

UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Studijní program: Fyziologie a patologická fyziologie

**Funkce mitochondrií v průběhu
experimentálních patologických stavů**

Mitochondrial function during experimental
pathological conditions

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.

Plzeň 2024

MUDr. Martina Grundmanová

Abstrakt

Disertační práce se zabývá problematikou mitochondriální dysfunkce ve vybraných patologických stavech, se zaměřením na tři konkrétní modely: mitochondriální dysfunkci v srdečních komorách potkana po aplikaci propofolu, v ledvinách u potkanů s chirurgicky navozeným chronickým renálním selháním (CRS) a u mužů s asthenozoospermií. Mitochondrie, jakožto klíčové orgány pro produkci energie prostřednictvím oxidativní fosforylace, hrají zásadní roli v udržování buněčné homeostázy, a jejich dysfunkce vede k závažným následkům v buňkách a tkáních s vysokou energetickou náročností, jako jsou srdce, ledviny, játra, mozek a spermie.

Stěžejní metodou použitou v této práci byla vysokoúčinná respirometrie, která umožnila detailní hodnocení spotřeby kyslíku mitochondriemi v různých tkáních a za různých podmínek. Tato metoda byla klíčová pro odhalení změn v mitochondriální aktivitě v jednotlivých modelech.

První část práce se zaměřuje na vliv propofolu na mitochondriální funkci v srdci. Všechny respirační parametry byly v levé kontrolní komoře výrazně vyšší než v pravé. Propofol při koncentraci $0,025 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ výrazně snížil aktivitu komplexu I a při koncentraci $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ také kontrakční sílu papilárního svalu. Délka akčního potenciálu nebyla propofolem ovlivněna při žádné z testovaných koncentrací. Výsledky naší studie naznačují, že mitochondriální dysfunkce, projevující se sníženou aktivitou komplexu I, může být jedním z mechanismů, které přispívají k oslabení srdeční kontrakce během anestezie propofolem.

Druhá část práce se věnuje studiu mitochondriálních změn v ledvinách u potkanů s chirurgicky navozeným chronickým renálním selháním. Model 5/6 nefrektomie u potkanů ukázal, že mitochondrie v ledvinách vykazují sníženou aktivitu v renální kůře, zatímco ve dřeni dochází k hypermetabolickému stavu jako mechanismu přispívajícímu ke kompenzaci ztráty funkční tkáně. Tato

dysfunkce vede k energetickému deficitu a mohla by stát za progresí poškození ledvin.

Třetí část práce zkoumá mitochondriální dysfunkci u mužů s asthenozoospermií, kde byla identifikována snížená aktivita elektronového transportního řetězce, a to konkrétně komplexu I. Navíc inhibice komplexu I rotenonem ukázala, že příspěvek komplexu I k celkové kapacitě oxidační fosforylace byl i u zdravých spermií relativně nižší, než je tomu typicky v somatických buňkách.

Závěrem tato disertační práce poskytuje nové poznatky o roli mitochondriální dysfunkce ve třech odlišných patologických stavech a otevírá cestu k možnému vývoji terapeutických intervencí zaměřených na obnovení mitochondriální funkce v těchto klinicky relevantních situacích.

Abstract

The dissertation focuses on the issue of mitochondrial dysfunction in selected pathological conditions, with an emphasis on three specific models: mitochondrial dysfunction in rat cardiac ventricles after propofol administration, in kidneys of rats with surgically induced chronic renal failure (CRF), and in men with asthenozoospermia. Mitochondria, as key organelles for energy production through oxidative phosphorylation, play a crucial role in maintaining cellular homeostasis, and their dysfunction leads to severe consequences in cells and tissues with high energy demands, such as the heart, kidneys, liver, brain, and sperm.

The primary method used in this study was high-resolution respirometry, which enabled detailed assessment of mitochondrial oxygen consumption in various tissues and under different conditions. This method was instrumental in revealing changes in mitochondrial activity in the individual models.

The first part of the dissertation focuses on the effect of propofol on mitochondrial function in the heart. All respiratory parameters in the control left ventricle were significantly higher than those in the right ventricle. Propofol at a concentration of $0.025 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ significantly reduced complex I activity, and at a concentration of $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, it also decreased the contractile force of the papillary muscle. The action potential duration was not affected by propofol at any of the tested concentrations. Our study's findings suggest that mitochondrial dysfunction, manifested by reduced complex I activity, may be one of the mechanisms contributing to weakened cardiac contraction during propofol anesthesia.

The second part of the dissertation explores mitochondrial changes in the kidneys of rats with surgically induced chronic renal failure. The 5/6

nephrectomy model in rats demonstrated that kidney mitochondria showed reduced activity in the renal cortex, while the medulla exhibited a hypermetabolic state as a compensatory mechanism for the loss of functional tissue. This dysfunction results in an energy deficit and may underlie the progression of kidney damage.

The third part of the dissertation investigates mitochondrial dysfunction in men with asthenozoospermia, identifying decreased activity of the electron transport chain, specifically complex I. Furthermore, inhibition of complex I with rotenone revealed that the contribution of complex I to the total oxidative phosphorylation capacity in healthy sperm was relatively lower than typically observed in somatic cells.

In conclusion, this dissertation provides new insights into the role of mitochondrial dysfunction in three distinct pathological conditions and opens pathways for the potential development of therapeutic interventions aimed at restoring mitochondrial function in these clinically relevant situations.

Předmluva a poděkování

Tato práce vznikla na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy. Ráda bych poděkovala své školitelce prof. MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D. za její odborné vedení a dohled nad prací.

MUDr. Martina Grundmanová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Plzni, dne 20. 11. 2024

MUDr. Martina Grundmanová

Obsah

1	TEORETICKÝ ÚVOD	14
1.1	Mitochondrie.....	14
1.1.1	Stavba mitochondrie	14
1.1.2	Respirační řetězec mitochondrie	18
1.2	Funkce mitochondrie	22
1.3	Úloha mitochondrie v různých patologických stavech	26
1.4	Vliv anestetik na funkci mitochondrií	38
2	CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	40
2.1	Cíle práce	40
2.2	Hypotézy	40
3	MATERIÁL A METODY	42
3.1	Analýza mitochondriální respirace	42
3.2	Mitochondriální respirační stavy	43
3.3	Metody vztahující se k cíli 1 – vliv propofolu na mitochondriální spotřebu kyslíku v levé a v pravé srdeční komoře	48
3.3.1	Experimentální zvířecí model	48
3.3.2	Vysokoúčinná respirometrie.....	48
3.3.3	Aktivita citrátsyntázy.....	51
3.3.4	Měření kontraktility a elektrofyzilogických parametrů	52
3.3.5	Statistické zpracování.....	53
3.4	Metody vztahující se k cíli 2 - vliv chronického onemocnění ledvin na mitochondriální spotřebu kyslíku, a to odděleně na kůru a dřeň	54
3.4.1	Experimentální zvířecí model	54
3.4.2	Vysokoúčinná respirometrie.....	55
3.4.3	Aktivita citrátsyntázy.....	57
3.4.4	Statistické zpracování.....	58

3.5	Metody vztahující se k cíli 3 - stanovení respirační aktivity mitochondrií spermií s normální a sníženou pohyblivostí	59
3.5.1	Studovaný soubor	59
3.5.2	Separace spermií metodou hustotního gradientu	59
3.5.3	Vysokoúčinná respirometrie.....	60
3.5.4	Statistické zpracování.....	60
4	VÝSLEDKY	62
4.1	Výsledky vztahující se k cíli 1 - vliv propofolu na mitochondriální spotřebu kyslíku v levé a v pravé srdeční komoře	62
4.1.1	Vysokoúčinná respirometrie.....	62
4.1.2	Měření kontraktility a elektrofyziologických parametrů	64
4.2	Výsledky vztahující se k cíli 2 - vliv chronického onemocnění ledvin na mitochondriální spotřebu kyslíku, a to odděleně na kůru a dřeň... 66	
4.2.1	Účinek 5/6 nefrektomie	66
4.2.2	Vysokoúčinná respirometrie.....	67
4.2.3	Aktivita citrátsyntázy.....	70
4.3	Výsledky vztahující se k cíli 3 - stanovení respirační aktivity mitochondrií spermií s normální a sníženou pohyblivostí	72
5	DISKUZE.....	75
5.1	Diskuze vztahující se k cíli 1 - vliv propofolu na mitochondriální spotřebu kyslíku v levé a v pravé srdeční komoře	75
5.2	Diskuze vztahující se k cíli 2 - vliv chronického onemocnění ledvin na mitochondriální spotřebu kyslíku, a to odděleně na kůru a dřeň... 79	
5.3	Diskuze vztahující se k cíli 3 - stanovení respirační aktivity mitochondrií spermií s normální a sníženou pohyblivostí	83
6	ZÁVĚR.....	86
7	LITERATURA.....	88
8	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	119

8.1	Odborné publikace vztahující se k tématu disertační práce	119
8.2	Ostatní odborné publikace	120
8.3	Prezentace výsledků na odborných setkáních a konferencích	120
9	PŘÍLOHY	122

Seznam použitých zkratk

ADP; D	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
Ama	antimycin A
As, Asc	askorbát
Azd	azid
Bcl-2	odvozeno z anglického názvu „B cell lymphoma“
CIV	aktivita komplexu IV
CoA	koenzym A
CoQ	koenzym Q
COX1	první podjednotka <i>cytochrom-c-oxidasy</i>
COX2	druhá podjednotka <i>cytochrom-c-oxidasy</i>
COX3	třetí podjednotka <i>cytochrom-c-oxidasy</i>
CS	citrátsyntáza
Cyt c	cytochrom c
DNA	deoxyribonukleová kyselina
e ⁻	elektron
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
EF	frakční exkrece
ETS	elektronový transportní řetězec, elektronový transportní systém
FAD	flavinadenindinukleotid
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon
FADH ₂	redukováná forma flavinadenindinukleotid
G	glutamát
H ⁺	proton

HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
KI; I	komplex I elektrontransportního systému
KII; II	komplex II elektrontransportního systému
KIII; III	komplex III elektrontransportního systému
KIV; IV	komplex IV elektrontransportního systému
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LEAK	nefosforylační respirační stav
L _{OMY}	stav úniku po aplikaci inhibitoru ATP syntázy oligomycinu
M	malát
MCU	mitochondriální vápníkový uniportér
mPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti
mtDNA	mitochondriální DNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
mtSSB	mitochondriální jednořetězcový protein vázající DNA
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
OMY	oligomycin
OXPHOS	oxidativní fosforylace
P	pyruvát
PINK1	PTEN-indukovaná kináza 1 je mitochondriální serin/threonin-protein kináza
POLG	gen DNA-polymerázy gama
PTP	přechodový pór permeability (z anglického Permeability Transition Pore)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z anglického Rective Oxygen Species)
Rot	rotenon
ROX	reziduální spotřeba kyslíku

rRNA	ribosomální RNA
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
S	sukcinát
TFAM	mitochondriální transkripční faktor A
TMPD	N,N,N',N'-tetrametyl-p-fenylendiamin dichlorid
tRNA	transferová RNA
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Mitochondrie

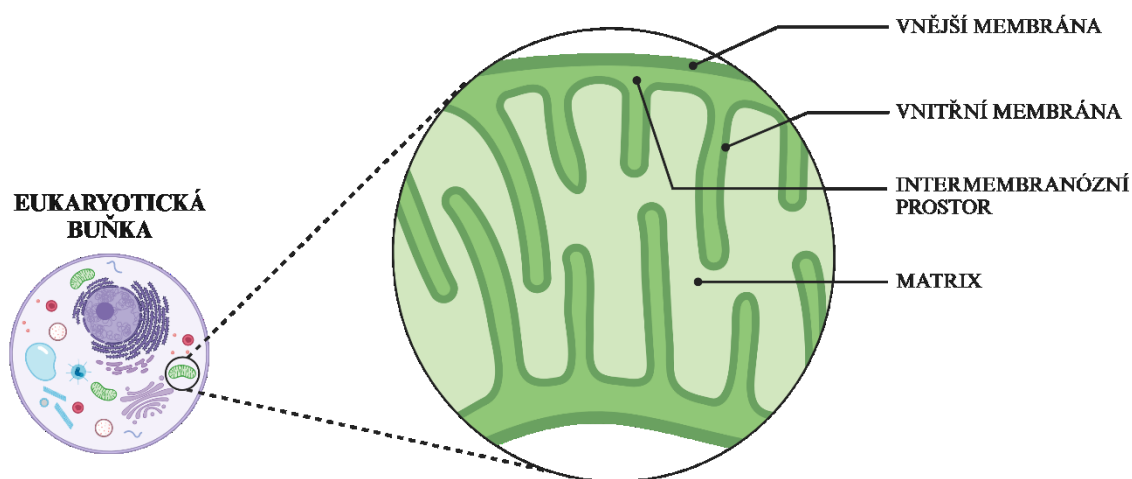
Mitochondrie jsou semiautonomní membránové organely eukaryotických buněk. Jejich původ vysvětluje endosymbiotická teorie, podle které se mitochondrie pravděpodobně vyvinuly ze samostatně žijících bakterií, které „vstoupily“ do hostitelské buňky (Margulis 1975).

Jejich počet v jednotlivých buňkách je individuální a závisí na metabolické aktivitě daného typu buňky. V průměrné buňce se tak jejich počet pohybuje ve stovkách, ale u buněk s vysokými nároky na spotřebu energie, přesahuje jejich počet i 1000. Mezi tyto buňky patří např. kardiomyocyty, hepatocyty, renální tubulární buňky nebo sekreční buňky žláz. Mitochondrie také v buňce nejsou solitárními strukturami, ale jsou vzájemně propojeny do dynamické, stále se přeskupující mitochondriální sítě (Amchenkova et al. 1988).

1.1.1 Stavba mitochondrie

Jedná se o struktury délky 0,5 až 1 μm , tvořené dvěma membránami (vnější a vnitřní), mezimembránovým prostorem a vnitřní matrix (Obrázek 1). Vnější mitochondriální membrána slouží k oddělení mezimembránového prostoru mitochondrie od buněčné cytoplazmy a je skrze ni umožněna komunikace mezi těmito dvěma prostředími. Prostup je umožněn molekulám do maximální velikosti 6 kDa (Zalman et al. 1980). Pod vnější mitochondriální membránou se nachází mezimembránový prostor, jehož složení je velmi podobné okolnímu cytosolu a umožňuje propojení mitochondriálních procesů s těmi buněčnými. Vnitřní mitochondriální membrána odděluje intermembránový prostor od vnitřní matrix. Vytváří vchlípeniny do vnitřního prostoru mitochondrie, které se označují jako krysty, které zvětšují povrch

membrány a poskytují tak dostatečný prostor pro průběh řady metabolických reakcí. Vnitřní membrána je minimálně propustná a přestup látek skrze ni je přísně regulován specifickými transportéry a pumpami. Součástí této membrány jsou proteiny dýchacího řetězce (bude rozebráno dále). Poslední částí mitochondrie je její matrix, kde se nachází jednak mitochondriální DNA (mtDNA), ribozomy, ale také mnoho enzymů účastnících se celé řady metabolických dějů (Krebsův cyklus, β -oxidace mastných kyselin) (Srere a Sumegi 1986).



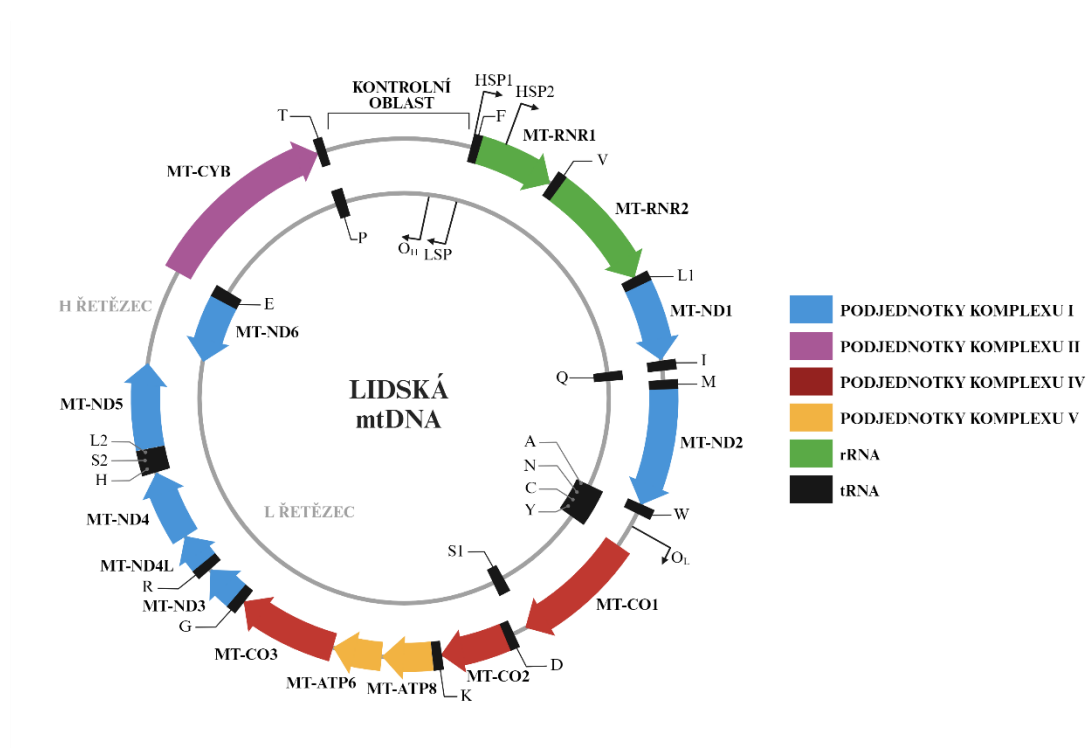
Obrázek 1 - Základní struktura mitochondrie

Mitochondriální genom

Typická mitochondriální DNA je uzavřená dvouvláknová kruhová molekula, jejíž velikost se u různých druhů liší a pohybuje se v rozmezí od 11,4 kb po 32,1 kb (Gissi et al. 2008).

Lidská mitochondriální DNA je o délce 16 569 párů bází (Anderson et al. 1981) a obsahuje 37 genů kódujících dvě ribosomální RNA (rRNA), 22 transferových RNA (tRNA) a 13 polypeptidů, které jsou součástí systému

oxidativní fosforylace (Castellana et al. 2011). Podrobnou strukturu mtDNA zobrazuje Obrázek 2. Jednotlivá vlákna mtDNA se liší složením bází, kdy těžké vlákno je bohaté na guanin a kóduje většinu mitochondriálních genů (12 polypeptidů, 2 rRNA a 14 tRNA), naproti tomu lehké vlákno obsahuje dominantně cytosin a nese geny pro 1 polypeptid a 8 tRNA (Clayton 2000). Součástí mtDNA je i tzv. D-smyčka, což je významná regulační oblast, ve které dochází k počátku replikace obou řetězců (Shadel a Clayton 1997).



Obrázek 2 - Struktura lidské mitochondriální DNA

Savčí buňky mohou obsahovat stovky až deset tisíc molekul mtDNA s více kopiemi na jednu mitochondrii, a to v závislosti na své funkční a metabolické aktivitě (Chinnery a Hudson 2013). Replikace mtDNA je nezávislá na replikaci buňky a je prováděna DNA polymerázou gama, kódovanou jaderným genem POLG. Polymeráza gama je heterotrimerní komplex jedné katalytické a dvou přídatných podjednotek (Kaguni 2004), který je ve spolupráci s DNA helikázou Twinkle a mitochondriálním

jednořetězcovým vazebným proteinem DNA (mtSSB) dostačující k replikaci mtDNA i *in vitro* (Korhonen et al. 2004).

Mitochondriální DNA je organizována do struktur nazývaných nukleoidy, kde je asociována s proteiny, jako je mitochondriální transkripční faktor TFAM a další, které pomáhají stabilizovat mtDNA a regulovat její replikaci a expresi (Bogenhagen 2012). Asociace s těmito proteiny zvyšuje ochranu mtDNA před škodlivými vlivy, a to zejména volnými kyslíkovými a dusíkatými radikály, podobně jako tuto funkci plní histonové proteiny u jaderné DNA (Gaziev et al. 2014). Celkově se odhaduje, že s mitochondriemi je spojeno kolem 1500 proteinů v závislosti na organismu a tkáni (Lotz et al. 2014). Všechny proteiny kódované mtDNA tvoří klíčové složky pro tvorbu komplexů dýchacího řetězce, kdy je zde kódováno sedm podjednotek komplexu I, jedna podjednotka podjednotka komplexu III, tři podjednotky komplexu IV a dvě podjednotky komplexu V (Schon et al. 2012).

V průběhu života dochází k postupným změnám v mitochondriálním genomu, a to ve formě bodových mutací, ale i větších přestaveb. Tyto mutace se postupně hromadí a při dosažení prahu – situace, kdy akumulace dysfunkčního produktu dosáhne určité úrovně, mitochondrie ztrácí schopnost plnit své základní funkce a dochází k patologické manifestaci mutace (Rossignol et al. 2003). Mezi faktory přispívající ke zvýšenému výskytu mutací v mtDNA patří např. a) absence efektivních opravných mechanismů, které jsou běžné u jaderné DNA; b) chemická modifikace mtDNA způsobená vnitřními alkylačními činidly, volnými kyslíkovými a dusíkatými radikály, některými hormony a toxickými látkami, jako je etanol, chemoterapeutika apod.; c) blízkost mtDNA k místu produkce kyslíkových radikálů; d) omezená kapacita polymerázy gama (Alexeyev et al. 2013). I když je celková hladina mutované mtDNA nízká, aby ovlivnila celou tkáň, mutace mohou tvořit „slabá

místa“, která jsou schopna funkci tkáně paralyzovat (Greaves et al. 2014; Khrapko a Turnbull 2014).

1.1.2 Respirační řetězec mitochondrie

Elektronový transportní řetězec (ETS) je komplexní systém, který hraje zásadní roli v procesu oxidativní fosforylace v mitochondriích eukaryotických buněk. Tento řetězec je tvořen 4 komplexy (komplex I – NADH-koenzym Q oxidoreduktáza; komplex II – sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza; komplex III – koenzym Q-cytochrom c oxidoreduktáza a komplex IV – cytochrom c oxidáza), dvěma mobilními elektronovými přenašeči (koenzym Q a cytochrom c) a ATP syntázou (nazývána též komplex V).

Komplex I

Komplex I neboli NADH-koenzym Q oxidoreduktáza je prvním komplexem systému oxidativní fosforylace. Jedná se o největší z komplexů dýchacího řetězce, jeho tvar připomíná písmeno L a celkově ho tvoří 44 podjednotek, z nichž 7 je kódováno na mitochondriální DNA, a to konkrétně podjednotky ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 a ND6 (Brandt 2006). Funkce tohoto enzymu spočívá v příjmu dvou elektronů z NADH, jejich následný přenos přes několik železo-sirných center až na první z mobilních přenašečů, a to koenzym Q. Zároveň dochází k pumpování 4 H^+ z matrix do intermembránového prostoru (Sazanov 2015).

Komplex II

Sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza neboli komplex II, je druhým komplexem elektronového transportního řetězce. Jeho struktura je tvořena ze 4 podjednotek a to SDHA (flaviprotein podjednotka), SDHB (železo-sirná podjednotka, SDHC a SDHD (cytochrom b podjednotky). Podjednotka SDHA

obsahuje jako kofaktor flavin adenin dinukleotid, jedná se o místo, kde se sukcinát oxiduje na fumarát. SDHB podjednotka obsahuje tři železo-sirná centra, která přenášejí elektrony z FADH_2 na koenzym Q. Podjednotky SDHC a SDHD je podílejí na vazbě koenzymu Q a přenosu elektronů na něj.

Funkcí komplexu II je zprostředkování oxidace sukcinátu na fumarát v Krebsově cyklu, což je spojeno s redukcí FAD na FADH_2 . K dalšímu významnému ději, ke kterému dochází, je redukce koenzymu Q (ubichinon) na ubichinol, a to díky přenosu elektronů z FADH_2 přes železo-sirná centra. Odtud jsou elektrony následně předány na komplex III (Bezawork-Geleta et al. 2017). Skrze komplex II nedochází k pumpování protonů do mezimembránového prostoru.

Komplex III

Komplex III je známý také jako koenzym Q-cytochrom *c* oxidoreduktáza nebo cytochrom *bc*₁ komplex. Jedná se o třetí proteinový komplex elektronového transportního řetězce. Tento komplex hraje významnou roli při přenosu elektronů z ubichinolu na cytochrom *c* a při pumpování protonů, čímž přispívá k vytvoření protonového gradientu, který je nezbytný pro syntézu adenosintrifosfátu (ATP) (Rieske 1976; Denis 1986).

Tento komplex je tvořen z 11 podjednotek, z nichž hlavní jsou cytochrom *b*, cytochrom *c*₁ a Rieskeho železo-sirný protein. Mezi další menší podjednotky patří např. core protein 1 (UQCRFS1) a core protein 2 (UQCRFS2), které podporují strukturu a stabilitu komplexu III a jsou nezbytné pro udržení jeho celkové integrity (Crofts 2004).

Přenos elektronů zahrnuje 2 fáze. V první fázi dochází k navázání ubichinolu na komplex III a uvolnění 2 elektronů, kdy jeden je přenesen na Rieskeho železo-sirný protein, poté na cytochrom *c*₁ a nakonec na cytochrom *c*. Naopak druhý elektron putuje cestou přes hem na ubichinon,

který se redukuje na ubisemichinon. Ve druhé fázi dochází k zopakování celého procesu, kdy opět jeden elektron putuje přes železo-sírné centrum na cytochrom *c* a druhý přes hem na koenzym Q, který se stane plně redukovaný (Banerjee et al. 2022). Během tohoto cyklu jsou pumpovány 4 protony (H^+) do mezimembránového prostoru.

