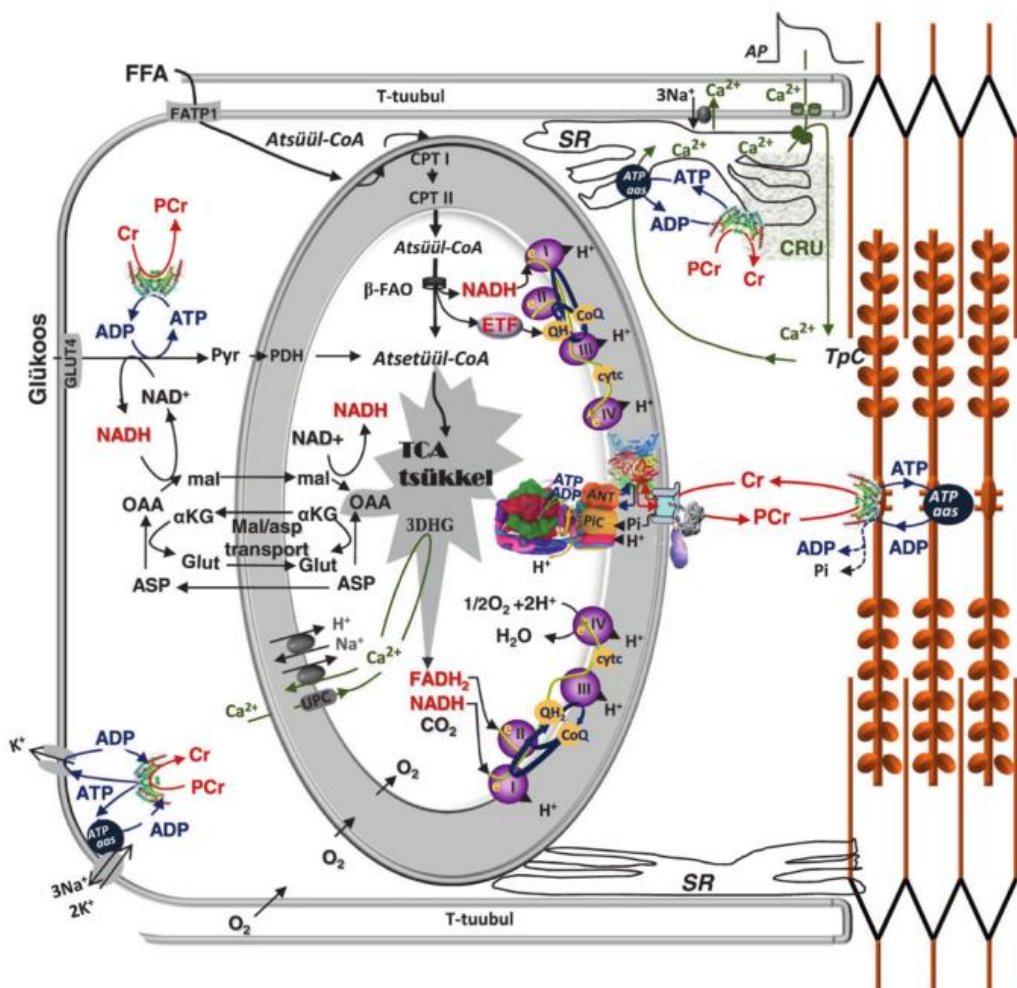
Teist tüüpi mitokondrid asuvad sarkolemmi all ja toodavad energiat MP tagamiseks. Kardiomüotsüütides, nagu ka neuronites, toimub aktivatsioon aktsioonipotentsiaali

vahendusel. Südames on selle konduktsiooni kiirus 0,3-1 m/s. (Yang et al., 2014) Aktsioonipotentsiaal liigub T-tuubuleid pidi lihaskiududesse ja vabastab sarkoplasmaatilisesest võrgustikust (SR) järgmise signaalina rakku kaltsiumi, (Rizzo, 2010) mis omakorda aktiveerib müofibrillid ja seega kontraktsiooni. Aktsioonipotentsiaali lõppedes resorbeerib SR kaltsiumi ioonid ja kontraktsioon lõpeb. Kogu süsteemi jaoks on vaja ATP-d kulutavate transmembraansete ionipumpade regulaarset tööd ja see on kontraktsiooni kõrval teine oluline energiat kulutav funktsioon. (Rizzo, 2010)

KM-l on hästi arenenud metaboolse homeostaasi säilitamise võime. Ehkki hapnikutarve ja energia tootmine on omavahel lineaarses seoses, püsivad isegi 20 kordse hapnikutarve suurenemisega ATP, ADP ja PCr tase oluliselt muutumatuna. Seda võimet metaboliitide taset säilitada nimetatakse metaboolse homeostaasi paradoksiks. (Anmann et al., 2013) Kuna selline homeostaas nõuab väga tundlikku OxPhos reguleerimist, on teaduslik huvi KM mitokondriaalse regulatsiooni vastu suur. Uuritakse nii kontraktsiooni aktiveeriva tsütosoolse kaltsiumi (Balaban et al., 2002) kui metaboolsete substraatide reguleerimise mõju OxPhos-le (Anmann et al., 2013).

1.3. Rakusisene energeetiline ühik

Rakusisene energeetiline ühik (EÜ) on oksüdatiivses võõtlihaskoes leiduv ühtne struktuurne ja funktsionaalne tervik, mille moodustavad aktomüosiinsüsteem, mitokondrid, SR ja neid fikseerivad ning reguleerivad tsütoskeleti valgud (joonis 3).



Joonis 3. Rakusisene energeetiline ühik. Joonisel on näidatud müofibrillide, mitokondri ja sarkoplasmaatilise võrgustiku omavahelised interaktsioonid ning tsütoplasmaatiline metabolism. Joonisel: α KG – α -ketoglutarat. 3DHG – dehüdrogenaasid. Atsetüül-CoA – atsetüülkoensüüm A. ANT – adeniinnukleotiidi translokaas. AP – aktsioonipotentsiaal. Asp – aspartaat. CPT I – karnitiini-palmitiini tranferaas I. CPT II – karnitiini-palmitiini tranferaas II. CRU – kaltsiumi vabanemise üksus. Cyt C – tsütokroom c. ETF – elektronide ülekande flavoproteiin. FATP1 – plasmamembraani proteiinid. FFA – vabad rasvhapped. GLU – glükoos. Glut – glutamaat. GLUT-4 – glükoosi transportija 4. Mal – malaat. OAA – oksaalatsetaat. PDH – püruvaadi dehüdrogenaaside kompleks. PIC – fosfaadi kandja. Pyr – püruvaat. RC – hingamisahel. TpC – troponiin C. TKT – trikarboksüülhapete tsükel. UPC – uniporterkanal. β -FAO – rasvhapete β -oksüdatsioon. (Anmann et al., 2013)

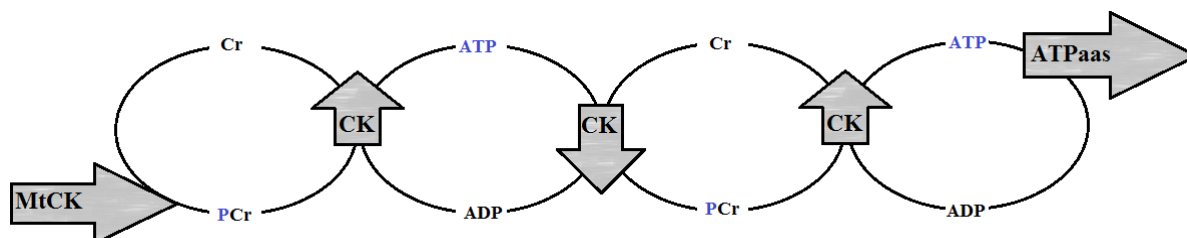
On teada, et EÜ süsteemis edastatakse energiat ATPaasideni energia ülekandevõrgustikega (CK ja AK süsteemid). Lisaks omavad ülekandevõrgustiku metaboolsed produktid (Cr ja AMP) olulist reguleerivat mõju mitokondrile. CK süsteem on KM-s põhiline ja teised pigem toetavas funktsioonis. Sellele annab tõestust mitokondri välismembraani oluline difusioonitakistus ADP-le. Näiline $K_m(\text{ADP})$ on KM-s 360 μM , samas kui isoleeritud mitokondritel on see vaid $\sim 50 \mu\text{M}$, mis suureneb oluliselt arengu käigus. (Anmann et al., 2014)

1.3.1. Energiaülekande võrgustik kardiomüotsüüdis

Mitokondris toimuv OxPhos on oksüdatiivse lihaskoe põhiline energiaallikas, mida kulutavad ATPaasid, tootes produktidena ADP, Pi ja H^+ . Ehkki mitokondrid asuvad tihti ATPaaside lähedal, on ATP tootmine ja tarbimine siiski ruumiliselt lahutatud. Energia transport difusiooniga on aga kineetiliselt ja termodünaamiliselt ebasoodne. Esiteks nõuaks see suurt ATP kontsentratsioonigradienti, teiseks on takistavad tsütosooli makromolekulid steeriliselt difusiooni, muutes selle aeglasemaks ja ebaühtlaseks. Kolmandaks hakkaksid kuhjuvad metaboliidid inhibeerima ATPaaside tööd, eriti võib südamelihase kontraktsiooni takistada ADP kogunemine. Seega on vaja raku bioenergeetilise süsteemi efektiivsemaks töötamiseks energiarohked fosforüülrühmad kontrollitult transportida energia tarbimise sihtkohtadesse. Süsteem peab olema võimeline lihase muutuvale energiavajadusele kiirelt reageerima. Samal ajal on vaja eemaldada ATP hüdrolyüsi produktid, et hoida kineetilist ja termodünaamilist homeostaasi. (Dzeja & Terzic, 2003)

Selle probleemi lahendusena on välja pakutud kontseptsioon, mille kohaselt ATP transport mitokondrist toimub üle ensümaatiliste radade ja otsese difusiooni osakaal on väike. Antud võrgustikus asuvad kindlalt fikseeritud asukohtades fosforüülrühma ülekannet katalüüsivad ensüümid CK ja adenülaatkinaas (AK). Fosforüülrühmi transporditakse mööda nendest moodustuvaid energiaülekande radasid mitokondri maatriksist kuni ATPaasideni. Lisaks vahendab võrgustik ATP tootmist reguleerivaid signaale tuumale, mitokondrile, membraani sensoritele ja muudele ATP-tundlikele kompartmentidele. Võrgustikus olevate ensüümide isovormide jaotused, aktiivsused ja summaarse fosforüülrühmade voo dünaamika

korreleeruvad hästi raku funktsiooniga, kinnitades nende olulist rolli energia transpordis, jaotuses ja homeostaasis. (Dzeja & Terzic, 2003)



Joonis 4. Kreatiinkinaasi rada. Fosforüülrühma kantakse CK poolt üle erinevatele liganditele. Substraatide kontsentratsioonid püsivad stabiilsed, kuid fosforüülrühma ja selles salvestunud energiat kantakse edasi ATPaasini. Cr – kreatiin. PCr – fosfokreatiin. MtCK – mitokondriaalne kreatiinkinaas.

CK süsteem koosneb järjestikest, ahelat moodustavatest CK tsütoplasmaatilistest isoensüümidest (CK-MM). Need katalüüsivad $ADP + PCr \xleftrightarrow{CK} ATP + Cr$ tasakaalureaktsioone, tekitades palju väikseid ruumis järjestikku asetsevaid kontsentratsioonigradiente, mida raja järgnev ensüüm tasakaalustab (joonis 4). Metaboliitide gradiendid püsivad stabiilsed ning ensüümide poolt vahendatavad reaktsioonid tasakaalustuvad kiiresti. Ligandid ise ei liigu kogu raja ulatuses, vaid rajal järjestikuste ensüümide vahet. Seega, PCr ega ATP ei difundeeru laialt vaid nende tekkiv kontsentratsioon aktiveerib kõrval asetseva CK, mis kannab fosforüülrühma järgmisele ligandile. Nii liiguvad fosforüülrühmad, kuid mitte ligandid ega ensüümid voona mööda kindlat rada ATPaasini. Selline voog liigutab fosforüülrühmasid kiiremini kui difusioon (kiirus on arvutatav ruutjuurena reaktsioonikiiruse konstandist ja difusiooni koefitsiendist). Lisaks ei ole levimiseks vaja suuri kontsentratsioonigradiente. CK süsteemi metaboolne produkt on Cr, võimaldades Cr kasutada signaalmolekulina. (Dzeja & Terzic, 2003) Kuna ATPaasi juures olev ATP taastatakse koheselt PCr arvelt, aitab see ka vältida tsütosoolset ADP/ATP taseme kõikumisi (Anmann et al., 2013).

