

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra buněčné biologie



Bakalářská práce

**MITOCHONDRIÁLNÍ CYTOCHROM C OXIDÁZA:
STRUKTURA, FUNKCE A INHIBICE KYANIDEM**

*MITOCHONDRIAL CYTOCHROME C OXIDASE:
STRUCTURE, FUNCTION AND CYANIDE INHIBITION*

HANA NŮSKOVÁ

Praha 2008

Děkuji svému školiteli RNDr. Zdeňku Drahotovi, DrSc. za cenné rady, které přispěly významnou měrou k sepsání mé bakalářské práce. Rovněž bych chtěla vyjádřit své díky celému oddělení Bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR pod vedením MUDr. Josefa Houšťka, DrSc. za příjemné a podnětné prostředí a předané zkušenosti, jež mi v mnohém ulehčily práci.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
ABSTRAKT	5
ÚVOD	7
VLASTNÍ LITERÁRNÍ PŘEHLED	
1. OBECNÝ ÚVOD	8
1.1. MITOCHONDRIE – BUNĚČNÁ ELEKTRÁRNA	8
1.2. DÝCHACÍ ŘETĚZEC	9
1.2.1. Komplex I (NADH:koenzym Q oxidoreduktáza)	11
1.2.2. Komplex II (sukcinát:koenzym Q oxidoreduktáza)	11
1.2.3. Komplex III (koenzym Q:cytochrom c oxidoreduktáza)	11
1.2.4. Komplex IV (cytochrom c oxidáza)	11
1.2.5. Komplex V (ATP syntáza)	12
2. STRUKTURA CYTOCHROM C OXIDÁZY	13
3. FUNKCE CYTOCHROM C OXIDÁZY	15
3.1. KATALYTICKÝ CYKLUS CYTOCHROM C OXIDÁZY	15
3.2. TRANSLOKACE PROTONŮ PŘES VNITŘNÍ MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNU	16
3.3. FUNKCE JADERNĚ KÓDOVANÝCH PODJEDNOTEK	18
4. INHIBICE CYTOCHROM C OXIDÁZY	21
4.1. INHIBICE CYTOCHROM C OXIDÁZY KYANIDEM	21
4.1.1. Zdroje kyanidu	21
4.1.2. Mechanismus inhibice COX kyanidem	22
4.1.3. Léčba kyanidové otravy založená na endogenních mechanismech detoxifikace organismu	23
4.1.4. Reverzibilita kyanidové inhibice COX působením 2-oxokyselin	25
4.2. DALŠÍ INHIBITORY CYTOCHROM C OXIDÁZY	27
4.2.1. Oxid dusnatý	27
4.2.2. Reakce COX v přítomnosti kyanidu i NO současně	27
4.2.3. Částečné a nespecifické inhibitory COX	29
ZÁVĚR	30
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	31
PŘÍLOHA	33

Seznam použitých zkratek

[O ₂]	molární koncentrace kyslíku
2-OG	2-oxoglutarát
3-MP	3-merkaptopyruvát
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
bp	bázový pár deoxyribonukleové kyseliny
COX	cytochrom <i>c</i> oxidáza
cyt	cytochrom
Da	dalton (g/ mol)
EC ₅₀	<i>effective concentration</i> – efektivní koncentrace, která inhibuje 50 % respirace
FAD/FADH ₂	flavinadenin dinukleotid (oxidovaná/redukovaná forma)
HIF-1	<i>hypoxia-inducible transcription factor 1</i> – transkripční faktor aktivovaný v podmínkách hypoxie
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration</i> – koncentrace, která inhibuje aktivitu z 50 %
k	rychlostní konstanta reakce
K _A	asociační konstanta
K _D	disociační konstanta
K _M	Michaelisova konstanta
LD ₅₀	<i>lethal dose</i> – dávka, která je smrtelná pro 50 % experimentálních zvířat
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NAD ⁺ /NADH	nikotinamidadenin dinukleotid (oxidovaná/redukovaná forma)
OXPHOS	systém oxidativní fosforylace
pK _a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny (pK _a = - log K _a)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> – reaktivní sloučeniny kyslíku
tRNA	transferová ribonukleová kyselina

Abstrakt

Cytochrom *c* oxidáza (COX) je jedním z komplexů dýchacího řetězce na vnitřní mitochondriální membráně. Je známa krystalová struktura celého bakteriálního i savčího komplexu COX skládajícího se ze 4, resp. ze 13 podjednotek. Tři mitochondriálně kódované podjednotky tvoří konzervované katalytické jádro savčího enzymu. Mutace v mitochondriálně kódovaných podjednotkách COX i v jaderně kódovaných specifických asambláčnických faktorech jsou příčinou dědičných mitochondriálních poruch.