Komplex IV

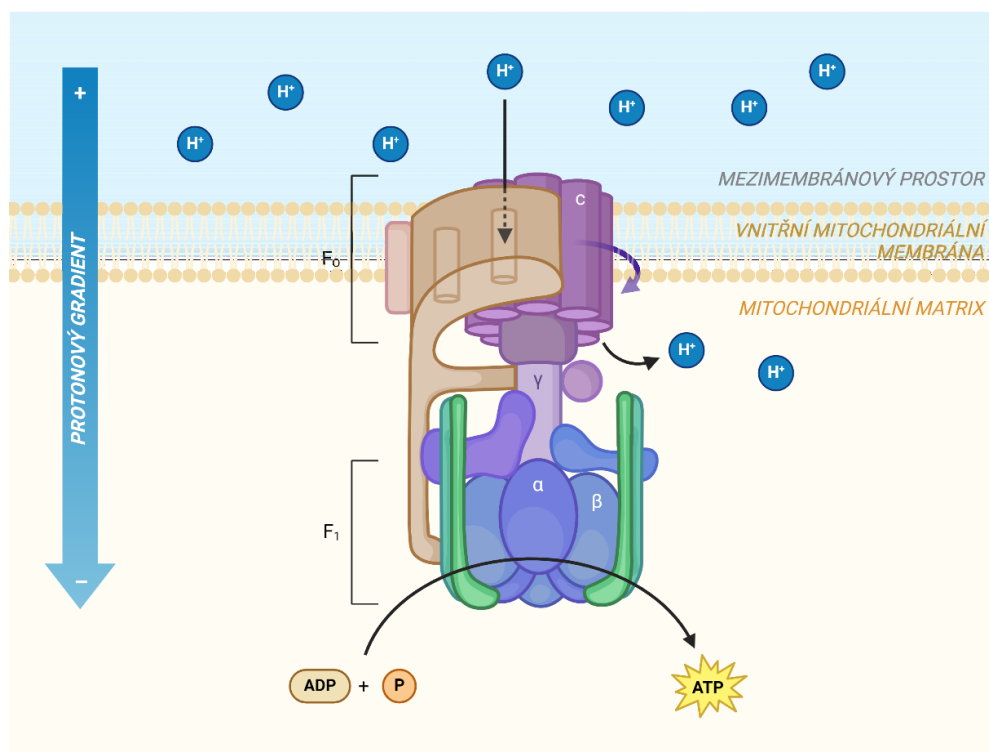
Komplex IV je známý také jako cytochrom *c* oxidáza (Wikstrom 1977). Jedná se o poslední komplex elektron transportního řetězce. Je tvořen 13 podjednotkami, z nichž nejdůležitější jsou COX1, COX2 a COX3. Tyto podjednotky jsou také jako jediné kódované mitochondriální DNA (Brzezinski a Gennis 2008). Jejich součástí jsou aktivní centra s atomy mědi, na která jsou přenášeny elektrony z redukovaného cytochromu *c*. Nejprve jsou elektrony předány měďnatému centru Cu_a (součást podjednotky COX2), odkud pokračují přes cytochrom *a*, cytochrom a_3 na druhé měďnaté centrum – Cu_b (Popović 2013). Finálním akceptorem elektronů je molekulární kyslík. Kyslík je redukován na vodu pomocí čtyř elektronů a čtyř protonů ($O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$). Na každé čtyři elektrony, které jsou přeneseny na kyslík, dojde k přenosu čtyř protonů z matrix do mezimembránového prostoru.

ATP syntáza

ATP syntáza nebo také F_0F_1 ATP syntáza nebo komplex V je klíčovým enzymem v energetickém metabolismu buněk, přeměňující energii z protonového gradientu na chemickou energii ve formě ATP.

Komplex je funkčně rozdělen na 2 části a to konkrétně F_0 a F_1 . F_0 část je tvořena 10 podjednotkami (a , b_2 , c_8 , d , e , f , g , F_6 , A_6L , OSCP) a je ukotvena do vnitřní mitochondriální membrány. Tato část slouží jako protonový kanál, kterým protony procházejí z mezimembránového prostoru zpět do matrix

mitochondrie. Druhá část, F_1 část, je složena jen ze 6 podjednotek, a to konkrétně α , β , γ , δ , ϵ a inhibičním proteinem IF_1 , kdy podjednotky α a β tvoří hexamerickou strukturu s katalytickými místy pro syntézu ATP. F_1 podjednotka vyčnívá do matrix mitochondrie (Neupane et al. 2019). Podrobná stavba komplexu V je znázorněna na Obrázek 3. Přenos protonů a syntéza ATP probíhají v několika krocích. Nejprve dochází k přestupu protonů přes F_0 část, kdy dochází k rotaci kruhu podjednotek c a následně centrální hřídele (γ podjednotka F_1 části), což způsobuje konformační změny hexameru $\alpha_3\beta_3$ a tvorbu ATP (Yoshida et al. 2001; Guo a Rubinstein 2022).



Obrázek 3 - Detailní stavba F_0F_1 ATP syntázy

1.2 Funkce mitochondrie

Mitochondrie hrají klíčovou roli v metabolismu eukaryotických buněk, přičemž jejich hlavní funkcí je přeměna energie prostřednictvím oxidativní fosforylace.

Oxidativní fosforylace je důležitý proces buněčného metabolismu, během kterého dochází k produkci energie ve formě ATP. Tento proces, jak již bylo zmíněno, probíhá na vnitřní mitochondriální membráně, kde jsou integrovány čtyři hlavní enzymatické komplexy dýchacího řetězce (komplexy I - IV) a ATP syntáza (Alberts et al. 2002).

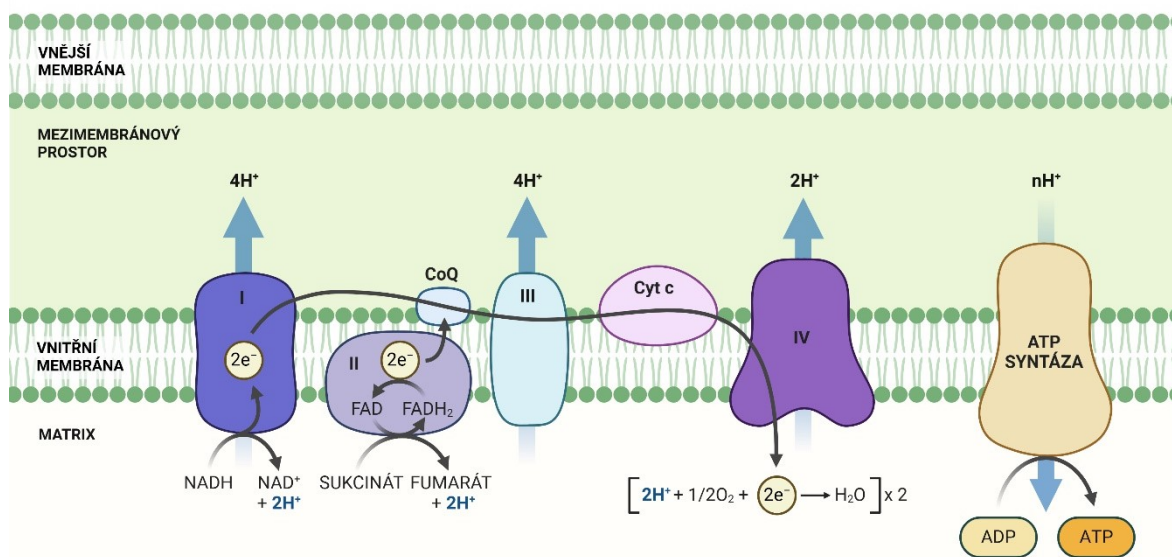
Oxidativní fosforylace začíná přenosem elektronů z molekul NADH a FADH₂, které jsou výsledkem glykolýzy, citrátového cyklu a beta-oxidace mastných kyselin. Elektrony z NADH vstupují do komplexu I, který tyto elektrony přenáší na ubiquinon (koenzym Q) a zároveň využívá energii z tohoto přenosu k čerpání protonů (H⁺) z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru (Cooper 2000). Tento proces je klíčový pro vytvoření protonového gradientu, který je nezbytný pro syntézu ATP. FADH₂, který odevzdává elektrony prostřednictvím komplexu II, je přenáší přímo na ubiquinon, ale bez spojení s čerpáním H⁺ do mezimembránového prostoru, takže přenos elektronů z FADH₂ generuje méně ATP než z NADH (Stryer 1995).

Ubichinon přenáší elektrony dále na komplex III, následně jsou předány skrze cytochrom c na komplex IV (Mitchell 1976). Komplex IV je posledním krokem v dýchacím řetězci a zde dochází k redukci kyslíku, čímž vzniká voda (Nicholls a Ferguson 2002). Tento proces je důležitý nejen pro likvidaci volných elektronů, ale také pro prevenci tvorby reaktivních kyslíkových forem (ROS), které by mohly poškozovat buňky.

Během přenosu elektronů skrz komplexy I, III a IV dochází k čerpání protonů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru, což vytváří

elektrochemický gradient, známý také jako protonový gradient (Alberts et al. 2002). Tento gradient je formou potenciální energie, která je využita ATP syntázou pro syntézu ATP z ADP a anorganického fosfátu. Protony se vrací do mitochondriální matrix skrze ATP syntázu, což je enzym, který katalyzuje fosforylaci ADP na ATP (Boyer 1997). Tento proces je známý jako chemiosmóza a je základem teorie, kterou navrhl Peter Mitchell v roce 1961 (Mitchell 1961). ATP syntáza funguje jako molekulární motor, který využívá energii toku protonů po jejich koncentračním gradientu k mechanickému otáčení a chemické reakci mezi ADP a fosfátem (Cooper 2000). Průběh procesu oxidativní fosforylace zobrazuje Obrázek 4. Každá molekula NADH může teoreticky generovat tři molekuly ATP, zatímco FADH_2 generuje přibližně dvě molekuly ATP, protože vstupuje do dýchacího řetězce na úrovni komplexu II, a tedy obchází čerpání protonů komplexem I. Výsledkem oxidativní fosforylace je produkce velkého množství ATP, které buňka využívá pro energeticky náročné procesy, jako je syntéza bílkovin, aktivní transport molekul přes membrány a svalová kontrakce (Alberts et al. 2002).

Oxidativní fosforylace je vysoce regulovaný proces. Aby se zabránilo nadměrnému vytváření ATP a reaktivních kyslíkových forem, je přítomno několik zpětnovazebních mechanismů, které zahrnují regulaci dostupnosti substrátů, jako je kyslík, ADP a fosfát, a také kontrolu aktivity jednotlivých enzymatických komplexů dýchacího řetězce (Stryer 1995).



Obrázek 4 - Dýchací řetězec mitochondrie. Schéma znázorňuje průběh oxidativní fosforylace - transport elektronů skrze jednotlivé komplexy na molekulární kyslík a tvorbu ATP. I – komplex I; II – komplex II; CoQ – koenzym Q; III – komplex III; Cyt c – cytochrom c; IV – komplex IV; ATP – adenosintrifosfát; e^- – elektron

Mitochondrie však nejsou pouze místem produkce energie. Jsou neopominutelné pro další buněčné procesy, jako je apoptóza (programovaná buněčná smrt), která je důležitá pro udržení homeostázy a odstranění poškozených nebo nepotřebných buněk (Kroemer et al. 1998). Apoptóza probíhá prostřednictvím dvou hlavních drah: vnější a vnitřní dráhy. Vnitřní dráha apoptózy je řízena mitochondriemi, které uvolňují proapoptotické proteiny, jako je cytochrom c nebo SMAC/DIABLO, do cytosolu (Green a Reed 1998). Cytochrom c aktivuje apoptosom, což je multiproteinový komplex, který spouští kaspázovou kaskádu vedoucí k degradaci buněčných komponent (Green 2005). Tento proces je regulován rodinou proteinů Bcl-2, které kontrolují permeabilitu vnější mitochondriální membrány, a tím

rozhodují o tom, zda dojde k uvolnění pro-apoptotických faktorů (Youle a Strasser 2008).

Mitochondrie se také podílejí na metabolismu lipidů. Jsou zásadní pro beta-oxidaci mastných kyselin, která probíhá v mitochondriální matrix (Mayr 2015). Mastné kyseliny jsou v cytosolu aktivovány na acyl-CoA a poté přeneseny do mitochondrie pomocí karnitinového transportního systému, kde jsou postupně oxidovány na acetyl-CoA, který vstupuje do citrátového cyklu (Cooper 2000). Tento proces je důležitý zejména v buňkách, které vyžadují velké množství energie, jako jsou buňky srdečního svalu nebo hepatocyty v játrech (Dabravolski et al. 2021).

Další důležitou funkcí mitochondrií je detoxikace reaktivních forem kyslíku, které vznikají jako vedlejší produkty dýchacího řetězce, zejména na úrovni komplexu I a III (Turrens 2003). ROS jsou důležité signální molekuly, které se podílejí na regulaci buněčných procesů, včetně buněčné proliferace, diferenciace a odpovědi na stres (Finkel 2011). Mitochondrie obsahují enzymy jako superoxiddismutázu a glutathionperoxidázu, které neutralizují ROS a chrání buňku před oxidačním stresem (Nicholls a Ferguson 2002). Pokud je produkce ROS příliš vysoká a překročí kapacitu antioxidačních enzymů, může dojít k poškození mitochondriální DNA, proteinů a lipidů, což vede k dysfunkci mitochondrií a přispívá k procesu stárnutí a vzniku degenerativních chorob (Valko et al. 2007; Wallace 1999).

Zásadní roli hrají také v regulaci vápníkového homeostázy. Fungují jako zásobárna vápenatých iontů (Ca^{2+}), které ukládají a uvolňují podle potřeby, čímž regulují různé buněčné procesy, včetně svalové kontrakce, sekrece hormonů a signální dráhy apoptózy (Rizzuto et al. 2012). Vápník je transportován do mitochondriální matrix pomocí specifických transportérů, jako je mitochondriální vápníkový uniportér (MCU), a hraje klíčovou roli

v aktivaci metabolických enzymů, jako jsou pyruvátdehydrogenáza a isocitrátdehydrogenáza, které zvyšují rychlost citrátového cyklu (Duchen 2000). Nadměrná akumulace vápníku v mitochondriích může vést k otevření přechodových pórů, což vede k depolarizaci membrány, ztrátě ATP a nakonec k buněčné smrti (Bernardi et al. 2001; Mishra a Kumar 2005).

Dalším významným aspektem mitochondriální funkce je jejich role v buněčné diferenciaci a signální transdukcii. Mitochondrie regulují signální dráhy související s růstem a přežitím buněk, zejména prostřednictvím kontrolního bodu mTOR (mammalian Target of Rapamycin), který je důležitý pro kontrolu růstu buněk a syntézu bílkovin (Chen et al. 2014). Mitochondrie také ovlivňují stav redoxního potenciálu buňky a produkci signálních molekul, jako je ATP, které působí jako zásadní signály pro různé buněčné procesy (Wallace 2005).

Mitochondrie jsou proto mnohem více než jen mikroelektárny buněk. Mají multifunkční úlohy v regulaci metabolismu, buněčné smrti, produkci reaktivních kyslíkových radikálů, metabolismu vápníku a signální transdukcii. Jejich správná funkce je klíčová pro přežití a zdraví buňky, zatímco jejich dysfunkce je spojena s řadou lidských chorob, včetně neurodegenerativních onemocnění, kardiovaskulárních poruch a stárnutí (Gorman et al. 2016).

1.3 Úloha mitochondrie v různých patologických stavech

Genetické mutace hrají zásadní roli ve vývoji mitochondriální dysfunkce, která může vést k širokému spektru závažných onemocnění. Mitochondrie mají vlastní genom (mtDNA), který kóduje 13 proteinů nezbytných pro funkci elektronového transportního řetězce, stejně jako 22 transferových RNA (tRNA) a dva ribozomální RNA (rRNA), které jsou důležité pro syntézu proteinů uvnitř mitochondrií (Taanman 1999). Na rozdíl

od jaderné DNA je mtDNA náchylnější k mutacím kvůli nedostatku ochranných histonů a omezené schopnosti opravovat poškození.

Mutace v mitochondriálním genomu jsou často spojovány s mitochondriálními onemocněními, která se mohou projevovat v různých tkáních a orgánech. Zatímco mutace v jaderné DNA ovlivňující mitochondriální funkce mohou být dědičné v Mendelovském vzorci, mutace v mtDNA jsou dědičné matrilineárně, protože mtDNA se přenáší téměř výhradně prostřednictvím oocytů (Gorman et al. 2015). Mitochondriální onemocnění mohou postihnout různé systémy, ale nejčastěji se projevují v tkáních s vysokou energetickou náročností, jako jsou svaly, nervová soustava a srdce (Gorman et al. 2016).

Mutace v genech, které kódují proteiny elektronového transportního řetězce, mohou způsobit mitochondriální dysfunkci tím, že naruší přenos elektronů mezi jednotlivými komplexy elektrontransportního systému. To vede ke snížení produkce ATP a ke zvýšení tvorby ROS, což poškozuje buňky a přispívá k rozvoji onemocnění, jako jsou mitochondriální myopatie, encefalopatie, a také kardiomyopatie (Spinazzola a Zeviani 2009). Vedle mutací v mtDNA existují i mutace v jaderné DNA, které ovlivňují funkci mitochondrií (Chinnery 2015). Tyto mutace mohou postihnout geny zodpovědné za replikaci a opravy mtDNA, syntézu proteinů, transport metabolitů přes mitochondriální membránu a mnoho dalších aspektů mitochondriálního metabolismu. Například mutace v genu POLG, který kóduje mitochondriální DNA polymerázu, vedou k několika závažným poruchám, včetně progresivní vnější oftalmoplegie a Alpers-Huttenlocherova syndromu (Stumpf et al. 2013).

U autozomálních recesivních mitochondriálních onemocnění, jako je Leighův syndrom nebo MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes), je mitochondriální dysfunkce způsobena

mutacemi v mitochondriální DNA nebo jaderných genech kódujících proteiny dýchacího řetězce, což vede k narušení přeměny energie a k hromadění laktátu v tělesných tkáních (DiMauro a Schon 2003). Tyto poruchy způsobují rozsáhlé neurologické a svalové symptomy v důsledku nedostatečného přísunu energie pro vysoce energeticky náročné tkáně, jako jsou mozek a svaly (DiMauro a Schon 2003).

Mitochondriální dysfunkce způsobená genetickými mutacemi má také širší vliv na stárnutí a vývoj nádorových onemocnění. Hromadění mutací v mtDNA během stárnutí přispívá k poklesu energetické produkce a zvýšení oxidačního stresu, což je spojeno s celkovým zhoršením funkce tkání a orgánů s věkem (Loeb et al. 2005).

Mitochondriální dysfunkce je sice typicky spojována s primárními mitochondriálními onemocněními, která jsou způsobena mutacemi v mitochondriální DNA nebo v jaderných genech, které regulují mitochondriální funkce, avšak v řadě patologických stavů není mitochondriální dysfunkce primární příčinou onemocnění, ale sekundárním důsledkem jiných nemocí. Tento typ dysfunkce může významně přispívat k progresi choroby a zhoršovat klinický průběh, a proto je zásadní pro pochopení těchto chorob a vývoj nových terapeutických intervencí.

Mitochondriální dysfunkce a kardiovaskulární onemocnění

Mitochondrie hrají významnou úlohu v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění díky jejich centrální roli v energetickém metabolismu a produkci reaktivních forem kyslíku. V srdečních buňkách zajišťují mitochondrie více než 90 % produkce ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace, což je nezbytné pro kontinuální funkci srdečního svalu (Perrelli et al. 2011). Když je funkce mitochondrií narušena, dochází k poklesu tvorby ATP, což oslabuje kontraktilní kapacitu myokardu a zhoršuje srdeční výkon (Murphy

a Steenbergen 2008). Během ischemických událostí, kdy je snížena dodávka kyslíku do tkání, jsou mitochondrie jedním z hlavních cílů poškození. Nedostatek kyslíku způsobuje hromadění redukováných koenzymů, jako je NADH a FADH₂, což vede k přetížení dýchacího řetězce a zvýšené produkci ROS (Lesnefsky et al. 2001, 2004, 2017). ROS hrají podstatnou roli v poškození srdeční tkáně tím, že vyvolávají oxidativní stres, který poškozuje lipidy, proteiny a DNA, což vede až k nekróze nebo apoptóze buněk (Turrens 2003). Mitochondrie jsou tedy také významně zapojeny do mechanismů apoptózy, což je programovaná buněčná smrt, která se aktivuje při vážném poškození buněk a tkání. V podmínkách ischemicko-reperfuzního poškození dochází k masivní produkci ROS při obnově dodávky kyslíku, což dále poškozuje mitochondrie a způsobuje otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) ve vnitřní mitochondriální membráně (Bernardi et al. 2001). Otevření mPTP vede k depolarizaci mitochondriální membrány, ztrátě membránového potenciálu a úniku pro-apoptotických faktorů, jako je cytochrom c, do cytosolu, což spouští apoptotickou kaskádu (Murphy a Steenbergen 2008). Tento proces má devastující dopad na srdeční tkáň, zejména během srdečního infarktu, kdy je významná část srdeční svaloviny nevratně poškozena.

Zároveň mitochondrie hrají důležitou úlohu v regulaci metabolismu vápníku v kardiomyocytech. Vápník je nezbytný pro svalovou kontrakci, ale jeho přetížení v mitochondriích může vyvolat otevření mPTP, což vede k buněčné smrti (O'Rourke 2000). Dysfunkce mitochondrií v důsledku oxidačního stresu a poruchy metabolismu vápníku přispívá k rozvoji srdečního selhání, kde chronický nedostatek ATP omezuje schopnost srdečního svalu se správně stahovat (Lesnefsky et al. 2001, 2004). Navíc mitochondriální DNA je citlivější na poškození oxidačním stresem kvůli své blízkosti k dýchacímu

řetězci a absenci ochranných histonů, což vede k akumulaci mutací, které dále zhoršují mitochondriální funkci (Wallace 1999).

Mitochondriální dysfunkce je také spojena s rozvojem aterosklerózy, kde poškozené mitochondrie v endoteliálních buňkách cév indukují zánětlivé procesy a přispívají k tvorbě aterosklerotických plátů (Ballinger et al. 2002). Dále mitochondriální dysfunkce přispívá k progresi aterosklerózy tím, že podporuje oxidační stres, který vede k oxidaci lipoproteinů, zejména lipoproteinů o nízké hustotě (LDL, low-density lipoprotein), v endoteliálních buňkách. Oxidované LDL jsou klíčovým faktorem při tvorbě aterosklerotických plátů, protože podporují zánětlivé reakce, přitahují monocyty do cévní stěny a stimulují jejich diferenciaci na makrofágy, které následně fagocytují oxidované LDL a mění se v pěnové buňky, hlavní složky aterosklerotických lézí (Ballinger et al. 2002). ROS produkované mitochondriemi dále zhoršují endoteliální dysfunkci, což vede k ztrátě vazodilatační schopnosti cév a k vyššímu riziku vaskulárního poškození. Dysfunkční endoteliální buňky nejenže produkují více ROS, ale také ztrácejí schopnost reagovat na endogenní antioxidanty, jako je oxid dusnatý, který za normálních podmínek působí jako vazodilatátor a chrání cévy před zánětlivými procesy (Madamanchi a Runge 2007).

V případě srdečního selhání dochází k významnému poklesu energetické produkce mitochondrií v důsledku snížení aktivity dýchacího řetězce, což vede k chronickému nedostatku ATP. To má za následek zhoršenou funkci srdečního svalu a neschopnost kardiomyocytů se adekvátně stahovat s následkem poklesu srdečního výdeje (Lesnefsky et al. 2001). Zvýšená produkce ROS v srdečních buňkách během srdečního selhání dále přispívá k poškození mitochondrií a zhoršuje jejich schopnost generovat energii. Oxidační stres také vede k aktivaci prozánětlivých drah, které zhoršují strukturální poškození

myokardu, včetně remodelace srdeční tkáně a fibrózy, což nakonec přispívá k progresi srdečního selhání (Tsutsui et al. 2011).

Navíc mitochondriální dysfunkce hraje důležitou roli také při ischemicko-reperfučním poškození, ke kterému dochází při obnovení krevního toku po ischemické události, jako je infarkt myokardu. Paradoxně, i když je přísun kyslíku obnoven, mitochondrie reagují nadměrnou produkcí ROS, což způsobuje další poškození srdečních buněk. Tento fenomén je znám jako reperfuční syndrom, při němž mitochondrie hrají centrální roli v iniciaci apoptózy i nekrózy buněk (Murphy a Steenbergen 2008). Otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti je důležitým faktorem tohoto procesu, protože umožňuje únik proapoptotických faktorů, což vede k nevratnému poškození buněk a ztrátě funkce myokardu (O'Rourke 2000). Tato dysfunkce vede nejen k akutnímu poškození během infarktu, ale také k dlouhodobým následkům, jako je remodelace levé komory a srdeční selhání (Lesnefsky et al. 2001).

Mitochondriální dysfunkce a renální selhání

Mitochondrie hrají nezanedbatelnou roli i při vzniku a progresi onemocnění ledvin, zejména proto, že ledviny mají vysoké energetické nároky a spoléhají na mitochondriální oxidativní fosforylaci pro produkci ATP (Forbes a Thorburn 2018). Ledvinné buňky potřebují velké množství energie pro udržení homeostázy. Mezi hlavní energeticky náročné procesy v těchto buňkách patří např. transport iontů, vstřebávání vody, transport glukózy a aminokyselin, sekrece metabolitů atd., což činí mitochondrie klíčovými pro normální funkci ledvin (Cheng a Cheng 2024). Dysfunkce mitochondrií, která může zahrnovat snížení produkce ATP, zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku, ale i poruchu vápníkové homeostázy, vede k oxidačnímu stresu,

apoptóze a nekróze ledvinových buněk, což přispívá k progresi onemocnění, jako je akutní a chronické poškození ledvin (Fan et al. 2016).