AK-ülekandevõrgustik on sarnane CK omale: AK ensüümid on ruumis fikseeritud ning vahendavad fosforüülrühmade transporti voona ilma, et ligandid terve raja ulatuses kaasa peaksid liikuma. Erinevalt CK-st vahendab AK pöörduvat reaktsiooni $2 ADP \leftrightarrow AMP + ATP$. Seega ei vastuta AK ainult kõige väilimise ehk γ -fosforüülrühma transpordi eest,

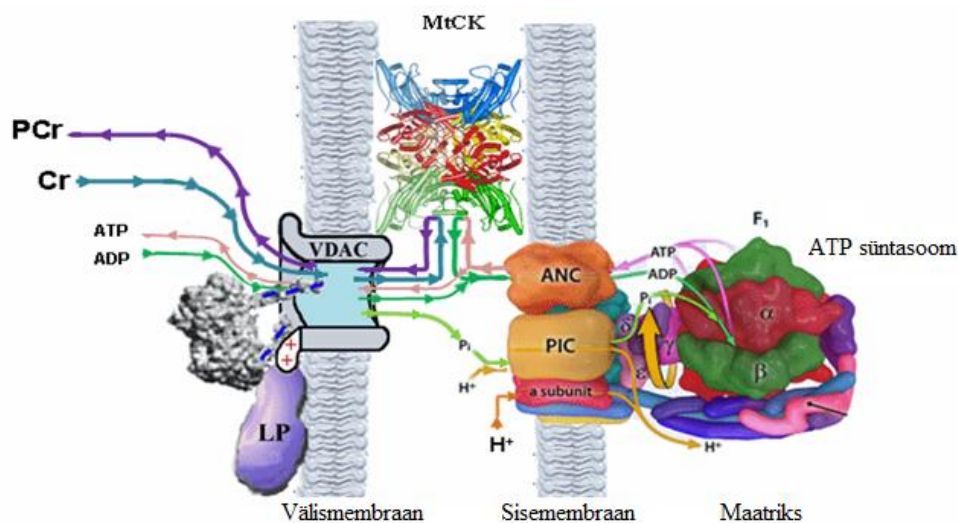
vaid võimaldab ka β -fosforüülrühma rakendamist. Esiteks võimaldab see ühest ATP molekulst rohkem energiat saada ning neid võib leida ATPaaside juures (näiteks düneiini lokaalselt ATP-ga varustamiseks). (Dzeja & Terzic, 2009)

Lisaks teise fosforüülrühma rakendamisele toodab AK metaboliidina AMP, mis on omaette signaalmolekul. AMP aktiveerib AMP-tundlikke metaboolseid ensüüme ja sensoreid nagu AMPK. Sensoorse poole pealt on see oluline, kuna AMP on tsütosoolis vähem kui ADP ja seega on rakus leiduvad sensorid AMP suhtes tundlikumad. AMP aktiveerib nii glükolüütilist kui glükogenolüütilist rada. Lisaks rakkudele leidub AMP ka veres, edastades energia kulutamise seotud signaale mitte ainult rakusiseselt vaid ka organismi tasandil. (Dzeja & Terzic, 2009)

1.3.2. Mitokondriaalne interaktsioon

Eelnevates uurimistöödes on näidatud, et võtmerolli energiavoo suunamisel mitokondrist CK ülekanderaajale omab mitokondri membraanides ja membraanidevahelises ruumis asuvatest kompleksidest moodustunud superkompleksi MI. MI-sse kuuluvad ATP süntasoomi kompleks, mitokondriaalne CK isovorm (mtCK), VDAC ja selle läbitavust reguleerivad kompleksid (joonis 5). Lisaks on tsütosoolne transport seotud mitokondri sisemembraanil asuva mtCK-ga, mis on funktsionaalselt sidustatud ANT ja OxPhos-ga. (Timohhina et al., 2009)

VDAC on mitokondri välismembraanis olev 280 aminohappest koosnev anioonkanal, läbi mille toimub fosfaatrühmadega seotud ühendite, adeniinnukleotiidid ja Cr voog tsütosooli ja mitokondri välismembraani vahel. KM-s tekib VDAC-il arengu käigus selektiivne läbilaskvus, suurendades difusioonitakistust ADP ja ATP suhtes, kuid võimaldades samas jätkuvalt Cr ja PCr vaba liikumist läbi kanali. MtCK asetseb mitokondri membraanidevahelises ruumis, kuid kinnitub sisemembraamile. Erinevalt MM-CK-st katalüüsib see reaktsiooni $ATP + Cr \rightarrow ADP + PCr$, kuna ANT, mis transpordib ADP/ATP läbi mitokondri sisemembraani tekitab mtCK kontsentratsioonigradiendi, tagades nii reaktsiooni suunamise PCr tekkele. (Timohhina et al., 2009)



Joonis 5. Mitokondriaalne interaktosoom. Nooltega on kujutatud fosofrüülrühmade liikumine Joonisel: ANC – adeniinnukleotiidi translokaas. VDAC – pingest sõltuv anioonkanal. MtCK – mitokondriaalne kreatiinkinaas. LP – lipoproteiin. Cr – kreatiin. PCr – fosfokreatiin. (Käämbre & Varikmaa, 2013)

See mtCK ja ANT sidestatus tekitab mitokondri-sisese adeniinnukleotiidi ringluse. ATP süntaasi poolt sünteesitud ATP väljub maatriksist ANT kaudu, mis suunab selle membraanidevahelises ruumis, asuva mtCK kompleksile. Toodetud ATP ei välju sealt, vaid katalüüsitakse mtCK poolt Cr juuresolekul ADP-ks, tootes PCr. MtCK poolt toodetud PCr väljub membraanidevahelisest ruumist läbi VDAC-i ilma takistusteta tsütosooli, CK ülekandevõrgustikku. MtCK poolt tekitatud ADP kontsentratsioonigradient tekib ANT lähedal ning kiirendab ADP transporti ANT kaudu maatriksisse tagasi, tekitades funktsionaalse sidestuse mtCK ja ANT vahel. Seega, funktsionaalne MI kompleks tagab energiavoo suunamise CK ülekanderaajale, samuti selle, et nii Cr-l kui ADP-l on mitokondrit aktiveeriv mõju. Tänu sellele on CK süsteem prevaleeriv energia ülekandmises ja energiatootmise regulatsioonis ning ülejäänud toetavas funktsioonis. (Timohhina et al., 2009)

Välismembraani difusioonitakistus ADP-le varieerub elu vältel seoses nii arengu (Anmann et al., 2013) kui patoloogilise seisundiga (Roosimaa et al., 2013). Ehkki välismembraani läbitavus sõltub VDAC-ist on seni on teadmata, kuidas rakk seda täpselt kontrollib. VDAC-l on avatud ja suletud olekud, mis võivad alluda allosteerilisele kontrollile. Suletud olekus säilib läbitavus madala molekulkaaluga ühenditele, samas kui ATP-le läbitavus väheneb. (Rostovtseva & Colombini, 1996) On teada, et VDAC läbitavus sõltub sellele kinnitunud

kompleksidest ja nt proteolüütilise trüpsiiniga töötlemisel väheneb Km(ADP) ehk suureneb kanali läbitavus (Appaix et al., 2003). On põhjust arvata, et VDAC läbitavust reguleerivad tsütoskeleti valgud. KM tubuliini lisamine viib VDAC suletud olekusse (Rostovtseva et al., 2008), samas kui tsütoskeleti valkude lüüsimine tõstab välismembraani läbitavust (Kishore et al., 2014). Lisaks kolokaliseeruvad VDAC ja β -tubuliin arengu käigus ning nende kolokalisatsiooni teke korreleerub MI arenguga (Anmann et al., 2014). VDAC läbilaskvust mõjutab ka HK, mis võib mitokondrile kinnitudes ATP voogu inhibeerida. (Perevoshchikova et al., 2010)

1.4. Kardiomiotsüütide areng

Arengu varajases faasis on KM-l suur proliferatsioonivõime. Embrüonaalne süda kasvab peamiselt hüperplaasia (raku paljunemise), mitte hüpertroofia (raku kasv) kaudu. See võimekus väheneb sünnijärgselt kiiresti, inimesel on KM paljunemisvõimelised veel paar kuud. Proliferatsioonivõime kadumisel säilib siiski tuumade jagunemine: tekivad mitmetuumased rakud, mille osakaal suureneb ning on täiskasvanul ~25%. DNA paljunemine säilib siiski ja tekivad polüploidised rakud. Täpne kromosoomide arv varieerub 8N (terves südames) kuni 64N (ülekoormusega südames). Sünnijärgne südame kasv tuleb pigem rakkude kuni 40-kordse suurenemise ehk hüpertroofia tõttu. Raku suurus on kasvamises oluline faktor, kuna sellest sõltuvad impulsi juhtimine, depolarisatsiooni kiirus ja kontraktilne jõud. (Yang et al., 2014)

Sünnijärgselt toimub oluline pööre südameraku bioenergeetikas – seniselt valdavalt glükolüütiline energiametabolism asendub aeroobse OxPhos-ga. Suureneb mitokondrite hulk rakus, mitokondrid muutuvad struktuuri poolest pikemaks ja tekivad lamellaarsed, korrapäraselt jaotatud harjased. (Yang et al., 2014) Tõuseb ka mitokondriaalsete ensüümide aktiivsus (Tiivel et al., 2000). Kasutatava substraadina hakkab vähenema glükoosi ja suurenema rasvhapete osakaal. Vahetult pärast sündi kasutab rakk 80% glükolüüsi, samas kui küpsemate, aeroobselt efektiivsemate mitokondrite arenguga muutub valdavaks rasvhapete mitokondriaalne β -oksüdatsioon. (Yang et al., 2014)

OxPhos arengut on võimalik hinnata ka hingamisahela I ja II kompleksi suhtelise aktiivsuse järgi. Esimesel kolmel elupäeval on need suhtes 1,2 : 1,4 viidates glükolüütilisemale ainevahetusele, mida seotakse kompleks II suurema aktiivsusega. Südamerakkude arenedes suureneb I kompleksi suhteline aktiivsus ning alates 10. elupäevast on I ja II komplekside suhe 0,9, mis jääb samaks ka järgneva komplekside aktiivsuse tõusu jooksul. (Anmann et al., 2013)

On leitud, et täiskasvanud kardiomiotsüütide energeetilise metabolismi väljakujunemine sõltub struktuuri ja funktsiooni omavahelistest vastasmõjudest mitokondrite ja tsütoskeleti

valkude vahel. Seetõttu on bioenergeetilise regulatsiooni arenguga seotud muutused KM morfoloogias, sh rangelt organiseeritud kristallilaadse struktuuri teke ja mitokondrite ümberpaigutamine eelduseks järgnevale funktsionaalsele küpsemisele. (Anmann et al., 2013)

Morfoloogiliselt on kardiomüotsüüdid esimesel sünnijärgsel päeval süstikulaadsed ja vaid ühe tuumaga. Mitokondrite korrapärane paigutus puudub, need asuvad valdavalt sarkolemmi all ja tuuma ümber. Kümnendal päeval hakkab rakk sarnanema täiskasvanud rakule: kuju on piklik ja torujas, sisaldab kahte tuuma. Organellid, sh SR, mitokondrid ja müofibrillid hakkavad võtma korrapärasemat kuju. Kolme nädalaselt on mitokondrid liikunud müofibrillide vahele, andes rohkem energiat kontraktsiooniks ning vähem DNA sünteesiks. Kahe kuuselt on rakud 3–4 korda suuremad ning organellide paigutus kristallilaadses arhitektuuris fikseeritud, mis on eelduseks energeetilise ühiku kujunemisele. (Anmann et al., 2013)

Raku struktuuri ja mitokondri funktsiooni vahelist seost mõjutavad mitokondri välismembraani VDAC seosed tsütoskeleti valkudega. Arengu käigus korreleeruvad oluliselt VDAC difusioonitakistuste suurenemine ADP-le ja kolokalisatsioon tsütoskeleti valkudega. Seega mõjutab rakk tsütoskeleti valkude abil mitokondri välismembraani selektiivset läbilaskvust ja MI arengut. (Anmann et al., 2013)

MI ja ülekandevõrgustiku arengut on võimalik hinnata, vaadeldes *in situ* mitokondrite tundlikkust ADP ja Cr reguleerivale mõjule ning mtCK kogust. Juba 1. nädalast on näha mtCK esinemist, kuid oksügraaafilistest mõõtmistest on näha, et Cr aktivatsioon puudub. Cr poolt aktiveeritav mtCK hakkab reguleerivalt prevaleerima kolmandast nädalast. Samal ajal hakkab afiinsus ADP-le oluliselt vähenema ja ka looma kehamass suureneb järsult. Edasi väheneb tundlikkus ADP-le regulaarselt ja suureneb mtCK ekspressioon, jõudes täiskasvanu tasemele 6. nädalal. Kahe kuu vanuselt on tundlikkus ADP-le saavutanud täiskasvanule iseloomuliku väärtuse, kolme kuu vanusena vastab MI kineetika funktsionaalselt täiskasvanu omale ja rott on saavutanud täiskasvanu kehamassi. (Anmann et al., 2013)

Ka mitokondrite MP suureneb arengu käigus. Selleks on mitu põhjust. Hiire KM-des on embrüonaalses faasis prootonite leke, võimaldades OxPhos-ga sidestamata voogu tagasi

maatriksisse. Arengu käigus väheneb prootonite leke oluliselt. (Yang et al., 2014) Lisaks sellele suureneb hingamisahela komponentide kontsentratsioon, kiirendades prootongradiendi teket (Tiivel et al., Seppet, 2000).

