

Cardiac mitochondria in the role of cardioprotective strategies

Srdcové mitochondrie v úlohe kardioprotektívnych stratégií

Andelová N, Jašová M, Kancirová I, Ferko M

Centrum experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied, Ústav pre výskum srdca, Bratislava, Slovenská republika

Andelova N, Jasova M, Kancirova I, Ferko M. **Cardiac mitochondria in the role of cardioprotective strategies.** Cardiology Lett. 2020;29(2):106–112

Abstract. In recent years, the view of cardiac mitochondria as an energy source providing the ATP supply needed to maintain contractile function, basal metabolic processes and ionic homeostasis has changed significantly. It is currently known that dysfunction of these organelles results in the development of a large number of diseases, including cardiovascular diseases. Mitochondria are currently considered a promising target and end effector of endogenous strategies necessary to protect the myocardium from acute ischemia/reperfusion injury. The present review offers an overview of survival cascades involved in the endogenous protective mechanisms and adaptability of cardiac mitochondria. Regulation at the level of mitochondrial permeability transition pores is an important part of the cardioprotective compensatory mechanisms. The involvement of mitochondria in endogenous protective processes is also associated with the signaling role of reactive oxygen species (ROS). The described mechanisms are part of an innovative strategy to compensating for myocardial pathological stimuli associated with energy deficiency, prolonged calcium transient, and massive ROS formation. Fig. 1, Ref. 93, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Key words: cardiac mitochondria – mitochondrial permeability transition pores – heart energetics – cardioprotection

Andelová N, Jašová M, Kancirová I, Ferko M. **Srdcové mitochondrie v úlohe kardioprotektívnych stratégií.** Cardiology Lett. 2020;29(2):106–112

Abstrakt. V ostatných rokoch sa pohľad na srdcové mitochondrie ako na zdroj energie zabezpečujúci dodávku ATP potrebnú na udržanie kontraktilnej funkcie, bazálnych metabolických procesov a iónovej homeostázy výrazne zmenil. V súčasnosti je známe, že dysfunkcia týchto organel má za následok vývoj veľkého počtu ochorení, vrátane kardiovaskulárnych. Práve mitochondrie sa aktuálne považujú za sľubný cieľ a koncový efektér endogénnych stratégií nevyhnutných na ochranu myokardu pred akútnym ischemicko/reperfúznym poškodením. Predkladané review ponúka prehľad kaskád prežitia účinných v procesoch adaptácie a endogénnej ochrany navodených prostredníctvom srdcových mitochondrií. Významnou súčasťou kompenzačných mechanizmov je kardioprotektívna regulácia na úrovni mitochondriálnych pórov prechodnej permeability. Do mitochondriálnych procesov stimulácie endogénnej ochrany sa zapája aj signálna úloha voľných kyslíkových radikálov. Opísané mechanizmy sú súčasťou inovatívnej stratégie kompenzujúcej patologické podnety v myokarde spojené s energetickou deficienciou, predĺženým vápnikovým transientom a mohutnou tvorbou voľných radikálov. Obr. 1, Lit. 93, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Kľúčové slová: srdcové mitochondrie – mitochondriálne póry prechodnej permeability – energetika srdca – kardioprotekcia

Kardiovaskulárne ochorenia (KVO) zostávajú v rozvinutých krajinách stále hlavnou príčinou chorobnosti a úmrtnosti, preto sa mechanizmom vedúcim ku kardioprotekcii venuje

taká veľká pozornosť. Aj napriek tomu, že v súčasnosti existujú medicínske technológie a terapie, ktoré sú schopné znížiť poškodenie spôsobené KVO, molekulárne mechanizmy

Z Centra experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied, Ústav pre výskum srdca, Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 27. novembra 2019; prijaté dňa 2. decembra 2019

Adresa pre korešpondenciu: Mgr. Natália Andelová, Centrum experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied, Ústav pre výskum srdca, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: nat.andelova@gmail.com

na úrovni subcelulárnych systémov sú stále málo objasnené (1 – 4).

Vzhľadom na to, že mitochondrie sú hlavným zdrojom energie buniek, ich dysfunkcii sa pripisuje veľký počet chorôb, vrátane KVO (2). Ako koncový efektor poškodenia buniek predstavujú mitochondrie zároveň rozhodujúcu zložku ich prežitia (5) a sú zapojené do viacerých potenciálne účinných terapeutických prístupov (6, 7).