Akutní poškození ledvin může způsobit ischemie, při níž je omezen průtok krve do ledvin. To vede k narušení mitochondriálního dýchacího řetězce v ledvinných buňkách a ke zvýšené produkci ROS, které poškozují buněčné struktury, včetně lipidů, proteinů a DNA (Tsuji et al. 2023). Zvýšená produkce ROS způsobuje oxidační stres, který následně vede k apoptóze nebo nekróze ledvinových buněk a narušuje funkci jak glomerulů, tak tubulů (Bhatia et al. 2020; Srivastava et al. 2023). Mitochondrie také hrají důležitou roli při ischemicko-reperfučním poškození, které nastává při obnově krevního toku po ischemii (Kalogeris et al., 2012).

V případě chronického onemocnění ledvin mitochondriální dysfunkce přispívá k postupnému úbytku funkce ledvin. Chronická expozice zvýšené produkci ROS vede k dlouhodobému oxidačnímu stresu, což způsobuje fibrotizaci ledvinové tkáně a ztrátu funkčních nefronů (Eirin et al. 2014). Důsledkem je snížení filtrační kapacity ledvin, které vede k akumulaci toxických metabolitů v těle. Mitochondriální poškození u chronického onemocnění ledvin zahrnuje nejen zvýšenou produkci ROS, ale také snížení mitochondriální biogeneze a degradaci mitochondriální DNA (mtDNA), což má za následek sníženou schopnost mitochondrií produkovat ATP (Forbes a Thorburn 2018). Dysfunkční mitochondrie dále podporují zánětlivé procesy, které stimulují fibrotické změny v ledvinách, a to prostřednictvím aktivace celé řady signálních drah (Gu et al. 2020; Isaka 2018).

Mitochondriální dysfunkce je rovněž spojena s poruchami v metabolismu vápníku v ledvinách. Narušení vápníkové homeostázy v mitochondriích může vést k otevření mPTP, což vede k depolarizaci mitochondriální membrány, následně k úniku pro-apoptotických faktorů

a spuštění apoptózy (Duchen 2000). Tento proces hraje významnou roli při akutním i chronickém poškození ledvin a přispívá k nevratné ztrátě ledvinových buněk (Duchen 2000; Tanaka et al. 2004; Zhang et al. 2021).

Mitochondriální dysfunkce a snížená motilita spermií

Mitochondrie hrají zásadní roli u spermií, zejména při dodávání energie potřebné pro jejich pohyb, a jejich dysfunkce je úzce spojena s mužskou neplodností, zejména u tzv. asthenozoospermie, což je stav charakterizovaný sníženou motilitou spermií (Amaral et al. 2013). Bičík spermie, který je klíčový pro umožnění jejího pohybu, je energeticky náročný a mitochondrie, které se nacházejí ve střední části spermie, jsou primárním zdrojem ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace (Ruiz-Pesini et al. 2000; Ruiz-Pesini et al. 2007). U asthenozoospermie je časté, že mitochondrie vykazují funkční abnormality, které vedou k nedostatečné produkci ATP, což přímo ovlivňuje schopnost spermií správně se pohybovat a dosáhnout oocytů (Piomboni et al. 2012).

Jedním z hlavních mechanismů, kterými mitochondriální dysfunkce přispívá k asthenozoospermii, je opět zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku. Nadměrné množství ROS poškozuje mitochondriální DNA (mtDNA), lipidy a proteiny, což vede ke strukturálním a funkčním poruchám mitochondrií (Koppers et al. 2008). Vzhledem k tomu, že mitochondrie spermií mají omezenou schopnost oprav mtDNA, poškození způsobené ROS má kumulativní efekt, což dále zhoršuje jejich funkčnost a přispívá ke snížené motilitě spermií (Liu et al. 2004). Kromě toho bylo zjištěno, že mutace v mitochondriální DNA mohou mít přímý vliv na kvalitu spermií, včetně asthenozoospermie. Studie ukázaly, že specifické mutace nebo delece v mitochondriálním genomu jsou spojeny s poruchou produkce energie a zhoršenou motilitou spermií (St John et al. 2005).

Kromě energetického metabolismu a produkce ROS hrají mitochondrie také klíčovou roli při apoptóze spermií. V případě mitochondriální dysfunkce mohou mitochondrie uvolňovat pro-apoptotické proteiny, jako je cytochrom c, což spouští kaspázovou kaskádu vedoucí k apoptóze spermií (Said et al. 2010). Tato apoptotická aktivita může být zvýšená u mužů s asthenozoospermií, což vede k vyšší míře ztráty životaschopných spermií a dále přispívá ke snížené kvalitě spermatu (Said et al. 2010).

Další důležitý aspekt mitochondriální dysfunkce u asthenozoospermie je narušení mitochondriální dynamiky, což zahrnuje procesy fúze a dělení mitochondrií a mitofagii, které jsou nezbytné pro udržení jejich správné funkce (Amaral et al. 2013). Fúze a dělení umožňují mitochondriím sdílet funkční materiál a separovat poškozené části, čímž zajišťují rovnoměrné rozložení mitochondriální DNA a proteinů potřebných pro oxidativní fosforylaci a přípravu na mitofagii, která umožňuje odstranění poškozených mitochondrií (Chen a Chan 2009). Pokud jsou tyto procesy narušeny, dochází ke hromadění poškozených mitochondrií, které nejsou schopny efektivně produkovat ATP a zvyšuje se pravděpodobnost nadprodukce reaktivních forem kyslíku (Chen et al. 2005). U mužů s asthenozoospermií bylo zjištěno, že mají sníženou schopnost provádět správnou mitofagii, což vede k hromadění dysfunkčních mitochondrií ve spermiích a přispívá k jejich snížené motilitě (Amaral et al. 2013).

Další mitochondriální abnormalita související s asthenozoospermií zahrnuje mutace v mitochondriálních genech, které kódují komponenty dýchacího řetězce, například geny pro cytochrom c oxidázu nebo ATP syntázu (St John et al. 2005). Například specifické mutace v genu MT-ATP6, který kóduje jednu z podjednotek ATP syntázy, byly spojeny se zhoršenou motilitou spermií a neschopností produkovat dostatečné množství ATP pro pohyb

(Piomboni et al. 2012). Studie ukázaly, že takové mutace mohou být přenášeny mitochondriální dědičností a mohou být důvodem pro mitochondriální genetické predispozice k asthenozoospermii (Ruiz-Pesini et al. 2000; Ruiz-Pesini et al. 2007).

Mitochondrie také ovlivňují transport a metabolismus lipidů, což je důležité pro správnou funkci spermií. Dysfunkce mitochondrií vede k narušení metabolismu lipidů, což má přímý dopad na schopnost spermií získávat z nich energii, což dále snižuje motilitu spermií (Piomboni et al. 2012).

Také zvýšená teplota může vést k poškození spermií a jejich mitochondrií. Jedná se o běžný problém mužů s varikokélou, kteří často trpí asthenozoospermii (Shamsi et al., 2008). Přehřátí může způsobit zvýšenou produkci ROS a následné poškození mitochondriální DNA, což vede ke snížené funkci mitochondrií a energetickému deficitu, který snižuje schopnost spermií pohybovat se (Dada et al. 2007). Tento proces může být dále umocněn sníženou aktivitou antioxidantů ve spermiích (Sikka 2001).

Celkově mitochondriální dysfunkce u asthenozoospermie zahrnuje zejména kombinaci snížené produkce ATP, zvýšené produkce ROS, mutací v mitochondriální DNA a zvýšené apoptózy, což vede k výraznému poklesu motility spermií a následně k mužské neplodnosti (Koppers et al. 2008).

Úloha mitochondrií při vzniku dalších onemocnění

Mitochondrie hrají zásadní roli ve vzniku a progresi celé řady dalších onemocnění, včetně neurodegenerativních poruch, diabetes mellitus a zhoubných nádorových onemocnění, a to díky jejich klíčové funkci v energetickém metabolismu, produkci reaktivních forem kyslíku a regulaci apoptózy. U neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba,

Parkinsonova choroba nebo amyotrofická laterální skleróza, je mitochondriální dysfunkce pravděpodobně jedním z centrálních patogenetických mechanismů. V těchto stavech dochází k narušení produkce ATP, což má za následek energetický deficit v neuronech, které jsou velmi závislé na mitochondriálním metabolismu (Lin a Beal 2006). Zvýšená produkce ROS z mitochondrií vede k oxidačnímu stresu, který poškozuje lipidy, proteiny a DNA, což přispívá k progresivní ztrátě neuronů a kognitivních funkcí u těchto onemocnění (Finkel a Holbrook 2000). U Alzheimerovy choroby bylo navíc zjištěno, že se v mitochondriích hromadí amyloidní beta peptidy, které narušují dýchací řetězec a tím dochází ještě k dalšímu zvýšení produkce ROS a k apoptóze neuronů (Reddy a Beal 2005). U Parkinsonovy choroby je mitochondriální dysfunkce spojena s mutacemi v genech, jako jsou PINK1 a parkin, které regulují mitofagii, proces odstraňování poškozených mitochondrií (Exner et al. 2012). Nedostatečná mitofagie vede k hromadění dysfunkčních mitochondrií, což způsobuje dysfunkci neuronů v oblasti substantia nigra, která je klíčová pro kontrolu pohybů (Youle a van der Bliek 2012).

Mitochondrie hrají významnou roli i v patogenezi onemocnění diabetes mellitus, zejména u 2. typu. U tohoto onemocnění je mitochondriální dysfunkce spojena s inzulínovou rezistencí, kdy snížená aktivita mitochondrií vede k akumulaci lipidů v buňkách kosterního svalstva a dalších tkáních (Lowell a Shulman 2005). Akumulace lipidů interferuje s inzulínovou signalizací, což vede ke snížené schopnosti buněk odpovídat na inzulín a ke zvýšené hladině glukózy v krvi (Holloway et al. 2018). Mitochondriální dysfunkce také přispívá k rozvoji diabetických komplikací, jako je diabetická neuropatie a diabetická retinopatie, prostřednictvím zvýšené produkce ROS, která způsobuje poškození mikrocirkulace a nervových tkání (Sivitz a Yorek 2010). Zvýšená produkce ROS v mitochondriích navíc přispívá k chronickému zánětu, který je úzce spojen s inzulínovou rezistencí a progresí diabetu (Bonnard et al. 2008).

U onkologických onemocnění se mitochondriální dysfunkce podílí na reprogramování metabolismu nádorových buněk, známém jako Warburgův efekt, kdy nádorové buňky využívají glykolýzu i v přítomnosti dostatečného množství kyslíku (Warburg 1956). I přesto, že mitochondrie nejsou v nádorových buňkách primárním zdrojem ATP, hrají významnou roli v regulaci apoptózy a produkci biosyntetických prekurzorů pro rychle se dělící nádorové buňky (Heiden et al. 2009). Mitochondrie v nádorových buňkách často vykazují zvýšenou produkci ROS, která podporuje genetickou nestabilitu, mutace a proliferaci buněk (Sullivan a Chandel 2014). Kromě toho mnoho rakovinných buněk vykazuje mutace v mitochondriálních genech nebo proteinech regulujících mitochondriální funkce, jako jsou proteiny rodiny Bcl-2, které ovlivňují apoptózu (Willis et al. 2003). Tyto mutace umožňují rakovinným buňkám vyhnout se programované buněčné smrti a pokračovat v nekontrolované proliferaci.

Také u onemocnění jater, jako je nealkoholová steatóza jater (NAFLD), je mitochondriální dysfunkce sekundárním důsledkem metabolických změn spojených s nadměrným hromaděním lipidů v hepatocytech. V důsledku akumulace tuků jsou mitochondrie přetíženy nadměrným množstvím mastných kyselin, což vede ke zvýšené produkci ROS a následnému oxidačnímu poškození (Pessayre a Fromenty 2005).

Mitochondrie také ovlivňují onemocnění spojená s poruchami metabolismu vápníku, včetně osteoporózy a osteogenesis imperfecta. Dysfunkce mitochondrií může vést k narušení vápníkové homeostázy v buňkách kostí, což má za následek zvýšenou resorpci kosti osteoklasty a sníženou tvorbu nové kosti osteoblasty, což vede ke ztrátě kostní hmoty a křehkosti kostí (Yan et al. 2023; Liu et al. 2024).

1.4 Vliv anestetik na funkci mitochondrií

Anestezie je podstatným prvkem chirurgických zákroků a může působit jako významný stresový faktor, který ovlivňuje metabolismus a imunitní systém pacientů.

Intravenózní anestetika, jako je propofol, se běžně používají při celkové anestezii kvůli jejich rychlému nástupu účinku a jeho krátkému trvání, což je činí ideálními pro sedaci a navození spánku. Propofol nejen zajišťuje hloubku anestezie a úlevu od bolesti během operace, ale také chrání orgány, inhibuje agregaci krevních destiček a snižuje pooperační nevolnost a zvracení (Kotani et al. 2023). Nicméně je třeba brát v úvahu potenciální rizika, kam patří alergická reakce, hypotenze (Sneyd et al. 2022), pooperační kognitivní deficit (Liu et al. 2022) či rozvoj syndromu propofolové infuze (Singh a Anjankar 2022).

Výzkumy tedy ukazují, že perioperační léky, jako jsou anestetika a analgetika, mají vliv na funkce orgánů mimo nervový systém (Sellbrant et al. 2016). Jedná se o látky, které mají významný vliv na funkci mitochondrií, což může ovlivnit buněčnou energetiku a metabolismus.

Propofol, jako intravenózní anestetikum, ovlivňuje mitochondriální dýchací řetězec, zejména v oblastech, kde se zapojují komplexy I a III. Výzkumy ukazují, že propofol může snížit aktivitu komplexu I, což vede k omezení transportu elektronů a následnému snížení produkce ATP (Rigoulet et al. 2011).

Dále bylo zjištěno, že propofol může zvýšit tvorbu reaktivních forem kyslíku v mitochondriích, což vede k oxidačnímu stresu. Tento jev je především spojen s inhibicí dýchacího řetězce a může způsobit poškození

mitochondriálních membrán a dalších buněčných struktur (Hsu et al. 2015). Zvýšená produkce ROS může vyústit v apoptózu, pokud je mitochondriální poškození příliš rozsáhlé (Liang et al. 2022).

Propofol rovněž ovlivňuje mitochondriální membránový potenciál, což narušuje protonový gradient nezbytný pro tvorbu ATP. Když dochází k úniku protonů přes mitochondriální membránu, spotřeba kyslíku se zvyšuje, aniž by došlo k adekvátní syntéze ATP, což vede k neefektivnímu energetickému metabolismu a vyšší spotřebě kyslíku v klidovém stavu (LEAK respirace) (He et al. 2020; Liang et al. 2022).

Navzdory těmto negativním účinkům na mitochondrie může propofol za určitých podmínek mít ochranný efekt. Některé studie naznačují, že propofol má antioxidační vlastnosti a může chránit mitochondrie před poškozením způsobeným oxidačním stresem, čímž omezuje poškození buněk během ischemicko-reperfuzních poranění (Li et al. 2014).

Přestože byl vliv perioperačních léků na mitochondrie rozsáhle zkoumán, stále existují jen omezené informace o konkrétních mechanismech účinků těchto léků a jejich klinických dopadech. Mitochondriální účinky mohou být také výrazně ovlivněny typem léku, dávkou, načasováním podání a charakteristikami studovaných subjektů. Příčiny těchto rozdílů a jejich klinický význam vyžadují další podrobný výzkum.

2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1 Cíle práce

Tato práce si klade za cíl přispět k identifikaci patofyziologických mechanismů několika patologických stavů, které jsou nejspíše spojeny s dysfunkcí mitochondriálního dýchacího řetězce.

Cíl práce 1

Cílem této práce bylo stanovení vlivu propofolu na mitochondriální spotřebu kyslíku v levé a v pravé srdeční komoře u přesně definovaného souboru pokusných jedinců.

Cíl práce 2

Cílem studie bylo posoudit vliv chronického onemocnění ledvin na mitochondriální spotřebu kyslíku, a to odděleně pro kůru a dřeň.

Cíl práce 3

Cílem práce bylo komplexní stanovení respirační aktivity mitochondrií lidských spermií s normální a sníženou pohyblivostí.

2.2 Hypotézy

V návaznosti na jednotlivé cíle jsme stanovili následující hypotézy u jednotlivých prací.

Hypotéza práce 1

Aplikace propofolu ovlivňuje mitochondriální funkce v kardiomyocytech izolovaných z pravé a levé komory experimentálního zvířete, přičemž účinky propofolu se mohou lišit mezi jednotlivými komorami s ohledem na rozdílnou metabolickou a funkční zátěž těchto oblastí srdečního svalu.

Hypotéza práce 2

Chronické onemocnění ledvin navozené chirurgickou 5/6 nefrektomií vede ke změnám v mitochondriální spotřebě kyslíku v kůře a dřeni ledvin experimentálního zvířete, přičemž rozdílnost mezi těmito dvěma oblastmi vzniká v důsledku jejich odlišné struktury a funkční náročnosti.

Hypotéza práce 3

Respirační aktivita mitochondrií lidských spermií se sníženou pohyblivostí je odlišná od aktivity mitochondrií spermií s normální pohyblivostí.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Analýza mitochondriální respirace

Přístroj Oroboros Oxygraph-2k (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko) je vysoce citlivý přístroj používaný pro měření buněčného respiračního metabolismu, konkrétně spotřeby kyslíku v živých buňkách, permeabilizovaných tkání nebo izolovaných mitochondriích. Tento přístroj funguje na principu polarografického měření koncentrace kyslíku v uzavřeném systému, kde je vzorek vložen do komůrky a změny v hladině kyslíku jsou detekovány pomocí kyslíkového senzoru (Pesta a Gnaiger 2012). Přístroj je vybaven dvěma komorami, což umožňuje simultánní měření ve dvou vzorcích, a nabízí možnost sledování dynamických změn v respiraci, což je klíčové pro studium funkčnosti mitochondrií. Výhodou přístroje Oroboros je vysoké rozlišení a citlivost měření, což umožňuje přesné sledování i malých změn v respiraci (Pesta a Gnaiger 2012). Navíc tento přístroj umožňuje provádět experimenty za různých podmínek, jako je změna koncentrace substrátů, inhibitorů nebo aktivátorů, což nabízí možnost analyzovat různé aspekty mitochondriální bioenergetiky a dynamiky buněčného metabolismu.

Oroboros Oxygraph-2k se často používá ke zkoumání různých stavů mitochondriální dysfunkce, například u onemocnění jako diabetes mellitus, neurodegenerativní poruchy nebo u výzkumu stárnutí, kde hraje důležitou roli v pochopení bioenergetiky buněk (Doerrier et al. 2018). Díky vysoce přesnému měření a schopnosti analyzovat několik parametrů současně, je tento přístroj široce využíván v klinickém i základním výzkumu mitochondrií a jejich bioenergetiky.



Obrázek 5 - Oroboros Oxygraph-2k

3.2 Mitochondriální respirační stavy

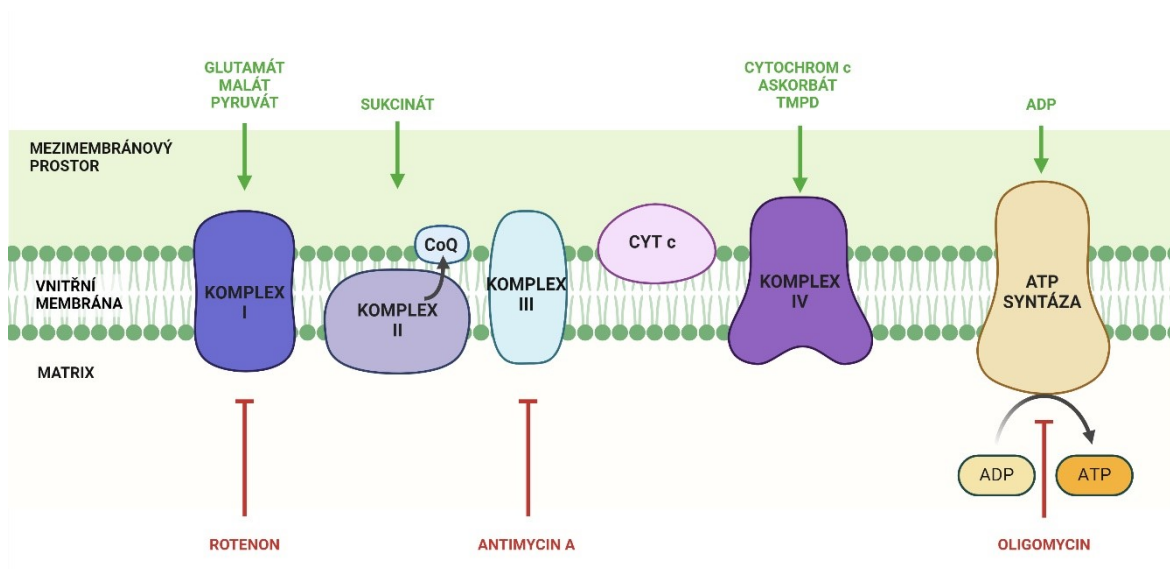
Princip měření pomocí přístroje Oroboros O2k spočívá v kontinuálním sledování koncentrace kyslíku v uzavřené komoře, kde se nachází biologický vzorek (např. permeabilizovaný kousek tkáně, izolované mitochondrie) suspendovaný v respiračním médiu. V průběhu měření jsou ke vzorkům přidávány jednotlivé substráty, inhibitory a uncouplery. Tyto látky jsou přidávány postupně, což umožňuje analýzu různých částí mitochondriálního dýchacího řetězce a odhalení jeho specifických defektů nebo omezení v oxidační fosforylaci (Lemieux et al. 2017). Tento postup se nazývá SUIT protokol (Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration) a je stěžejní pro komplexní charakterizaci mitochondriální funkce. Podrobný seznam použitých substrátů,

inhibitorů a uncouplerů v našich experimentech shrnuje Tabulka 1 a Obrázek 6.

Tabulka 1 - Seznam použitých substrátů, inhibitorů a uncouplerů pro analýzu mitochondriální respirace

	Název (zkratka)	Cíl působení	Přidávané množství (μl)	Finální koncentrace v komoře
Substrát	Glutamát (G)	komplex I	10	10 mM
	Malát (M)	komplex I	5	2 mM
	Pyruvát (P)	komplex I	5	5 mM
	Sukcinát (S)	komplex II	20	10 mM
	ADP (D)	komplex V	20	1-5 mM
	Cytochrom c (c)	komplex IV	5	10 μM
	Askorbát (As)	antioxidant	5	2 mM
	TMPD (TM)	komplex IV	5	0,5 mM
Inhibitor	Rotenon (Rot)	komplex I	1	0,5 μM
	Oligomycin (Omy)	komplex V	1	2 μg·ml ⁻¹
	Antimycin A (Ama)	komplex III	1	2,5 μM
	Azid (Azd)	komplex IV	50	100 mM
Uncoupler	FCCP	gradient protonů	titrace	0,05 μM

ADP = adenosindifosfát; TMPD = N,N,N',N'-tetrametyl-p-fenylendiamin dichlorid; FCCP = karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon



Obrázek 6 - Schématické znázornění cíle působení jednotlivých substrátů (zelená barva) a inhibitorů (červená barva) dýchacího řetězce. CoQ – koenzym Q; Cyt c – cytochrom c

Pomocí těchto látek je možná analýza jednotlivých respiračních stavů mitochondrií, a to konkrétně stavů LEAK, OXPHOS, ETS a ROX.

LEAK je nefosforylační respirační stav, kdy mitochondrie spotřebovávají kyslík bez tvorby ATP. Kyslík je zde využíván k udržení mitochondriálního membránového potenciálu, který je udržován díky protonovému gradientu. ATP syntáza není aktivní, protože není přítomný ADP. Tento stav odráží protonový únik přes vnitřní mitochondriální membránu a je důležitým ukazatelem efektivity mitochondriální respirace a míry ztráty protonů (Brand a Nicholls 2011). LEAK stav je stanovován v přítomnosti substrátů komplexu I (glutamát, malát, pyruvát) nebo po inhibici ATP syntázy oligomycinem.

OXPHOS představuje aktivní stav oxidativní fosforylace, kdy dochází k oxidaci redukovaných substrátů, přenosu elektronů na molekulární kyslík a k fosforylaci ADP na ATP. Z tohoto důvodu je tohoto stavu dosaženo po přidání jako substrátu ADP.

Rozlišujeme několik stavů OXPHOS, a to v závislosti na aktivaci různých komplexů danými substráty.

- OXPHOS I – měřen v přítomnosti substrátů komplexu I (malát, glutamát, pyruvát) a ADP
- OXPHOS I_c – měřen v přítomnosti substrátů komplexu I, ADP a cytochromu c (slouží k ověření integrity vnější mitochondriální membrány)
- OXPHOS I+II – měřen v přítomnosti substrátů komplexu I, ADP a substrátu komplexu II (sukcinát)
- OXPHOS II – měřen v přítomnosti substrátu komplexu II, ADP a inhibitoru komplexu I (rotenon)

OXPHOS ukazuje maximální kapacitu mitochondrií pro tvorbu ATP při saturující koncentraci substrátů a ADP (Hütter et al. 2006), a jeho měření nám umožňuje určit schopnost mitochondrií efektivně využívat kyslík k produkci energie.

Dalším sledovaným stavem je ETS, tento stav představuje maximální kapacitu elektronového transportního systému přenášet elektrony po odpojení fosforylace. Vzniká titrací rozpřahovače (např. karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazonu, FCCP), který permeabilizuje vnitřní mitochondriální membránu, způsobí kolaps mitochondriálního membránového napětí únikem protonů do matrix, a naruší tak spřažení elektronového transportu se syntézou ATP.