Müofibrillid arenevad koos KM-ga, nende struktuur muutub organiseeritumaks ja need pikenevad. Neonataalne kontraktilne jõud on umbes $0,6\text{mN/mm}^2$, tunduvalt vähem kui küpsel rakul. Täiskasvanud KM lõdvestunud olekus on sarkomeeride pikkus $\sim 2,2\mu\text{m}$. Küpsemisega vahetuvad ka müofibrillide isovormid, nt titiin muutub jäigemaks, reguleerides pinget lõdvestunud sarkomeeris. Ka troponiin I isovorm vahetub. Arengu käigus on see aeglane skeletaalne troponiin I, kuid täiskasvanul on Ca-le vähen tundlik südame troponiin I. Müosiini rasked ahelad on nii a kui b vormidena olemas, kuid loote rakkudel on a-vormi rohkem. T-tuubulid vastündinud rotil puuduvad, 6-9 elupäeval on T-tuubulite sarnased struktuurid sarkolemmi all ning kahe nädala vanusel rotil on need irregulaarsed, kuid olemas. (Yang et al., 2014)

Kardiomüotsüütide MP ja selle mehhanismid arenevad küpsedes. Aktsioonipotentsiaali teke nõuab mitme ioonkanali koostööd. Nii sünnieelselt kui –järgselt areneb kindlatest kanali tüüpide ekspressioonist ja funktsioonist välja küpse KM fenotüüp. K ja Na kanalite väiksema aktiivsuse tõttu on MP sünnijärgselt väiksem kui täiskasvanud KM-s, vastavalt -60 mV ja -90 mV . Liidesed kontsentreeruvad raku otstesse, kiirendades rakkudevahelist signaali conduktiooni. Kaniinide puhul on teada, et signaali edastamise kiirus vatsakese KM-des tõuseb $0,33\text{ m/s}$ pealt $0,5\text{ m/s}$. (Yang et al., 2014)

1.5. Patoloogilised ja vananemisega seotud muutused.

Energiametabolismi häiretega on seotud erinevad patoloogilised seisundid nagu südamepuudulikkus (Roosimaa et al., 2013) ja kasvajakasv (Käämbre et al., 2013), aga ka vananemisega seotud muutused (Dzeja & Terzic, 2009; Nemutlu et al., 2015). Vananemise puhul võib tuua välja vanuse poolt esile kutsutud muutuseid EÜ-s ja eraldi ka mitokondrite rolli vananemise ühe võimaliku põhjustajana.

Vananemise põhjendamiseks on erinevad teooriad. Ühe populaarse teooria kohaselt põhjustab vananemist mitokondris toodetud ROSide toimel tekkinud oksüdatiivne kahjustus. Mitokondrid, täpsemalt hingamisahela I ja III kompleks toodavad ROSe, mis difundeeruvad mitokondri maatriksisse ning mille vastu on seal piiratud kaitse. (Chen et al., 2003) Tekkivad radikaalid kahjustavad mitokondris omakorda hingamiskompleksi, lipiide ja mtDNA-d, tekitades nii kumuleeruva tsüki, mida peetakse vananemise üheks olulisemaks põhjuseks. Tagajärjena väheneb OxPhos ja suureneb glükolüüsi osakaal. (Tepp et al., 2016) Kõige suuremad muutused toimuvad loomuliku vananemise käigus kompleks I-s, mille aktiivsus väheneb ja mis muutub ka vähem vastuvõtlikuks rotenooniga inhibeerimisele (Lenaz et al., 1997). Mitokondrite poolt põhjustatud vananemise teooria suhtes on ka kriitikat. On uuritud närilisi, kes toodavad suures koguses vabu radikaale (*Heterocephalus glaber*) või kes on geneetiliselt muundatud vastuvõtlikuks mtDNA punktmutatsioonidele. Neil tekivad olulised mitokondriaalsed kahjustused, kuid nende eluiga ei vähenenud. (Sanz & Stefanatos, 2008)

Uurides vananemisega seotud muutuseid rotil (võrreldi 6 kuu ja 2 aasta vanuseid) on tuvastatud, et vananemise käigus fosfometaboliitide taastootmine (ingl k *turnover rate*) väheneb. Samal ajal tekivad häired fosforüülühma ülekandevõrgustikes, mis takistavad ATP transporti. Ka substraatide suunamine mitokondrisse ja seega OxPhos väheneb. Väheneb ka glükolüüsi aktiivsus. Need muutused võivad olla seotud kogu energeetilise süsteemi haavatavusega. (Nemutlu et al., 2015) Samas suureneb vananedes, võimalik et kompensatoorselt, AMP kontsentratsioon ja AMPK aktivatsioon. (Dzeja & Terzic, 2009)

Erinevad südamehaigused on üheks levinumaks surma põhjustajaks. Juba kergemad südame funktsioonihäired võivad põhjustada hemodünaamilisest stressist tingitud koja laienemist. See

omakorda põhjustab teatud patoloogilisi muutuseid koes, olles aluseks südamepuudulikkusele ja aatriaalsele fibrillatsioonile. Atriaalne fibrillatsioon on arütmia ehk südame rütmi häire, kus kodade kokkutõmbed on elektrisignaali organisatsiooni häirete tõttu kiired ja ebaregulaarsed. Individuaalsed rakud kontraheeruvad koordineerimata. (Rizzo, 2010) Tagajärjena ei lähe veri vatsakesse nii, nagu peaks ning südame jõudlus väheneb. Fibrillatsioon võib olla krooniline või ajutine, kuid see suurendab infarktiohtu. Seda põhjustavad häired elektrisignaali organiseerituses. Kuna elektrisignaali edastamise süsteem kulutab pidevat subsarkolemmaarsete mitokondrite energiat, võivad need häired olla põhjustatud energiaallikate süsteemi kahjustustest. (Nemutlu et al., 2015)

Aatriumi laienemisest tingitud patoloogiliste muutuste kirjeldamisel on käsile võetud termin aatriaalne remodelleerimine, mis sisaldab endas rakkude apoptootilist ja nekrootilist surma, hüpertroofiat, elektrijuhtivuse häireid, kontraktsioonivõime vähenemist ja muud. (Roosimaa et al., 2013) Lisaks toimuvad sellises koes ka bioenergeetilised muutused, mis viitavad EÜ kahjustusele. Vähenevad CK ja AK aktiivsused ning ATP ja CrP hulgad (Cha et al., 2003), suureneb difusioonitakistus ADP-le ning väheneb V_0 . Tekib ka HK-2 mitmekordne ekspressioon. Kuna HK-2 kinnitub mitokondril VDAC-le ning loovutab ADP-d otse mitokondrisse, stimuleerib see nii HK glükolüütilist aktiivsust (ADP kui inhibiitori puudumine) kui stimuleerib OxPhos. Tulemusena suureneb glükoosi efekt sellises olukorras kahekordseks, viidates glükoosi ja HK olulisele reguleerijale. Sellist interaktsiooni kutsuvad esile nii isheemia kui kardioprotektandid. On võimalik, et HK-2 kinnitumine membraanile kompenseerib kahjustatud EÜ-st tingitud vähenenud reageerimisvõimekust. (Roosimaa et al., 2013)

Energiametabolism on seotud isheemilise kahjustusega (Dzeja & Terzic, 2009). ROS teke suureneb, kui tekivad kõrvalekalded hingamisahela komplekside normaalsest talitusest, nt isheemilises keskkonnas (Tepp et al., 2016). Veres ringleva AMP tase tõuseb mitte ainult füüsilisel pingutusel vaid ka müokardiaalse isheemia puhul juba minutitega, olles muuhulgas hea diagnostiline indikaator. Isheemia likvideerimisel ja koe hapnikuvarustuse taastamisel, kui seda ei tehta piisavalt kiiresti, tekib aga reperfusiooni kahjustus. Toodetakse suures koguses ROS, häirub katioonide homeostaas, tekib ultrastruktuurne kahjustus ja üldine kardiaalne depressioon. (Dhalla & Duhamel, n.d.) Kuna AMP suudab vähendada ROS produktsiooni, võib see omada reperfusiooni vastu kaitsvat rolli. AK1 (tsütosoolne isovorm)

puudumise tagajärjel on täheldatud madalamat energeetilist efektiivsust, aeglasemat lõdvestumist, puudulikku AMP signaalide edastamist ja suuremat vastuvõtlikkust isheemiaile. (Dzeja & Terzic, 2009) Fosforüülrühma ülekande koha pealt võib langenud AK aktiivsust kompenseerida suurenenud CK aktiivsus. (Dzeja & Terzic, 2003)

2. Materjal ja metoodika

Katsetes kasutati Wistari liini rottide südamekudet ja eraldatud kardiomüotsüüte. Loomi kasvatati püsival temperatuuril (22 °C) vastavalt 12:12 tunni valguse ja pimeduse režiimil ning standardsel toidul *ad libitum*. Loomkatseid viisid läbi selleks kvalifitseeritud isikud, katsed toimusid Põllumajandusministeeriumi loomkatsete eetikakomitee tingimustest lähtudes ja ministeeriumi väljastatud loa number 19, välja antud 09.12.2013, alusel. Ensüümaktiivsuste ja oksügraafiliste parameetrite analüüsiks kasutati eraldi isendeid ja proove töödeldi erinevalt. Ensüümaktiivsusteks kasutati rotte vanuserühmades 1 päev, 3 päeva, 7 päeva, 18 päeva, 30 päeva, täiskasvanu, 1 aasta, 1,5 aastat ja 2 aastat. Igast vanuserühmast analüüsiti 4-6 isendit, sugu eristamata. Oksügraafiaks kasutati rotte vanuserühmades 1 aasta, 1,5 aastat ja 2 aastat. Igast vanuserühmast ja mõlemast soost analüüsiti 5-6 isendit.

2.1. Proovimaterjali ettevalmistus

Ensüümaktiivsuste määramiseks kasutati roti südamekoe lüsaati. Pärast roti surmamist süda eemaldati ning külmutati koheselt vedelas lämmastikus. Materjali hoiti kasutamiseni temperatuuril -80 °C. Katsete läbiviimise ajal hoiti materjali +4 °C juures. Esimese etapina peenestati proov uhmerdades vedelas lämmastikus. Pulbrit kaaluti prooviks 50–100 milligrammi, täpne märgkaal fikseeriti. Materjal võeti üles lüüsilahuses, mille koostisse kuulusid 20mM Tris-HCl, pH=8,1, 20mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 900mM KCl, 10mM EDTA- Na_2 , 10mM glükoos ja 0,25% Triton-X.

Lüüsilahuses olev materjal jahvatati jahvatuskuulikestega seadmes *Retch MM 100 mill*, sagedusel 25 Hz, 1 minut. Seejärel eemaldati kuulikesed ja tsentrifuugiti lüsaati +4 °C temperatuuril, 11900 g juures 10 minutit. Lüsaadi supernatant eraldati uude eppendorffi ensüümaktiivsuste määramiseks. Ensüümaktiivsused määrati puhtast lüsaadist kas kohe, või säilitati -20 °C juures ning analüüsiti järgneva 24 tunni jooksul. Proovst eraldati 100–200 µl materjali hilisemaks valgu kontsentratsiooni määramiseks ning seda säilitati sügavkülmas -20 °C juures.