Údaje zo štúdií viacerých autorov preukázali, že ovplyvňovanie rozhodujúcich mechanizmov zapojených do zachovania mitochondriálnej funkcie, akou je regulácia mitochondriálnej priepustnosti prostredníctvom mitochondriálnych pórov prechodnej permeability (mPTP) (8), mitochondriálnych K⁺ kanálov závislých od ATP (mKATP) (9), membránovej fluidity (10), nadprodukcie reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS) (11), alebo mitochondriálnych morfológických zmien (12), by mohlo zabrániť smrteľnému poškodeniu kardiomyocytov a udržať funkciu myokardu (7).

Kardiomyocyty sú vysoko závislé od dostatočných zásob kyslíka, preto nie je prekvapujúce, že narušenie oxidačnej fosforylácie pôsobí ako iniciačný faktor mitochondriálnej dysfunkcie (2, 13). Spotreba kyslíka kardiomyocytmi závisí od fyziologického stavu organizmu (14). Pri civilizačných ochoreniach, akými sú napríklad ischemická choroba srdca (15) alebo diabetes mellitus (16, 17), je srdcové tkanivo vystavené značnému nedostatku kyslíka. Nedostatok kyslíka počas ischemie myokardu alebo poškodenie na úrovni elektrónového transportného reťazca má za následok zníženie energie produkovanej srdcovými mitochondriami (18 – 20). Aj napriek tomu majú mitochondrie schopnosť kompenzácie proti nepriaznivým podmienkam, čím sú schopné udržať systémom požadovanú hladinu energie (19, 21).

Mitochondrie majú hlavnú úlohu v energetickej rovnováhe myokardu, preto je nevyhnutné zachovať ich správnu funkciu. Práve z týchto dôvodov sú viaceré terapeutické stratégie s cieľom zabezpečiť funkciu srdca zamerané na ochranu mitochondrií (22).

Jestvuje viacero známych experimentálnych prístupov, akými sú ischemický preconditioning (PC) (23), ischemický postconditioning (24) či remote ischemický PC (25), ako neinvazívna stratégia pre kardioprotekciu. Založené sú na princípe opakovania krátkych epizód ischemie/reperfúzie (I/R) pred nástupom predĺženej ischemie, ktoré predstavujú protekciu pred ischemickým poškodením myokardu. Práve v mitochondriách sa väčšina signálnych dráh vedúcich k protekcii spája (26 – 29). PC zabezpečená ochrana myokardu sa dosiahne aktiváciou mnohých signálnych dráh, ktoré vedú práve k inhibícii otvárania mPTP spôsobenému reperfúziou (30 – 32). Regulácia otvárania mPTP sa zdá byť rozhodujúcim mechanizmom pri udržaní zásob energie v stave patologickej záťaže myokardu. V tomto prehľade sa bližšie zameriame na energetiku mitochondrií s upriamenou pozornosťou na mitochondriálne membrány, signálnu úlohu ROS a reguláciu otvárania mPTP vo vzťahu

k ochranným mechanizmom zapojeným do štrukturálnych a funkčných zmien srdcových mitochondrií.

Energetické substráty srdca pri fyziologických podmienkach

Ochorenia myokardu sú často sprevádzané nielen zmenami na úrovni fyziologických funkcií, ale aj zmenami energetických substrátov. V súvislosti s energetickými požiadavkami na srdce je vysokou prioritou zabezpečenie nepretržitej tvorby ATP s cieľom udržania kontraktilnej funkcie, bazálnych metabolických procesov a iónovej homeostázy (33, 34).

Srdcové mitochondrie používajú masné kyseliny a karbohydráty ako primárne zdroje na tvorbu energie. V normoxických podmienkach pri normálnej hladine kyslíka v tkanivách a krvi, predstavuje β -oxidácia voľných mastných kyselín 60 až 70 % produkcie energie, zvyšok tvorí oxidácia pyruvátu, získaného v približne rovnakých množstvách z glykolýzy a oxidácie laktátu a tiež ketónových látok (vo veľmi nízkom percente) (35, 36). Pomer oxidácie mastných kyselín a oxidácie pyruvátu sa môže meniť v závislosti od fyziologických potrieb organizmu (37).