Stav ROX (reziduální spotřeba kyslíku) je navozen inhibicí přenosu elektronů skrze elektronový transportní systém, a to např. přidáním antimycinu A, inhibitoru komplexu III. Stav navozený antimycinem A reflektuje zejména nemitochondriální spotřebu kyslíku způsobenou dalšími oxidázami v buňkách a používá se k odlišení mitochondriální a nemitochondriální respirace.

Posledním měřeným stavem je aktivita komplexu IV, která je stanovena po přidání jeho umělého substrátu TMPD (N,N,N',N'-tetrametyl-p-fenylendiamin dichloridu), který přímo poskytuje elektrony tomuto komplexu, a askorbátu, jenž částečně chrání substrát před autooxidací, které v přítomnosti kyslíku snadno podléhá. Pro odhad skutečné aktivity komplexu IV je třeba do komůrky ještě aplikovat azid sodný, inhibitor komplexu IV, a zbytkovou spotřebu kyslíku od stavu TMPD a askorbátu odečíst. Tento stav umožňuje změřit schopnost komplexu IV využívat kyslík a je nezávislý na ostatních komplexech dýchacího řetězce (Gnaiger et al. 1998).

Při hodnocení funkčního stavu mitochondrií se také využívají kontrolní poměry, které umožňují kvantifikaci různých aspektů mitochondriální respirace. Patří sem např. poměry L/E, P/E a P I/P I+II. Respirační kontrolní poměr L/E je poměr mezi LEAK respirací a kapacitou elektrontransportního systému a jeho hodnota roste z teoretického minima (0,0) u plně propojeného systému po 1,0 pro plně rozpojený stav. Další kontrolní poměr P/E ukazuje, do jaké míry je kapacita OXPHOS omezena fosforylačním systémem. Poslední poměr PI/PI+II slouží ke stanovení relativního příspěvku komplexu I k celkové respiraci zahrnující komplexy I a II.

Titrační protokoly mohou být různě modifikovány podle metabolismu zkoumané tkáně, např. v orgánech zpracovávajících mastné kyseliny jako zdroj energie je vhodné testovat kapacitu proteinu ETF (proteinu přenášejícího elektrony z metabolismu mastných kyselin na komplex II). Odpovídající stavy se pak označují OXPHOS FAO nebo ETS FAO.

Detailní popis jednotlivých titračních protokolů použitých v našich experimentech a další dílčí metodické postupy jsou uvedeny v následujících kapitolách.

3.3 Metody vztahující se k cíli 1 – vliv propofolu na mitochondriální spotřebu kyslíku v levé a v pravé srdeční komoře

3.3.1 Experimentální zvířecí model

Pro experimenty bylo použito celkem 37 samců potkanů kmene Wistar ve věku 6 měsíců (VELAZ, Praha, Česká republika). Všechny experimenty byly provedeny v souladu s Evropskou směrnicí o ochraně obratlovců používaných pro vědecké a experimentální účely (86/609/EU) a odpovídajícími pokyny Ministerstva zemědělství České republiky týkajícími se vědeckých pokusů na zvířatech, schválenými univerzitní komisí pro laboratorní experimenty na zvířatech. Pro snížení počtu zvířat nutných k provedení všech plánovaných pokusů a k dosažení srovnatelných výsledků s dostupnými experimentálními daty jsme používali výhradně dospělé samce. V den pokusu byla zvířata usmrcena cervikální dislokací a srdce byla rychle vyjmuto z těla. Pro elektrofyzilogická měření byly z levé i pravé komory vypreparovány papilární svaly nebo vhodné trabekuly svalové tkáně. Pro respiometrické měření byly odebrány malé vzorky tkáně (přibližně 20 mg) ze subendokardiální vrstvy přední volné stěny obou komor.

3.3.2 Vysokoučinná respiometrie

Vzorky komorové tkáně byly umístěny do ledově studeného konzervačního roztoku BIOPS s přesně definovaným složením: CaK_2EGTA 2,77 mmol·l⁻¹, K_2EGTA 7,23 mmol·l⁻¹, Na_2ATP 5,77 mmol·l⁻¹, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6,56 mmol·l⁻¹, taurin 20 mmol·l⁻¹, $\text{Na}_2\text{fosfokreatin}$ 15 mmol·l⁻¹, imidazol 20 mmol·l⁻¹, dithiotreitol 0,5 mmol·l⁻¹ a MES hydrát 50 mmol·l⁻¹ při pH 7,1 a teplotě 0 °C (Kuznetsov et al. 2004). Tkáně byly opatrně mechanicky permeabilizovány pomocí ostrých pinzet tak, aby se zvětšil jejich objem přibližně na dvojnásobek (Pesta a Gnaiger 2012). Následně byla vlákna

inkubována při teplotě 37 °C v roztoku BIOPS obsahujícím saponin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu 10 minut a dvakrát promyta v respiračním médiu s katalázou (MiR06) po dobu 10 minut. MiR06 obsahuje: EGTA $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, K-laktobionát $60 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, taurin $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, KH_2PO_4 $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, HEPES $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, sacharózu $110 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a albumin z hovězího séra bez mastných kyselin ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,1 (Pesta a Gnaiger 2012). Poté byla vlákna osušena, zvážena a připravena tak k respiometrickému měření.

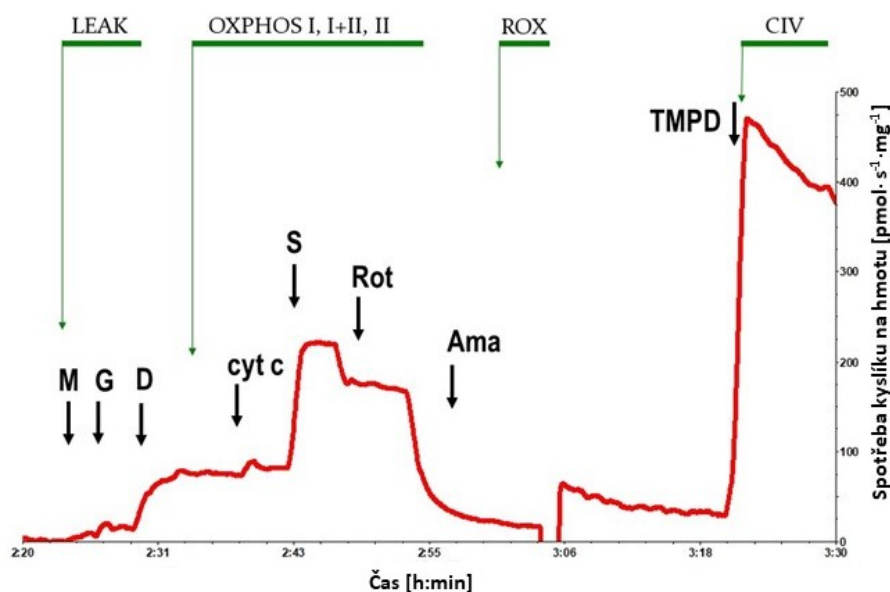
Spotřeba kyslíku srdečními vlákny byla měřena při teplotě 37 °C v 2 ml skleněných komůrkách oxygrafu Oroboros (Oroboros, Innsbruck, Rakousko), který byl napojen na počítač se softwarem DatLab 6, umožňujícím sběr a analýzu dat (Oroboros, Innsbruck, Rakousko). Pokles koncentrace kyslíku v komůrce byl kontinuálně přepočítáván záporně vzatou derivací křivky koncentrace na spotřebu kyslíku v $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Po 40 minutách, kdy koncentrace kyslíku v komůrkách odpovídala hodnotám v atmosférickém vzduchu a jeho rozpustnosti v médiu (0,92), byla přidána permeabilizovaná vlákna, komůrky byly uzavřeny a koncentrace kyslíku v nich byla zvýšena na $400\text{-}500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ titrací peroxidu vodíku ($200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Po stabilizaci byly do komůrek postupně přidávány zvolené substráty a inhibitory, aby bylo možné měřit spotřebu O_2 jednotlivými úseky elektronového transportního systému (SUIT protokol). Použitá sekvence substrátů a inhibitorů byla následující: a) malát a glutamát – substráty komplexu I (stav LEAK); b) adenosin difosfát (stav OXPHOS I); c) cytochrom c – detekce integrity vnější mitochondriální membrány (stav OXPHOS I_c); d) sukcinát – substrát komplexu II (stav OXPHOS I+II); e) rotenon – inhibitor komplexu I (stav OXPHOS II); f) antimycin A – inhibitor komplexu III (stav ROX); g) N, N, N', N'- tetrametyl-p-fenylendiamin dihydrochlorid

a askorbát a následně azid sodný (stav CIV). Ve výsledkové části byly všechny stavy korigovány na reziduální spotřebu kyslíku. Ilustrativní křivka s použitou sekvencí látek je znázorněna na Obrázku 7.

Propofol byl rozpuštěn v čistém ethanolu a přidán do komůrek 20 minut před zahájením SUIIT protokolu, přičemž byly použity koncentrace od $0,005 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Množství ethanolu, které bylo aplikováno, činilo $1 \text{ } \mu\text{l}$ na komůrku. V samostatných pokusech byl testován vliv ethanolu (do $5 \text{ } \mu\text{l}$) na spotřebu kyslíku, ale nebyly zaznamenány žádné změny v respirometrických parametrech.

Po ukončení respirometrického měření byl obsah komůrek odebrán z oxygrafu, uskladněn v $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ a později použit na stanovení aktivity citrátsyntázy.



Obrázek 7 - Reprezentativní křivka znázorňující titrační protokol. M = malát; G = glutamát; D = adenosindifosfát; cyt c = cytochrom c; S = sukcinát; Rot = rotenon; Ama = Antimycin A; TMPD = N, N, N', N'- tetrametyl-p-fenylendiamin dihydrochlorid; LEAK = nefosforylační respirační stav; OXPHOS = oxidativní fosforylace; ROX = reziduální spotřeba kyslíku; CIV = aktivita komplexu IV

3.3.3 Aktivita citrátsyntázy

Citrátsyntáza (CS) je enzym vyskytující se v matrix mitochondrií, kde katalyzuje první reakci Krebsova cyklu, v níž acetylkoenzym A kondenzuje s oxalacetátem za vzniku citrátu a koenzymu A. Měření aktivity CS se používá jako indikátoru množství mitochondrií v buňkách. Aktivita CS se stanovuje spektrofotometrickou metodou, přičemž se měří vzestup koncentrace volné SH skupiny koenzymu A (CoA) pomocí Ellmanova činidla (DTNB, kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová). Měřicí médium (800 μl ; 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoová) kyselina, 0,25 % Triton-X, 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ oxalacetát, 0,31 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ acetylkoenzym A, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

triethanolamin hydrochlorid a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,1) bylo smícháno s 200 μl homogenizovaného obsahu komůrky. Enzymatická aktivita byla měřena spektrofotometricky při 412 nm a teplotě $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 200 sekund a vyjádřena v IU na mg hmotnosti tkáně (Kuznetsov et al. 2002). Aktivita citrátsyntázy byla měřena ve všech vzorcích odebraných z oxygrafů, přičemž vzorky byly po celou dobu uchovávány na ledu.

3.3.4 Měření kontraktility a elektrofyziologických parametrů

Papilární svaly nebo trabekuly byly odebrány z pravé nebo levé komory a umístěny do experimentální komory, která byla promývána okysličeným Tyrodovým roztokem o konstantním průtoku $6\text{-}10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ při teplotě $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Tyrodův roztok obsahoval následující složky: NaCl $137 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, KCl $4,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, MgCl_2 $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, CaCl_2 $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, glukózu $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, HEPES $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. pH bylo nastaveno na hodnotu 7,4 pomocí NaOH. Po stabilizaci preparátu trvající 30 minut byla měřena síla kontrakce a membránový potenciál za pomoci izometrického snímače síly kontrakce (model F30; Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus, Německo) a membránového napětí pomocí skleněných mikroelektrod naplněných 3M KCl s odporem větším než $20 \text{ M}\Omega$ vyrobených v laboratoři (Microelectrode Puller P-1000, Sutter Instrument, USA). Měření probíhala při stimulačních frekvencích 1, 2, 3 a 5 Hz (Pulsemaster Multi-Channel Stimulator A300; World Precision Instruments, USA).

Po zaznamenání kontrolních hodnot v Tyrodově roztoku byl do roztoku postupně přidáván propofol v koncentracích 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 a $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Signály byly zaznamenávány pomocí hardwaru a softwaru od společnosti National Instruments (Austin, TX, USA).

Pro analýzu zaznamenaných dat byl použit software MATLAB 2014b (MathWorks Inc., USA). Délka akčního potenciálu (APD) byla stanovena při 50 % a 90 % repolarizace (APD50 a APD90). Časový průběh síly kontrakce byl popsán třemi parametry: časem k dosažení maxima (TTP), časem k dosažení 50% relaxace (R50) a časem k dosažení 90% relaxace (R90). Klidové mechanické napětí bylo považováno za nulové a byla určena maximální amplituda kontrakční síly (CFmax). Všechna měření byla provedena na minimálně deseti kontrakcích, hodnoty byly zprůměrovány a tyto průměry byly použity pro další analýzy a srovnání.

3.3.5 Statistické zpracování

Výsledky jsou uvedeny jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka (SD) nebo střední chyba průměru (SEM). Pro statistickou analýzu případných rozdílů byl použit software STATISTICA Cz, verze 8 (StatSoft Inc., 2007, Praha, Česká republika) nebo OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA, 2011). Po provedení testů normality a homogenity rozptylů (Shapirův-Wilkův test, resp. F-test) byly rozdíly vyhodnoceny pomocí jednofaktorové ANOVA (s následným LSD nebo Bonferroniho testem) nebo Studentovým t-testem, pokud to bylo vhodné. Výsledky byly považovány za statisticky významné, pokud hodnota $p \leq 0,05$.

3.4 Metody vztahující se k cíli 2 - vliv chronického onemocnění ledvin na mitochondriální spotřebu kyslíku, a to odděleně na kůru a dřeň

3.4.1 Experimentální zvířecí model

Dospělí samci potkanů kmene Wistar, ve věku 4 měsíců (Velaz, Praha, Česká republika), podstoupili buď 5/6 nefrektomii (SNX; n=15), nebo simulovanou operaci (SHAM; n=15). Ve skupině potkanů SNX byla levá ledvina zpřístupněna laterálním dorzálním řezem, zbavena pouzdra a odstraněny oba póly ledviny, což odpovídá resekci přibližně 2/3 funkční ledvinné hmoty. Řezná plocha byla ošetřena kauterizací a aplikací hemostatika Lyostypt (B.Braun, Německo). Následně byl odstraněn podvaz renálních cév a zbylá část ledviny byla navracena zpět do břišní dutiny. Po dvou týdnech následovala druhá fáze zákroku, kdy byla odstraněna pravá ledvina, čímž došlo ke snížení celkové renální hmoty o 5/6. U kontrolní SHAM skupiny byly ledviny evakuovány, zbaveny pouzdra a neporušené zpět navraceny do dutiny břišní. Mezi jednotlivými operacemi (levá a pravá ledvina) byl opět dodržen dvoutýdenní interval. Po každé operaci byli potkani jednorázově léčeni antibiotikem marbofloxacinem ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, subkutánně, Marbocyl, Vétoquinol, Česká republika). Podrobný postup operace byl popsán v publikacích Švíglerová et al. (Švíglerová et al. 2010, 2012).

V krevních vzorcích odebraných z ocasní žíly byly u potkanů každý týden sledovány hladiny kreatininu, močoviny a draslíku, a to po dobu 10 týdnů. Na konci experimentu byli potkani umístěni do metabolických klecí, kde byla po dobu 24 hodin sbírána jejich moč. Koncentrace kreatininu, močoviny a draslíku v séru a moči byly měřeny pomocí automatického analyzátoru (Olympus AU 640, Mishima, Japonsko). Velikost glomerulární filtrace (GFR) byla odhadnuta na základě clearance kreatininu; byly také vypočítány clearance močoviny a frakční exkrece draslíku. Krevní tlak

(systolický i diastolický) byl měřen 10., 30., 50. a 70. den po operaci pomocí metody měření tlaku na ocase s využitím okluzní manžety (přístroj RTBP; Kent Scientific Co., USA).

Po aplikaci celkové anestezie (uretan; $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti) byli potkani usmrceni zlomením vazů a jejich ledviny byly vyjmuty, zváženy a připraveny pro měření mitochondriální respirace.

Všechny experimentální postupy byly provedeny v souladu s pokyny Ministerstva zemědělství ČR pro vědecké experimenty na zvířatech a evropskými směrnici (Směrnice o ochraně obratlovců používaných pro experimentální a vědecké účely; 86/609/EU) a schváleny Komisí pro ochranu zvířat na Lékařské fakultě v Plzni, Univerzita Karlova.

3.4.2 Vysokoučinná respirometrie

Mitochondriální spotřeba kyslíku byla měřena zvlášť v kůře a dřeni ledvin pomocí vysoce účinné respirometrie na oxygrafu O2k (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko).

Ledviny byly uloženy do konzervačního roztoku BIOPS se složením: CaK_2EGTA $2,77 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, K_2EGTA $7,23 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, imidazol $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, taurin $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, MES hydrát $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, dithiotreitol $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $6,56 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, Na_2ATP $5,77 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{fosfokreatin}$ $15 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 7,1. Z ledvin byly vypreparovány vzorky kůry a vnější vrstvy dřene (asi 10 mg) a jemně mechanicky permeabilizovány dvěma ostrými pinzetami v médiu MiR05, které obsahovalo $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EGTA, $3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $60 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ draselného laktobionátu, $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ taurinu, $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 , $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HEPES, $110 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ sacharózy a $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ albuminu z hovězího séra bez mastných kyselin, pH 7,0. Vzorky (cca 2 mg kůry a 4 mg dřene) byly zváženy a vloženy do předkalibrovaných oxygrafových

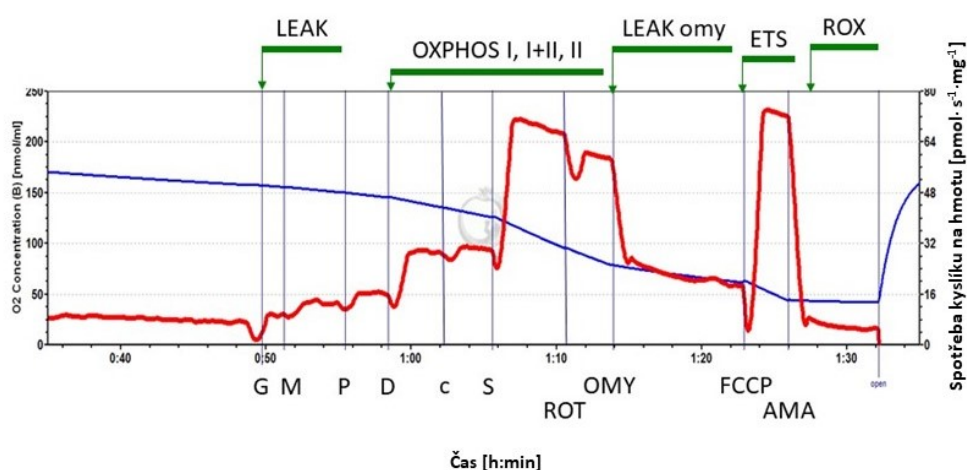
komůrek s roztokem MiR05. Obsah kyslíku byl ekvilibrován s atmosférickým vzduchem a teplota byla nastavena na 37 °C.

Po uzavření komůrek oxygrafu byly postupně přidávány substráty a inhibitory jednotlivých komplexů respiračního systému, aby byly určeny různé respirační stavy: LEAK, OXPHOS I, OXPHOS I+II a OXPHOS II, ETS II, ROX a CIV. Použitý titrační protokol pro kůru i dřev zahrnoval postupné přidání: malátu (M; 2 mmol·l⁻¹), glutamátu (G; 10 mmol·l⁻¹), pyruvátu (P; 5 mmol·l⁻¹), adenosindifosfátu (D; 5 mmol·l⁻¹), cytochromu c (c; 10 μmol·l⁻¹), sukcinátu (S; 10 mmol·l⁻¹), rotenonu (Rot; 0,5 μmol·l⁻¹), oligomycinu (Omy; 2 μg·ml⁻¹), FCCP (0,5 μmol·l⁻¹), antimycinu A (Ama; 2,5 μg·ml⁻¹), TMPD (0,5 mmol·l⁻¹) a askorbátu (Asc; 2 mmol·l⁻¹), a nakonec azidu sodného (Azd; 100 mmol·l⁻¹).

Stanovovány byly také kontrolní poměry a to: L_{OMY}/EII k odhalení potenciálního narušení spřažení oxidace s fosforylací u SNX jedinců; PI/PI+II k určení relativního příspěvku komplexu I ve srovnání s komplexy I + II a poměr PII/EII, který vyjadřuje míru zpětné kontroly elektrontransportního systému fosforylací.

Spotřeba kyslíku v jednotlivých respiračních stavech byla korigována na hodnoty ROX a vyjádřena buď v pmol·s⁻¹·mg⁻¹, nebo v pmol·s⁻¹·IU⁻¹ aktivity citrátsyntázy. V grafech jsou data prezentována jako průměry ± SD.

Reprezentativní graf respirometrického experimentu s permeabilizovanou dřeví ledvin je znázorněna na Obrázku 8.



Obrázek 8 - Reprezentativní křivka spotřeby kyslíku ledvinné dřeně s měřenými parametry a titračním protokolem. M = malát; G = glutamát; D = adenosindifosfát; cyt c = cytochrom c; S = sukcinát; Rot = rotenon; Omy = Oligomycin; FCCP = karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon; Ama = Antimycin A; LEAK = nefosforylační respirační stav; OXPHOS = oxidativní fosforylace; ETS = elektronový transportní systém; ROX = reziduální spotřeba kyslíku; CIV = aktivita komplexu IV

3.4.3 Aktivita citrátsyntázy

V této studii byla měřena aktivita citrátsyntázy v homogenizovaných vzorcích z každé komůrky oxygrafu. Konkrétně bylo 950 μl testovacího roztoku obsahujícího 0,1 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoovou) kyselinu, 0,25 % Triton-X, 0,5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ oxalacetát, 0,31 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetylkoenzym A, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA, 5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ triethanolamin hydrochlorid a 0,1 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl smícháno s 50 μl vzorku. Rychlost změny absorbance byla měřena po dobu 200 sekund při vlnové délce 412 nm a teplotě 30 °C pomocí UV/V_{is} spektrofotometru Life Science DU®730 (Brea, CA, USA).

3.4.4 Statistické zpracování

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Origin 2019 (OriginLab, Corp., Northampton, MA, USA) a hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za významné.

Po ověření normality rozložení (Smirnov-Kolmogorovův test) a případné logaritmické transformaci byly rozdíly průměrů analyzovány pomocí nepárového dvoustranného Studentova t-testu (např. pro respiometrická data, sérové koncentrace, clearance kreatininu). Aktivita citrátsyntázy byla analyzována dvoufaktorovou ANOVA (faktory: typ tkáně a zásah) a pro analýzu vývoje parametrů v čase byla použita dvoufaktorová smíšená ANOVA (jeden faktor opakovaného měření a druhý mezi skupinami pro SHAM a SNX potkany), následovaná post hoc Tukeyho testem (pro krevní tlak).

3.5 Metody vztahující se k cíli 3 - stanovení respirační aktivity mitochondrií spermií s normální a sníženou pohyblivostí

3.5.1 Studovaný soubor

Ejakuláty byly odebrány od 14 mužů v IVF Centru Prof. Zecha v Plzni. Podle klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) byli tito muži rozděleni do dvou skupin: normozoospermatici ($n = 7$, průměrný věk 33,1 let) a asthenozoospermatici ($n = 7$, průměrný věk 36,7 let). Vzorky byly vždy odebrány přímo v IVF centru, aby se minimalizovalo riziko znehodnocení vlivem skladování nebo transportu. Po zkapalnění ejakulátu (30 minut) byl proveden nativní spermioqram podle kritérií WHO z roku 2010, a to pomocí světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (zvětšení okulár 10x, objektiv 20x) a Maklerovy komůrky.

3.5.2 Separace spermií metodou hustotního gradientu

Spermie byly separovány a vyčištěny gradientovou centrifugací pomocí médií Sperm Filter Medium (SFM, CRYOS, Německo) a Quinn's Sperm Washing Medium (QSWM, SAGE, USA). SFM byl naředěn na 90 % (0,15 ml QSWM: 1,35 ml SFM), 70 % (0,09 ml QSWM: 0,21 ml SFM) a 50 % (0,15 ml QSWM: 0,15 ml SFM). Do kónické zkumavky byly postupně vrstveny 1,5 ml 90% roztoku, 0,3 ml 70% roztoku a 0,3 ml 50% roztoku. Poté byl přidán celý ejakulát a vzorek byl centrifugován po dobu 20 minut při 2000 otáčkách za minutu. Po odstranění supernatantu bylo přidáno 8 ml Quinn's Sperm Washing Media a vzorek byl znovu centrifugován 8 minut při 2000 otáčkách. Po dalším odstranění supernatantu byl vzorek připraven k použití v oxygrafu Oroboros (Oroboros, Innsbruck, Rakousko).

