

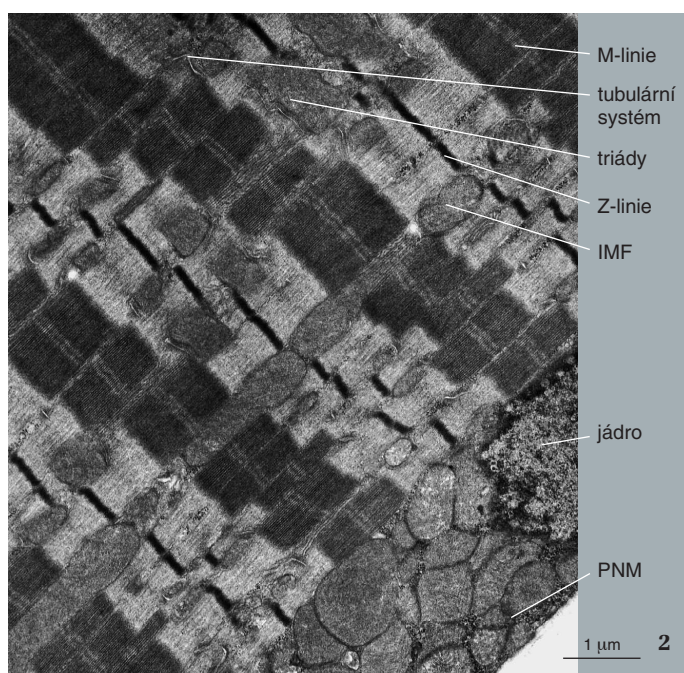
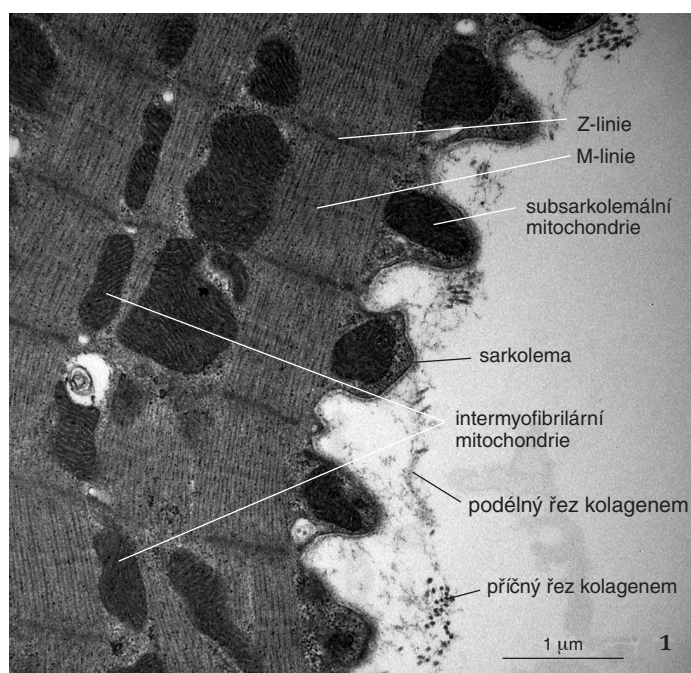
Kreatinkinázový systém v kosterním svalu