Prozkoumána je katalytická funkce enzymu. Elektrony z redukováného cytochromu *c* jsou přes redoxní centra COX přeneseny až na kyslík. Na vytvoření dvou molekul vody se spotřebují 4 H⁺ z matrix, další 4 H⁺ jsou transportovány do mezimembránového prostoru.

Na COX působí řada toxických sloučenin – kyanid, NO, sulfid, azid, hydroxylamin, CO či dikarbononorát. Nejvýznamnějším inhibitorem COX je kyanid, dříve užívaný k sebevražedným účelům i jako chemická zbraň. Antidota vycházejí z přirozených detoxifikačních mechanismů organismu. Podání thiosíranů stimuluje sulfurtransferázovou reakci, dusitany generují methemoglobin, který stejně jako kobalamin vychytává kyanid z krevního řečiště. Dosud používaná antidota jsou málo efektivní a k dosažení uspokojivého výsledku je nutné podat velkou dávku, nebo dokonce vykazují negativní vedlejší účinky. Zejména v souvislosti s rostoucí četností teroristických útoků se kyanid zmiňuje jako jed, který by mohl být použit jako zbraň hromadného ničení. Proto se hledají nová účinná antidota. Výsledkem hledání jsou zatím 3-merkaptopyruvát, substrát pro další typ sulfurtransferázové reakce, a kobinamid, derivát kobalaminu, který má ke kyanidu mnohem větší afinitu. Pozornost je zaměřena také na 2-oxokyseliny (2-oxoglutarát a pyruvát), jež reagují s kyanidem za vzniku kyanohydrinů. Vhodné by byly zřejmě jako preventivní léčba při chronickém vystavení subletálním dávkám kyanidu, např. u zaměstnanců v chemickém průmyslu.

Klíčová slova

Mitochondrie, respirační řetězec, cytochrom *c* oxidáza, inhibitory, kyanid, antidota.

Abstract

Cytochrome c oxidase (COX) is one of the respiratory chain complexes, localized in the inner mitochondrial membrane. The bacterial and mammalian COX is assembled from 4 and 13 subunits, respectively. The crystal structures of both are known. Three mitochondrial encoded subunits form the catalytic core of the mammalian enzyme. Mutations in both mitochondria encoded COX subunits and nuclear encoded specific assembly factors cause inherited mitochondrial diseases.

The catalytic function of COX is known in detail. Electrons supplied by the reduced cytochrome c are transported through the redox centres of COX to the active site, where the oxygen is reduced to two water molecules. 4 H⁺ from the mitochondrial matrix are used for the reduction; 4 H⁺ are transported into the intermembrane space.

COX is the target of several toxic compounds (cyanide, NO, sulphide, azide, hydroxylamine, CO or dicarbanonaborate). The most important COX inhibitor is cyanide, in the past used for suicides and also as a chemical weapon in wars. Antidotes are based on natural detoxifying mechanisms of organism. Thiosulphates administration stimulates sulphurtransferase, nitrites generate methemoglobin, which eliminates cyanide from the blood. Cobalamine has the same effect. These antidotes are poorly efficient and a great dose is necessary for satisfactory effect. In addition, some of them have negative side effects. In connection with increasing number of terrorist attacks, cyanide is mentioned as a poison which is quite likely to be used as a mass destruction weapon. Therefore it's searched for new efficient cyanide antidotes. Up to now, the results are 3-mercaptopyruvate, which is substrate for another type of sulphurtransferase, and cobinamide, a cobalamine derivative, that has a higher affinity for cyanide. Also 2-oxoacids (2-oxoglutarate and pyruvate) are considered as antidotes. They react with cyanide forming cyanohydrines. They would be suitable as a prophylactic treatment during chronic exposure to sublethal doses of cyanide, e. g. for workers in chemical industry.

Key words

Mitochondria, respiratory chain, cytochrome c oxidase, inhibitors, cyanide, antidotes.