Oksügraafia jaoks kasutati permeabiliseeritud kardiomyotsüüte, mille eraldamine toimus sarnaselt varem kasutatud metoodikale (Saks et al., 1991). Lühidalt pärast roti surmamist süda eemaldati ning ühendati perfusioonisüsteemiga, kus südamest juhiti läbi kollagenaasilahus (Collagenase B, Roche, 1,2 mg/mL). Pärast töötlust kojad eemaldati ja saadud pehmet kude töödeldi pipetiga ning saadud rakud filtreeriti läbi nailonvõrgu. Rakud viidi lahusesse Mitomedium B ja nende kuju ja eeldatavat funktsionaalsust hinnati valgusmikroskoobis.

Enne eksperimentide algust kontrolliti rakkude kvaliteeti oksügraafiliselt. Nende hapnikutarvet stimuleeriti 2 mM ADP lisamisega (V_{ADP}). Seejärel lisati 8 μ M cyt C, et kontrollida mitokondri välismembraani funktsionaalsust. Kahjustatud välismembraani korral on cyt C võimeline seda läbima. Endogeenne Cyt C on mitokondrist väljunud ja eksogeenselt lisatav cyt C asendab seda. Seega tõstab kahjustunud mitokondriga rakkudele cyt C lisamine hingamiskiirus. Tervete mitokondrite puhul jääb hingamiskiirus pärast cyt C lisamist V_{ADP} tasemele. Edasistes katsetes kasutati ainult kvaliteedikontrolli läbinud rakke.

2.2. Ensüümaktiivsuse määramine

Ensüümaktiivsust analüüsiti lüsaadi supernatandist kineetilise meetodi abil spektrofotomeetril Cary 100 (Varian), 25 °C juures. Igast proovist määrati kolme ensüümi, HK, CK ja AK aktiivsused. Aktiivsused esitati aktiivsuseühikutena, kus üks aktiivsuseühik katalüüsib 25 °C ja ensüümi optimaalse pH juures 1 μ mol substraati minutis. Iga ensüümi aktiivsust mõõdeti igast proovist vähemalt kolmes korduses. Kordustel kasutati vähemalt kahte erinevat lahjendust, et vältida süsteemsete vigade tõenäosust.

Analüüsimiseks pipeteeriti proovid vastavasse reaktsioonisegusse. HK määramiseks kasutati reaktsioonisegu A (42 mM Tris-HCl, pH=8,5, 7,7 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 45 mM KCl, 0,5 mM EDTA- Na_2 , 1 mM NaH_2PO_4 , 6,7 mM MgATP, 4,2 mM glükoos, 460 nM β -NADP). CK määramiseks kasutati reaktsioonisegu B (50 mM HEPES, pH=7,1, 5 mM Mg-atsetaat, 100 mM KCl, 0,5 mM EGTA, 1,2 mM ADP, 0,08 mM Ap5a, 340 U/mL HK, 170 U/mL G6PDH, 0,5 mM DTT, 20 mM glükoos, 0,6 mM β -NADP). AK määramiseks kasutati reaktsioonisegu C (20 mM HEPES, pH=7,5, 4 mM Mg-atsetaat, 100 mM KCl, 1 mM EDTA- Na_2 , 340 U/mL

HK, 170 U/mL G6PDH, 1 mM DTT, 20 mM glükoos, 2 mM β -NADP). Esmalt nulliti analüsaator reaktsioonisegu järgi. Teiseks lisati proov ja mõõdeti taust-aktiivsust, mis oli nullilähedane. Kolmandaks käivitati reaktsioon, lisades A, B või C reaktsioonisegule starterina vastavalt 1 U/mL G6PDH, 20 mM PCr või 2 mM ADP.

Toimuva reaktsioonide jada kiirust limiteeriv samm oli analüüsitava ensüümi aktiivsus. Mõõdetav kiirus oli reaktsioon kromogeeni NADP redutseerimine kromofooriks NADPH⁺. Kromofoori absorptsiooni mõõdeti 340 nm juures ning selle tõusu jälgiti ekraanil jooksvalt. Tõusust valiti lineaarne osa, mille järgi arvutati absorptsiooni muutuse kiirus ühes minutis ($\Delta A_{340}/\text{min}$), võttes arvesse proovi kontsentratsioon. Lõpptulemusena arvutati aktiivsuseühikud nii märgkaalu kui valgu massi kohta lähtudes valemist:

$$\text{Aktiivsuseühik milligrammi kohta} = \frac{\frac{\Delta A_{340nm}}{\text{min}}}{6,22 * \text{mass} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

2.3. Oksügraafia

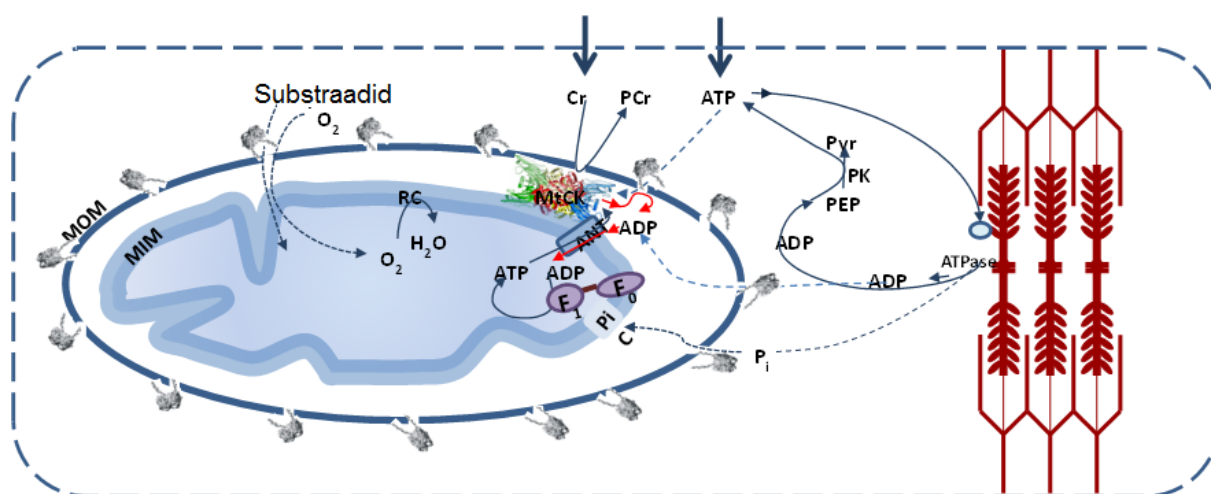
Analüüsimiseks kasutati suure lahutusvõimega oksügraafi Oroboros-2K (Oroboros Instruments). Proovid analüüsiti oksügraafi suletud kambris, milles mõõdeti Clarki elektroodiga hapniku kontsentratsioon ja arvutati selle muutus ajas (hapniku tarbimise kiirus). Kambris oli magnetsegaja, mis töötas kiirusega 300 pööret minutis. Rakud permeabiliseeriti saponiini lisamisega (25 mg/ml). Saponiin lagundab kolesteroolirikkad rakumembraani osad, kuid jätab kahjustamata raku struktuuri ja organellide membraanid (Kuznetsov et al., 2008). See tagab lahusesse lisatud substraatide ja reagentide vaba pääsu tsütosooli ja võimaldab täpselt kontrollida rakusisest lahustunud keskkonda. Analüüsid viidi läbi 25 °C juures. Hapnikutarbe kiirust väljendati kujul nmolO₂/min/mg valgu kohta.

Lahusena kasutati Mitomedium B lahust (Kuznetsov et al., 2008), milles substraatidena oli lisatud glutamaati (5 mM) ja malaati (2 mM). Esmalt küllastati kambris olev lahus hapnikuga, hoides kambrit avatuna. Seejärel lisati sinna rakud, kambris suleti ning lisati saponiin.

Et eristada mittespetsiifilist hapnikutarvet lisatud substraatide mõjul tekkinud hapnikutarbest, mõõdeti selles faasis ka baashingamine, V_0 . Seejärel viidi läbi analüüsid vastavalt protokollile. Iga substraadi lisamise järel oodati hingamiskiiruse stabiliseerumiseni ning registreeriti vastav väärtus.

ADP mõju hindamiseks süstiti kambrisse sammhaaval ADP lahust, saades lõppkontsentratsioonid vahemikus 50 μM – 2 mM. Fikseeriti hapnikutarbe väärtused erinevate kontsentratsiooniga. Mõõtmistulemustest arvutati $V_{\max}$ küllstava ADP kogusega ja näiline Michaelis Menteni konstant (K_m) eksogeense ADP suhtes.

Cr aktivatsiooni hindamiseks kasutati protokoll, mis on välja töötatud R. Guzuni poolt (Guzun et al., 2011). Kambrisse lisati 2 mM ATP, mis aktiveeris ATPaase, tekkiv ADP käivitas mitokondriaalse hingamise. Järgnevalt lisati 10 IU/mL PK (5mM PEP oli lisatud koos substraatidega). Antud PK-PEP süsteem regenereeris endogeense vabalt difundeeriva ADP, välistades selle mõju mitokondrile (joonis 6). Seega registreeriti järgnevalt ainult see hapnikutarve, mis lähtub mitokondris sees ringlevast ADP-st ja rakendub ATP tootmiseks. Seejärel aktiveeriti mtCK kaudu CK süsteem, lisades kambrisse 10mM Cr ja fikseeriti vastav hapniku tarbimise kiirus.



Joonis 6: PK/PEP süsteem. Joonisel: PEP – fosfoenoolpüruvaat. Pyr – püruvaat. PK – püruvaatkinaas. MIM – mitokondri sisemembraan. MOM – mitokondri välismembraan. Cr – kreatiin. PCr – fosfokreatiin. ANT – adeniinnukleotiidi translokaas. ATPaaside poolt toodetud tsütosoolne ADP regenereeritakse ATP-ks. (Rita Guzun et al., 2009)

AMP võimet aktiveerida OxPhos mõõdeti nii üldaktiivsuseks kui eraldi kahe isovormi, tsütosoolse AK1 ja mitokondriaalse AK2 aktiivsustena. ATP-aasid aktiveeriti 2mM ATP-ga. Lisati 2 mM AMP ning mõõdeti selle mõju raku hingamisele. Saadud hingamiskiirus näitab AK üldaktiivsust. Seejärel pipeteeriti kambrisse PK, aktiveerides PK/PEP süsteemi ja regenereerides endogeense ADP. Järgi jäi hingamiskiirus oli see, mida vahendas vaid AK2, mitokondriaalne isovorm. Viimasena lisati P1,P5-Di(adenosiin-5') pentafosfaat (Ap5a), mis on AK inhibiitor.

Glükoosi aktivatsioon näitab glükolüütilise süsteemi otsest aktiveerivat mõju OxPhos-le. Rakkudele lisati 2 mM ATP, et aktiveerida ATPaase ja toota väikeses koguses ADP-d. Seejärel süstiti kambrisse 10mM glükoosi ning regustreeriti sellejärgne hapnikutarve. Edasi süstiti küllastavas koguses (2 mM) ADP, saades maksimaalne ADP-ga saavutatav hingamiskiirus (V_{ADP}). Glükoosi aktivatsioon arvutati protsendina glükoosi lisamise järgse ja V_{ADP} suhtest.