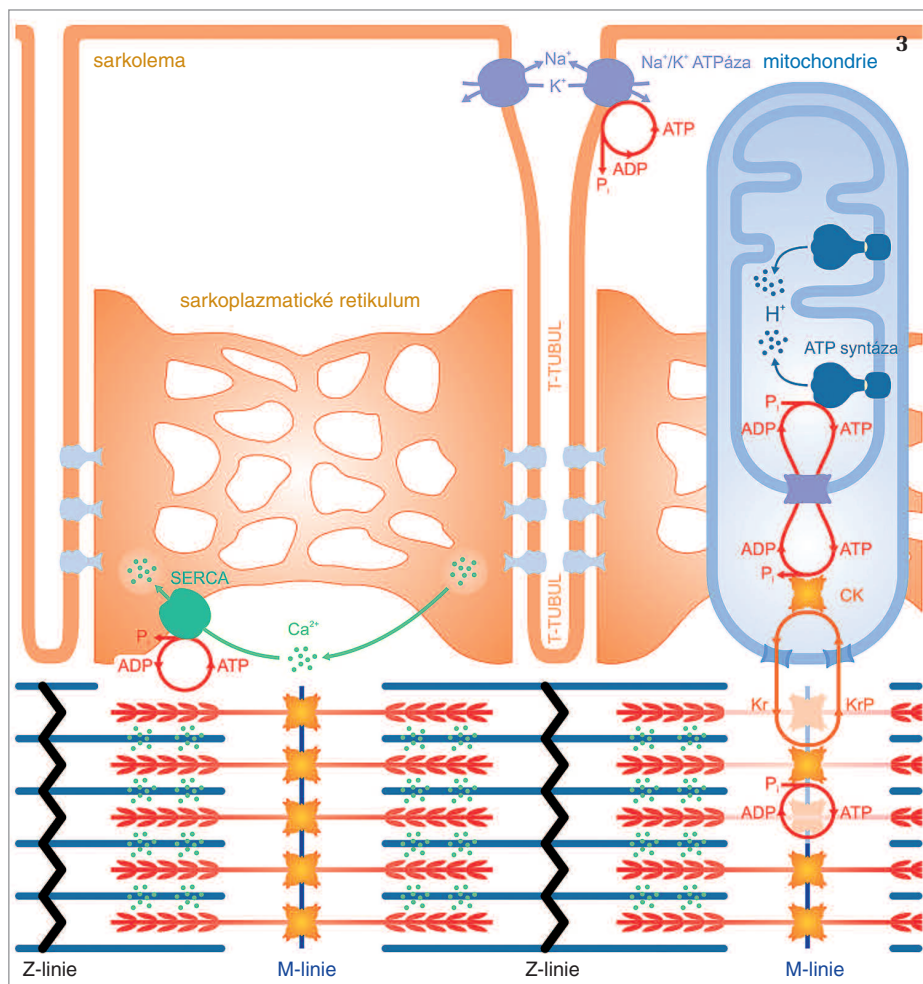
Možná si ještě pamatujeme, že se kosterní sval skládá ze snopců, ty ze snopečků a snopečky jsou tvořeny svalovými vlákny. Svalová vlákna obaluje buněčná membrána – sarkolema. Jejich nitro zcela vyplňují kontraktilní proteiny – myofibrily, které umožňují zkrácení svalu. Mezi nimi nacházíme mitochondrie – semiautonómni orgány obklopené dvěma membránami, které za přítomnosti kyslíku produkují chemickou energii ve formě adenosintrifosfátu (ATP). Energie ATP je využívána pro veškeré buněčné procesy. Substrátem pro tvorbu ATP je většinou glukóza a mastné kyseliny, v období hladovění mohou být za tímto účelem degradovány i proteiny z kosterních svalů. Myofibrily jsou obklopeny membránovým systémem, který je zásobárnou vápenatých iontů a nazývá se sarkoplazmatické retikulum. Následující řádky přináší informaci o významném mechanismu, jenž pomáhá udržovat energetickou rovnováhu buněk v okamžiku náhlého zvýšení požadavku na dodání energie a zároveň je také schopen usnadnit přenos energeticky bohatých substrátů z místa jejich produkce k místům spotřeby v buněčném prostoru při vysokém výkonu. Tento mechanismus je zvláště dokonale vyvinutý v buňkách schopných vysokého výkonu, jejichž požadavky na dodávku energie značně kolísají v čase. Tuto schopnost mají především svalová vlákna, srdeční myocyty, neurony, ale i spermie, které se po probuzení k aktivitě pokoušejí vyhrát závod s ostatními, a tak splnit svou biologickou úlohu.