Energetické substráty srdca pri kyslíkovej deprivácii

Počas patologických stavov spojených s nedostatkom prívodu kyslíka, ako je srdcová ischemia, je dostupnosť kyslíka znížená v dôsledku nedostatočnej perfúzie tkaniva spôsobenej diskrepanciou medzi požiadavkou na kyslík a jeho dodávkou. Znížený prietok kyslíka je navyše spojený s obmedzenou dodávkou živín vrátane externých voľných mastných kyselín. Voľné masné kyseliny sú však v cirkulujúcej plazme zvýšené počas a po ischemii (38). Ich dodávka a využitie v myokarde počas ischemického a postischemického obdobia sú tiež zvýšené (34). Ischemia vyvoláva poruchy rovnováhy medzi masnými kyselinami a oxidáciou glukózy. Poškodenie na úrovni oxidačnej fosforylácie, sprevádzané znížením produkcie ATP, katabolizmu voľných mastných kyselín a pyruvátu, je úmerné rozsahu ischemie (39). Okrem toho dochádza v podmienkach ischemie k špecifickým metabolickým zmenám pozostávajúcim z relatívneho zvýšenia oxidácie mastných kyselín v srdci, odpojení glykolýzy od oxidácie glukózy a výraznému poklesu oxidačného metabolizmu (40). Produkcia energie sa mení z mitochondriálneho na cytosólické glykolytické zdroje. Tento proces je sprevádzaný inhibíciou pyruvátdehydrogenázy a premenou glukózy na dve molekuly laktátu súbežne s premenou na dve molekuly ATP.

To vedie k nahromadeniu laktátu a H⁺ (41), ktoré môžu narušiť iónovú rovnováhu vyvolanú ischemiou. Avšak hromadenie laktátu a H⁺ je nižšie v kardiomyocytoch počas hypoxie alebo miernej ischemie v porovnaní s rozsiahlou ischemiou, kedy sú rýchlo odstránené z kardiomyocytov

(34) prostredníctvom monokarboxylátových transportérov 1 a Na^+ / H^+ výmenníkov (42, 43).

Vlastnosti mitochondriálnych membrán ischemického srdca

Abnormality mitochondriálnej štruktúry a funkcie majú rozhodujúcu úlohu v patogenéze a vývoji rôznych typov srdcových chorôb, vrátane akútneho infarktu myokardu a kardiomyopatií (44 – 46). Paralelne s deštruktívnymi procesmi, patologické impulzy reprezentované napríklad krátkymi periódami ischemie spúšťajú endogénne ochranné mechanizmy, odolnosť proti metabolickým a štruktúrnym zmenám vyvolaným ochorením. Mechanizmy endogénnej ochrany môžu čiastočne zmierniť vyvolané patologické zmeny účinkom sérii kompenzačných a adaptačných procesov v ischemickom srdci a v konečnom dôsledku predĺžiť jeho prežitie (47 – 51).

Počas ischemie a reperfúzie, v dôsledku ischemickej deplécie intracelulárneho ATP, dochádza k zmene transportu H^+ , Ca^{2+} a Na^+ iónov (52), čo spôsobuje preťaženie mitochondriálnym Ca^{2+} (53 – 55) a má za následok iniciáciu otvorenia mPTP (46). Tieto zmeny sú sprevádzané stratou mitochondriálneho membránového potenciálu a narušením produkcie ATP, čo prispieva k mitochondriálnemu opuchu a napokon k prasknutiu mitochondriálnej membrány (56). I/R poškodenie je sprevádzané poklesom membránovej fluidity mitochondrií (57). Tieto zmeny môžu byť príčinou zníženej molekulárnej mobility, ako aj preskupenia fosfolipidových acylových reťazcov vnútri lipidickej dvojvrstvy srdcových mitochondrií.

Priama molekulárna interakcia mitochondriálnych proteínov a komplexov respiračného reťazca s lipidmi sa okrem toho preukázala v mnohých kryštalografických štúdiách (58, 59). Najmä kardiopolín, ktorý je významnou zložkou vnútorných mitochondriálnych membrán (IMM) a podporuje štruktúrnu integritu, ako aj moduluje aktivitu mnohých multimérnych komplexov energetických membrán, je veľmi náchylný na peroxidačné reakcie kvôli jeho relatívne vysokému obsahu nenasýtených mastných kyselín (60, 61). Zdá sa, že oxidácia kardiopolínu nie je zodpovedná iba za moduláciu mitochondriálnej membrány, ale taktiež sa ukazuje byť zodpovedným faktorom pri indukcii otvárania mPTP a uvoľňovania cytochrómu c (26, 62).

Najmä ischemia vedie k deplécii srdcového mitochondriálneho kardiopolínu (63, 64) a k strate cytochrómu c sprevádzaného zvýšenou tvorbou peroxidu vodíka v dýchacom reťazci (65). Ukázalo sa, že prevencia proti peroxidácii kardiopolínu pôsobí kardioprotektívne (66, 67). Ako jeden z hlavných mechanizmov pri sprostredkovaní stupňa rigidity mitochondriálnej membrány bola identifikovaná toxicita ROS (61, 68). Okrem toho je zjavné, že účinkom ROS dochádza v srdcových mitochondriách počas I/R poškodenia k oxidácii cholesterolu a tvorbe oxysterolov (69). Konkrétne ide o autooxidované oxysteroly, ako napríklad 7 α OHC, 7 β OHC, 7-ketocholesterol a cholesterolové-epoxydy

(61). Ukázalo sa, že akumulácia oxysterolov je zodpovedná za smrť buniek v rôznych bunkových líniách tým, že vyvoláva fosfolipidózu, oxidáciu a zápal (70).