2.4. Valgu kontsentratsiooni määramine

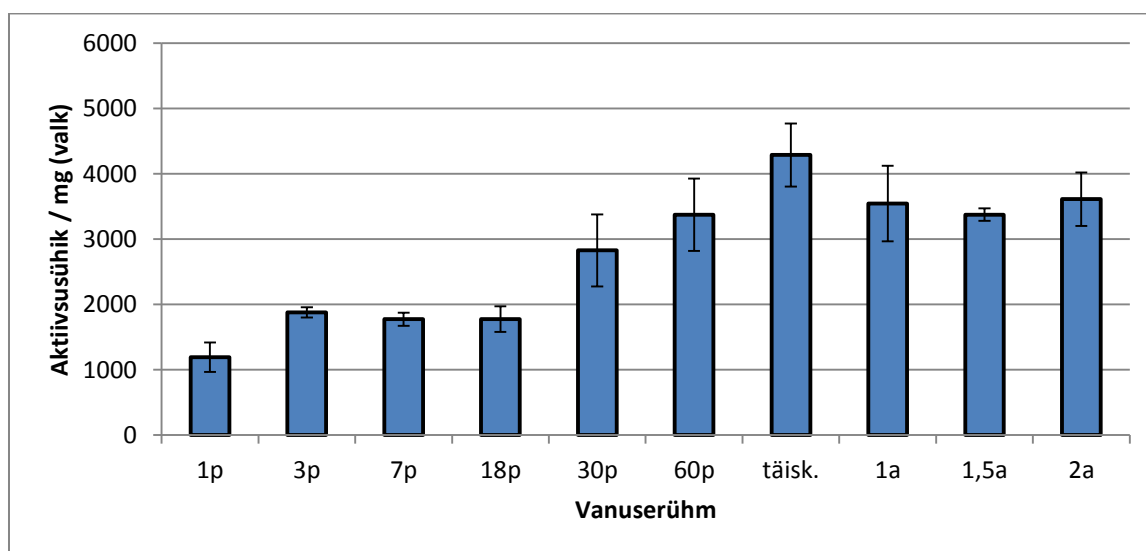
Valgu sisaldus lüsaadis määrati kasutades Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit-i, mis kasutab biureedireaktsiooni ja bikinkoniinhapet (BCA). Aluselises keskkonnas redutseeritakse Cu^{2+} valgu poolt Cu^{1+} -ks (biureetreaktsioon). Cu^{1+} tuvastatakse ja kvantifitseeritakse kolorimeetriliselt, kasutades BCA-d: kaks BCA molekuli kelaadivad ühe Cu^{1+} molekuli, tootes vesilahustuvat violetset produkti, millel on tugev absorptsioon 562 nm lainepikkusel. Spektrofotomeetriga mõõdetav absorptsioon on lineaarne valgukontsentratsiooniga vahemikus 20–2000 mg/L. (Thermo Scientific, 2014)

Proovile lisati 0,5% SDS lahust ja kuumutati seejärel 25 minutit 90 °C juures. Materjal tsentrifuugiti 2 minutit 10 000 g. Proovid pipeteeriti mikroplaadile vähemalt kahes lahjenduses, vahemikus 1:20-1:40. Samale plaadile pipeteeriti ka standardite rida. Standardite reaks kasutati BSA (ingl k *bovine serum albumin*) valku, millest tehti 8 lahjendust vahemikus 0-1000 mg/L. Reaktsiooni käivitamiseks hoiti proove 30 sekundit 60 °C juures. Jahtunud proovid mõõdeti spektrofotomeetril.

3. Tulemused

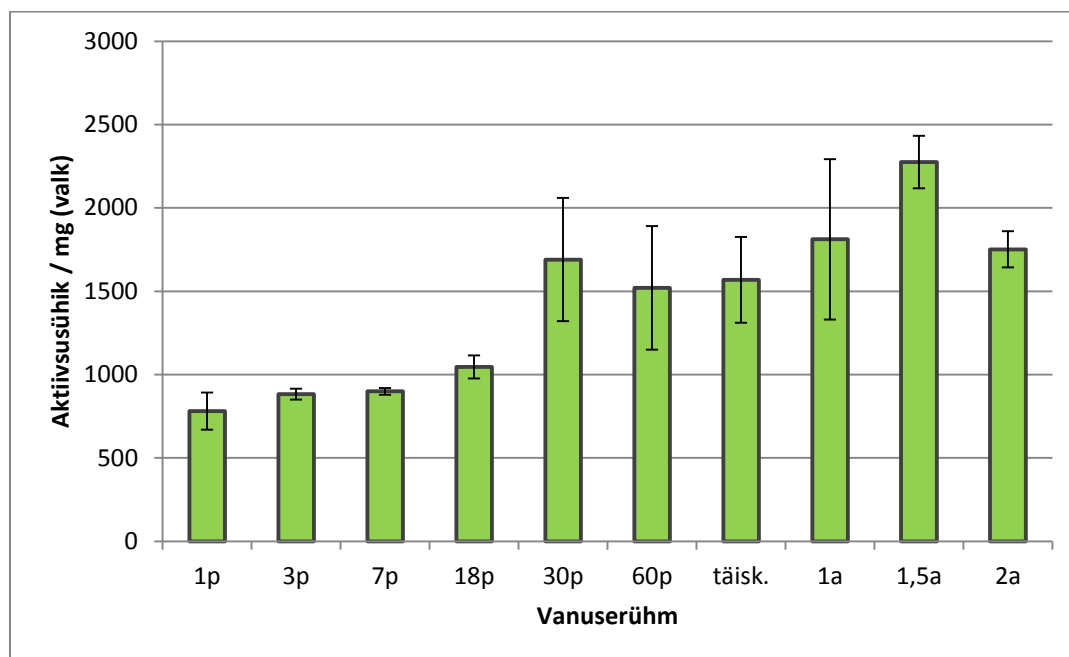
Ensüümaktiivsuseid mõõdeti kolmel energia transpordis olulisel ensüümil: HK, CK ja AK. Tulemused saadi aktiivsusiühikutes milligrammi valgu kohta. Hingamise kineetika parameetritest mõõdeti $V_{\max}$ (teoreetiline), $K_m(\text{ADP})$ ning Cr, AMP ja glükoosi aktivatsiooni koefitsiendid. Tulemused saadi hapniku tarbimise kiirusena, normeeritud valgule: nmol $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ (valk).

CK süsteem on südamelihase kõige olulisem ülekanderada. Mõõdetud CK aktiivsustest (joonis 7) ilmneb, et selle aktiivsus tõuseb oluliselt esiteks esimeste sünnijärgsete päevade jooksul 1100 ühikust 1800-ni ja püsib sel tasemel mitmenädalase arengu jooksul. Järgneb teine aktiivsuse tõus ühe kuu vanuselt, mis kestab kuni maksimaalse, täiskasvanuga võrdse taseme saavutamiseni (4300 ühikut) 3 kuu vanuselt. Vananemisega kaasneb nähtav CK aktiivsuse langus (3500 ühikut) üheaastaselt rotil. Samas, edasine langus ei ole pidev vaid püsib 1,5-2 aasta vanusel rotil orienteeruvalt samal tasemel. Need tulemused langevad kokku varasemate ja selle uurimuse käigus toimunud oksügraafiliste mõõtmistega, näidates CK-ülekandevõrgustiku süsteemi muutuseid ja tõestades ensüümaktiivsuse seotust CK süsteemiga.



Joonis 7. Kreatiinkinaasi aktiivsused roti südamekoest. Igast vanuserühmast on esitatud 4-6 isendi aritmeetiline keskmine. Usalduspiirid on esitatud standardveana.

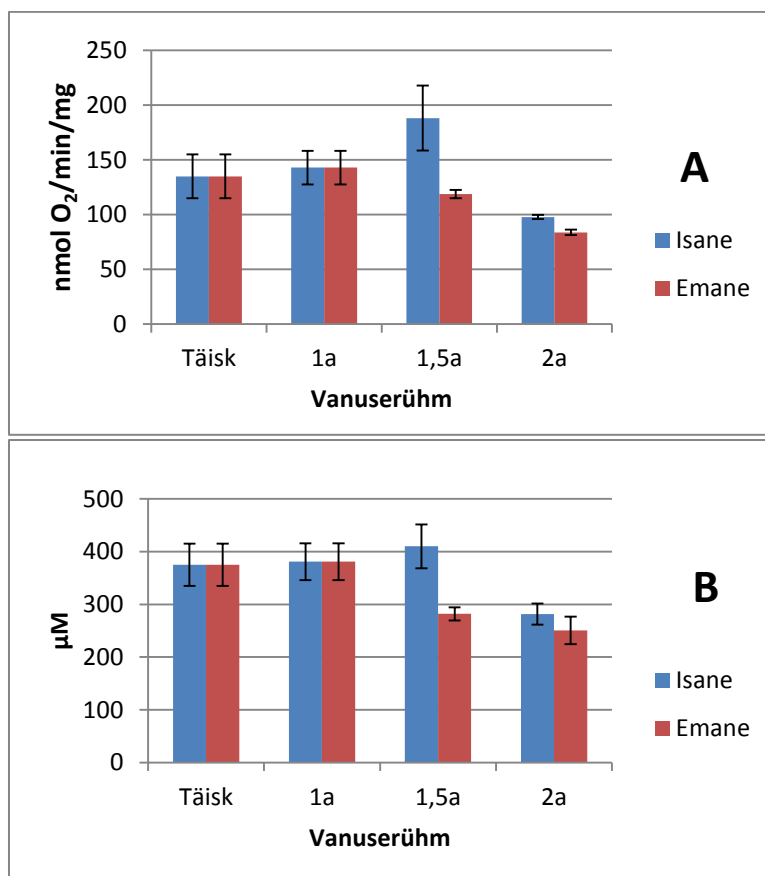
Lisaks mõõdeti teise, AK süsteemi hindamiseks AK ensüümaktiivsuseid roti erinevatel arenguetappidel (joonis 8). Sünnijärgselt tõuseb AK aktiivsus marginaalselt, püsides 1000 ühiku lähedal. AK aktiivsus hakkab nähtavalt suurenema 1 kuu vanuselt, orienteeruvalt samal ajal, kui teine CK aktiivsuse tõus ilmneb. AK aktiivsuses ei ilmne edasist järsku tõusu, nagu võib täheldada CK korral. Seevastu AK aktiivsus vananemise käigus oluliselt ei lange, täheldada võib isegi teatud kasvu üle 2000 ühiku, mis küll ei ole statistiliselt oluline.



Joonis 8: Adenülaatkinaasi aktiivsused roti südamekoest. Igast vanuserühmast on esitatud 4-6 isendi aritmeetiline keskmine. Usalduspiirid on esitatud standardveana.

HK aktiivsus näitab glükolüütilise süsteemi aktiivsust, kuna katalüüsib glükolüüsi esimest sammu. Glükolüüsil põhinev energiametabolism on prevaleeriv enne sündi. Sünnijärgselt toimub ümberlülitus aeroobsele ainevahetusele (Yang et al., 2014) ja seega oleks oodatav HK aktiivsuse langus. Suurenenud HK ekspressioon on pigem seotud selliste patoloogiliste muutustega, mis esinevad sagedamini vanemas eas (Roosimaa et al., 2013). Tulemustest selgub, et normaalse arengu ja vananemise käigus püsib HK aktiivsus sarnasel tasemel (100 ühikut) näiliselt oluliste muutusteta kogu elu vältel.

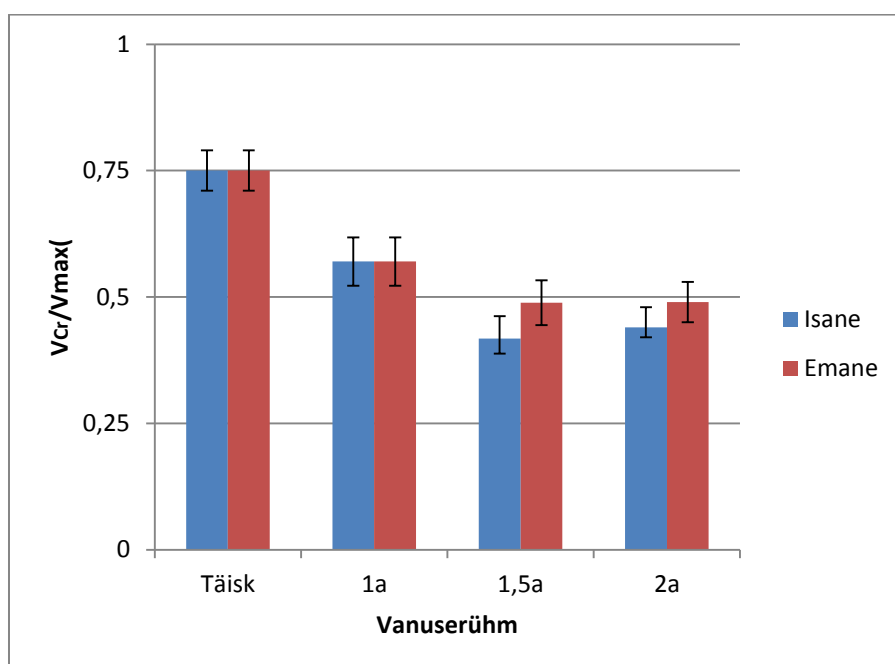
Oksügraafilised eksogeense ADP kineetikat mõõtvad analüüsid sooritati, lisades kambrisse ADP-d. ADP kontsentratsiooni tõsteti astmeliselt, kuni küllastumiseni. Hingamiskiirus fikseeriti erinevate kontsentratsioonide juures ning tulemustest saadi Michaelis-Menteni kineetika reaktsioonikõver. Tundlikkuse määramiseks arvutati näilised $K_m(\text{ADP})$ väärtused, mis näitavad mitokondri afiinsust ADP-le. Lisaks K_m väärtusele arvutati ka $V_{\max}(\text{ADP})$. See arvutati reaktsioonikõverast tuleneva teoreetilise maksimaalse kiirusena, mida ADP-ga stimuleerides on võimalik saavutada. Üheaastaste ja täiskasvanud rottide puhul langesid K_m ja $V_{\max}$ väärtused emastel ja isastel kokku (joonis 9). Huvitav on, et emasel rotil langeb hingamiskiirus 1,5 aastal vanuselt samas, kui isasel algab langus alles kaheaastaselt ehk vanana. Sarnased erinevused kajastuvad ka näilises K_m väärtustes, mis tõuseb isasel rotil üle 400 μM ning langeb 2a peal järsult 280 μM peale. Emasel langeb näiline K_m 180 μM peale juba 1,5a ja langeb edasi 150 μM peale.