Svalová vlákna kosterního svalu vznikla splynutím mnoha buněk v průběhu vývoje, a proto jsou mnohojaderná, což jim poskytuje velkou plasticitu při reakci na intenzitu a charakter zátěže. Během této reakce se „zapínají“ (exprimují) specifické geny, které zajišťují produkci dostatečného množství metabolických a strukturálních proteinů v souladu s charakterem zátěže, to umožňuje zvýšení výkonu svalu

a optimalizaci energetického metabolismu. „Zapínání“ může být vyvoláno nejen aktivací svalové kontrakce, tedy nervovou stimulací, ale i působením steroidních hormonů, což určuje fenotyp svalu (viz dále). Rozdílné fenotypy svalů lze proto pozorovat u mužů a žen, a mění se také při výkonnostním sportu. K ovlivnění fenotypu dochází též za různých patologických situací, jako jsou např. hormonální poru-

chy, mezi něž patří v současné době poměrně časté změny v hladině thyroïdních hormonů (tyroxin, trijodthyronin) produkovaných štítnou žlázou. Z hlediska fenotypu existují dva hraniční typy svalových vláken. Pomalá vlákna jsou málo unavitelná, s velkým počtem mitochondrií a vysoce oxidativním metabolismem. Tato vlákna jsou výhradně zastoupena v tzv. posturálních svalech, které udržují postavení našeho těla po celý den, aniž bychom nad tím přemýšleli. Pomalé svaly se diferencují až po narození a vyvíjejí se pod tonickou aktivitou neuronů (stálou aktivitou nízké intenzity dráždění). Rychlost kontrakce (stažení) i relaxace (uvolnění) tohoto typu svalu je pomalejší než u svalu rychlého, který se naopak vyvíjí pod rychlou fázičkovou nervovou stimulací (střídání vysoké intenzity dráždění s klidovou fází) a převažuje v embryonálním vývoji a časném postnatálním období. Rychlá svalová vlákna se vyznačují nižším počtem mitochondrií a mají tedy vyšší podíl energie získané bez využití kyslíku anaerobní glykolýzou probíhající v cytoplazmě, mimo mitochondrie. Svaly s převahou těchto glykolytických vláken jsou schopny krátkého a velkého výkonu, ale snadno se unaví. Produkují ve vysokém výkonu nadměrné množství kyseliny mléčné, která se štěpí na laktát a vodíkové protony, což okyseluje okolní prostředí, a tímto se podílí na svalové únavě. Kyselina mléčná je transportována do krve a metabolizována sousedními oxidativními vlákny kosterních svalů a srdcem, kde slouží jako výhodný zdroj energie využívaný mitochondriemi při dostatečném zásobení kyslíkem. Její zbytek putuje do jater, kde se stane substrátem pro syntézu glukózy, jež může opět vstupovat do krve. Tento proces se nazývá Coriho cyklus. K produkci laktátu dochází v malém množství i v pomalých oxidativních svalových vláknech a v srdci, kde je nezbytný pro další průběh glykolýzy. Experimentální inhibice syntézy laktátu vede k zastavení glykolýzy, což vyřadí metabolismus glukózy jako zdroj energie a zastaví svalovou kontrakci.





1 Podélný řez papilárním svałem z levé srdeční komory potkana v elektronovém mikroskopu. Papilární sval je maximálně kontrahovaný (zkrácený), což způsobilo zvlnění sarkolemy okolo subsarkolemálních mitochondrií (vpravo). Tyto mitochondrie zásobují energii Na/K-ATPázy na sarkolemě. Intermyo-fibrilární mitochondrie, uložené podélně mezi fibrilami, zásobují myozinové ATPázy a Ca-ATPázy sarkoplazmatického retikula. Délka sarkomery je zhruba poloviční (1,2 μm) ve srovnání s relaxovaným stavem. Aktinová a myozinová filamenta jsou do sebe zcela zasunuta, a tím vymizely světlé I-pruhy, které pozorujeme na relaxovaném svalu (obr. 2). Z-linie ohraničují sarkomeru a M-linie se nacházejí v jejím středu. Vně kardiomyocytu (vpravo) jsou patrná vlákna kolagenu v podélném a příčném řezu. Blíže v textu. Foto B. Elsnicová