Úvod

Dýchací řetězec lokalizovaný na vnitřní mitochondriální membráně patří mezi nejdůležitější metabolické dráhy v buňce. Díky jeho činnosti je produkována většina ATP, univerzálního zdroje energie. Součástí dýchacího řetězce je cytochrom *c* oxidáza (COX), která katalyzuje poslední krok dýchacího řetězce, tj. přenos elektronů z oxidovaných substrátů na molekulární kyslík za vzniku dvou molekul vody. Mutace v mitochondriálně kódovaných podjednotkách COX i v jaderně kódovaných specifických asemblačních faktorech jsou příčinou mitochondriálních dědičných poruch. To je důvodem, proč je COX jedním z předmětů zájmu oddělení Bioenergetiky Fyziologického ústavu AV ČR pod vedením MUDr. Josefa Houšťka, DrSc., kde jsem tuto bakalářskou práci vypracovala.

Rovněž je zřejmé, že inhibice COX má pro aerobní organizmy fatální důsledky. Nejvýznamnějším inhibátorem COX je kyanid, který používali traviči a sebevrazi už v době antiky. Již dříve se několik autorů pokusilo ve svých pracích shrnout poznatky o používaných antidotech. Z jejich závěrů vesměs plyne, že tato antidota nejsou příliš účinná a použití některých může být kvůli negativním vedlejším účinkům nebezpečné. Mým cílem je aktualizovat tyto zastaralé přehledy antidot, protože v nedávné době byla popsána nová alternativní antidota, která z hlediska účinnosti vypadají velmi nadějně. Pozornost věnuji z velké části 2-oxokyselinám, jejichž reakce s kyanidem za vzniku kyanohydrinů je známa, ale dosud nebyly zodpovězeny všechny otázky ohledně působení 2-oxokyselin při kyanidové otravě.

Pyruvát a kyanid je téma, které není ještě zcela vyřešené. Sama jsem již provedla několik experimentů, z nichž některé měly za cíl potvrdit již publikované údaje a přitom se seznámit s metodami, jiné přináší zcela nové výsledky (viz plakátové sdělení v příloze, které bylo vytvořeno při příležitosti kurzu oxygrafie „O2k-Course“ konaného v červenci 2007 ve Schröckenu v Rakousku).

Vlastní literární přehled

1. Obecný úvod

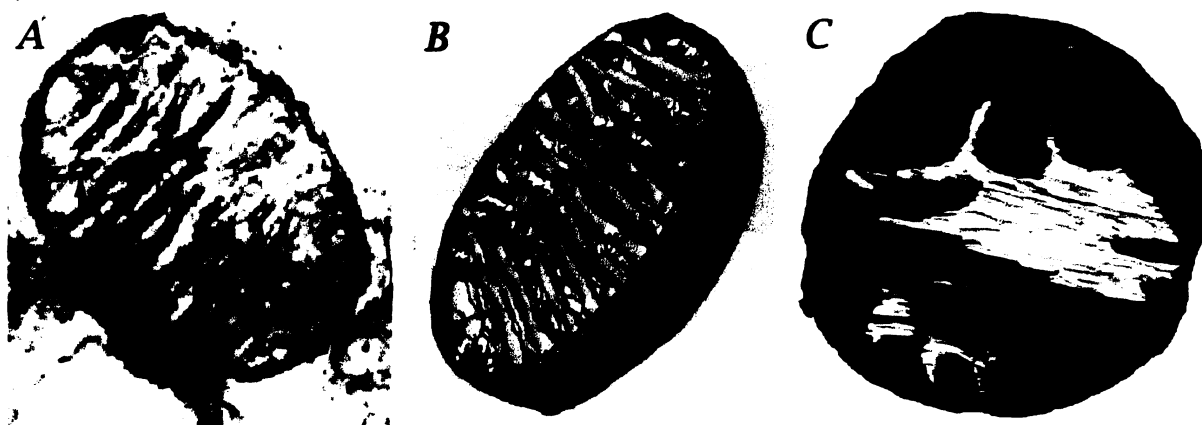
1.1. Mitochondrie – buněčná elektrárna

Prokaryotní i eukaryotní organizmy realizují svůj život na úkor energie, kterou získávají metabolickou přeměnou přijatých substrátů. Za anaerobních podmínek může buňka z jedné molekuly glukózy prostřednictvím glykolýzy, odehrávající se v cytoplazmě, získat pouhé 2 molekuly ATP, univerzálního zdroje energie pro všechny buněčné procesy, zatímco pokud buňka dokáže využít kyslík, může to být přibližně 15krát více v procesu oxidativní fosforylace. Eukaryotní buňka sama o sobě by však nedokázala kyslík takto využít, k tomu je zapotřebí speciální organela – mitochondrie, kde je oxidace glukózy dovedena až k CO_2 a H_2O . Mitochondrie je tak hlavním producentem ATP, což z ní činí jakousi „buněčnou elektrárnu“.