Mitochondrie ako dôležitý zdroj ROS (71) sú predovšetkým popisované vzhľadom na ich poškodzujúcu úlohu. Existujú však štúdie, ktoré pripúšťajú ich priaznivé účinky, spojené prevažne s ich signálnou úlohou vedúcou k iniciácii adaptačných zmien, ktoré smerujú k potenciálnej ochrane myokardu. Dôkazy o ich rozhodujúcej úlohe popísal už v roku 1997 vo svojej štúdii Tritto et al., v ktorej po vystavení nízkym koncentráciám ROS pozoroval obdobné kardioprotektívne účinky aké sa prejavujú v srdci po aplikácii ischemickým PC. PC indukovaný kyslíkovými radikálmi bol po aplikácii vychytávača radikálov, akým je superoxidodismutáza negovaný (72).

Fyziologická a patofyziologická úloha mPTP v regulačných procesoch

Mitochondrie zohrávajú hlavnú úlohu pri I/R poškodení srdca, kde strata mitochondriálnych funkcií vedie k smrti buniek apoptózou alebo nekrozou. Počas ischemie nedostatok kyslíka obmedzuje mitochondriálnu produkciu ATP a indukuje zvýšenie intracelulárneho Ca^{2+} . Reperfúzia nasledujúca po ischemii ďalej zvyšuje intracelulárny a zároveň aj mitochondriálny Ca^{2+} sprevádzaný tvorbou ROS. Všetky tieto faktory spolu so zvýšenou koncentráciou P_i a normalizáciou intracelulárneho pH majú za následok zmeny v priepustnosti IMM sprevádzané otvorením nešpecifického póru s vysokou vodivosťou mPTP. Počas ischemie zostáva mPTP uzavretý kvôli nízkemu intracelulárnemu pH (< 7,0), ale už počas prvých minút reperfúzie s normalizáciou pH sa otvára a spôsobuje nezvratné poškodenie srdca (30, 73, 74).

mPTP je nešpecifický megakanál s priemerom asi 2,3 nm na IMM, ktorý umožňuje prechod molekulám menším ako 1,5 kDa. Otvorenie mPTP zvyšuje priepustnosť IMM a umožňuje vstup metabolitov do matrixu mitochondrií, čo následne vedie k možnému kolapsu vnútornej membrány, odpojeniu dýchacieho reťazca, zastaveniu syntézy ATP v mitochondriách a napokon k opuchu mitochondrií, prasknutiu vonkajšej mitochondriálnej membrány, čím sa uvoľní cytochróm c a nastane bunková smrť (30, 32, 75).

mPTP sa vo väčšine prípadov spájajú s poškodením na úrovni mitochondrií a bunkovou smrťou, avšak otvorenie mPTP patrí aj medzi fyziologické procesy, ktoré mitochondrie používajú pri normálnom zdravom fungovaní bunky (76). Zistené dôkazy nasvedčujú tomu, že existujú dva možné spôsoby otvárania mPTP. Prvý mechanizmus predstavuje ireverzibilné plne vodivé otváranie mPTP pre trvalú priepustnosť vedúcu k bunkovej smrti a druhý mechanizmus pozostávajúci z prechodného krátko trvajúceho otvorenia mPTP s menšou a viac variabilnou vodivosťou (77). Zdá sa, že mPTP majú svoju úlohu pri mechanizme normálneho uvoľňovania Ca^{2+} ,