3.5.3 Vysokoúčinná respirometrie

V našich experimentech jsme zkoumali respirační aktivitu spermií pomocí dvoukanálového oxygrafu Oroboros O2k (Oroboros, Innsbruck, Rakousko). Měření probíhalo v uzavřených komůrkách o objemu 2 ml při teplotě 36 °C. Po 40-50 minutové ekvilibraci koncentrace kyslíku v respiračním médiu odpovídala jeho obsahu v atmosférickém vzduchu a rozpustnosti v médiu (0,92). Poté byly komůrky uzavřeny a do nich byl pomocí Hamiltonovy stříkačky přidán vzorek spermií. Nejprve byla membrána spermií permeabilizována digitoninem a byla změřena respirační aktivita před přidáním substrátů a ADP. Poté byl použit sekvenční titrační protokol s aplikací substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů respiračního systému. Zvolená sekvence podaných látek byla následující: a) substráty komplexu I - glutamát, malát, pyruvát (stav LEAK); b) substrát komplexu V – ADP (stav OXPHOS I); c) substrát komplexu II – sukcinát (stav OXPHOS I+II); d) cytochrom c (stav OXPHOS I+II_c); e) inhibitor komplexu I – rotenon (stav OXPHOS II); f) inhibitor komplexu V – oligomycin (stav LEAK_{OMY}); g) rozpřahovač oxidace a fosforylace – karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon (stav ETS II); h) inhibitor komplexu III – antimycin A (stav ROX).

V úvodních experimentech byla testována vhodná dávka digitoninu ($5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) pro permeabilizaci membrán spermií. K vzorku spermií byl přidán sukcinát, rotenon a ADP a digitonin byl postupně dávkován, dokud se respirace zvyšovala. Vyšší dávky digitoninu vedly k poškození mitochondriální membrány a úniku cytochromu c.

3.5.4 Statistické zpracování

Spotřeba kyslíku spermiemi byla vypočtena jako záporně vzatá derivace poklesu koncentrace kyslíku v komůrce pomocí softwaru DatLab, verze 6 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko).

K statistickému zpracování získaných dat byl použit program STATISTICA Cz, verze 8 (StatSoft CR, Praha, Česká republika). Neparametrický test pro dva výběry (Mannův-Whitneyho test) byl použit pro srovnání hodnot získaných od obou skupin. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

4 VÝSLEDKY

4.1 Výsledky vztahující se k cíli 1 - vliv propofolu na mitochondriální spotřebu kyslíku v levé a v pravé srdeční komoře

4.1.1 Vysokoúčinná respirometrie

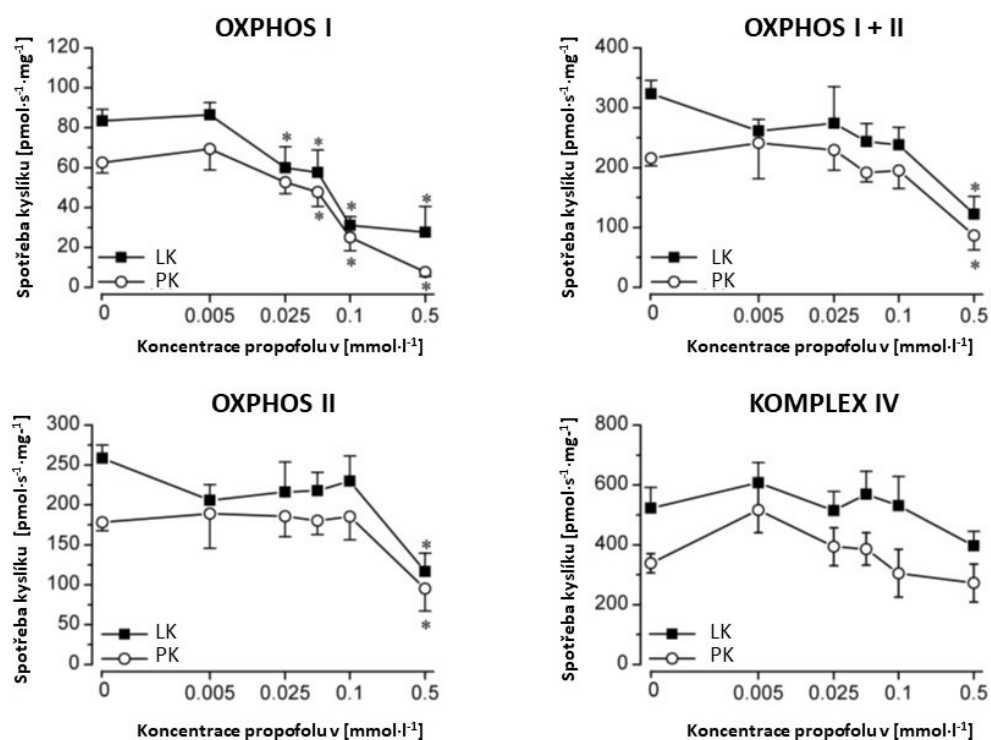
Propofol v levé komoře významně snížil spotřebu kyslíku při aktivaci komplexu I (OXPHOS I, PI) v koncentraci $0,025 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a jeho účinek se zvyšoval s rostoucí koncentrací anestetika. V pravé komoře byla minimální koncentrace propofolu, která výrazně ovlivnila respiraci ve stavu OXPHOS I, $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Na rozdíl od komplexu I neměl propofol žádný významný vliv na respiraci spojenou s komplexem II (OXPHOS I+II, OXPHOS II) nebo IV (CIV) při koncentracích nižších než $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledky shrnuje Obrázek 9.

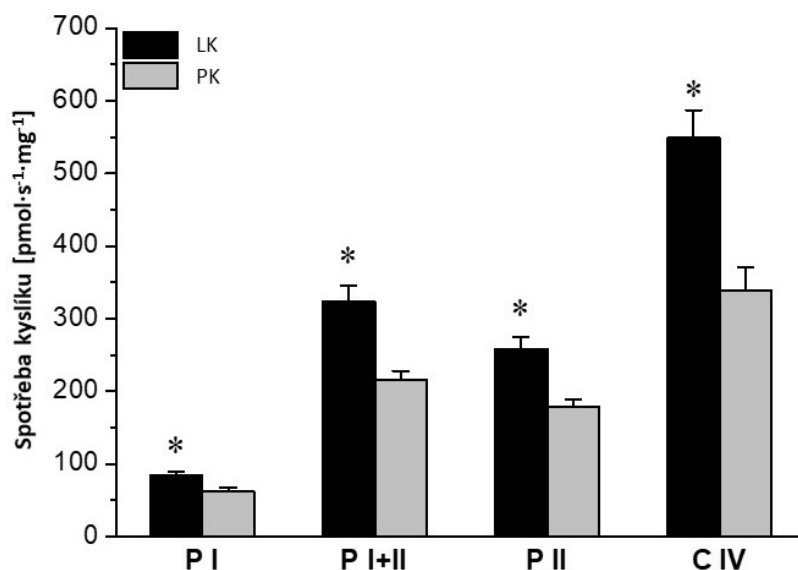
I když propofol neměl zásadní vliv na absolutní hodnoty stavu LEAK stavu (L), zvyšující se koncentrace propofolu vedla ke zvýšení poměru L/P, což ukazuje na nižší účinnost procesu fosforylace. V levé komoře byl výchozí poměr L/P $0,19 \pm 0,01$, přičemž výrazně vzrostl při koncentraci propofolu $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($L/P = 0,25 \pm 0,07$) až na $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($L/P = 0,69 \pm 0,14$). V pravé komoře byl tento poměr ve vzorcích bez přidaného propofolu $0,21 \pm 0,02$, přičemž při koncentraci $0,025 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ dosáhl $0,28 \pm 0,04$ a dále rostl s vyšší koncentrací propofolu.

Při porovnání respirační aktivity pravé a levé srdeční komory, bylo zjištěno, že všechny sledované parametry (OXPHOS I (PI), OXPHOS I+II (PI+II), OXPHOS II (PII) a aktivita komplexu IV (CIV)) byly vyšší v levé komoře v porovnání s pravou (Obrázek 10).

Aktivita enzymu citrát syntázy nebyla ovlivněna žádnou z testovaných koncentrací propofolu.



Obrázek 9 - Respirace permeabilizovaných svalových vláken izolovaných z levé (LK) a pravé srdeční komory (PK). OXPHOS = oxidativní fosforylace. Účinek propofolu byl testován v koncentracích 0,005; 0,025; 0,05; 0,1 a 0,5 mmol·l⁻¹. * $p \leq 0,05$ v porovnání s hodnotou bez propofolu.



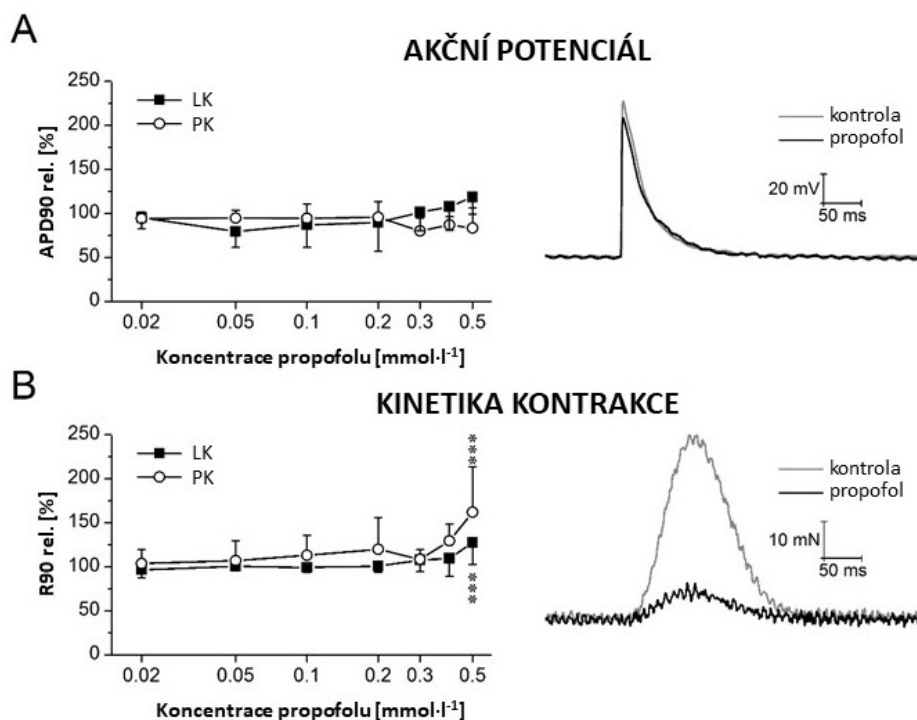
Obrázek 10 - Spotřeby kyslíku ve stavu OXPHOS a aktivita komplexu IV měřená za kontrolních podmínek v pravé (PK) a levé komoře (LK). PI = OXPHOS I, P I+II = OXPHOS I+II, PII = OXPHOS II, CIV = aktivita komplexu IV. * $p \leq 0,05$

4.1.2 Měření kontraktility a elektrofyzilogických parametrů

V obou srdečních komorách neměl propofol žádný významný vliv na délku trvání akčního potenciálu v žádné z jeho koncentrací, a to bez ohledu na frekvenci stimulace (1, 2, 3 nebo 5 Hz, Obrázek 11A). Ani průběh kontrakčně-relaxačního cyklu nebyl anestetikem ovlivněn, kromě nejvyšší testované koncentrace ($0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), kdy došlo k výraznému prodloužení doby do 50% (R50) a 90% (R90) relaxace v levé i pravé komoře (Obrázek 11B, při frekvenci stimulace 1 Hz). Doba potřebná k dosažení vrcholu kontrakční síly zůstala stejná při všech koncentracích propofolu.

Propofol snižoval sílu kontrakce při všech testovaných frekvencích stimulace (1, 2, 3 a 5 Hz). V pravé komoře se signifikantní snížení kontrakční síly objevilo při nižších koncentracích než v levé komoře. Přesto analýza křivek

závislosti účinku na dávce neukázala žádné statisticky významné rozdíly v hodnotách EC50 mezi jednotlivými frekvencemi stimulace: v levé komoře byly hodnoty $0,33 \pm 0,02$ (1 Hz), $0,24 \pm 0,03$ (2 Hz), $0,21 \pm 0,04$ (3 Hz), $0,31 \pm 0,05$ (5 Hz) $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a v pravé komoře $0,39 \pm 0,03$ (1 Hz), $0,23 \pm 0,03$ (2 Hz), $0,22 \pm 0,03$ (3 Hz) a $0,20 \pm 0,03$ (5 Hz) $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obrázek 11 - Vliv propofolu na časový průběh akčního potenciálu a kontrakční síly. (A) Délka akčního potenciálu při 90 % repolarizace v levé (LK) a pravé (PK) komoře při použité stimulační frekvenci 1 Hz a různých koncentrací propofolu, vyjádřená jako procento hodnot získaných v kontrolním roztoku. Pravý panel ukazuje reprezentativní záznam membránového potenciálu v roztoku s propofolem ($0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) a bez něj. (B) Čas k dosažení 90% relaxace v levé (LK) a pravé (PK) komoře při použité stimulační frekvenci 1 Hz a různých koncentrací propofolu, vyjádřená jako procento hodnot získaných v kontrolním roztoku. Pravý panel ukazuje reprezentativní záznam membránového potenciálu v roztoku s propofolem ($0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) a bez něj.

4.2 Výsledky vztahující se k cíli 2 - vliv chronického onemocnění ledvin na mitochondriální spotřebu kyslíku, a to odděleně na kůru a dřeň

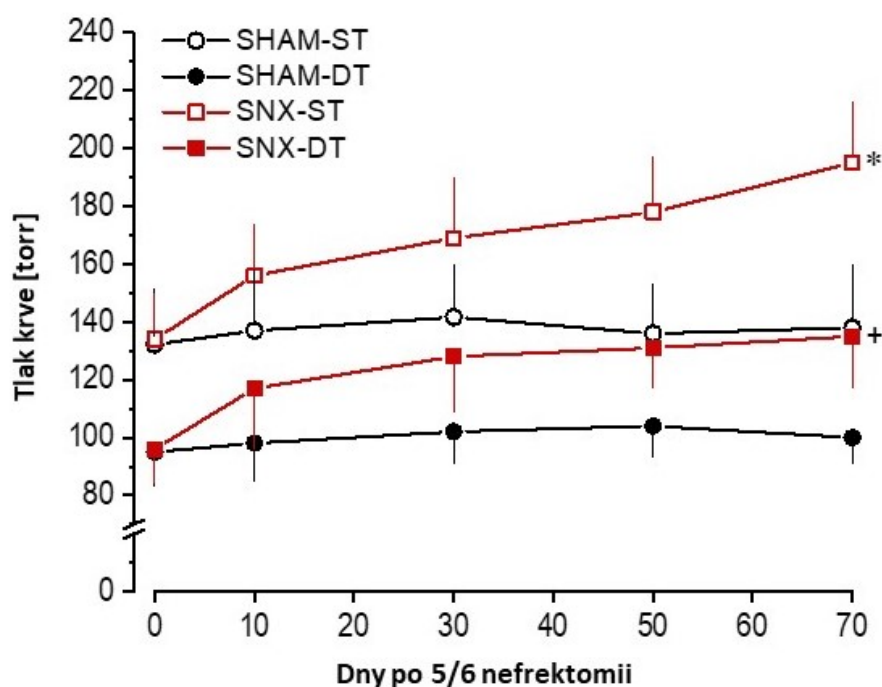
4.2.1 Účinek 5/6 nefrektomie

Deset týdnů po provedení 5/6 nefrektomie měli potkani SNX statisticky významně nižší hmotnost (395 ± 12 g) oproti skupině SHAM (446 ± 15 g). V Tabulce 2 jsou shrnuty výsledky týkající se některých funkčních renálních parametrů, které ukazují výrazné snížení clearance močoviny (C_{urea}) a kreatininu ($C_{\text{kreatinin}}$), spolu se zvýšením hladiny draslíku v krvi (S_{K^+}) a nárůstem exkreční frakce draslíku (EF_{K^+}) u potkanů SNX deset týdnů po subtotální nefrektomii. U všech přeživších SNX zvířat se projevila znatelná hypertrofie pahýlu zbývající ledviny. Po 5/6 nefrektomii se u potkanů výrazně zvýšil systolický i diastolický krevní tlak od desátého dne po operaci. Zatímco diastolický tlak zůstal stabilní od 30. dne, systolický tlak vykazoval kontinuální nárůst (Obrázek 12).

Tabulka 2 - Vliv 5/6 nefrektomie na ledvinné parametry

	SNX	n	SHAM	n
Váha ledviny [g]	$2,23 \pm 0,46^*$	10	$1,36 \pm 0,17$	15
$C_{\text{kreatinin}}$ [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$]	$0,86 \pm 0,38^*$	10	$2,24 \pm 0,45$	10
C_{urea} [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$]	$0,45 \pm 0,24^*$	10	$1,36 \pm 0,38$	10
S_{K^+} [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]	$6,6 \pm 1,7^*$	10	$5,2 \pm 1,1$	10
EF_{K^+} [%]	$38,72 \pm 6,83^*$	10	$15,61 \pm 2,36$	10

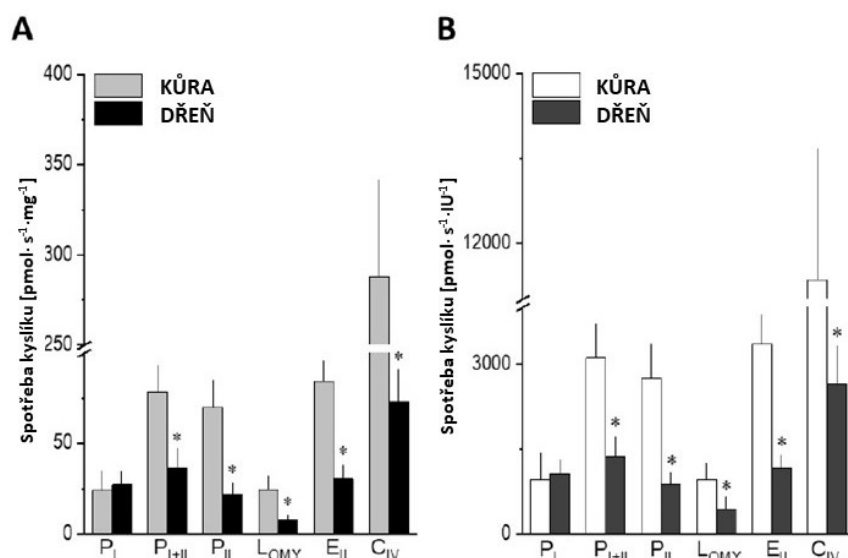
Clearance kreatininu a močoviny (C); koncentrace draslíku v séru (S_{K^+}); exkreční frakce draslíku (EF_{K^+}) vypočítaná jako procentuální poměr clearance draslíku ke clearance kreatininu; hmotnost jedné ledviny u SHAM potkanů a pyhýlu ledviny u potkanů s 5/6 nefrektomií (SNX); $*p \leq 0,05$ v porovnání se SHAM potkany



Obrázek 12 - Systolický (ST; otevřené symboly) a diastolický (DT; plné symboly) krevní tlak u kontrolních potkanů (SHAM; černé linie) a potkanů s 5/6 nefrektomií (SNX; červené linie). * $p < 0,05$, ST je signifikantně vyšší ve srovnání se SHAM potkany; + $p < 0,05$, DT je signifikantně vyšší ve srovnání se SHAM potkany.

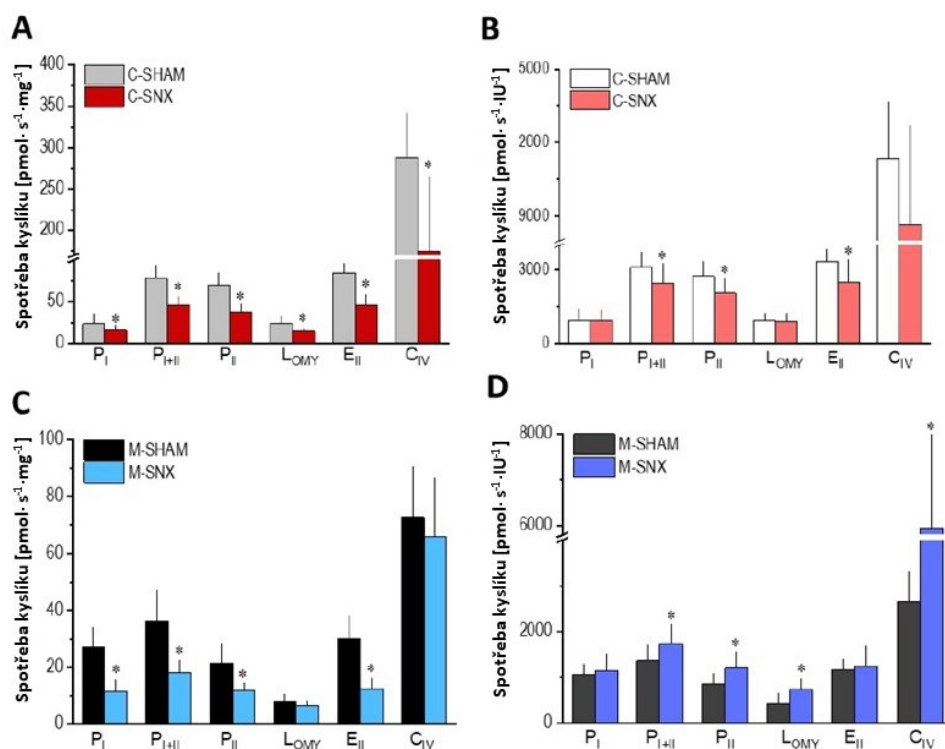
4.2.2 Vysokoučinná respirometrie

Kůra a dřeň ledvin vykazovaly rozdílné vzorce mitochondriální aktivity. S výjimkou stavu OXPHOS I (PI) byly všechny ostatní respirační stavy v dřeni statisticky významně nižší než v kůře u kontrolních (SHAM) potkanů (Obrázek 13A). Tento rozdíl nebyl způsoben odlišným množstvím mitochondrií v kůře a dřeni, protože podobné výsledky byly získány, když byly hodnoty spotřeby kyslíku přepočítány na aktivitu citrátsyntázy (Obrázek 13B).



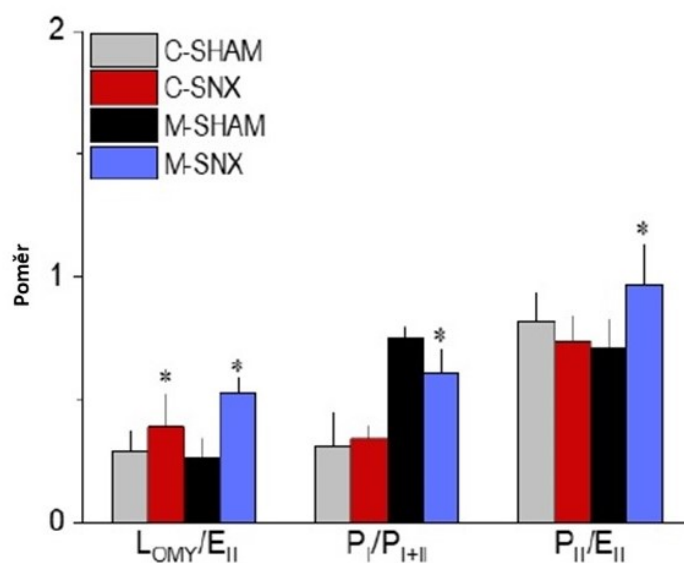
Obrázek 13 - Mitochondriální spotřeba kyslíku v permeabilizovaných vzorcích kůry a dřeně ledvin vyjádřená na mg vlhké hmotnosti tkáně (A) a IU aktivity citrátsyntázy (B). PI = OXPHOS I; P I+II = OXPHOS I+II; PII = OXPHOS II; L_{OMY} = stav LEAK po aplikaci inhibitoru ATP syntázy oligomycinu; EII = kapacita elektrontransportního systému po aplikaci uncoupleru; CIV = aktivita komplexu IV. * $p \leq 0,05$ ve srovnání s kůrou.

Zvýšení hmotnosti ledviny po nefrektomii mělo zajímavý vliv na mitochondriální aktivitu jak v kůře (Obrázek 14A, B), tak v dřeni ledvin (Obrázek 14C, D). Při přepočtu na gram vlhké hmotnosti tkáně byly všechny respirační stavy ve vzorcích SNX nižší než u vzorků SHAM (Obrázek 14A), výjimku představoval pouze stav LEAK (L_{OMY}) a aktivita komplexu IV (CIV) v dřeni ledvin (Obrázek 14C). Ale při normalizaci parametrů na aktivitu citrátsyntázy se ukázalo, že v kůře byly u SNX potkanů signifikantně nižší jen stavy PI+II, PII a EII ve srovnání s kontrolními potkany (SHAM). Naopak, dřeň vykazovala u jedinců SNX vyšší hodnoty při přepočtu na aktivitu citrátsyntázy ve stavech PI+II, PII a L_{OMY} ve srovnání s kontrolními vzorky.



Obrázek 14 - Mitochondriální spotřeba kyslíku v mechanicky permeabilizovaných vzorcích kůry ledvin (A, B) a dřeně (C, D) vyjádřená na mg vlhké hmotnosti tkáně (A, C) nebo aktivitu citrátsyntázy v IU (B, D). C = kůra ledviny; M = dřeň ledviny

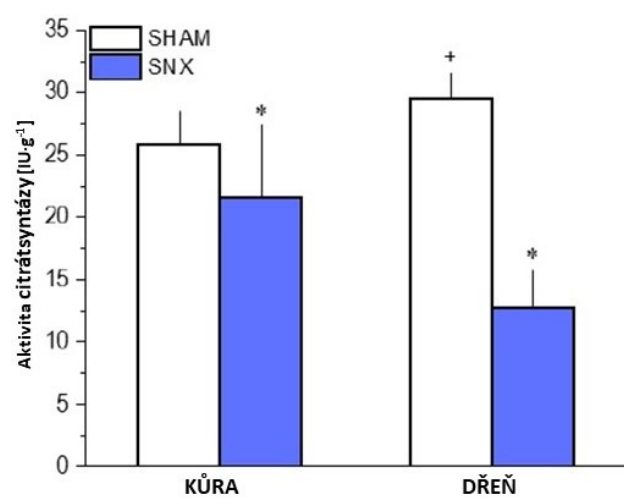
V dřeni subtotálně nefrektomovaných potkanů došlo také ke změnám v respiračních kontrolních poměrech: poměr L_{OMY}/E_{II} se po 5/6 nefrektomii zvýšil, stejně jako poměr P_{II}/E_{II}, zatímco poměr P_I/P_{I+II} se ve dřeni skupiny SNX jedinců (Obrázek 15).