Joonis 9a: Roti kardiomüotsüüdi $V_{\max}$. Igast vanuserühmast ja mõlemast soost on esitatud 5-6 isendi aritmeetiline keskmine. Usalduspiirid on esitatud standardveana. Täiskasvanu väärtused on võetud eelnevast tööst (Timohhina et al., 2009).

Joonis 9b: Roti kardiomüotsüüdi $K_m(\text{ADP})$. Igast vanuserühmast ja mõlemast soost on esitatud 5-6 isendi aritmeetiline keskmine. Usalduspiirid on esitatud standardveana. Täiskasvanu väärtused on võetud eelnevast tööst (Timohhina et al., 2009).

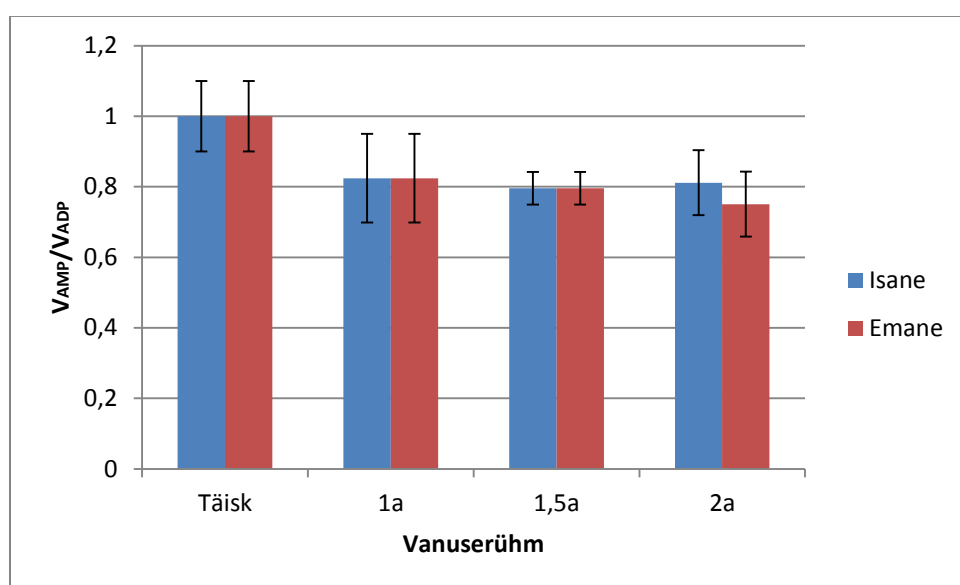
Mõõdeti ka Cr aktivatsioon keskkonnas, kus PK/PEP süsteem eemaldas raku tsütosoolis tekkiva ADP. Seetõttu saadi tulemuseks ainult Cr regulatoorne mõju mitokondrile (joonis 10). Aktivatsiooni koefitsient arvutati V_{Cr}/V_{max} kiiruste suhtena, kus V_{max} väärtus on arvutatud sama isendi K_m määramisest.



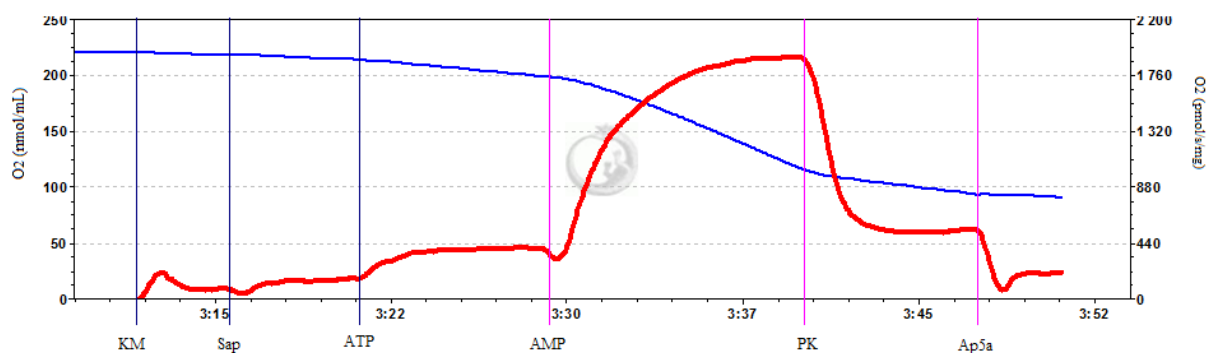
Joonis 10: Roti kardiomüotsüüdi kreatiini aktivatsiooni koefitsient, väljendatud V_{Cr}/V_{max} suhtena. Igast vanuserühmast ja mõlemast soost on esitatud 5-6 isendi aritmeetiline keskmine. Usalduspiirid on esitatud standardveana. Täiskasvanu väärtused on võetud eelnevast tööst (Timohhina et al., 2009).

Cr aktivatsioon langeb vananedes oluliselt. Kui täiskasvanul on Cr aktivatsiooni koefitsient 0,75, siis aasta vanusel rotil langeb see 0,57 peale ning sealt edasi 0,45 peale. Sarnaselt ensüümaktiivsustele on vananemisel näha funktsiooni langust, suurim langus ilmneb 1 aasta vanuses (keskealine rott) ja edasised muutused on väiksemad.

AK süsteemi osakaalu hindamiseks mõõdeti ka AMP võime aktiveerida OxPhos. Aktivatsiooni koefitsient arvutati V_{AMP}/V_{ADP} suhtena (joonis 11), kusjuures V_{ADP} oli mõõdetud sama eksperimendi käigus. Täiskasvanul on AMP aktivatsioon 1. Ilmnes, et keskealisel ehk üheaastasel rotil langes on väärtus langenud natuke, vaid 0,8 peale. Aktiivsus jäi sellele tasemele ka vanal rotil (2a). Isaste ja emaste tulemused olid sarnased, väike erinevus oli 2a vanustel, kus tulemused olid vastavalt 81% ja 75%. Tsütosoolis asuva AK1 ja mitokondriaalse AK2 aktivatsioonid mõõdeti ka eraldi (joonis 12). Nende omavaheline osakaal on kogu elu vältel sarnane, vastavalt 80% ja 20%.



Joonis 11. Roti kardiomiotsüüdi AMP-aktivatsiooni koefitsient, väljendatud V_{AMP}/V_{ADP} suhtena. Igast vanuserühmast ja mõlemast soost on esitatud 5-6 isendi aritmeetiline keskmine. Usalduspiirid on esitatud standardveana. Täiskasvanu väärtused on võetud eelnevast tööst (Timohhina et al., 2009).

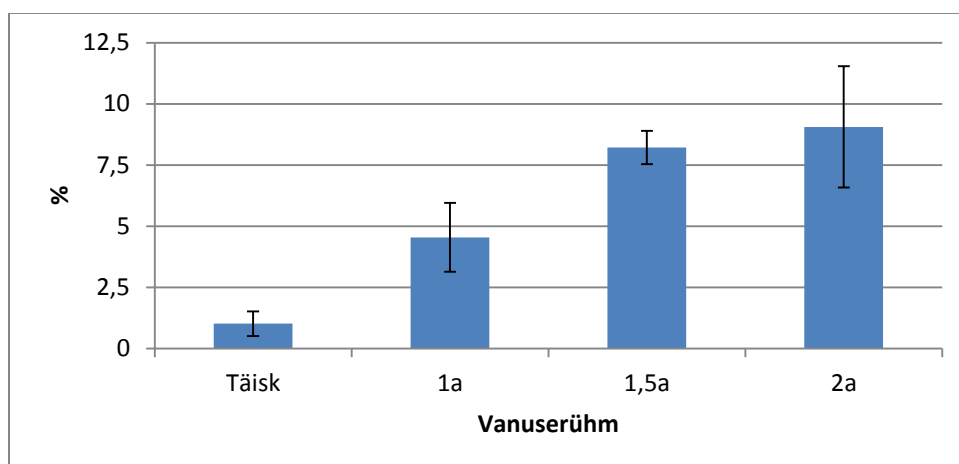


Joonis 12. Näidistulemus oksügraafia AMP aktivatsiooni mõõtmisest. Joonisel on sinisega näidatud hapniku kontsentratsioon (nmol/mL) ja punasega tarbimise kiirus (pmol/s/mg).

Glükolüütiline süsteem võib HK vahendusel otseselt stimuleerida OxPhos. Sel juhul on glükoosil mõõdetav mõju hingamiskiirusele. Katse käigus pipeteeriti kambrisse esmalt 2 mM ATP-d, et aktiveerida ATPaase ning toota väheses koguses ADP-d. Seejärel lisati kambrisse 10 mM glükoosi. Pärast glükoosi lisamise järgset hapnikutarbe fikseerimist lisati küllastav kogus ADP-d ning mõõdeti maksimaalset mõõdetavat hingamiskiirust. Glükoosi aktivatsiooni hindamiseks lahutati ATP indutseeritud hapniku tarbimise kiirus sellest, mis tekkis glükoosi lisamisel ning jagati hingamiskiirusega 2 mM ADP juuresolekul. Glükoosi aktivatsioon on väljendatud protsendina hapnikutarbe maksimaalsest ADP aktivatsioonist:

$$\text{Glükoosi aktivatsioon protsendina} = \frac{V(\text{glükoos}) - V(\text{ATP})}{V(\text{ADP})} * 100$$

Oksügraafilised analüüsid näitasid, et glükoosi võime aktiveerida OxPhos kasvab oluliselt roti vananedes. Täiskasvanud rotil on glükoosi aktivatsioon määramise piiril, jäädes alla 1%. Üheaastasel rotil tõuseb see 4,5% peale, 1,5 aastasel rotil 8,2% peale ja 2 aastasel rotil 9% peale, näidates glükolüütilise süsteemi mõju olulist suurenemist (joonis 13). See on olulisim muutus, kui võtta arvesse glükoosi aktivatsiooni sisulist puudumist täiskasvanul.



Joonis 13. Roti kardiomüotsüüdi glükoosi aktivatsioon, väljendatud protsentuaalse suhtena glükoosist tingitud hapnikutarbe ($V_{\text{glu}} - V_{\text{ATP}}$) ja V_{ADP} vahel. Igast vanuserühmast on esitatud 5-6 isendi aritmeetiline keskmine. Usalduspiirid on esitatud standardveana. Täiskasvanu väärtused on võetud eelnevast tööst (Timohhina et al., 2009).

4. Arutelu

Töö eesmärk oli hinnata mitokondri ja ATPaaside vahelise ülekandevõrgustikuga seotud ülekandesüsteemide ensüümide aktiivsust ja mõju mitokondri hapniku tarbimise kiirusele, erinevatel vanuserühmadel. Uuringu tulemused kinnitavad, et vananemisel toimuvad südamelihase rakkude energiametabolismis olulised muutused.

Lisaks vananemisega seotud muutustele ilmnevad tulemustest erinevused ka emaste ja isaste vahel. Sellele viitavad selgelt $V_{\max}$ ja K_m väärtused ning vähemal määral AMP ning Cr aktivatsioon. Mõlemal sool toimuvad siiski degeneratiivsed muutused ning nende hapnikutarve aeglustub.

Südamelihases rakkudes on olulisemateks ülekande CK ja AK süsteemid (Dzeja & Terzic, 2003; Valdur Saks et al., 2010). Samal ajal on näidatud et patoloogiate korral, näiteks CK-negatiivsetel hiirtel, on teised rajad võimelised osaliselt kompenseerima CK puudumist. Samas on sel juhul täheldatud mitmeid morfoloogilisi muutusi ning vähenenud füüsilist võimekust. (Dzeja et al., 2004; Valdur Saks et al., 2010) Samuti on näidatud, et PCr sisalduse langus lihaskoes on otseselt seotud patsientide elulemusega. (Neubauer et al., 1997; Neubauer, 2007) On leitud, et CK isoensüümide sisaldus müokardiumis oli täiskasvanud ja vanadel rottidel sama, samas kui stressi tingimustes oli see vanadel võrreldes täiskasvanuga langenud (Davydov & Shvets, 1999).