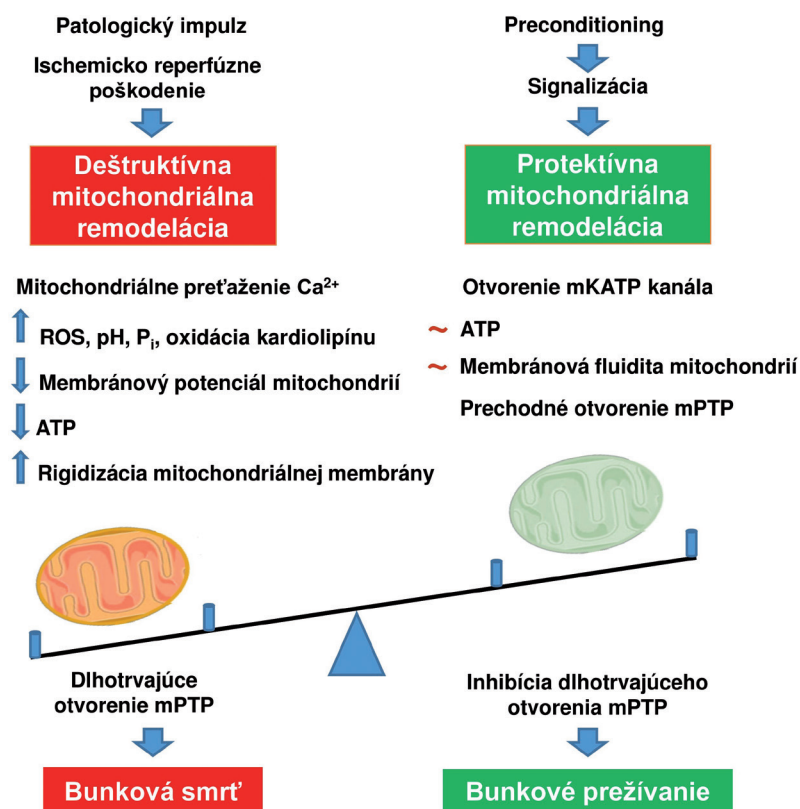
ktorý je potrebný pre správnu metabolickú reguláciu. Predpokladá sa, že prechodné otvorenie mPTP môže regulovať Ca^{2+} v cytosóle, keď dochádza k preťaženiu Ca^{2+} (76). Prechodné otvorenie mPTP sa tiež spája s dočasným zvýšením ROS ako signálnych molekúl (78) (**obrázok 1**).

mPTP predstavuje proteínový komplex, ktorého molekulárne zloženie zostáva doposiaľ neobjasnené. Neustále prichádzajú nové poznatky o štruktúre a regulácii tohto mitochondriálneho póru. Jedna z hypotéz o charaktere mPTP hovorí, že k ich otvoreniu a zvýšeniu počtu dochádza po nadviazaní Ca^{2+} a následnej konformačnej zmene ATP syntázy ako hlavnej štruktúrnej zložky (79, 80). Diskutuje sa však, či sa úloha ATP syntázy môže meniť z kľúčového enzýmu produkujúceho energiu na kanál rozptyľujúci energiu, ktorý vedie k bunkovej smrti (80). ATP syntáza spolu s fosfátovým nosičom a adenín nukleotidovým translokátorom (ANT) je organizovaná do supramolekulárnych jednotiek nazývaných syntazómy, ktoré zvyšujú účinnosť produkcie ATP (62, 81). Cyklofilín D (CypD) je hlavným regulátorom mPTP a zároveň reguluje dynamiku syntazómu v závislosti od bioenergetického stavu mitochondrií (82). Oxidácia kardiopolipínu môže narušiť interakcie medzi zložkami syntazómu, čo môže viesť k destabilizácii superkomplexu a následne podporuje otvorenie

mPTP (83). Štúdia Carrola et al. však popiera myšlienku o ATP syntáze ako hlavnej štruktúrnej zložke mPTP, pretože po delícii vybraných podjednotiek ATP syntázy a Ca^{2+} preťažení došlo k otvoreniu mPTP (84). Ďalšie nové štúdie potvrdili účasť ANT na štruktúre mPTP, pričom táto zložka je pravdepodobne regulovaná CypD (85).

mPTP v procesoch kardioprotekcie

Základom kardioprotektívnych mechanizmov je inhibícia otvárania mPTP, dosiahnuteľná farmakologickými liečivami, ako cyklosporín A (CsA) a sangliferín A, ktoré poskytujú ochranu pred reperfúznym poškodením, preukázanú na rôznych experimentálnych modeloch, vrátane tých aplikovateľných do klinickej praxe (74). Pilotná klinická štúdia pacientov s ischemiou myokardu autorov Piota et al. preukázala, že podávaním CsA ihneď po obnovení prietoku krvi sa znížila veľkosť infarktu o 40 % v porovnaní s placebom (86). Známe sú aj ďalšie neimunosupresívne analógy CypD ako MeAla6-cyklosporín (87), Debio-025 (88) a NIM811 (89), ktoré majú potenciál chrániť srdce počas chirurgických zákrokov pacientov trpiacich korárnou trombózou (32, 75). Avšak vývoj inhibítorov mPTP,



Obrázok 1 Deštruktívna vs. protektívna remodelácia srdcových mitochondrií v patologických a PC ovplyvnených podmienkach. Účasť mPTP v procese kardioprotekcie. Upravené podľa 93

s výnimkou prototypovej zlúčeniny – CsA je obmedzený vedľajšími účinkami a nízkou terapeutickou účinnosťou (90).