Obrázek 15 - Respirační kontrolní indexy. C = kůra ledviny; M = dřeň ledviny; L_{OMY} = stav úniku po aplikaci inhibitoru ATP syntázy oligomycinu; P_I = OXPHOS I; P_{I+II} = OXPHOS I+II; P_{II} = OXPHOS II; E_{II} = kapacita elektrontransportového systému po aplikaci uncoupleru. * $p \leq 0,05$

4.2.3 Aktivita citrátsyntázy

Aktivita citrátsyntázy byla u kontrolních jedinců mírně, ale statisticky významně vyšší v dřeni ledvin než v jejich kůře. Po subtotální nefrektomii došlo k výraznému poklesu aktivity citrátsyntázy v obou tkáních, přičemž tento pokles byl výraznější v dřeni než v kůře (Obrázek 16).



Obrázek 16 - Aktivita citrát-syntázy v kůře a dřeni ledvin SHAM a SNX potkanů

4.3 Výsledky vztahující se k cíli 3 - stanovení respirační aktivity mitochondrií spermií s normální a sníženou pohyblivostí

Nejprve bylo zapotřebí stanovit minimální měřitelné množství spermií aplikovaných do oxygrafických komůrek, aby byl zaznamenán dostatečný signál. Vhodný počet spermií byl stanoven na 5×10^6 na 1 ml média v komůrce. V další sérii předběžných experimentů byla testována permeabilizace buněčné membrány spermií digitoninem, kdy byly k vzorku spermií přidávány sukcinát, rotenon, ADP a digitonin, který byl postupně titrován, dokud se respirace zvyšovala.

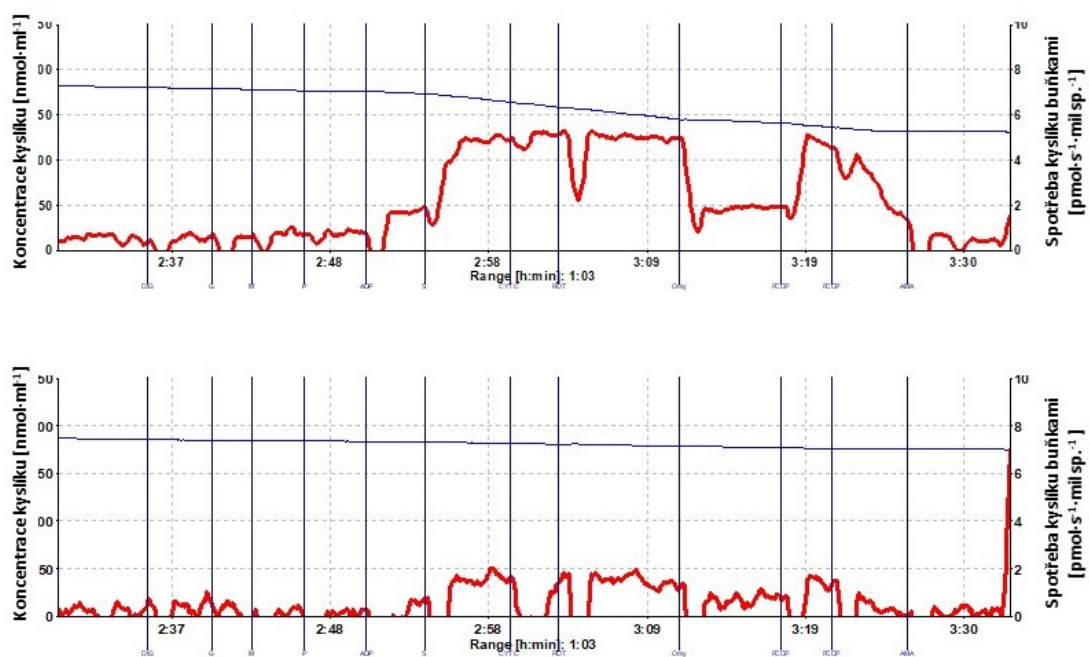
Ve vlastním titračním protokolu byly po digitoninu a stabilizaci spotřeby kyslíku přidány substrátu přinášející elektrony ke komplexu I (glutamát, malát, pyruvát), tak novazen stav LEAK.

Po aplikaci ADP byl měřen stav OXPHOS I, tedy spotřeba kyslíku během fosforylace ADP na ATP. U asthenozoospermatických vzorků byla hodnota OXPHOS I výrazně nižší než u vzorků normozoospermatických. Stav OXPHOS I + II (po přidání sukcinátu) se mezi sledovanými skupinami signifikantně nelišil. Komplex I byl následně inhibován rotenonem (stav OXPHOS II). Ani zde se sledované skupiny nelišily, ale výsledky ukazují, že u mitochondrií spermií je příspěvek komplexu I k celkové kapacitě oxidační fosforylace nižší, než je tomu u somatických buněk. Po inhibici ATP syntázy oligomycinem došlo k poklesu spotřeby kyslíku a indukci stavu LEAK_{OMY}, kdy vyšších hodnot dosahovaly asthenozoospermatické vzorky. Stavy ETS (maximální kapacita elektrontransportního systému) a ROX (reziduální spotřeba kyslíku) se u sledovaných vzorků nelišily. Podrobnější informace ke sledovaným respiračním parametrům zobrazuje Tabulka 3. Ukázkové křivky normozoospermatického a asthenozoospermatického vzorku ukazuje Obrázek 17.

Tabulka 3 - Spotřeba kyslíku permeabilizovanými spermii v jednotlivých respiračních stavech

Stav	Normozoospermie $\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mil sp.}^{-1}$ (n = 7)	Asthenozoospermie $\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mil sp.}^{-1}$ (n = 7)	p value
LEAK	$0,23 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,10$	n.s.
OXPHOS I	$1,32 \pm 0,16$	$0,56 \pm 0,16^*$	0,007
OXPHOS I + II	$3,38 \pm 0,52$	$2,72 \pm 0,79$	n.s.
OXPHOS II	$2,81 \pm 0,48$	$1,73 \pm 0,57$	n.s.
LEAK _{OMY}	$0,67 \pm 0,16$	$1,72 \pm 0,59$	0,046
ETS	$3,18 \pm 0,67$	$4,10 \pm 1,39$	n.s.
ROX	$0,14 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,05$	n.s.

LEAK = nefosforylační respirační stav; OXPHOS = oxidativní fosforylace;
 L_{OMY} = stav LEAK po aplikaci inhibitoru ATP syntázy oligomycinu; ETS =
 elektronový transportní systém; ROX = reziduální spotřeba kyslíku



Obrázek 17 - Typický průběh respirometrické analýzy normozoospermatického (A) a asthenozoospermatického (B) ejakulátu.

5 DISKUZE

Mitochondrie hrají klíčovou roli v patogenezi mnoha onemocnění, jelikož zajišťují základní buněčné funkce, zejména přeměnu energie živin na ATP, regulaci apoptózy nebo udržování redoxní rovnováhy. Poruchy v těchto funkcích mohou vést k rozvoji různých patologických stavů, zejména těch spojených s neurodegenerativními, metabolickými, nádorovými a kardiovaskulárními onemocněními. Změny ve funkci mitochondrií představují nezanedbatelný faktor v patogenezi řady chorob, přičemž jejich porozumění je zásadní pro vývoj nových terapeutických přístupů zaměřených na mitochondriální funkce.

Cílem naší práce bylo přispět k případné identifikaci některých patofyziologických mechanismů spojených s dysfunkcí mitochondriálního respiračního systému v několika typech tkání a buněk, a to konkrétně v srdci, ledvinách a u spermií. Vzhledem k tomu, že experimenty se často konají na anestezovaných zvířatech, nejprve jsme analyzovali vliv anestetika propofolu na mitochondriální respiraci myokardu.

5.1 Diskuze vztahující se k cíli 1 - vliv propofolu na mitochondriální spotřebu kyslíku v levé a v pravé srdeční komoře

Propofol je intravenózní anestetikum, které se používá především k navození a udržení celkové anestezie nebo k sedaci během lékařských zákroků. Je známý pro svůj rychlý nástup účinku a jeho krátké trvání, což z něj činí ideální volbu pro krátkodobé zákroky, sedaci na jednotkách intenzivní péče nebo při navození spánku před operací. Propofol působí tím, že zvyšuje účinek kyseliny γ -aminomáselné (GABA) na její receptory v centrálním nervovém systému, což má za následek inhibici neuronální aktivity a navození spánku či

bezvědomí (Tan et al. 2024). Na lidský organismus může mít jak pozitivní, tak negativní účinky.

Podle některých autorů může mít propofol protektivní účinek na mitochondrie mozku, zejména v souvislosti s ischemicko-reperfúzním poškozením. Propofol v koncentraci $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ inhiboval otevření mitochondriálních pórů přechodné propustnosti, čímž omezoval otok mitochondrií indukovaný vápníkem a produkci reaktivních forem kyslíku, což může přispívat k ochraně mozku před poškozením (Li et al. 2014). Ve studiích na myokardu zlepšil propofol antioxidační schopnosti mitochondrií, čímž snížil poškození myokardu a ochránil srdce rizikových pacientů (Shao et al. 2008). Na druhou stranu může být propofol potenciálně neurotoxický pro vyvíjející se mozek. Ve studiích na nervových kmenových buňkách (NSCs) způsobil propofol snížení jejich proliferace a urychlil apoptózu prostřednictvím mechanismů závislých na mitofagii (Liang et al. 2021).

V naší studii jsme zjistili, že propofol významně inhiboval aktivitu mitochondriálního komplexu I, což následně může vést ke snížení schopnosti produkovat ATP, které je nezbytné pro srdeční kontrakci. Tento vliv byl pozorován již při koncentraci $0,025 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což je hodnota, která může být klinicky relevantní při dlouhodobém podávání propofolu během sedace nebo anestezie. Tento náález podporuje řada studií, které ukázaly, že propofol může interferovat s mitochondriální funkcí (Finsterer a Frank 2016; Niezgod a Morgan 2013).

Na rozdíl od našich experimentů, Shao et al. (Shao et al. 2008) nepozorovali inhibici respirace v mitochondriích izolovaných ze srdce potkana ani při vyšších koncentracích propofolu ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), což může být způsobeno rozdíly v experimentálních podmínkách nebo rozdíly v použitém modelu, jako jsou izolované mitochondrie versus permeabilizovaná svalová

vlákna. Naše metoda, která použila permeabilizovaná svalové vlákna, poskytuje komplexnější obraz mitochondriální funkce v kontextu celé buňky, což může lépe reflektovat klinickou realitu *in vivo*.

Dalším důležitým nálezem této studie je, že propofol významně snižoval sílu kontrakce srdeční svaloviny, a to již při koncentraci $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což potvrzuje výsledky předchozích studií dokumentujících negativně inotropní účinek propofolu (Hamilton et al. 2000). Snižená kontraktilní síla může být částečně vysvětlena sníženou produkcí ATP v důsledku inhibice komplexu I, což je klíčový faktor pro udržení energetického metabolismu srdce. Zajímavé je, že propofol neměl žádný vliv na délku akčního potenciálu, což naznačuje, že elektrofyziologické vlastnosti membrán nejsou přímo ovlivněny tímto anestetikem (Azuma et al. 1993). Vzhledem k tomu, že myokardiální deprese je obávaným nežádoucím účinkem propofolu, experimentální data o účinku tohoto anestetika na srdeční kontrakci jsou relativně početná, ale extrémně rozporuplná. V již zmíněné studii Azumy a spol. (Azuma et al. 1993) nebyl pozorován žádný účinek propofolu na kontrakci papilárního svalu potkana až do koncentrace $600 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nicméně tyto experimenty byly prováděny při teplotě 30°C při stimulační frekvenci zcela nevhodné pro srdce potkana ($0,5 \text{ Hz}$). Většina studií však potvrzuje negativně inotropní účinek propofolu v koncentracích kolem $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a přisuzuje jej snížení proudu ICaL , snížení citlivosti kontraktilního aparátu k vápníku, změnám v aktivitě sodíko-vápníkového výměníku nebo zhoršení uptake vápníku do sarkoplasmatického retikula (Puttick a Terrar 1992; Hamilton et al. 2000; Sprung et al. 2001; Wickley et al. 2006, 2007)

Výsledky této studie naznačují, že myokardiální dysfunkce způsobená propofolem může být indukována také poruchou mitochondriální respirace, zejména sníženou kapacitou komplexu I. Zjištění, že propofol v klinicky

relevantních koncentracích inhibuje mitochondriální funkci a snižuje kontraktilitu srdečních svalů, potvrzuje možnost, že kombinace těchto faktorů může být příčinou indukce a progresu obávaného propofolového infuzního syndromu, jehož riziko stoupá u pacientů podstupujících dlouhodobou sedaci propofolem (Singh a Anjankar 2022).

5.2 Diskuze vztahující se k cíli 2 - vliv chronického onemocnění ledvin na mitochondriální spotřebu kyslíku, a to odděleně na kůru a dřeň

Chronické renální selhání je progresivní onemocnění, které vede k nevratnému poškození ledvin a snížení jejich funkce. Je charakterizováno postupnou ztrátou nefronů, spojenou se sníženou glomerulární filtrací a zvýšením markerů renálního poškození, jako je albuminurie nebo hladina kreatininu v krvi (Wilson et al. 2021).

Jedním z hlavních mechanismů, které přispívají k rozvoji chronického renálního selhání, je mitochondriální dysfunkce. Mitochondrie, které jsou zodpovědné za produkci ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace, hrají klíčovou roli v udržování energetické rovnováhy a funkce ledvinových buněk, zejména v energeticky náročných částech nefronu, jako jsou proximální tubuly. Poruchy mitochondriálních funkcí vedou k energetickému deficitu, oxidačnímu stresu a spuštění apoptotických procesů, které hrají zásadní roli v patogenezi tohoto onemocnění (Verissimo a de Seigneux 2024).

V experimentální praxi jsou metody redukce renální hmoty u potkanů obecně považovány za vhodný model pro studium patofyziologie chronického renálního selhání, i když poškození ledvin v tomto případě nastává náhle, následované kombinovanými kompenzačními procesy a postupným zhoršováním poškození v důsledku oslabené renální funkce a oxidačního stresu (Aparicio-Trejo et al. 2018). Nejpoužívanějším modelem mezi těmito metodami je 5/6 nefrektomie (Bao et al. 2018). Typické příznaky, jako hypertrofie nefronů, snížená glomerulární filtrace, zhoršené tubulární funkce, závažná arteriální hypertenze, se obvykle objeví během jednoho týdne po snížení renální hmoty (Švíglerová et al. 2012).

Výsledky naší studie ukazují, že subtotální nefrektomie a následné chronické renální selhání mají různé účinky na spotřebu kyslíku v korových

a dřeňových mitochondriích 10 týdnů po provedení 5/6 nefrektomie. V kůře ledvin byla mitochondriální respirace významně snížena ve všech měřených respiračních stavech, pokud byla vyjádřena na jednotku vlhké hmotnosti, a zůstala snižena ve stavech OXPHOS I+II, OXPHOS II a ETSII, pokud byla vztažena na aktivitu citrátsyntázy, tedy na množství mitochondriální hmoty. Naopak v dřeni vedl výrazný pokles aktivity citrátsyntázy k významnému zvýšení hodnot respiračních stavů OXPHOS I+II, OXPHOS II, LEAK_{OMY} a CIV vyjádřených na jednotku aktivity citrátsyntázy, což naznačuje kompenzační hypermetabolický stav ve zbývajících funkčních mitochondriích, který však není dostatečný k úplné kompenzaci respiračního deficitu vztaženého na hmotnost tkáně.

Je třeba zdůraznit, že většina studií zabývajících se spotřebou kyslíku mitochondriemi, aktivitou jednotlivých respiračních komplexů nebo produkcí ATP v ledvinách potkanů v různých časových intervalech po 5/6 nefrektomii byla prováděna na mitochondriích izolovaných buď z celého orgánu, nebo z kůry ledvin, a nezohledňovala tak možný vliv chronického renálního selhání na mitochondriální respiraci v dřeni ledvin (Aparicio-Trejo et al. 2017; Correa et al. 2013; Hui et al. 2017). Je dobře známo, že různé segmenty nefronu vykazují značné rozdíly nejen ve svých transportních procesech, membránových proteinech a intracelulárních enzymech, ale také ve struktuře a funkčních vlastnostech mitochondrií (Hall et al. 2009). Studie, která používala vysokoúčinnou respiometrii (O2k) k měření spotřeby kyslíku v permeabilizovaných homogenátech kůry a dřene ledvin, zaznamenala podobný charakter mitochondriální respirace jako v našich experimentech: vyšší spotřebu kyslíku v kůře s výjimkou fosforylační respirace spojené s komplexem I (OXPHOS I v naší studii), která byla vyšší v dřeni (Woodman et al. 2020). Některé studie také naznačují, že mitochondrie v kůře jsou citlivější na ischemické nebo toxické poškození než mitochondrie ve vnější

dřeni (Brezis et al. 1985). Důvod tohoto jevu není zcela jasný, jedna z teorií předpokládá, že mitochondrie v dřeni jsou schopné využívat strategii k udržení produkce ATP i v suboptimálních podmínkách (Schiffer et al. 2018).

Kromě poškození mitochondrií mohou také změny v mitochondriální biogenezi a dynamice hrát důležitou roli při vzniku chronického renálního selhání. Mitochondriální biogeneze je významná pro udržování dostatečného množství funkčních mitochondrií v ledvinových buňkách. U pacientů s chronickým renálním selháním je biogeneze mitochondrií často snížena, což vede k neschopnosti regenerovat poškozené mitochondrie a obnovit energetickou rovnováhu v buňkách (Higgins a Coughlan 2014). Navíc dysfunkce v dynamice mitochondrií, jako jsou procesy fúze a dělení, může vést k akumulaci poškozených mitochondrií, což dále přispívá k mitochondriální dysfunkci a poškození renálních tubulárních buněk (Cedikova et al. 2016).

Dysfunkce mitochondrií hraje rovněž důležitou roli v zánětlivých procesech, což přispívá k chronickému zánětlivému stavu v ledvinách, který je zásadní pro progresi chronického renálního selhání. Chronický zánět podporuje poškození ledvinové tkáně, ztrátu nefronů a rozvoj glomerulární a tubulointersticiální fibrózy, která je hlavním patogenetickým mechanismem v rozvoji tohoto onemocnění (Bhatia et al. 2020; Jin et al. 2021).

Závěrem lze konstatovat, že výsledky naší studie dokumentují, že chronické renální selhání navozené 5/6 nefrektomií u potkana pravděpodobně vyvolává nejen mitochondriální dysfunkci (v kůře ledvin), ale také adaptační změny v dřeni, které mají tendenci alespoň částečně kompenzovat ztrátu mitochondrií. Zvýšení poměru PII/EII v dřeni subtotálně nefrektomovaných potkanů naznačuje, že řízení transportu elektronů fosforylačním systémem je méně těsné a umožňuje maximální využití elektronů pro syntézu ATP. Kromě toho může stimulace komplexu II pomoci kompenzovat zvýšený stav LEAK

a může se tak podílet na metabolické adaptaci v podmínkách podstatné redukce tkáně ledvin (Acín-Pérez et al. 2014). Dysfunkční mitochondriální respirace je tak dalším klíčovým faktorem v patogenezi chronického renálního selhání vedle oxidačního stresu, apoptózy, zánětlivých procesů a narušené mitochondriální biogeneze a dynamiky. Porozumění těmto mechanismům je zásadní pro vývoj nových terapeutických přístupů zaměřených na obnovení mitochondriálních funkcí a zpomalení progresu renálního selhání.

5.3 Diskuze vztahující se k cíli 3 - stanovení respirační aktivity mitochondrií spermií s normální a sníženou pohyblivostí

Mitochondrie hrají zásadní roli v zajišťování energie pro mnoho buněčných funkcí, včetně motility spermií, tj. jejich schopnost aktivního pohybu, který je klíčovým faktorem v mužské plodnosti, protože umožňuje spermiím dosáhnout vajíčka a oplodnit jej. Asthenozoospermie, charakterizovaná sníženou motilitou spermií, je jednou z hlavních příčin mužské neplodnosti a jedním z důležitých faktorů, který přispívá k rozvoji asthenozoospermie, je mitochondriální dysfunkce.

U spermií jsou mitochondrie lokalizovány v jejich střední části, která je přímo spojená s bičíkem, tedy strukturou umožňující pohyb. Oxidativní fosforylace je hlavním zdrojem energie pro pohyb spermií, i když relativní podíl ATP získaného v oxidativních mitochondriálních procesech a glykolýzou v cytosolu se může velmi lišit u různých živočišných druhů (Storey 2008). Studie na lidských spermiích však ukazují, že snížení aktivity komplexů elektrontransportního systému, zejména komplexu I a komplexu IV, je spojeno se sníženou motilitou spermií (Piomboni et al. 2012).

Také výsledky našich experimentů potvrzují nález snížené aktivity komplexu I v mitochondriálním respiračním systému asthenozoospermatických vzorků. U těchto vzorků bylo také prokázáno zvýšení stavu $LEAK_{OMY}$, který je důležitým ukazatelem propustnosti vnitřní mitochondriální membrány a míry ztráty protonů (Brand a Nicholls 2011). Stav LEAK je stanovován v přítomnosti substrátů komplexu I (glutamát, malát, pyruvát) nebo po enzymatické inhibici ATP syntázy oligomycinem. Naopak aktivita komplexu II i celková aktivita při stavu OXPHOS I + II nebyla mezi sledovanými skupinami rozdílná.

Mitochondriální DNA hraje podstatnou roli v regulaci mitochondriální aktivity, protože kóduje proteiny nezbytné pro OXPHOS. U mužů

s asthenozoospermií byly zjištěny různé mutace v mtDNA, které ovlivňují funkci elektrontransportního systému a jsou spojeny se sníženou pohyblivostí spermií (Holyoake et al. 2001). Změny v mtDNA mohou být buď dědičné, nebo získané během spermatogeneze, přičemž mutace mtDNA vznikají častěji v důsledku omezených mechanismů opravy DNA v mitochondriích a zvýšené expozice oxidačnímu stresu.

Kromě snížené aktivity kapacit elektrontransportního systému jsou u mužů s asthenozoospermií pozorovány i změny ve struktuře mitochondrií. Detailní mikroskopie odhalila abnormality v morfologii mitochondrií, jako je jejich fragmentace, narušená ultrastruktura a abnormální uspořádání mitochondriálních krist (Williamson et al. 1984; Joshi et al. 2001). Tyto strukturální změny ovlivňují schopnost mitochondrií efektivně produkovat ATP, což přímo ovlivňuje pohyb spermií. Mitochondrie u asthenozoospermických mužů vykazují také sníženou schopnost fúze a dělení, což narušuje jejich dynamiku a vede k hromadění poškozených mitochondrií v buňkách (Varuzhanyan et al. 2019).

Oxidační stres hraje klíčovou roli v regulaci mitochondriální funkce a tím i motility spermií. Zvýšená hladina ROS je spojována se sníženou motilitou spermií a zvýšeným výskytem defektních spermií (Agarwal et al. 2014). Vysoké koncentrace ROS narušují mitochondriální membrány, což vede k narušení integrity elektrontransportního systému a následné snížené produkci ATP. Snížená schopnost spermií získat energii tedy přímo souvisí s oxidačním stresem, který může být způsoben různými faktory, jako jsou infekce, toxiny z prostředí nebo zánětlivé procesy (Chianese a Pierantoni 2021).

Mitochondrie mohou také reagovat na další environmentální faktory, které potenciálně ovlivňují kvalitu spermií. Toxiny, těžké kovy, pesticidy mohou způsobit mitochondriální stres a dále tak přispívat ke zhoršení kvality a motility spermií (Kumar et al. 2014; Marić et al. 2021).

Zajímavou otázkou je, zda by glykolýza, jako alternativní produkce ATP, mohla kompenzovat mitochondriální dysfunkci u spermií. Některé studie naznačují, že glykolýza, která probíhá v cytosolu, může přispět k tvorbě ATP potřebného pro motilitu, zejména v situacích, kdy jsou mitochondriální funkce omezené. Většina ATP pro pohyb lidských spermií je však získávána prostřednictvím oxidativní fosforylace, což zdůrazňuje nezastupitelnou roli funkčních mitochondrií ve spermiích (Mukai a Okuno 2004).

Lze tedy říci, že mitochondriální dysfunkce hraje nezanedbatelnou roli v patogenezi asthenozoospermie. Snížená aktivita elektronového transportního řetězce, zvýšený oxidační stres, mutace v mitochondriální DNA a strukturální změny v mitochondriích vedou k nedostatečné produkci ATP a omezení pohyblivosti spermií. Tyto změny mohou být ovlivněny jak genetickými, tak environmentálními faktory a lepší porozumění těmto mechanismům může přispět k vývoji terapeutických strategií zaměřených na obnovení mitochondriální funkce a zlepšení motility spermií u mužů s asthenozoospermii.