2 Podélný řez kosterním svałem pomaleho typu (*musculus soleus*) myši v relaxovaném stavu. Vyznačeny jsou morfologické struktury: M-linie ve středu sarkomery, Z-linie ohraničující sarkomeru, IMF – uspořádání mitochondrií mezi myofibrilami v řetízku (tzv. intermyofibrilární mitochondrie), což je typické pro pomalý typ svalů; jádro, PNM – perinukleární mitochondrie, T-tubulární systém, SR – sarkoplazmatické retikulum, triády skládající se z T-tubulu (světlá) a dvou cisteren sarkoplazmatického retikula (tmavě, viditelná je pouze jedna nad T-tubulem). S laskavým svolením M. Novotové (Slovenská akademie věd)

3 Organizace kreatinkinázového systému v buňce kosterního svalu. Kreatinkináza

(CK) je zobrazena žlutě. Cyklus ATP a kreatinfosfátu (KrP) probíhá mezi místy produkce energie – adenosintrifosfátu (ATP) v mitochondriích (modře) a příslušnými enzymy – ATPázami, kde se energie spotřebovává (červené kruhy). Kr – kreatin, Pi – anorganický fosfát, ADP – adenosindifosfát, SERCA – vápenaté pumpy (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase). Zelené místa působení vápenatých iontů. Orig. M. Hock podle návrhu Z. Polenské

Svalová buňka

Svalovou buňku kosterního i srdečního svalu zcela vyplňují myofibrily, které se skládají z opakujících se kontraktlních jednotek – sarkomer. Při pohledu na sarkomeru v elektronovém mikroskopu (viz obr. 1 a 2) je patrné její ohraničení dvěma tmavými tenkými Z-liniami (nebo též Z-disky), mezi kterými lze pozorovat dva světlé pruhy (I-pruhy, izotropní) a jeden tmavý pruh uprostřed (A-pruh, anizotropní). Z-linie jsou příčné struktury myofibril, tvořené mnoha proteiny a plní významnou úlohu v hexagonálním uspořádání filament, což umožňuje jejich zasouvání při kontrakci sarkomer. Z-linie se jeví při velkém zvětšení na snímku z elektronového mikroskopu zubatě (obr. 2). V Z-linii jsou zakotvena aktinová filamenta (tenká filamenta), která se při kontrakci zasouvají do myozinových filament (silná filamenta). Ta jsou ve střední části sarkomery (M-linie, z anglického medial) opačně orientovaná a pevně svázaná též v hexagonálním uspořádání. V elektronovém mikroskopu se M-linie jeví jako příčné světlé pruhy uprostřed

tmavých myozinových filament. Počet těchto světlých linií se liší u různých typů svalů a souvisí s rozdílným složením proteinů, které zde kotví myozinová filamenta, a tím zajišťují odlišnou pevnost a pružnost jejich spojení. M-linie má strukturální funkci a brání vzájemnému posuvu myozinových filament. Ukázalo se, že M-linie funguje jako senzor zatížení sarkomery. V posledních letech jsou objevovány signální dráhy informující mitochondrie, buněčné jádro i sousední filamenta o míře zátěže sarkomery a o jejím metabolickém nebo strukturálním požadavku. Obdobné mechanismy jsou pozorovány delší dobu i v oblasti Z-disků.