Inhibíciou mPTP dochádza k zmierneniu preťaženia Ca^{2+} v matrici mitochondrie, oxidačného poškodenia alebo udržuje nízke pH počas skoršej fázy reperfúzie. Ukázalo sa, že jeden z najsilnejších kardioprotektívnych mechanizmov, ischemický PC, tiež pôsobí prostredníctvom inhibície otvorenia mPTP (91) (**obrázok 1**). Ďalším zo silných kardioprotektívnych stimulov je tzv. teplotný PC, pri ktorom je srdce pred normotermickou ischemiou vystavené krátkym hypotermickým cyklom (26 °C), pričom tento mechanizmus spôsobí tiež inhibíciu otvorenia mPTP (92).

Zhrnutie

Zachovanie správnej funkcie srdcových mitochondrií aj v podmienkach s obmedzeným prísunom kyslíka, akou je ischemická choroba srdca, je predmetom mnohých kardioprotektívnych terapií. Známe je, že mitochondrie majú rozhodujúcu úlohu v procese adaptácie srdca na nepriaznivé podmienky. Jedným zo základných mechanizmov prispievajúcim k udržateľnosti energetického metabolizmu myokardu patrí nesporné aj regulácia otvárania mPTP. Predchádzajúce zistenia naznačujú, že do procesu adaptácie sú zapojené nielen funkčné, ale aj štruktúrne zmeny srdcových mitochondrií. Táto znalosť je podporená vzťahom zloženia mitochondriálnej membrány a funkčných vlastností srdca. Štruktúra kardiolipínu, stupeň fluidity mitochondriálnej membrány, ROS či Ca^{2+} ióny ovplyvňujú tvorbu a otváranie mPTP, čo sa prejavuje v mitochondriálnom prežívaní. Procesy inhibície otvárania mPTP a zabezpečenia procesu oxidačnej fosforylácie vedúcej k udržaniu adekvátnej produkcie ATP predstavujú esenciálnu a výhodnú kardioprotektívnu stratégiu.

Podakovanie:

Práca bola finančne podporená grantmi: APVV 15-0119, VEGA 2/0121/18, ITMS 26230120009.

Nexistuje žiadny konflikt záujmov.

Čestné vyhlásenie o nestrannosti a vylúčení konfliktu záujmov: Autori deklarujú, že neexistuje konflikt záujmov vo vzťahu k tejto práci.

Literatúra

- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, et al. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res* 2011;1813:1360–1372.
- Ajith TA, Jayakumar TG. Mitochondria-targeted agents: future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases. *World J Cardiol* 2014;6:1091–1099.
- Chen HY, Jia XL, Zhao SQ, et al. Dual role of polyamines in heart ischemia/reperfusion injury through regulation of mitochondrial permeability transition pore. *Sheng Li Xue Bao* 2019;71:681–688.
- Kurian GA. Mitochondrial dysfunction plays a key role in the abrogation of cardioprotection by sodium hydrosulfide post-conditioning in diabetic cardiomyopathy rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2019; doi:10.1007/s00210-019-01733-z.
- Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med* 2002;2:339–348.
- Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 2001;89:29–46.
- Picard M, McEwen B, Epel ES, et al. An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Front Neuroendocrinol* 2018;49:72–85.
- Kristian T, Bernardi P, Siesjö BK. Acidosis promotes the permeability transition in energized mitochondria: implications for reperfusion injury. *J Neurotrauma* 2001;18:1059–1074.
- Liu Y, Sato T, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 1998;97:2463–2469.
- Waczulíková I, Ziegelhöffer A, Országhová Z, et al. Fluidising effect of resorcylicidene aminoguanidine on sarcolemmal membranes in streptozotocin-diabetic rats: blunted adaptation of diabetic myocardium to Ca^{2+} overload. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:727–739.
- von Ruecker AA, Han-Jeon BG, Wild M, et al. Protein kinase C involvement in lipid peroxidation and cell membrane damage induced by oxygen-based radicals in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:836–842.
- Ong SB, Subrayan S, Lim SY, et al. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2010;121:2012–2022.
- Kueh HY, Niethammer P, Mitchison TJ. Maintenance of mitochondrial oxygen homeostasis by cosubstrate compensation. *Biophys J* 2013;104:1338–1348.
- Saks V, Favier R, Guzun R, et al. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *J. Physiol.* 2006;577:769–777.
- Schanze N, Bode C, Duerschmied D. Platelet Contributions to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Immunol* 2019;10:1260.
- Nyengaard JR, Ido Y, Kilo C, et al. Interactions between hyperglycemia and hypoxia: Implications for diabetic retinopathy. *Diabetes* 2004;53:2931–2938.
- Cerychova R, Pavlinkova G. HIF-1, metabolism, and diabetes in the embryonic and adult heart. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2018;9:460.
- Ferko M, Gvozďjaková A, Kucharská J, et al. Functional remodeling of heart mitochondria in acute diabetes: interrelationships between damage, endogenous protection and adaptation. *Gen Physiol Biophys* 2006;25:397–413.
- Ziegelhöffer A, Waczulíková I, Ferko M, et al. Calcium signaling-mediated endogenous protection of cell energetics in the acutely diabetic myocardium. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:1083–1094.

20. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol* 2014;2:702–714.
21. Ferree A, Shirihai O. Mitochondrial dynamics: The intersection of form and function. *advances in experimental medicine and biology* 2012;748:13–40.
22. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007;59:418–458.
23. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124–1136.
24. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579–88.
25. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al. Regional ischemic preconditioning protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993;87:893–899.
26. Ferko M, Andelová N, Szeiffová Bačová B, et al. Myocardial adaptation in pseudohypoxia: signaling and regulation of mPTP via mitochondrial connexin 43 and cardiolipin. *Cells* 2019;8:E1449.
27. Boengler K, Lochnit G, Schulz R. Mitochondria “THE” target of myocardial conditioning. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2018;315:H1215–H1231.
28. Halestrap A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:372–385.
29. Heusch G. Molecular Basis of Cardioprotection. *Circ. Res.* 2015;116:674–699.
30. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2015;78:100–106.
31. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009;46:821–831.
32. Kwong JQ, Molken JD. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab* 2015;21:206–214.
33. Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol. Physiol.* 2007;292:C670–C686.
34. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 2010;90:207–258.
35. Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol* 1994;19:59–113.
36. Jaswal JS, Cadete VJJ, Lopaschuk GD. Optimizing cardiac energy substrate metabolism: a novel therapeutic intervention for ischemic heart disease. *Heart Metab* 2008;38:5–14.
37. Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC, et al. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest* 1988;82:2017–2025.
38. Hendrickson SC, St Louis JD, Lowe JE, et al. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1997;166:85–94.
39. Jaswal JS, Keung W, Wan W, et al. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation – a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:1333–1350.
40. Fillmore N, Mori J, Lopaschuk GD. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol* 2014;171:2080–2090.
41. Dennis SC, Gevers W, Opie LH. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:1077–1086.
42. Pike MM, Luo CS, Clark MD, et al. NMR measurements of Na and cellular energy in the ischemic rat heart: role of Na/H exchange. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1993;265:H2017–H202.
43. Cruz RS, de Aguiar RA, Turnes T, et al. Intracellular shuttle: the lactate aerobic metabolism. *Scientific World Journal* 2012;4:20984.
44. Adameova A, Dhalla NS. Role of microangiopathy in diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev* 2014;19:25–33.
45. Ong SB, Dongworth RK, Cabrera-Fuentes HA, et al. Role of the mPTP in conditioning the heart – translatability and mechanism. *Br J Pharmacol* 2015a;172:2074–2084.
46. Ong SB, Samangouei P, Kalkhoran SB, et al. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2015b;78:23–34.
47. Tribulová N, Ravingerová T, Volkovová K, et al. Resistance of diabetic rat hearts to ca overload-related injury. Histochemical and ultrastructural study. *Diabetes Res Clin Pract* 1996;31:S113–S122.
48. Ziegelhöffer A, Ravingerová T, Styk J, et al. Diabetic cardiomyopathy in rats: biochemical mechanisms of increased tolerance to calcium overload. *Diabetes Res Clin Pract* 1996;31:S93–103.
49. Ziegelhöffer A, Ravingerová T, Styk J, et al. Mechanisms that may be involved in calcium tolerance of the diabetic heart. *Mol Cell Biochem* 1997;176:91–98.
50. Ravingerová T, Štetka R, Volkovová K, et al. Diabetes modulates response to ischemia in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 2000;210:143–151.
51. Ravingerová T, Štetka R, Barančík M, et al. Response to ischemia and endogenous myocardial protection in the diabetic heart. *Adv Exp Med Biol* 2001;498:285–293.
52. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ Res* 1989;65:1045–1056.
53. Marban E, Koretsune Y, Kusuoka H. Disruption of intracellular Ca²⁺ homeostasis in hearts reperfused after prolonged episodes of ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1994;723:38–50.
54. Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS, et al. Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 1998;39:423–433.
55. Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, et al. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 2001;51:241–250.
56. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007;357:1121–1135.
57. Ferko M, Kancirová I, Jašová M, et al. Remote ischemic preconditioning of the heart: protective responses in functional and biophysical properties of cardiac mitochondria. *Physiol Res* 2014;63:S469–S478.