6 ZÁVĚR

Mitochondrie jsou klíčovými organelami, které zajišťují přeměnu energie živin v buňkách prostřednictvím procesu oxidativní fosforylace, ale jejich funkce není omezena pouze na tvorbu ATP. Mitochondrie také přispívají k vápníkové homeostáze, regulují apoptózu, produkci reaktivních forem kyslíku, hrají významnou roli v metabolismu lipidů a aminokyselin. Poruchy mitochondriální funkce, mohou mít závažné důsledky pro zdraví a jsou spojeny s různými patologickými stavy, zejména neurodegenerativními, kardiovaskulárními, metabolickými a nádorovými onemocněními. Zhoršení mitochondriální funkce může být způsobeno genetickými mutacemi, environmentálními faktory nebo sekundárními změnami v důsledku jiných chorobných procesů. Pochopení těchto poruch je zásadní pro vývoj nových terapeutických strategií zaměřených na obnovu mitochondriální aktivity a zlepšení buněčného metabolismu.

Cílem této práce bylo přispět k identifikaci patofyziologických mechanismů několika patologických stavů, které jsou nejspíše spojeny s dysfunkcí mitochondriálního dýchacího řetězce.

Výzkum dysfunkce mitochondrií a jejich role v patogenezi různých onemocnění je dynamicky se rozvíjející částí vědy, která má potenciál zásadně ovlivnit budoucí diagnostiku, léčbu a prevenci celé řady chorob. Jednou z hlavních oblastí výzkumu je identifikace mitochondriálních biomarkerů pro časnou diagnostiku onemocnění. Tyto informace by mohly napomoc nejen k časnému odhalení onemocnění, ale i např. efektivně terapeuticky zasáhnout dříve, než dojde k rozvoji nevratných změn.

Další významný pokrok se očekává v oblasti terapie zaměřené na mitochondrie včetně genové terapie. Mnoho současných terapeutických přístupů se zaměřuje na symptomy mitochondriální dysfunkce, ale v budoucnosti se očekává vývoj léků a intervenčních strategií, které budou cílit

přímo na mitochondrie. Například antioxidanty, které snižují hladiny ROS a tím chrání mitochondrie před poškozením.

Závěrem lze říci, že budoucnost výzkumu mitochondrií v kontextu lidských onemocnění je plná příležitostí. S pokrokem v chápání mitochondriálních funkcí a patofyziologie mitochondriální dysfunkce se očekává, že se otevrou nové cesty pro diagnostiku a léčbu onemocnění, která jsou v současné době obtížně léčitelná. Vědecký pokrok v oblasti mitochondrií má potenciál změnit terapeutické možnosti v mnoha oborech, od neurologie po onkologii, a přinést významné zlepšení zdravotní péče a kvality života pacientů.

7 LITERATURA

1. ACÍN-PÉREZ, Rebeca, Isabel CARRASCOSO, Francesc BAIXAULI, Marta ROCHE-MOLINA, Ana LATORRE-PELLICER, Patricio FERNÁNDEZ-SILVA, María MITTELBRUNN, Francisco SANCHEZ-MADRID, Acisclo PÉREZ-MARTOS, Clifford A. LOWELL, Giovanni MANFREDI a José Antonio ENRÍQUEZ, 2014. ROS-triggered phosphorylation of complex II by Fgr kinase regulates cellular adaptation to fuel use. *Cell Metabolism* [online]. **19**(6), 1020–1033. ISSN 1932-7420. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2014.04.015
2. AGARWAL, A, D DURAIRAJANAYAGAM a SS DU PLESSIS, 2014. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* [online]. **12** [vid. 2024-10-16]. ISSN 1477-7827. Dostupné z: doi:10.1186/1477-7827-12-112
3. ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER, 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th vyd. B.m.: Garland Science. ISBN 978-0-8153-3218-3.
4. ALEXEYEV, Mikhail, Inna SHOKOLENKO, Glenn WILSON a Susan LEDOUX, 2013. The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity—Critical Analysis and Update. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **5**(5), a012641. ISSN , 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012641
5. AMARAL, Alexandra, Bárbara LOURENÇO, Mónica MARQUES a João RAMALHO-SANTOS, 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* [online]. **146**(5), R163–R174. ISSN 1470-1626, 1741-7899. Dostupné z: doi:10.1530/REP-13-0178

6. AMCHENKOVA, A. A., L. E. BAKEEVA, Y. S. CHENTSOV, V. P. SKULACHEV a D. B. ZOROV, 1988. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *The Journal of Cell Biology* [online]. **107**(2), 481–495. ISSN 0021-9525, 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.107.2.481

7. ANDERSON, S., A. T. BANKIER, B. G. BARRELL, M. H. DE BRUIJN, A. R. COULSON, J. DROUIN, I. C. EPERON, D. P. NIERLICH, B. A. ROE, F. SANGER, P. H. SCHREIER, A. J. SMITH, R. STADEN a I. G. YOUNG, 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. **290**(5806), 457–465. ISSN 0028-0836.

8. APARICIO-TREJO, Omar Emiliano, Edilia TAPIA, Eduardo MOLINA-JIJÓN, Omar Noel MEDINA-CAMPOS, Norma Angélica MACÍAS-RUVALCABA, Juan Carlos LEÓN-CONTRERAS, Rogelio HERNÁNDEZ-PANDO, Fernando E. GARCÍA-ARROYO, Magdalena CRISTÓBAL, Laura Gabriela SÁNCHEZ-LOZADA a José PEDRAZA-CHAVERRI, 2017. Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: Relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics. *BioFactors* [online]. **43**(2), 293–310. ISSN 1872-8081. Dostupné z: doi:10.1002/biof.1338

9. APARICIO-TREJO, Omar Emiliano, Edilia TAPIA, Laura Gabriela SÁNCHEZ-LOZADA a José PEDRAZA-CHAVERRI, 2018. Mitochondrial bioenergetics, redox state, dynamics and turnover alterations in renal mass reduction models of chronic kidney diseases and their possible implications in the progression of this illness.

- Pharmacological Research* [online]. **135**, 1–11. ISSN 1096-1186.
Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2018.07.015
10. AZUMA, M., C. MATSUMURA a O. KEMMOTSU, 1993. Inotropic and electrophysiologic effects of propofol and thiamylal in isolated papillary muscles of the guinea pig and the rat. *Anesthesia and Analgesia* [online]. **77**(3), 557–563. ISSN 0003-2999. Dostupné z: doi:10.1213/00000539-199309000-00022
 11. BALLINGER, Scott W., Cam PATTERSON, Cynthia A. KNIGHT-LOZANO, David L. BUROW, Caryl A. CONKLIN, Zhaoyong HU, Johannes REUF, Chris HORAIST, Russell LEOVITZ, Glenn C. HUNTER, Ken MCINTYRE a Marschall S. RUNGE, 2002. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* [online]. **106**(5), 544–549. ISSN 1524-4539. Dostupné z: doi:10.1161/01.cir.0000023921.93743.89
 12. BANERJEE, Rishi, Janne PURHONEN a Jukka KALLIJÄRVI, 2022. The mitochondrial coenzyme Q junction and complex III: biochemistry and pathophysiology. *The FEBS journal* [online]. **289**(22), 6936–6958. ISSN 1742-4658. Dostupné z: doi:10.1111/febs.16164
 13. BAO, Yin-Wu, Yuan YUAN, Jiang-Hua CHEN a Wei-Qiang LIN, 2018. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. *Zoological Research* [online]. **39**(2), 72–86. ISSN 2095-8137. Dostupné z: doi:10.24272/j.issn.2095-8137.2017.055
 14. BERNARDI, P., V. PETRONILLI, F. DI LISA a M. FORTE, 2001. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **26**(2), 112–117. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/s0968-0004(00)01745-x

15. BEZAWORK-GELETA, Ayenachew, Jakub ROHLENA, Lanfeng DONG, Karel PACAK a Jiri NEUZIL, 2017. Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. *Trends in biochemical sciences* [online]. **42**(4), 312–325. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2017.01.003
16. BHATIA, Divya, Allyson CAPILI a Mary E. CHOI, 2020. Mitochondrial dysfunction in kidney injury, inflammation, and disease: potential therapeutic approaches. *Kidney Research and Clinical Practice* [online]. **39**(3), 244–258. ISSN 2211-9132. Dostupné z: doi:10.23876/j.krcp.20.082
17. BOGENHAGEN, Daniel F., 2012. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. **1819**(9–10), 914–920. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagrm.2011.11.005
18. BONNARD, Charlotte, Annie DURAND, Simone PEYROL, Emilie CHANSEAUME, Marie-Agnes CHAUVIN, Béatrice MORIO, Hubert VIDAL a Jennifer RIEUSSET, 2008. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **118**(2), 789–800. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI32601
19. BOYER, P. D., 1997. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **66**, 717–749. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.717
20. BRAND, Martin D. a David G. NICHOLLS, 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal* [online]. **435**(Pt 2), 297–312. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20110162

21. BRANDT, Ulrich, 2006. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annual Review of Biochemistry* [online]. **75**, 69–92. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142539

22. BREZIS, M., P. SHANLEY, P. SILVA, K. SPOKES, S. LEAR, F. H. EPSTEIN a S. ROSEN, 1985. Disparate mechanisms for hypoxic cell injury in different nephron segments. Studies in the isolated perfused rat kidney. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **76**(5), 1796–1806. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI112171

23. BRZEZINSKI, Peter a Robert B. GENNIS, 2008. Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* [online]. **40**(5), 521–531. ISSN 0145-479X. Dostupné z: doi:10.1007/s10863-008-9181-7

24. CASTELLANA, S., S. VICARIO a C. SACCONI, 2011. Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in Metazoa: exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein coding genes. *Genome Biology and Evolution* [online]. ISSN 1759-6653. Dostupné z: doi:10.1093/gbe/evr040

25. CEDIKOVA, M., P. PITULE, M. KRIPNEROVA, M. MARKOVA a J. KUNCOVA, 2016. Multiple roles of mitochondria in aging processes. *Physiological Research* [online]. **65**(Suppl 5), S519–S531. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.933538

26. CLAYTON, D. A., 2000. Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reproduction (Oxford, England)* [online]. **15 Suppl 2**, 11–17. ISSN 0268-1161. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/15.suppl_2.11

- 27.COOPER, Geoffrey M., 2000. *The Cell*. 2nd vyd. B.m.: Sinauer Associates. ISBN 978-0-87893-106-4.

- 28.CORREA, Francisco, Mabel BUELNA-CHONTAL, Sauri HERNÁNDEZ-RESÉNDIZ, Wylly R. GARCÍA-NIÑO, Francisco J. ROLDÁN, Virgilia SOTO, Alejandro SILVA-PALACIOS, Alejandra AMADOR, José PEDRAZA-CHAVERRÍ, Edilia TAPIA a Cecilia ZAZUETA, 2013. Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease. *Free Radical Biology & Medicine* [online]. **61**, 119–129. ISSN 1873-4596. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.017

- 29.CROFTS, Antony R., 2004. The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annual Review of Physiology* [online]. **66**, 689–733. ISSN 0066-4278. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251

- 30.DABRAVOLSKI, Siarhei A., Evgeny E. BEZSONOV, Mirza S. BAIG, Tatyana V. POPKOVA a Alexander N. OREKHOV, 2021. Mitochondrial Lipid Homeostasis at the Crossroads of Liver and Heart Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(13), 6949. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22136949

- 31.DADA, Rima, R. KUMAR, M. B. SHAMSI, T. SIDHU, A. MITRA, S. SINGH, R. KUMAR, R. S. SHARMA, S. K. GUPTA a N. P. GUPTA, 2007. Azoospermia factor deletions in varicocele cases with severe oligozoospermia. *Indian Journal of Medical Sciences*. **61**(9), 505–510. ISSN 1998-3654.

- 32.DENIS, M., 1986. Structure and function of cytochrome-c oxidase. *Biochimie* [online]. **68**(3), 459–470. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/s0300-9084(86)80013-x
- 33.DIMAURO, Salvatore a Eric A. SCHON, 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *The New England Journal of Medicine* [online]. **348**(26), 2656–2668. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra022567
- 34.DOERRIER, C, LF GARCIA-SOUZA, G KRUMSCHNABEL, Y WOHLFARTER, AT MÉSZÁROS a E GNAIGER, 2018. High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. **1782** [vid. 2024-09-30]. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7831-1_3
- 35.DUCHEN, Michael R, 2000. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of Physiology* [online]. **529**(Pt 1), 57–68. ISSN 0022-3751. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x
- 36.EIRIN, Alfonso, Amir LERMAN a Lilach O. LERMAN, 2014. Mitochondrial injury and dysfunction in hypertension-induced cardiac damage. *European Heart Journal* [online]. **35**(46), 3258–3266. ISSN 1522-9645. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehu436
- 37.EXNER, Nicole, Anne Kathrin LUTZ, Christian HAASS a Konstanze F. WINKLHOFFER, 2012. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences.

- The EMBO journal* [online]. **31**(14), 3038–3062. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2012.170
- 38.FAN, Pei-Chun, Chia-Chun CHEN, Yung-Chang CHEN, Yu-Sun CHANG a Pao-Hsien CHU, 2016. MicroRNAs in acute kidney injury. *Human Genomics* [online]. **10**(1), 29. ISSN 1473-9542. Dostupné z: doi:10.1186/s40246-016-0085-z
- 39.FINKEL, Toren, 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology* [online]. **194**(1), 7–15. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201102095
- 40.FINKEL, Toren a Nikki J. HOLBROOK, 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* [online]. **408**(6809), 239–247. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/35041687
- 41.FINSTERER, Josef a Marlies FRANK, 2016. Propofol Is Mitochondrion-Toxic and May Unmask a Mitochondrial Disorder. *Journal of Child Neurology* [online]. **31**(13), 1489–1494. ISSN 1708-8283. Dostupné z: doi:10.1177/0883073816661458
- 42.FORBES, Josephine M. a David R. THORBURN, 2018. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nature Reviews. Nephrology* [online]. **14**(5), 291–312. ISSN 1759-507X. Dostupné z: doi:10.1038/nrneph.2018.9
- 43.GAZIEV, Azhub I., Serzh ABDULLAEV a Andrej PODLUTSKY, 2014. Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age. *Biogerontology* [online]. **15**(5), 417–438. ISSN 1573-6768. Dostupné z: doi:10.1007/s10522-014-9515-2

44. GISSI, C., F. IANNELLI a G. PESOLE, 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* [online]. **101**(4), 301–320. ISSN 1365-2540. Dostupné z: doi:10.1038/hdy.2008.62

45. GNAIGER, E., B. LASSNIG, A. KUZNETSOV, G. RIEGER a R. MARGREITER, 1998. Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *The Journal of Experimental Biology* [online]. **201**(Pt 8), 1129–1139. ISSN 0022-0949. Dostupné z: doi:10.1242/jeb.201.8.1129

46. GORMAN, Gráinne S., Patrick F. CHINNERY, Salvatore DIMAURO, Michio HIRANO, Yasutoshi KOGA, Robert MCFARLAND, Anu SUOMALAINEN, David R. THORBURN, Massimo ZEVIANI a Douglass M. TURNBULL, 2016. Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. **2**(1), 1–22. ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/nrdp.2016.80

47. GORMAN, Gráinne S., Andrew M. SCHAEFER, Yi NG, Nicholas GOMEZ, Emma L. BLAKELY, Charlotte L. ALSTON, Catherine FEENEY, Rita HORVATH, Patrick YU-WAI-MAN, Patrick F. CHINNERY, Robert W. TAYLOR, Douglass M. TURNBULL a Robert MCFARLAND, 2015. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of Neurology* [online]. **77**(5), 753–759. ISSN 1531-8249. Dostupné z: doi:10.1002/ana.24362

48. GREAVES, Laura C., Marco NOOTEBOOM, Joanna L. ELSON, Helen A. L. TUPPEN, Geoffrey A. TAYLOR, Daniel M. COMMANE, Ramesh P. ARASARADNAM, Konstantin KHRAPKO, Robert W.

- TAYLOR, Thomas B. L. KIRKWOOD, John C. MATHERS a Douglass M. TURNBULL, 2014. Clonal expansion of early to mid-life mitochondrial DNA point mutations drives mitochondrial dysfunction during human ageing. *PLoS genetics* [online]. **10**(9), e1004620. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1004620
49. GREEN, D. R. a J. C. REED, 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **281**(5381), 1309–1312. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.281.5381.1309
50. GREEN, Douglas R., 2005. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* [online]. **121**(5), 671–674. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2005.05.019
51. GU, Yue-Yu, Xu-Sheng LIU, Xiao-Ru HUANG, Xue-Qing YU a Hui-Yao LAN, 2020. TGF- β in Renal Fibrosis: Triumphs and Challenges. *Future Medicinal Chemistry* [online]. **12**(9), 853–866. ISSN 1756-8919. Dostupné z: doi:10.4155/fmc-2020-0005
52. GUO, Hui a John L. RUBINSTEIN, 2022. Structure of ATP synthase under strain during catalysis. *Nature Communications* [online]. **13**(1), 2232. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-29893-2
53. HALL, Andrew M., Robert J. UNWIN, Nadeene PARKER a Michael R. DUCHEN, 2009. Multiphoton imaging reveals differences in mitochondrial function between nephron segments. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* [online]. **20**(6), 1293–1302. ISSN 1533-3450. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2008070759
54. HAMILTON, D. L., M. R. BOYETT, S. M. HARRISON, L. A. DAVIES a P. M. HOPKINS, 2000. The concentration-dependent effects of

- propofol on rat ventricular myocytes. *Anesthesia and Analgesia* [online]. **91**(2), 276–282. ISSN 0003-2999. Dostupné z: doi:10.1097/00000539-200008000-00005
- 55.HE, Lin, Xuan WANG a Shan ZHENG, 2020. Inhibition of the electron transport chain in propofol induced neurotoxicity in zebrafish embryos. *Neurotoxicology and Teratology* [online]. **78**, 106856. ISSN 0892-0362. Dostupné z: doi:10.1016/j.ntt.2020.106856
- 56.HEIDEN, Matthew G. Vander, Lewis C. CANTLEY a Craig B. THOMPSON, 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **324**(5930), 1029. Dostupné z: doi:10.1126/science.1160809
- 57.HIGGINS, G. C. a M. T. COUGHLAN, 2014. Mitochondrial dysfunction and mitophagy: the beginning and end to diabetic nephropathy? *British Journal of Pharmacology* [online]. **171**(8), 1917. Dostupné z: doi:10.1111/bph.12503
- 58.HOLLOWAY, Graham P., Andrew M. HOLWERDA, Paula M. MIOTTO, Marlou L. DIRKS, Lex B. VERDIJK a Luc J. C. VAN LOON, 2018. Age-Associated Impairments in Mitochondrial ADP Sensitivity Contribute to Redox Stress in Senescent Human Skeletal Muscle. *Cell Reports* [online]. **22**(11), 2837–2848. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2018.02.069
- 59.HOLYOAKE, A. J., P. MCHUGH, M. WU, S. O’CARROLL, P. BENNY, I. L. SIN a F. Y. T. SIN, 2001. High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *International Journal of Andrology*

- [online]. **24**(3), 175–182. ISSN 1365-2605. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2605.2001.00292.x
- 60.HSU, Hung-Te, Yu-Ting TSENG, Ya-Yun HSU, Kuang-I CHENG, Shah-Hwa CHOU a Yi-Ching LO, 2015. Propofol Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Reactive Oxygen Species Production Through Activation of Nrf2/GSH and Suppression of NADPH Oxidase in Human Alveolar Epithelial Cells. *Inflammation* [online]. **38**(1), 415–423. ISSN 1573-2576. Dostupné z: doi:10.1007/s10753-014-0046-4
- 61.HUI, Yan, Miaomiao LU, Yarong HAN, Hongli ZHOU, Wei LIU, Lijing LI a Ruixia JIN, 2017. Resveratrol improves mitochondrial function in the remnant kidney from 5/6 nephrectomized rats. *Acta Histochemica* [online]. **119**(4), 392–399. ISSN 1618-0372. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2017.04.002
- 62.HÜTTER, E., H. UNTERLUGGAUER, A. GAREDEW, P. JANSEN-DÜRR a E. GNAIGER, 2006. High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. *Experimental Gerontology* [online]. **41**(1), 103–109. ISSN 0531-5565. Dostupné z: doi:10.1016/j.exger.2005.09.011
- 63.CHEN, Hsiuchen a David C. CHAN, 2009. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics* [online]. **18**(R2), R169-176. ISSN 1460-2083. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/ddp326
- 64.CHEN, Hsiuchen, Anne CHOMYN a David C. CHAN, 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **280**(28), 26185–26192. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M503062200

- 65.CHEN, Yongqiang, Huijun WEI, Fei LIU a Jun-Lin GUAN, 2014. Hyperactivation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) promotes breast cancer progression through enhancing glucose starvation-induced autophagy and Akt signaling. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **289**(2), 1164–1173. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M113.526335
- 66.CHENG, Yong-Yao W. a Chih-Jen CHENG, 2024. Mitochondrial bioenergetics: coupling of transport to tubular mitochondrial metabolism. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* [online]. **33**(4), 405–413. ISSN 1473-6543. Dostupné z: doi:10.1097/MNH.0000000000000986
- 67.CHIANESE, Rosanna a Riccardo PIERANTONI, 2021. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality. *Antioxidants* [online]. **10**(1), 92. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10010092
- 68.CHINNERY, Patrick F., 2015. Chapter 24 - Mitochondrial Disorders Due to Mutations in the Nuclear Genome. In: Roger N. ROSENBERG a Juan M. PASCUAL, ed. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition)* [online]. Boston: Academic Press, s. 283–290 [vid. 2024-10-16]. ISBN 978-0-12-410529-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-410529-4.00024-3
- 69.CHINNERY, Patrick Francis a Gavin HUDSON, 2013. Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin* [online]. **106**, 135–159. ISSN 1471-8391. Dostupné z: doi:10.1093/bmb/ldt017

- 70.ISAKA, Yoshitaka, 2018. Targeting TGF- β Signaling in Kidney Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **19**(9), 2532. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19092532
- 71.JIN, Lini, Binfeng YU, Ines ARMANDO a Fei HAN, 2021. Mitochondrial DNA-Mediated Inflammation in Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. **2021**(1), 9985603. ISSN 1942-0994. Dostupné z: doi:10.1155/2021/9985603
- 72.JOSHI, N, H MEDINA, I CRÚZ a J OSUNA, 2001. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. *Fertility and sterility* [online]. **75**(5) [vid. 2024-10-16]. ISSN 0015-0282. Dostupné z: doi:10.1016/s0015-0282(01)01755-1
- 73.KAGUNI, Laurie S., 2004. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **73**, 293–320. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161455
- 74.KHRAPKO, Konstantin a Doug TURNBULL, 2014. Mitochondrial DNA mutations in aging. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [online]. **127**, 29–62. ISSN 1878-0814. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394625-6.00002-7
- 75.KOPPERS, Adam J., Geoffrey N. DE IULIIS, Jane M. FINNIE, Eileen A. MCLAUGHLIN a R. John AITKEN, 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [online]. **93**(8), 3199–3207. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2007-2616

- 76.KORHONEN, Jenny A., Xuan Hoi PHAM, Mina PELLEGRINI a Maria FALKENBERG, 2004. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *The EMBO journal* [online]. **23**(12), 2423–2429. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7600257
- 77.KOTANI, Yuki, Alessandro PRUNA, Stefano TURI, Giovanni BORGHI, Todd C. LEE, Alberto ZANGRILLO, Giovanni LANDONI a Laura PASIN, 2023. Propofol and survival: an updated meta-analysis of randomized clinical trials. *Critical Care* [online]. **27**(1), 139. ISSN 1364-8535. Dostupné z: doi:10.1186/s13054-023-04431-8
- 78.KROEMER, G., B. DALLAPORTA a M. RESCHE-RIGON, 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology* [online]. **60**, 619–642. ISSN 0066-4278. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.619
- 79.KUMAR, Sunil, Shiva MURARKA, V.V. MISHRA a A.K. GAUTAM, 2014. Environmental & lifestyle factors in deterioration of male reproductive health. *The Indian Journal of Medical Research*. **140**(Suppl 1), S29–S35. ISSN 0971-5916.
- 80.KUZNETSOV, Andrey V., Stefan SCHNEEBERGER, Rüdiger SEILER, Gerald BRANDACHER, Walter MARK, Wolfgang STEURER, Valdur SAKS, Yves USSON, Raimund MARGREITER a Erich GNAIGER, 2004. Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* [online]. **286**(5), H1633-1641. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00701.2003

- 81.KUZNETSOV, Andrey V, Daniela STROBL, Elfriede RUTTMANN, Alfred KÖNIGSRAINER, Raimund MARGREITER a Erich GNAIGER, 2002. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Analytical biochemistry* [online]. **305**(2), 186–194. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.2002.5658

- 82.LEMIEUX, Hélène, Pierre U. BLIER a Erich GNAIGER, 2017. Remodeling pathway control of mitochondrial respiratory capacity by temperature in mouse heart: electron flow through the Q-junction in permeabilized fibers. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 2840. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-02789-8

- 83.LESNEFSKY, E. J., S. MOGHADDAS, B. TANDLER, J. KERNER a C. L. HOPPEL, 2001. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [online]. **33**(6), 1065–1089. ISSN 0022-2828. Dostupné z: doi:10.1006/jmcc.2001.1378

- 84.LESNEFSKY, Edward J., Qun CHEN, Thomas J. SLABE, Maria S. K. STOLL, Paul E. MINKLER, Medhat O. HASSAN, Bernard TANDLER a Charles L. HOPPEL, 2004. Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* [online]. **287**(1), H258-267. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00348.2003

- 85.LESNEFSKY, Edward J., Qun CHEN, Bernard TANDLER a Charles L. HOPPEL, 2017. Mitochondrial Dysfunction and Myocardial Ischemia-Reperfusion: Implications for Novel Therapies. *Annual review of*

- pharmacology and toxicology* [online]. **57**, 535–565. ISSN 0362-1642. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pharmtox-010715-103335
- 86.LI, J, W YU, XT LI, SH QI a B LI, 2014. The effects of propofol on mitochondrial dysfunction following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Neuropharmacology* [online]. **77** [vid. 2024-10-10]. ISSN 1873-7064. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2013.08.029
- 87.LIANG, Chao, Minli SUN, Jing ZHONG, Changhong MIAO a Xiaodan HAN, 2021. The Role of Pink1-Mediated Mitochondrial Pathway in Propofol-Induced Developmental Neurotoxicity. *Neurochemical Research* [online]. **46**(9), 2226–2237. ISSN 1573-6903. Dostupné z: doi:10.1007/s11064-021-03359-1
- 88.LIANG, Yubing, Yu HUANG, Rongge SHAO, Fei XIAO, Fei LIN, Huijun DAI a Linghui PAN, 2022. Propofol produces neurotoxicity by inducing mitochondrial apoptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. **24**(4), 630. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2022.11567
- 89.LIN, Michael T. a M. Flint BEAL, 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* [online]. **443**(7113), 787–795. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature05292
- 90.LIU, Chun-Yi, Cheng-Feng LEE, Chiung-Hui HONG a Yau-Huei WEI, 2004. Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. **1011**, 133–145. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-41088-2_14

- 91.LIU, Jialing, Zhonghua GAO a Xiangjie LIU, 2024. Mitochondrial dysfunction and therapeutic perspectives in osteoporosis. *Frontiers in Endocrinology* [online]. **15** [vid. 2024-09-30]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2024.1325317

- 92.LIU, Pengfei, Sheng ZHAO, Hui QIAO, Tianzuo LI, Weidong MI, Zhipeng XU a Xinying XUE, 2022. Does propofol definitely improve postoperative cognitive dysfunction?-a review of propofol-related cognitive impairment. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* [online]. **54**(7), 875–881. ISSN 1745-7270. Dostupné z: doi:10.3724/abbs.2022067

- 93.LOEB, Lawrence A., Douglas C. WALLACE a George M. MARTIN, 2005. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **102**(52), 18769–18770. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0509776102

- 94.LOTZ, Christopher, Amanda J. LIN, Caitlin M. BLACK, Jun ZHANG, Edward LAU, Ning DENG, Yueju WANG, Nobel C. ZONG, Jeong H. CHOI, Tao XU, David A. LIEM, Paavo KORGE, James N. WEISS, Henning HERMJAKOB, John R. YATES, Rolf APWEILER a Peipei PING, 2014. Characterization, design, and function of the mitochondrial proteome: from organs to organisms. *Journal of Proteome Research* [online]. **13**(2), 433–446. ISSN 1535-3907. Dostupné z: doi:10.1021/pr400539j

- 95.LOWELL, Bradford B. a Gerald I. SHULMAN, 2005. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)* [online].