Myozinové molekuly slouží jako molekulární motory a využívají energii ATP k pohybu svých hlav. Myozin ve svalech se skládá ze dvou molekul – každá má dvě hlavní části, hlavu a ocásek. Ocásky jsou obtočené kolem sebe a zakončené koncem v M-linii, hlavy na opačném konci mají volnost pohybu a ATPázovou aktivitu (viz níže), která jim pohyb umožňuje. Navázání hlavy na aktinová filamenta spouští tuto aktivitu. Společně s opakovaným uvolněním a znovunavázáním hlavy tak dochází k postupnému zasouvání aktinových filament, zkracování každé ze sarkomer až o 1 μm, a tím ke stažení celého svalu. Popsaná interakce aktinu a myozinu probíhá pouze v přítomnosti dostatečně zvýšené koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě, jež se vylévají ze sarkoplazmatického retikula při aktivaci svalu nervovým vzruchem. Výlev vápenatých iontů je zajištěn těsným sousedstvím a komunikací sarkolemy se sarkoplazmatickým retikulem v místě jejího zanoření do nitra buňky, kde sarkolema tvoří T-tubulus (obr. 3). K T-tubulům přiléhají v kosterním svalu z obou stran cisterny sarkoplazmatického retikula a tvoří triády, zatímco v srdečním svalu je pouze jedna cisterna a vzniká tak diáda. Sarkoplazmatické retikulum je v kosterním svalu velmi rozsáhlý membránový systém váčků a cisteren, který obaluje myofibrily a jsou v něm uloženy vápenaté ionty. Funkční kontakt retikula a T-tubulů zajišťují speciální receptory citlivé na změnu napětí na sarkolemě, vyvolanou nervovým vzruchem při kontrakci. Při aktivaci stahu vzroste obsah vápenatých iontů v cytosolu zhruba 100× během několika milisekund. Vápenaté ionty jsou okamžitě vstřebávány zpět do retikula proti koncentračnímu gradientu výměnou za hořečnaté ionty pomocí vápenatých pump SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase), za současné spotřeby ATP. Rychlost kontrakce svalu je v tomto ohledu určována rychlostí výlevu vápenatých iontů a jejich vzhoubou na aktinová filamenta, zatímco uvolnění závisí na rychlosti poklesu koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě. Hořečnaté ionty působí antagonisticky vzhledem k vápenatým iontům, vykazují tlumivý vliv a jejich nedostatek může přispívat ke svalovým křečím. Naopak kofein výrazně podporuje výlev vápenatých iontů a zesiluje tak kontrakci.

Mitochondrie jsou rozmístěny mezi kontraktlními filamenty a pod sarkolemou ve větší nebo menší hustotě, záleží na typu svalové vlákna a typu metabolismu. Anaerobní glykolýza probíhá v cytosolu