Vananemise uuringutes esitatud muutused CK sisalduses ja CK süsteemi aktiivsuses on erinevad ja sõltuvad tihti uuritavast koest. Mitmetel juhtudel on registreeritud geeniekspressiooni mõõtmistel CK erinevate isoensüümide hulga vähenemine oksüdatiivses lihases. (Kayo et al., 2001; Wei et al., 2009) Teisalt on mõõdetud CK sarkomeerse vormi 3,8-kordne kasv mRNA ekspressioonis, samal ajal kui mitmete teiste mitokondriaalsete hingamisega seotud ensüümide sisaldus koes väheneb (Lee et al., 1999).

Töö tulemusena mõõdetud muutused CK ensüümaktiivsustes ja hingamisparameetrites on omavahel hästi seotud. Eelnevad roti südamerakkude oksügraafilised mõõtmised sünnijärgse

arengu perioodil on näidanud, et Cr võime OxPhos aktiveerida algab roti südamerakkude puhul 3. sünnijärgsest nädalast, samaaegselt difusioonitakistuse olulise suurenemisega, mis näitab mitokondriaalse hingamise regulatsiooni kiiruse arengut. (Anmann et al., 2014) Kreatiini aktivatsiooni kasv jätkub püsivalt kuni 3. elukuuni, mil see, samuti ka näiline $K_m(\text{ADP})$ saavutavad täiskasvanule iseloomuliku väärtuse. See näitab, et vahetult pärast sündi, esimeste elunädalate jooksul toimuvad rakus esmalt struktuurse paigutusega seotud muutused. Mitokondrite korrapärase paigutuse teke loob eelduse täiskasvanuga võrdse maksimaalse hingamiskiiruse $V_{\max}$ saavutamiseks. Sellele järgneb regulatoorne areng, mille väljenduseks on näilise $K_m(\text{ADP})$ ja Cr aktivatsiooni edasine kasv.

Käesolev töö näitab, et CK aktiivsus tõuseb vähesel määral esimestel sünnijärgsetel päevadel ning püsib seejärel 3-18 päeva vanuses platoona. Teine olulisem tõus ilmneb 1 kuu vanuselt, aktiivsus kasvab kiiresti mitu korda ning saavutab samuti maksimaalse taseme 3. elukuul. Esimene tõus CK aktiivsuses võib olla seotud sünnijärgsete muutustega, mis on seotud aeroobsele ainevahetusele üleminekuga. Western blot analüüsides on näha, et mtCK isovormi esinemine on registreeritav esimesel sünnijärgsel nädalal, kuid selle sisaldus on esialgu väike (Anmann et al., 2013). Samuti pole veel tekkinud funktsionaalselt toimivat MI. Teine CK aktiivsuse tõus kestab 1-3 kuu vanuselt, kinnitades, et MI teke langeb sellesse vanusevahemikku.

Vananemise käigus on tulemuste järgi üheaastaselt rotil (mida võib vastavalt Wistari roti elulemusgraafikule võtta keskealise mudelina) CK aktiivsus oluliselt vähenenud, samas statistiliselt olulist langust edaspidi ei järgne. Oksügraafilised mõõtmised näidavad samuti Cr aktivatsiooni olulist langust ühe aasta vanusel rotil, väiksemat langust 1,5 aasta vanuselt ning edasist olulist vähenemist 2 aasta vanusel rotil langust ei tuvastatud. Seega võib oletada, et CK süsteemis toimuvad muutused suhteliselt vara, samas säilitab MI oma funktsiooni ka vanemas eas.

On ka märkimisväärne et, ehkki see ei ole statistiliselt oluline, on 1,5 ja 2 aasta, kuid mitte 1 aasta vanustel rottidel isastel loomadel Cr aktivatsiooni langus näiliselt suurem. See erinevus võib katsete kordamisel osutada statistiliselt oluliseks, kuna langeb kokku erinevusega hingamiskiiruses, kus isastel $K_m(\text{ADP})$ väärtus kasvab või jääb samale tasemele ja

maksimaalne hingamiskiirus vastab pigem Km väärtusele. See langeb kokku uuringutulemustega ja rõhutab fakti, et laialt levinud tava kasutada uuringutes isasloomi ning laiendada saadud tulemused mõlema soo peale ei pruugi anda tõeseid tulemusi, eriti vananemise uuringutes.

AK süsteem areneb ühtlasemalt kui CK süsteem. Aktiivsuse kiirem tõus on näha 1 kuu vanuselt, korreleerudes CK süsteemi hüppelise kasvuga. See on arenguperiood, kus südamerakk on struktuurselt formeerunud ja koos füüsilise aktiivsuse kasvuga ning roti kehamassi järsu suurenemisega (Anmann et al., 2014) toimub muutus ka toitumises (võõrutusperiood). Kõik see mõjutab ka südameraku energiametabolismi funktsionaalset küpsemist, mis lõpeb MI moodustumisega 3. kuu lõpuks.

Samal ajal kui CK aktiivsuses toimub teine oluline tõus pärast 1 kuud, säilitab AK 1. kuuks säilitatud aktiivsuse, jäädes ka täiskasvanuks saades samale tasemele. Vananedes AK aktiivsuses olulist muutust ei registreeritud. Oksügraafiliste mõõtmiste tulemusena (joonis 11) ilmnes, et üheaastase roti südamelihase rakkudes on registreeritav langus AMP aktivatsioonis. Samas on see oluliselt väiksem kui Cr aktivatsioonis (18% täiskasvanu omast, võrreldes 24% Cr puhul). Vananemise järgnevatel etappidel jäi AMP-i aktiveeriv mõju samale tasemele. Vaadeldes AK aktiivsusi, võib vananemisel täheldada isegi väikest tõusu. On võimalik, et intensiivistub AK ülekande radade kaudu energia ATPaasideni transport samas, kui selle võime mitokondrit aktiveerida väheneb natuke. Antud tulemused viitavad, et AK süsteem saavutab küpsuse varem ja säilitab oma võimekuse paremini ka vanemas eas. Antud tulemused viitavad, et kuigi CK süsteem ja sellega seotud MI on valdavaks energia ülekande südamelihases on AK roll oluline südamelihase rakkude kujunemise perioodil, aga samuti vananemise käigus, kus ta võib kompenseerida CK süsteemi vähenenud võimekust.

HK aktiivsuse olulist tõusu on seostatud patoloogiatega, eriti vähi ja sellega seotud nn aeroobse glükolüüsi ehk Warburgi efektiga. See on seostatud HK kinnitumisega mitokondri välismembraanis asuva VDAC kanaliga, mille tulemusena saab ta eelistatud juurdepääsu mitokondris toodetavale ATP-le. (Pedersen, 2007; Pedersen, 2008). Vananemise käigus on täheldatud glükolüüsi olulisuse kasvu (McMillin et al, 1993), samas ka glükoosi kui substraadi osakaalu tõusu, võrreldes täiskasvanud südamerakkudega (Kates et al., 2003). On

ka uuringuid, mis ei täheldanud olulisi muutusi glükoosi kasutamises skeletilihases (Sample et al., 2006). Ei ole selget seisukohta, kas nn terve vananemise käigus on tegemist patoloogia ilminguga või kompensatoorse muutusega, tagamaks südamelihase efektiivsemat tööd.(Sabbaha & Stanley, 2002)

Glükoosi aktivatsiooni tulemused näitavad, et täiskasvanud südamerakkudes on glükoosi aktiveeriv mõju mitokondriaalsele hingamisele marginaalne. Oluline kasv ilmneb vananemisel – muutus on nii täiskasvanu ja üheaasta roti kui ka 1a ja 1,5a roti vahel. Samas püsib HK aktiivsus kogu elu vältel samal tasemel. HK aktiivsuse stabiilsus võib viidata energiaühikute süsteemi kahjustusega seostuvate patoloogiliste muutuste puudumisele. On võimalik, et HK aktiivsuse mõõtmiste abil oleks võimalik eristada patoloogilisi ja füsioloogilisi, vananemisest tingitud muutuseid.

Sünnijärgsel perioodil toimub kiire ümberlülitus sünnieelselt glükolüütiliselt ainevahetuselt aeroobseks mitokondriaalseks OxPhos-ks, samas kui vananemisel on täheldatud glükolüütilise ainevahetuse positiivset mõju vananevas lihases. Töö tulemused kinnitavad samuti glükolüüsi olulisuse tõusu südamerakkude bioenergeetikas vananemise käigus.

Uuringu tulemustest võib järeldada, et CK aktiveerumine on viimane etapp funktsionaalse, täiskasvanud südameraku bioenergeetika arengus. Samas on CK süsteem ka esimene, mis näitab vananemisel taandarengu märke. AK süsteem saavutab täiskasvanud rakule vastava taseme varem, olles nii kompensatoorseks rajaks CK arenemise ajal kui hiljem, vananemise käigus. Antud tulemused viitavad, et südamelihase töövõime säilitamiseks ka vanemas eas oleks vajalik uurida võimalusi CK raja võimekuse säilitamiseks ka vanemas eas. On andmeid Cr transporterite aktiveerimise positiivsest mõjust patoloogiate korral (Neubauer, 2007; Lygate et al., 2012), samas kui Cr manustamine annab vaid lühiajalist efekti. Analoogiline mõju vananemise korral vajab veel täiendavaid uuringuid.

Kokkuvõte

Südamerakkude energia ülekandevõrgustikuga seotud muutuseid rottide südames uuriti nii sünnijärgsel arengul kui vananemise mudelil. Sünnijärgselt toimuvad südameraku energiametabolismis olulised muutused, mis kajastusid tulemustes ja sobivad kokku sama uurimisrühma eelneva tööga (Anmann et al., 2013). Vananemise käigus on näha olulisemaid muutusi CK süsteemis ja glükoosi aktivatsiooni suurenemist ilma üldise HK aktiivsuse kasvuta. Võib väita, et nii ensüümide aktiivsus kui nende mõju mitokondri hapnikutarbimise kiirusele on erinevatel vanuserühmadel kaardistatud.

Töös mõõdeti kolme ensüümi aktiivsust. Heksokinaasi aktiivsus püsib elu vältel sarnasena. Kreatiinkinaasi aktiivsus tõuseb kergelt sünnijärgselt ning järgnev oluline tõus on vanusevahemikus 1-3 kuud. Ensüümi aktiivsus vananedes langeb, kusjuures oluliseim langus on 1a vanuses. Adenülaatkinaasi aktiivsus on kreatiinkinaasi omast regulaarselt madalam, tõustes sünnijärgselt kergelt. Suurim kasv toimub 1. elukuul, aktiivsus vananemisel oluliselt ei lange.

Oksügraafiliselt mõõdetud kreatiini aktivatsiooni koefitsient näitas vananemisel langust, langedes kokku ensüümaktiivsusetel määramisel saadud mustriga. AMP aktivatsioon näitab AK süsteemi aktiivsuse langust vananemisel, kuid antud langus oli oluliselt väiksem võrreldes Cr aktivatsiooni langusega. Kui AMP ja Cr aktivatsioon vähenesid erineval määral, siis glükoosi aktivatsioon tõusis samal ajal vananedes oluliselt.

Sünnijärgse arengu kohta saadud info kinnitas eelneval uuringul saadud tulemusi. CK ja AK ensüümide aktiivsused tõusid ootuspäraselt kergelt kuid selgelt esimeste sünnijärgsete päevade jooksul, mil toimub aeroobsele ainevahetusele üleminek. Need saavutasid aga kiiresti platoo ja ka heksokinaasi aktiivsus jäi muutumatuks. Energiaülekande võrgustiku areng kajastus ka ensüümaktiivsustes ootuspäraselt.

Vananemisel toimuvatest muutustest on oluline, et samal ajal kui kreatiinkinaasi süsteem on viimane osa täiskasvanud südameraku toimivast energeetilisest ühsusest, mis saavutab oma

täieliku aktiivsuse, taandareneb just selle süsteemi võimekus esmajärjekorras. See tähendab, et esmased vananemise ilmingud südamelihase energetikas on seotud just kreatiinkinaasi süsteemiga. Samas võib väita, et kuigi toimub oluline võimekuse langus, jääb see ülekandesüsteem siiski elu lõpuni prevaleerivaks, olles adenülaatkinaasist kõrgema aktiivsusega. Märkimisväärne on ka see, et langus on ühekordne, st saavutatakse platoo, millest madalamale CK aktiivsus ega Cr aktivatsioon normaalsel vananemisel ei lange.

Vananemisel toimuvad reaktsioonina kreatiinkinaasi süsteemi degeneratsioonile ka kompensatoorsed asendused. Adenülaatkinaasi kompensatoorne mõju avaldub kahes aspektis. Esiteks ilmnes kerge tõus ensüümaktiivsuses, mis oli küll statistiliselt ebaoluline. Teiseks tõuseb ka AMP aktivatsiooni väikese languse puhul selle tegelik tähtsus, kui võrrelda seda Cr aktivatsiooni olulise langusega. Ilmnes ka glükolüütilise süsteemi suurenenud võime indutseerida oksüdatiivset fosforüülimist.