- 307**(5708), 384–387. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1104343
- 96.MADAMANCHI, Nageswara R. a Marschall S. RUNGE, 2007. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation Research* [online]. **100**(4), 460–473. ISSN 1524-4571. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.0000258450.44413.96
- 97.MARGULIS, L., 1975. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. (29), 21–38. ISSN 0081-1386.
- 98.MARIĆ, Tihana, Aleksandra FUČIĆ a Anna AGHAYANIAN, 2021. Environmental and Occupational Exposures Associated with Male Infertility. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* [online]. **72**(2), 101–113. ISSN 0004-1254. Dostupné z: doi:10.2478/aiht-2021-72-3510
- 99.MAYR, Johannes A., 2015. Lipid metabolism in mitochondrial membranes. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **38**(1), 137–144. ISSN 1573-2665. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-014-9748-x
100. MISHRA, Neerad C. a Shailendra KUMAR, 2005. Apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death. *Indian Journal of Experimental Biology*. **43**(1), 25–34. ISSN 0019-5189.
101. MITCHELL, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* [online]. **191**, 144–148. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/191144a0

102. MITCHELL, P., 1976. Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *Journal of Theoretical Biology* [online]. **62**(2), 327–367. ISSN 0022-5193. Dostupné z: doi:10.1016/0022-5193(76)90124-7
103. MUKAI, Chinatsu a Makoto OKUNO, 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction* [online]. **71**(2), 540–547. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.103.026054
104. MURPHY, Elizabeth a Charles STEENBERGEN, 2008. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiological Reviews* [online]. **88**(2), 581–609. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00024.2007
105. NEUPANE, Prashant, Sudina BHUJU, Nita THAPA a Hitesh Kumar BHATTARAI, 2019. ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomolecular Concepts* [online]. **10**(1), 1–10. ISSN 1868-503X. Dostupné z: doi:10.1515/bmc-2019-0001
106. NIEZGODA, Julie a Phil G MORGAN, 2013. Anesthetic Considerations in Patients with Mitochondrial Defects. *Paediatric anaesthesia* [online]. **23**(9), 785–793. ISSN 1155-5645. Dostupné z: doi:10.1111/pan.12158
107. NICHOLLS, David G. a Stuart J. FERGUSON, 2002. *Bioenergetics*. B.m.: Elsevier. ISBN 978-0-08-052793-2.
108. O'ROURKE, B., 2000. Myocardial K(ATP) channels in preconditioning. *Circulation Research* [online]. **87**(10), 845–855. ISSN 1524-4571. Dostupné z: doi:10.1161/01.res.87.10.845

109. PERRELLI, Maria-Giulia, Pasquale PAGLIARO a Claudia PENNA, 2011. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World Journal of Cardiology* [online]. **3**(6), 186–200. ISSN 1949-8462. Dostupné z: doi:10.4330/wjc.v3.i6.186
110. PESSAYRE, Dominique a Bernard FROMENTY, 2005. NASH: a mitochondrial disease. *Journal of Hepatology* [online]. **42**(6), 928–940. ISSN 0168-8278. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhep.2005.03.004
111. PESTA, Dominik a Erich GNAIGER, 2012. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. **810**, 25–58. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-382-0_3
112. PIOMBONI, P, R FOCARELLI, A STENDARDI, A FERRAMOSCA a V ZARA, 2012. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *International journal of andrology* [online]. **35**(2), 109–124. ISSN 1365-2605. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x
113. POPOVIĆ, Dragan M., 2013. Current advances in research of cytochrome c oxidase. *Amino Acids* [online]. **45**(5), 1073–1087. ISSN 1438-2199. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-013-1585-y
114. PUTTICK, R. M. a D. A. TERRAR, 1992. Effects of propofol and enflurane on action potentials, membrane currents and contraction of guinea-pig isolated ventricular myocytes. *British Journal of Pharmacology* [online]. **107**(2), 559–565. ISSN 0007-1188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.1992.tb12783.x

115. REDDY, P. Hemachandra a M. Flint BEAL, 2005. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Research. Brain Research Reviews* [online]. **49**(3), 618–632. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresrev.2005.03.004
116. RIESKE, J. S., 1976. Composition, structure, and function of complex III of the respiratory chain. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. **456**(2), 195–247. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/0304-4173(76)90012-4
117. RIGOULET, M, ED YOBOUE a A A, 2011. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H(2)O(2) signaling. *Antioxidants & redox signaling* [online]. **14**(3) [vid. 2024-10-09]. ISSN 1557-7716. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2010.3363
118. RIZZUTO, Rosario, Diego DE STEFANI, Anna RAFFAELLO a Cristina MAMMUCARI, 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* [online]. **13**(9), 566–578. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3412
119. ROSSIGNOL, Rodrigue, Benjamin FAUSTIN, Christophe ROCHER, Monique MALGAT, Jean-Pierre MAZAT a Thierry LETELLIER, 2003. Mitochondrial threshold effects. *The Biochemical Journal* [online]. **370**(Pt 3), 751–762. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20021594
120. RUIZ-PESINI, E., A. C. LAPEÑA, C. DÍEZ, E. ALVAREZ, J. A. ENRÍQUEZ a M. J. LÓPEZ-PÉREZ, 2000. Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. **300**(1–2), 97–105. ISSN 0009-8981.

121. RUIZ-PESINI, Eduardo, Carmen DÍEZ-SÁNCHEZ, Manuel José LÓPEZ-PÉREZ a José Antonio ENRÍQUEZ, 2007. The Role of the Mitochondrion in Sperm Function: Is There a Place for Oxidative Phosphorylation or Is This a Purely Glycolytic Process? In: *Current Topics in Developmental Biology* [online]. B.m.: Academic Press, The Mitochondrion in the Germline and Early Development, s. 3–19 [vid. 2024-09-26]. Dostupné z: doi:10.1016/S0070-2153(06)77001-6

122. SAID, Tamer M., Aarti GAGLANI a Ashok AGARWAL, 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive Biomedicine Online* [online]. **21**(4), 456–462. ISSN 1472-6491. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbmo.2010.05.011

123. SAZANOV, Leonid A., 2015. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* [online]. **16**(6), 375–388. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3997

124. SELLBRANT, I, M BRATTWALL, P JILDENSTÅL, M WARREN-STOMBERG, S FORSBERG a JG JAKOBSSON, 2016. Anaesthetics and analgesics; neurocognitive effects, organ protection and cancer reoccurrence an update. *International journal of surgery (London, England)* [online]. **34** [vid. 2024-10-10]. ISSN 1743-9159. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijssu.2016.08.235

125. SHADEL, G. S. a D. A. CLAYTON, 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **66**, 409–435. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.409

126. SHAO, H., J. LI, Y. ZHOU, Z. GE, J. FAN, Z. SHAO a Y. ZENG, 2008. Dose-dependent protective effect of propofol against mitochondrial dysfunction in ischaemic/reperfused rat heart: role of cardiolipin. *British Journal of Pharmacology* [online]. **153**(8), 1641–1649. ISSN 0007-1188. Dostupné z: doi:10.1038/bjp.2008.45
127. SCHIFFER, Tomas A., Håkan GUSTAFSSON a Fredrik PALM, 2018. Kidney outer medulla mitochondria are more efficient compared with cortex mitochondria as a strategy to sustain ATP production in a suboptimal environment. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* [online]. **315**(3), F677–F681. ISSN 1522-1466. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00207.2018
128. SCHON, Eric A., Salvatore DIMAURO a Michio HIRANO, 2012. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature Reviews. Genetics* [online]. **13**(12), 878–890. ISSN 1471-0064. Dostupné z: doi:10.1038/nrg3275
129. SIKKA, S. C., 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry* [online]. **8**(7), 851–862. ISSN 0929-8673. Dostupné z: doi:10.2174/0929867013373039
130. SINGH, Aayushi a Ashish P. ANJANKAR, 2022. Propofol-Related Infusion Syndrome: A Clinical Review. *Cureus* [online]. **14**(10), e30383. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.30383
131. SIVITZ, William I. a Mark A. YOREK, 2010. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. **12**(4), 537–577. ISSN 1557-7716. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2009.2531

132. SNEYD, J. Robert, Anthony R. ABSALOM, Clemens R. M. BARENDSE a Jordan B. JONES, 2022. Hypotension during propofol sedation for colonoscopy: a retrospective exploratory analysis and meta-analysis. *British Journal of Anaesthesia* [online]. **128**(4), 610–622. ISSN 1471-6771. Dostupné z: doi:10.1016/j.bja.2021.10.044
133. SPINAZZOLA, A. a M. ZEVIANI, 2009. Disorders from perturbations of nuclear-mitochondrial intergenomic cross-talk. *Journal of Internal Medicine* [online]. **265**(2), 174–192. ISSN 1365-2796. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2796.2008.02059.x
134. SPRUNG, J., M. L. OGLETREE-HUGHES, B. K. MCCONNELL, D. R. ZAKHARY, S. M. SMOLSKY a C. S. MORAVEC, 2001. The effects of propofol on the contractility of failing and nonfailing human heart muscles. *Anesthesia and Analgesia* [online]. **93**(3), 550–559. ISSN 0003-2999. Dostupné z: doi:10.1097/00000539-200109000-00006
135. SRERE, P. A. a B. SUMEGI, 1986. Organization of the mitochondrial matrix. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. **194**, 13–25. ISSN 0065-2598. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4684-5107-8_2
136. SRIVASTAVA, Anjali, Bhawna TOMAR, Divyansh SHARMA a Srikanta Kumar RATH, 2023. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: Role in chronic kidney disease. *Life Sciences* [online]. **319**, 121432. ISSN 0024-3205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2023.121432
137. ST JOHN, Justin C., Roobin P. JOKHI a Christopher L. R. BARRATT, 2005. The impact of mitochondrial genetics on male

- infertility. *International Journal of Andrology* [online]. **28**(2), 65–73. ISSN 0105-6263. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00515.x
138. STOREY, Bayard T., 2008. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *The International Journal of Developmental Biology* [online]. **52**(5–6), 427–437. ISSN 0214-6282. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.072522bs
 139. STRYER, Lubert, 1995. *Biochemistry*. B.m.: W.H. Freeman. ISBN 978-0-7167-2009-6.
 140. STUMPF, Jeffrey D., Russell P. SANETO a William C. COPELAND, 2013. Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **5**(4), a011395. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a011395
 141. SULLIVAN, Lucas B. a Navdeep S. CHANDEL, 2014. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & Metabolism* [online]. **2**, 17. ISSN 2049-3002. Dostupné z: doi:10.1186/2049-3002-2-17
 142. ŠVÍGLEROVÁ, J., J. KUNCOVÁ, L. NALOS, Z. TONAR, D. RAJDL a M. STENGL, 2010. Cardiovascular parameters in rat model of chronic renal failure induced by subtotal nephrectomy. *Physiological Research* [online]. **59 Suppl 1**, S81–S88. ISSN 0862-8408. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.932003
 143. ŠVÍGLEROVÁ, Jitka, Jitka KUNCOVÁ, Lukáš NALOS, Jaromír HOLAS, Zbyněk TONAR, Daniel RAJDL a Milan ŠTENGL, 2012. Cardiac remodeling in rats with renal failure shows interventricular

- differences. *Experimental Biology and Medicine* [online]. **237**(9), 1056–1067. ISSN 1535-3702. Dostupné z: doi:10.1258/ebm.2012.012045
144. TAANMAN, J. W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1410**(2), 103–123. ISSN 0006-3002.
 145. TAN, Xuxin, Ruixue LIU, Ling DAN, He HUANG a Chenyang DUAN, 2024. Effects of anesthetics on mitochondrial quality control: mechanisms and clinical implications. *Anesthesiology and Perioperative Science* [online]. **2**(3), 31. ISSN 2731-8389. Dostupné z: doi:10.1007/s44254-024-00070-6
 146. TANAKA, Tetsuhiro, Masaomi NANGAKU, Toshio MIYATA, Reiko INAGI, Takamoto OHSE, Julie R. INGELFINGER a Toshiro FUJITA, 2004. Blockade of calcium influx through L-type calcium channels attenuates mitochondrial injury and apoptosis in hypoxic renal tubular cells. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* [online]. **15**(9), 2320–2333. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1097/01.ASN.0000138287.46849.82
 147. TSUJI, Kenji, Hiroyuki NAKANO, Kazuhiko FUKUSHIMA, Shinji KITAMURA a Jun WADA, 2023. MicroRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets for Acute Kidney Injury. *Diagnostics* [online]. **13**(18), 2893. ISSN 2075-4418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics13182893
 148. TSUTSUI, Hiroyuki, Shintaro KINUGAWA a Shouji MATSUSHIMA, 2011. Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* [online].

- 301(6)**, H2181-2190. ISSN 1522-1539. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00554.2011
149. TURRENS, Julio F, 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* [online]. **552**(Pt 2), 335–344. ISSN 0022-3751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2003.049478
 150. VALKO, Marian, Dieter LEIBFRITZ, Jan MONCOL, Mark T. D. CRONIN, Milan MAZUR a Joshua TELSER, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. **39**(1), 44–84. ISSN 1357-2725. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
 151. VARUZHANYAN, Grigor, Rebecca ROJANSKY, Michael J SWEREDOSKI, Robert LJ GRAHAM, Sonja HESS, Mark S LADINSKY a David C CHAN, 2019. Mitochondrial fusion is required for spermatogonial differentiation and meiosis. *eLife* [online]. **8**, e51601. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.51601
 152. VERISSIMO, Thomas a Sophie DE SEIGNEUX, 2024. New evidence of the impact of mitochondria on kidney health and disease. *Nature Reviews Nephrology* [online]. **20**(2), 81–82. ISSN 1759-507X. Dostupné z: doi:10.1038/s41581-023-00803-z
 153. WALLACE, D C, 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science (New York, N.Y.)*. **283**(5407), 1482–1488. ISSN 0036-8075.
 154. WALLACE, Douglas C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics* [online]. **39**, 359–

407. ISSN 0066-4197. Dostupné z:
doi:10.1146/annurev.genet.39.110304.095751
155. WARBURG, O., 1956. On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **123**(3191), 309–314. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.123.3191.309
156. WICKLEY, Peter J., Toshiya SHIGA, Paul A. MURRAY a Derek S. DAMRON, 2006. Propofol decreases myofilament Ca²⁺ sensitivity via a protein kinase C-, nitric oxide synthase-dependent pathway in diabetic cardiomyocytes. *Anesthesiology* [online]. **104**(5), 978–987. ISSN 0003-3022. Dostupné z: doi:10.1097/00000542-200605000-00014
157. WICKLEY, Peter J., Toshiya SHIGA, Paul A. MURRAY a Derek S. DAMRON, 2007. Propofol modulates Na⁺-Ca²⁺ exchange activity via activation of protein kinase C in diabetic cardiomyocytes. *Anesthesiology* [online]. **106**(2), 302–311. ISSN 0003-3022. Dostupné z: doi:10.1097/00000542-200702000-00019
158. WIKSTROM, Marten K. F., 1977. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature* [online]. **266**(5599), 271–273. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/266271a0
159. WILLIAMSON, R. A., J. K. KOEHLER, W. D. SMITH a M. A. STENCHEVER, 1984. Ultrastructural sperm tail defects associated with sperm immotility. *Fertility and Sterility* [online]. **41**(1), 103–107. ISSN 0015-0282. Dostupné z: doi:10.1016/s0015-0282(16)47549-7
160. WILLIS, Simon, Catherine L. DAY, Mark G. HINDS a David C.S. HUANG, 2003. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *Journal of*

- Cell Science* [online]. **116**(20), 4053–4056. ISSN 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.00754
161. WILSON, Scott, Pasquale MONE, Stanislovas S. JANKAUSKAS, Jessica GAMBARDELLA a Gaetano SANTULLI, 2021. Chronic kidney disease: Definition, updated epidemiology, staging, and mechanisms of increased cardiovascular risk. *The Journal of Clinical Hypertension* [online]. **23**(4), 831–834. ISSN 1524-6175. Dostupné z: doi:10.1111/jch.14186
 162. WOODMAN, Andrew G., Richard MAH, Danae L. KEDDIE, Ronan M. N. NOBLE, Claudia D. HOLODY, Sareh PANAHI, Ferrante S. GRAGASIN, Helene LEMIEUX a Stephane L. BOURQUE, 2020. Perinatal iron deficiency and a high salt diet cause long-term kidney mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Cardiovascular Research* [online]. **116**(1), 183–192. ISSN 1755-3245. Dostupné z: doi:10.1093/cvr/cvz029
 163. YAN, Chunlu, Yao SHI, Lingqing YUAN, Donghui LV, Bai SUN, Jiayu WANG, Xiyan LIU a Fangyu AN, 2023. Mitochondrial quality control and its role in osteoporosis. *Frontiers in Endocrinology* [online]. **14** [vid. 2024-09-30]. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2023.1077058
 164. YOSHIDA, Masasuke, Eiro MUNEYUKI a Toru HISABORI, 2001. ATP synthase — a marvellous rotary engine of the cell. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **2**(9), 669–677. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/35089509
 165. YOULE, Richard J. a Andreas STRASSER, 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature*

- Reviews. Molecular Cell Biology* [online]. **9**(1), 47–59. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm2308
166. YOULE, Richard a Alexander VAN DER BLIEK, 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **337**(6098) [vid. 2024-09-30]. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1219855
167. ZALMAN, L. S., H. NIKAIDO a Y. KAGAWA, 1980. Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. *The Journal of Biological Chemistry*. **255**(5), 1771–1774. ISSN 0021-9258.
168. ZHANG, Xiaoqin, Ewud AGBORBESONG a Xiaogang LI, 2021. The Role of Mitochondria in Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease and Its Therapeutic Potential. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(20), 11253. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222011253

8 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

8.1 Odborné publikace vztahující se k tématu disertační práce

- JEDLIČKA, J., **M. GRUNDMANOVÁ**, J. ŠVÍGLEROVÁ, Z. TŮMA, L. NALOS, D. RAJDL, M. ŠTENGL a J. KUNCOVÁ, 2022. Mitochondrial dysfunction in kidney cortex and medulla of subtotaly nephrectomized rats. *Physiological Research* [online]. **71**(S2), S219–S226. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.935000. **IF₂₀₂₂ = 2,1**
- **GRUNDMANOVÁ, M.**, D. JARKOVSKÁ, A. SÜß, Z. TŮMA, M. MARKOVÁ, Z. GRUNDMAN, A. EL-KADI, M. ČEDÍKOVÁ, M. ŠTENGL a J. KUNCOVÁ, 2016. Propofol-induced mitochondrial and contractile dysfunction of the rat ventricular myocardium. *Physiological Research* [online]. **65**(Suppl 5), S601–S609. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.933537. **IF₂₀₁₆ = 1,461**
- CEDIKOVA, M., M. MIKLIKOVA, L. STACHOVA, **M. GRUNDMANOVA**, Z. TUMA, V. VETVICKA, N. ZECH, M. KRALICKOVA a Jitka KUNCOVA, 2014. Effects of the czech propolis on sperm mitochondrial function. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* [online]. **2014**, 248768. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2014/248768. **IF₂₀₁₄ = 1,880**
- ČEDÍKOVÁ, M., M. MIKLÍKOVÁ, **M. GRUNDMANOVÁ**, N. H. ZECH, M. KRÁLÍČKOVÁ a J. KUNCOVÁ, 2014. Sperm mitochondrial function in men with normozoospermia and asthenozoospermia. *Ceska Gynekologie*. **79**(1), 22–28. ISSN 1210-7832.

8.2 Ostatní odborné publikace

- TUMA, Z., J. KUNCOVA, J. MARES, **M. GRUNDMANOVA** a M. MATEJOVIC, 2016. Proteomic approaches to the study of renal mitochondria. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic* [online]. **160**(2), 173–182. ISSN 1804-7521. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2016.012. **IF₂₀₁₆ = 0,894**
- CEDIKOVA, M., M. KRIPNEROVÁ, J. DVORAKOVA, P. PITULE, M. GRUNDMANOVA, V. BABUSKA, D. MULLEROVA a J. KUNCOVA, 2016. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells International* [online]. **2016**, 6067349. ISSN 1687-966X. Dostupné z: doi:10.1155/2016/6067349. **IF₂₀₁₆ = 3,540**

8.3 Prezentace výsledků na odborných setkáních a konferencích

- Long-term effects of guanethidine and capsaicin on the sympathetic innervation of the rat heart and aorta. KUNCOVÁ Jitka, FAITOVÁ Šárka, CAPOUCH Jan, GRUNDMANOVÁ Martina, MUDRA Jiří, ŠVÍGLEROVÁ Jitka, SLAVÍKOVÁ Jana. 25th European Section Meeting - International Society for Heart Research, 53-57, 2005.
- A progression series of murine fibrosarcoma separates proliferative and invasive transformation characteristics. KRIPNEROVÁ Michaela; TUKOVÁ Jitka; ŠRÁMEK Vlastislav; HOUDEK Zbyněk; PEŠTA Martin; GRUNDMANOVÁ Martina; KUNCOVÁ Jitka.; HATINA Jiří. 40th Congress ESMO a 18th ECCO - účast ČR, 2015.

- Porcine hearts samples preparation: PBI-Shredder or saponin?
MARKOVÁ Michaela, ČEDÍKOVÁ Miroslava, GRUNDMANOVÁ
Martina, KUNCOVÁ Jitka. MitoFit Science Camp 2016, July 7 – 13,
2016, Kuehtai, Rakousko

9 PŘÍLOHY

Manuskript 1 – Propofol-induced mitochondrial and contractile dysfunction of the rat ventricular myoocardium

GRUNDMANOVÁ, M., D. JARKOVSKÁ, A. SÜß, Z. TŮMA, M. MARKOVÁ, Z. GRUNDMAN, A. EL-KADI, M. ČEDÍKOVÁ, M. ŠTENGL a J. KUNCOVÁ, 2016. Propofol-induced mitochondrial and contractile dysfunction of the rat ventricular myocardium. *Physiological Research* [online]. **65**(Suppl 5), S601–S609. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.933537

Manuskript 2 – Mitochondrial dysfunction in kidney cortex and medulla of subtotally nephrectomized rats

JEDLIČKA, J., M. GRUNDMANOVÁ, J. ŠVÍGLEROVÁ, Z. TŮMA, L. NALOS, D. RAJDL, M. ŠTENGL a J. KUNCOVÁ, 2022. Mitochondrial dysfunction in kidney cortex and medulla of subtotally nephrectomized rats. *Physiological Research* [online]. **71**(S2), S219–S226. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.935000

Manuskript 3 – Sperm mitochondrial function in men with normozoospermia and asthenozoospermia

CEDIKOVA, M., M. MIKLIKOVA, M. GRUNDMANOVA, N. H. ZECH, M. KRALICKOVA a J. KUNCOVA, 2014. Sperm mitochondrial function in men with normozoospermia and asthenozoospermia. *Ceska gynekologie* [online]. **79**(1) [vid. 2023-08-08]. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24635361/>

Manuscript 4 – Effect of the Czech Propolis on Sperm Mitochondrial Function

CEDIKOVA, M., M. MIKLIKOVA, L. STACHOVA, M. GRUNDMANOVA, Z. TUMA, V. VETVICKA, N. ZECH, M. KRALICKOVA a J. KUNCOVA, 2014. Effects of the czech propolis on sperm mitochondrial function. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* [online]. **2014**, 248768. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2014/248768