a poskytuje pouze dvě molekuly ATP z jedné molekuly glukózy, zatímco oxidativní fosforylace (lokalizovaná na vnitřní mitochondriální membráně) produkuje až 36 molekul ATP z oxidace jedné molekuly glukózy nebo dvou molekul laktátu (viz Živa 2013, 5: 202–205). V mitochondriích je na konci dráhy oxidativní fosforylace umístěna ATPsyntáza, využívající energii elektrochemického gradientu vodíkových protonů (H^+) na vnitřní mitochondriální membráně k syntéze ATP z adenosindifosfátu (ADP) a anorganického fosfátu (Pi). [Pozn.: Za objasnění mechanismu syntézy ATP enzymovým komplexem H^+ -ATPsyn-tázou získali Paul D. Boyer z Kalifornské univerzity v Los Angeles a John E. Walker z Laboratoře pro molekulární biologii v Cambridge, Velká Británie, v r. 1997 Nobelovu cenu za chemii, společně s Jensem Ch. Skouem z univerzity v Kodani, Dánsko, za vysvětlení mechanismu činnosti Na/K-ATPázy – viz dále v textu.] Lze tedy říci, že zvýšený vstup ADP do mitochondrií podporuje tvorbu ATP a je nezbytný pro funkci ATPsyntázy. Na druhé straně enzymy, které mohou ATP štěpit a využít energii skrytou ve vysokoenergetických chemických vazbách této molekuly, se nazývají ATPázy. Dvě z nich už byly zmíněny, tvoří součást myozinové hlavy – myozinová ATPáza a SERCA pumpa na sarkoplazmatickém retikulu. K nim můžeme přidat ještě Na/K-ATPázu na sarkolemě, kde udržuje elektrochemický potenciál. ATPázy zajišťují hydrolyzu ATP a produktem této reakce, vedle uvolněné energie, je také ADP a anorganický fosfát. Tyto látky mohou stimulovat ATPsyntázu a současně ve vyšší koncentraci inhibovat enzymatickou aktivitu ATPáz. ATPázy též produkují H^+ ionty, které lokálně okyselují prostředí buňky, a tím omezují její aktivitu. Snížené pH negativně ovlivňuje i jiné metabolické enzymy, které jsou na změny pH citlivé. Okyselení buňky se podílí na svalové únavě, pokud nejsou H^+ ionty efektivně odstraňovány. Obecně platí, že izoformy ATPáz přítomné v rychlých vláknech jsou méně citlivé na pokles pH ve srovnání s vlákny oxidativními, kde dochází k podstatně menšímu výkyvu pH. V rychlých vláknech může pH klesnout až na hodnotu 6,5 z původní 7,2. Z uvedeného

vyplývá, že akumulace produktů hydrolyzy ATP (ADP, Pi, H^+) silně ovlivňuje výkon svalového stahu, stejně jako dostupnost ATP z mitochondrií nebo z glykolýzy.

Enzym kreatinkináza – CK systém

Zásoba volného ATP v cytosolu, dostupná příslušným ATPázám, je poměrně nízká, zhruba 5–8 mM. Představíme-li si rychlost nástupu svalové kontrakce u sprintera a zvážíme-li koncentraci volného ATP, zdá se, že nutně musí dojít k poklesu volného ATP již na počátku výkonu a k následnému vychýlení energetické rovnováhy. Zvýšení produkce ATP glykolýzou a oxidativní fosforylací je stimulováno zvýšenou koncentrací vápenatých iontů a nastupuje s určitým zpožděním za počátkem svalové práce. Zhruba před 30 lety bylo zjištěno, že se hladina ATP během svalové kontrakce nemění. Tento nálezn vedl k hledání mechanismu, který udržuje hladinu ATP. Centrem pozornosti se stal kreatinfosfát, známý již od 30. let minulého stol., avšak jeho funkce nebyla zcela jasná. Brzy poté byl objeven enzym kreatinkináza (CK), katalyzující přenos fosfátu z kreatinfosfátu na ADP za vzniku ATP a kreatinu. Tato reakce je vratná, může tedy probíhat oběma směry s podobnou rychlostí v závislosti na koncentraci substrátů a pH v buněčném kompartmentu (např. prostor pod sarkolemou nebo mezi myofibrilami). Kreatinkinázovou reakci známe pod názvem Lohmannova reakce.

Nedávné studie ukázaly, že kreatinkináza v kosterním svalu zastupují dvě izoformy, mitochondriální a cytosolická. Isoformy se v buňce nacházejí jak v místech spotřeby energie, tak její produkce. Pokud jde o spotřebu energie, je enzym lokalizován v blízkosti ATPáz a strukturně se váže zhruba na třech strategických místech – v centru sarkomery v M-linii poblíž myozinové ATPázy, dále na membráně sarkoplazmatického retikula poblíž vápníkové pumpy SERCA a na sarkolemě poblíž Na/K-ATPázy, která zde udržuje iontovou rovnováhu (obr. 3). V těchto místech využívá kreatinkináza kreatinfosfát a produkty hydrolyzy ATP (ADP, H^+) k syntéze ATP. Zajišťuje tak okamžitě odstraňování potenciálních inhibitorů enzymatické aktivity ATPáz (ADP, H^+) a současně 10× rych-

leji recykluje ATP ve srovnání s jeho syntézou. Tím vzniká lokálně vysoký poměr ATP/ADP, nezbytný pro dobrý výkon svalové kontrakce. Reakce katalyzovaná kreatinkinázou tedy udržuje stálý vysoký poměr ATP/ADP tím, že poskytuje ATP a naopak snižuje obsah ADP ve svém okolí. Je proto považována za lokální energetický pufr.