Summary

Aivar Uus, „Developmental and age-related changes of myocardial phosphotrasfer network profiles“

The purpose of this paper is to determine the changes in the profile of phospotransfer pathways, from the postnatal period until senescence. For this, the activity of enzymes hexokinase, creatine kinase and adenylate kinase were measured spectrophotomerically as well as kietic respiratory parameters of permeabilized cardiomyocytes were measured with a high-resolution oxygraph. The respiratory parameters were $K_m(\text{ADP})$ with and without creatine, resporatory chain activities, creatine activation coefficient, AMP-effect and glucose efect.

An increase in both CK and AK was detected in the first few postnatal days. At 1 month, the activity of AK reaches adult level while the activity of CK keeps rising until it reaches adult level at 3 months. At midage (1 year), the activity of CK-system decreased markedly as evidenced by both decreased creatine activation of OxPhos and CK activity. Both stayed on a constant plato until old age. The AK activity does not decrease during ageing and AMP activation of OxPhos decreases only by 20%, markedly less than the change in Cr activation. The glucose activation of OxPhos increases with senescence, reaching 9% in old age (2 years). During senescence, both the AK and the glycolytic system obtain compensatory role. The results can be used to produce markers for energy-related disorders of the heart muscle.

Keywords: bioenergetics, intracellular energetic unit, cardiomyocyte, development, ageing, mitochondria

Allikate loetelu

- Anmann, T., Varikmaa, M., Tepp, K., Timohhina, N., Ševtšuk, I., Tšekulajev, V., ... Käämbre, T. (2013). Südamerakkude sünnijärgse arengu bioenergeetilised aspektid: struktuuri ja funktsiooni vaheliste seoste väljakujunemine. *Eesti Arst*, 92(7), 372–381.
- Anmann, T., Varikmaa, M., Timohhina, N., Tepp, K., Shevchuk, I., Chekulayev, V., ... Kaambre, T. (2014). Formation of highly organized intracellular structure and energy metabolism in cardiac muscle cells during postnatal development of rat heart. *Biochim Biophys Acta*, 1837(8), 1350–1361.
- Appaix, F., Kuznetsov, A. V., Usson, Y., Kay, L., Andrienko, T., Olivares, J., ... Saks, V. (2003). Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Experimental Physiology*, 88(1), 175–90. Retrieved from
- Artner, J. (2002). *Atlas of Human Skeletal Anatomy*.
- Balaban, R. S., Gray, M., Cavalier-Smith, T., Mootha, V., Arai, A., Balaban, R., ... Mottino, G. (2002). Cardiac Energy Metabolism Homeostasis: Role of Cytosolic Calcium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(10), 1259–1271.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2012). *Biochemistry* (7th ed.).
- Cha, Y.-M., Dzeja, P. P., Shen, W. K., Jahangir, A., Hart, C. Y. T., Terzic, A., ... Zipes, D. (2003). Failing atrial myocardium: energetic deficits accompany structural remodeling and electrical instability. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 284(4), H1313–20.
- Chen Chen, Y. K. D. J. L. C. L. P. (2004). Mitochondrial ATP Synthasome. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31761–31768.
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: CENTRAL ROLE OF COMPLEX III. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36027–36031.
- Davydov, V. V., & Shvets, V. N. (1999). Different changes in the cytosole creatine kinase isoenzymes from heart of adult and old rats during stress. *Experimental Gerontology* (Vol. 34).
- Dhalla, N. S., & Duhamel, T. A. (n.d.). The paradoxes of reperfusion in the ischemic heart.
- Dzeja, P. P., & Terzic, A. (2003). Phosphotransfer networks and cellular energetics. *The Journal of Experimental Biology*, 206, 2039–2047.
- Dzeja, P. P., Terzic, A., & Wieringa, B. (2004). Phosphotransfer dynamics in skeletal muscle from creatine kinase gene-deleted mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 256-257(1-2), 13–27.
- Dzeja, P., & Terzic, A. (2009). Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(4), 1729–1772.
- Enríquez, J. A. (2015). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annual Review of Physiology*, 78(1), annurev-physiol-021115-105031.
- Gerbitz, K. D., Gempel, K., & Brdiczka, D. (1996). Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes*, 45(2),

- Guzun, R., Timohhina, N., Tepp, K., Gonzalez-Granillo, M., Shevchuk, I., Chekulayev, V., ... Saks, V. A. (2011). Systems bioenergetics of creatine kinase networks: physiological roles of creatine and phosphocreatine in regulation of cardiac cell function. *Amino Acids*, 40(5), 1333–1348.
- Guzun, R., Timohhina, N., Tepp, K., Monge, C., Kaambre, T., Sikk, P., ... Saks, V. (2009). Regulation of respiration controlled by mitochondrial creatine kinase in permeabilized cardiac cells in situ. Importance of system level properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(9), 1089–1105.
- Holloway, G. P., Luiken, J. J. F. P., Glatz, J. F. C., Spriet, L. L., & Bonen, A. (2008). Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 194(4), 293–309.
- Ishiki, M., & Klip, A. (2005). Minireview: Recent Developments in the Regulation of Glucose Transporter-4 Traffic: New Signals, Locations, and Partners. *Endocrinology*, 146(12), 5071–5078.
- Kates, A. M., Herrero, P., Dence, C., Soto, P., Srinivasan, M., Delano, D. G., ... Gropler, R. J. (2003). Impact of aging on substrate metabolism by the human heart. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(2), 293–299.
- Kayo, T., Allison, D. B., Weindruch, R., & Prolla, T. A. (2001). Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5093–8.
- Kishore, A., Vail, A., Majid, A., Dawson, J., Lees, K. R., Tyrrell, P. J., & Smith, C. J. (2014). Detection of Atrial Fibrillation After Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*, 45(2), 520–526.
- Koonen, D. P. Y., Glatz, J. F. C., Bonen, A., & Luiken, J. J. F. P. (2005). Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1736(3), 163–180.
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., & Kunz, W. S. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, 3(6), 965–976.
- Käämbre, T., Koit, A., Ševtšuk, I., Tšekulajev, V., Tepp, K., Timohhina, N., ... Valvere, V. (2013). Uusi suundi kasvajate energiametabolismi uuringutes. *Eesti Arst*, 92(5), 261–267.
- Käämbre, T., & Varikmaa, M. (2013). Energia, elu ja tervis: süsteemibioloogiast, bioenergeetikast ja biomeditsiinist. *Horisont*, 16–23.
- Lee, C. K., Klopp, R. G., Weindruch, R., Prolla, T. A., Jazwinski, S. M., Martin, G. M., ... Weindruch, R. (1999). Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5432), 1390–3.
- Lenaz, G., Bovina, C., Castelluccio, C., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M. L., ... Biagini, G. (1997). Mitochondrial Complex I defects in aging. In *Detection of Mitochondrial Diseases* (pp. 329–333). Boston, MA: Springer US.
- Leverve, X. M., Taleux, N., Favier, R., Demaille, D., Devin, A., Fontaine, E., ... Saks, V. (2007). Molecular System Bioenergetics: Basic Principles, Organization, and Dynamics

- of Cellular Energetics. In *Molecular System Bioenergetics: Energy for Life*.
- Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D. L., Jaswal, J. S., Stanley, W. C., Aasum, E., ... Schwartz, G. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(1), 207–58.
- Lygate, C. A., Bohl, S., ten Hove, M., Faller, K. M. E., Ostrowski, P. J., Zervou, S., ... Neubauer, S. (2012). Moderate elevation of intracellular creatine by targeting the creatine transporter protects mice from acute myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 96(3), 466–75.
- McMillin, J. B., Taffet, G. E., Taegtmeyer, H., Hudson, E. K., & Tate, C. A. (1993). Mitochondrial metabolism and substrate competition in the aging Fischer rat heart. *Cardiovascular Research*, 27(12), 2222–8.
- Nemutlu, E., Gupta, A., Zhang, S., Viqar, M., Holmuhamedov, E., Terzic, A., ... Dzeja, P. (2015). Decline of phosphotransfer and substrate supply metabolic circuits hinders ATP cycling in aging myocardium. *PLoS ONE*, 10(9), 1–17.
- Neubauer, S. (2007). The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *The New England Journal of Medicine*, 356, 1140–51.
- Neubauer, S., Horn, M., Cramer, M., Harre, K., Newell, J. B., Peters, W., ... Kochsiek, K. (1997). Myocardial Phosphocreatine-to-ATP Ratio Is a Predictor of Mortality in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*, 96(7), 2190–2196.
- Ogata, T., & Yamasaki, Y. (1997). Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *The Anatomical Record*, 248(2), 214–223.
- Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(6), 711–23.
- Pedersen, P. L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers’ most common phenotypes, the “Warburg Effect”, i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(3), 211–222.
- Pedersen, P. L. (2008). Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment’s roles together with hexokinase-2 in the “Warburg effect” in cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(3), 123–126.
- Perevoshchikova, I. V., Zorov, S. D., Kotova, E. A., Zorov, D. B., & Antonenko, Y. N. (2010). Hexokinase inhibits flux of fluorescently labeled ATP through mitochondrial outer membrane porin. *FEBS Letters* (Vol. 584).
- Rizzo, D. C. (2010). *Fundamentals of Anatomy and Physiology* (3rd ed.).
- Roosimaa, M., Põdrängi, T., Kadaja, L., Ruusalepp, A., Paju, K., Puhke, R., ... Seppet, E. (2013). Dilation of human atria: Increased diffusion restrictions for ADP, overexpression of hexokinase 2 and its coupling to oxidative phosphorylation in cardiomyocytes. *Mitochondrion*, 13(5), 399–409.
- Rostovtseva, T., & Colombini, M. (1996). ATP Flux Is Controlled by a Voltage-gated Channel from the Mitochondrial Outer Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 28006–28008.

- Rostovtseva, T. K., Sheldon, K. L., Hassanzadeh, E., Monge, C., Saks, V., Bezrukov, S. M., & Sackett, D. L. (2008). Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18746–51.
- Sabbaha, H. N., & Stanley, W. C. (2002). Partial fatty acid oxidation inhibitors: a potentially new class of drugs for heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 4(1), 3–6.
- Saks, V., Belikova, Y. O., & Kuznetsov, A. V. (1991). In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochem Biophys Acta*, 1074, 302–11.
- Saks, V., Guzun, R., Timohhina, N., Tepp, K., Varikmaa, M., Monge, C., ... Seppet, E. (2010). Structure–function relationships in feedback regulation of energy fluxes in vivo in health and disease: Mitochondrial Interactosome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6), 678–697.
- Saks, V., Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Wallimann, T., Bagur, R., Zorman, S., ... Guzun, R. (2014). Systems Level Regulation of Cardiac Energy Fluxes Via Metabolic Cycles: Role of Creatine, Phosphotransfer Pathways, and AMPK Signaling (pp. 261–320). Springer Berlin Heidelberg.
- Sample, J., Cleland, J. G. F., & Seymour, A.-M. L. (2006). Metabolic remodeling in the aging heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 40(1), 56–63.
- Sanz, A., & Stefanatos, R. K. A. (2008). The Mitochondrial Free Radical Theory of Aging: A Critical View. *Current Aging Science*, 1(1), 10–21.
- Scientific, T. (2014). Instructions: Pierce™ BCA Protein Assay Kit.
- Tepp, K., Timohhina, N., Puurand, M., Klepinin, A., Chekulayev, V., Shevchuk, I., & Kaambre, T. (2016). Bioenergetics of the aging heart and skeletal muscles: Modern concepts and controversies. *Ageing Research Reviews*, 28, 1–14.
- Tiivel, T., Kadaya, L., ... Saks, V., Seppet, E. K. (2000). Developmental changes in regulation of mitochondrial respiration by ADP and creatine in rat heart in vivo. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 208, 1009–128.
- Timohhina, N., Guzun, R., Tepp, K., Monge, C., Varikmaa, M., Vija, H., ... Saks, V. (2009). Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: Some evidence for mitochondrial interactosome. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(3), 259–275. <http://doi.org/10.1007/s10863-009-9224-8>
- Wei, Y.-H., Wu, S.-B., Ma, Y.-S., & Lee, H.-C. (2009). Respiratory Function Decline and DNA Mutation in Mitochondria, Oxidative Stress and Altered Gene Expression during Aging. *Chang Ging Medical Journal*, 32(2), 113–132.
- Wyss, M., & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews*, 80(3), 1107–213.
- Yang, X., Pabon, L., & Murry, C. E. (2014). Engineering adolescence: Maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circulation Research*, 114(3), 511–523.