58. Horvath SE, Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* 2013;52:590–614.
59. Guo R, Gu J, Zong S, et al. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomed J* 2018;41:9–20.
60. Mileykovskaya E, Zhang M, Dowhan W. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry (Mosc)* 2005;70:154–158.
61. Paradis S, Leoni V, Caccia C, et al. Cardioprotection by the TSPO ligand 4'-chlorodiazepam is associated with inhibition of mitochondrial accumulation of cholesterol at reperfusion. *Cardiovasc Res* 2013;98:420–427.
62. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, et al. Role of cardiolipin in mitochondrial function and dynamics in health and disease: molecular and pharmacological aspects. *Cells* 2019;8:728.
63. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, et al. Role of cardiolipin peroxidation and Ca²⁺ in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell Calcium* 2009;45:643–650.
64. Assaly R, de Tassigny A, d'Anglemont, Paradis S, et al. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening and cell death during hypoxia–reoxygenation in adult cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 2012;675:6–14.
65. Chen Q, Lesnfsky EJ. Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain. *Free Radic Biol Med* 2006;40:976–982.
66. Petrosillo G, Matera M, Moro N, et al. Mitochondrial complex I dysfunction in rat heart with aging: critical role of reactive oxygen species and cardiolipin. *Free Radic Biol Med* 2009;46:88–94.
67. Feillet-Coudray C, Fouret G, Casas F, et al. Impact of high dietary lipid intake and related metabolic disorders on the abundance and acyl composition of the unique mitochondrial phospholipid, cardiolipin. *J Bioenerg Biomembr* 2014;46:447–457.
68. Paradies G, Petrosillo G, Pistolesse M, et al. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 1999;27:42–50.
69. Murphy RC, Johnson KM. Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *J Biol Chem* 2008;283:15521–15525.
70. Vejux A, Malvitte L, Lizard G. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz J Med Biol Res* 2008;41:545–556.
71. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott JS. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014;94:909–950.
72. Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, et al. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1997;80:743–748.
73. Javadov S, Jang S, Parodi-Rullán R, et al. Mitochondrial permeability transition in cardiac ischemia-reperfusion: whether cyclophilin D is a viable target for cardioprotection? *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2017;74:2795–2813.
74. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:129–141.
75. Pérez MJ, Quintanilla RA. Development or disease: duality of the mitochondrial permeability transition pore. *Dev Biol* 2017;426:1–7.
76. Elrod JW, Molkentin JD. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ J.* 2013;77:1111–1122.
77. Hou Y, Ghosh P, Wan R, et al. Permeability transition pore-mediated mitochondrial superoxide flashes mediate an early inhibitory effect of amyloid beta1-42 on neural progenitor cell proliferation. *Neurobiol Aging.* 2014;35:975–989.
78. Lu X, Kwong JQ, Molkentin JD, et al. Individual cardiac mitochondria undergo rare transient permeability transition pore openings. *Circ Res* 2016;118:834–841.
79. Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 2012;35:211–225.
80. Bernardi P. Why F-ATP synthase remains a strong candidate as the mitochondrial permeability transition pore. *Front. Physiol.* 2018;9.
81. Karch J, Molkentin JD. Identifying the components of the elusive mitochondrial permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014;111:10396–10397.
82. Beutner G, Alanzalon RE, Porter GA. Cyclophilin D regulates the dynamic assembly of mitochondrial ATP synthase into synthasomes. *Sci. Rep.* 2017;7:14488.
83. Claypool SM. Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2009;1788:2059–2068.
84. Carroll J, He J, Ding S, et al. Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116:12816–12821.
85. Karch J, Brourd MJ, Khalil H, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD. *Sci Adv.* 2019;5:eaaw4597.
86. Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2008;359:473–481.
87. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 1995;307:93–98.
88. Gomez L, Thibault H, Gharib A, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1654–661.
89. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:367–374.
90. Briston T, Selwood DL, Szabadkai G, et al. Mitochondrial permeability transition: a molecular lesion with multiple drug targets. *Trends Pharmacol Sci* 2019;40:50–70.
91. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, et al. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2004;61:115–122.
92. Khaliulin I, Clarke SJ, Lin H, et al. Temperature preconditioning of isolated rat hearts—a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Physiol* 2007;58:1147–1161.
93. Saotome M, Hajnóczky G, Katoh H, et al. “Mitochondrial remodeling” in coronary heart disease. *Res Rep in Clin Cardiol* 2014;5:111–122.