V oblasti produkce ATP v cytosolu, kde je lokalizovaná glykolýza a v místě oxidativní fosforylace, v intermembránovém prostoru mitochondrií, má působení kreatinkinázy opačný charakter. Reakce zde probíhá v obráceném směru, tedy ve prospěch syntézy kreatinfosfátu. Jeho molekula je ve srovnání s ATP podstatně menší, a proto její difuze z míst produkce k místům spotřeby probíhá mnohem rychleji. Z tohoto důvodu se nazývá kreatinkinázový systém též prostorovým energetickým pufr. Navíc kreatinkináza využívá kreatin z cytosolu a ATP z mitochondrií v intermembránovém prostoru mitochondrií k produkci ADP, které zde přímo spotřebává ATPsyntáza pro tvorbu ATP. ATPsyntáza je tak udržovaná ve vysokém výkonu. Bylo prokázáno, že tato přímá stimulace ATPsyntázy snižuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (tj. superoxidového radikálu a jeho dalších produktů) v mitochondriích, jež jsou při své nadměrné koncentraci pro buňku toxické. Zásoba kreatinfosfátu ve svalové buňce se pohybuje mezi 15–30 mM, což pokryje zhruba 8–10 sekund vysokého výkonu sprintera. Tato doba postačuje k aktivaci glykolýzy stimulované zvýšenou koncentrací anorganického fosfátu uvolněného při hydrolyze ATP a vápenatými ionty uvolněnými z retikula. Z tohoto pohledu se kreatinkinázový systém též označuje jako časový energetický pufr. Je třeba zdůraznit, že v mitochondriích kreatinkinázová reakce také produkuje vodíkové protony, což zvyšuje jejich elektrochemický potenciál na vnitřní membráně pro syntézu ATP.

Závěrem lze říci, že kreatinkinázový systém patří mezi fosfagenové systémy, kterých se v živočišné říši vyvinulo celkem 8. Mají společnou funkci – doplňovat hladinu ATP, liší se však chemickými charakteristikami. Vedle CK systému se nejčastěji setkáme s argininkinázovým systémem, který zahrnuje argininfosfát a argininkinázu a jeho kinetické vlastnosti jsou odlišné. Existují organismy, jež mají oba zmíněné systémy, buď odděleně v různých tkáních, nebo společně v jednom typu tkáně (např. ježovky ve svalech). Kreatinkinázový systém není pro buňky životně důležitý, neboť vypnutí genu pro kreatinkinázu u myši bylo úspěšně kompenzováno během jejich vývoje morfologicky – množením mitochondrií, a tedy zkrácením difuzní vzdálenosti mezi místy produkce a spotřeby energie. Zvířata poměrně dobře prospívala, vykazovala ale vyšší svalovou únavu. Funkce tohoto systému velmi citlivě reaguje na zvýšenou koncentraci volných radikálů a je v buňce potlačena v případě energetické nouze, kdy se patrně jeví jako nadbytečný konzument ATP. Kreatinkinázový systém můžeme tedy považovat za modulátor a synchronizátor energetického metabolismu za fyziologických podmínek a současně doklad dokonalosti přírody.



ONO SE ŘEKNE, ŽE VĚDA SI MÁ NA SEBE PŘINYDELAT,
ALE JAK ŽE MĚ UŽ DO ŽADNÉ PÍP SOU NEVEZMOU.

Orig. Vladimír Renčín