Mitochondrie se obvykle zobrazují jako izolované protáhlé cylindrické útvary v cytoplazmě buňky o průměru 0,5 – 1 μm , ale mohou tvořit i dynamické síťovité struktury. Jejich původ vysvětluje tzv. endosymbiotická teorie vzniku organel, podle níž jsou mitochondrie eukaryotních buněk přímými potomky eubakteriálního endosymbionta, který byl původně endocytován protoeukaryotní hostitelskou buňkou s anaerobním heterotrofním typem metabolismu. Jako následek jejich endosymbiotického způsobu života mají mitochondrie ve srovnání s příbuznými mikroorganizmy značně redukovaný genom. Během vývoje došlo k přesunu většiny původně bakteriálních genů do jádra a mitochondrie se stala semiautonomní organelou, plně závislou na jaderných genech. Pro správné proteinové složení a funkci mitochondrií je tedy nutná koordinovaná součinnost jaderného a vlastního mitochondriálního genomu. Jako typický bakteriální genom tvoří i ten mitochondriální většinou cyklická molekula DNA a jeho velikost se pohybuje přibližně v rozmezí 6 až 200 kbp. Mitochondriální DNA (mtDNA) kóduje omezený počet molekul RNA a proteinů, jež jsou esenciální pro zformování funkční mitochondrie, konkrétní obsah genů v mtDNA je však značně proměnlivý druh od druhu. V zásadě platí, že čím evolučně pokročilejší organizmus, tím méně genů zůstalo zachováno v mitochondriálním genomu. Kupříkladu lidská mtDNA umožňuje expresi 13 proteinů, jež tvoří podjednotky komplexů dýchacího řetězce i ATP syntázy, a zároveň kóduje sadu 22 tRNA, jež plně dostačuje k překladu všech kodonů vlastním translačním aparátem. Analýza mitochondriálních genových sekvencí podporuje monofyletický původ mitochondrií, což znamená, že mitochondrie jako organela v evoluci vznikly pouze jednou, a to již ve společném předkovi všech v současnosti existujících eukaryotních organizmů. Za nejbližší známé příbuzné mitochondrií je považována rickettsiální podskupina α -proteobakterií, což jsou obligátní intracelulární parazité [1].

Také struktura mitochondrie je značně ovlivněna jejím endosymbiotickým původem. Donedávna byl obecně přijímán tzv. baffle model mitochondrie (do češtiny možno přeložit snad jako záhybový), podle něž vnější (odvozena od plazmatické membrány eukaryotní hostitelské buňky) a vnitřní membrána (původem plazmatická membrána eubakteriálního endosymbionta) vymezují 2 vnitřní kompartmenty – intermembránový (mezimembránový) prostor mezi nimi a matrix ohraničenou vnitřní

membránou. Povrch vnitřní membrány je mnohem větší než té vnější a je uvnitř poskládán v jakési záhyby (odtud název), které tvoří kristy. Poněkud odlišný pohled na strukturu mitochondrií přinesla nově vyvinutá metoda – elektronová tomografie. V souladu s ní se vnitřní mitochondriální membrána skládá ze 2 komponent – jedna kopíruje vnější membránu a lze ji označit jako vnitřní hraniční membrána (*inner boundary membrane*), zbývající část tvoří kristy, výběžky do matrix (obr. 1). Mezi kristami a vnitřní hraniční membránou se nacházejí tubulární spoje, *cristae junctions*, mající průměr přibližně 28 nm. Kristy výrazně zvětšují povrch vnitřní membrány, kde jsou lokalizovány enzymatické komplexy dýchacího řetězce a ATP syntázy. Existují experimentální důkazy, které prokazují, že o COX je obohacena především membrána krist, dokládají tedy funkční kompartmentalizaci vnitřní membrány, která je zřejmě udržována prostřednictvím regulace *cristae junctions* [2].



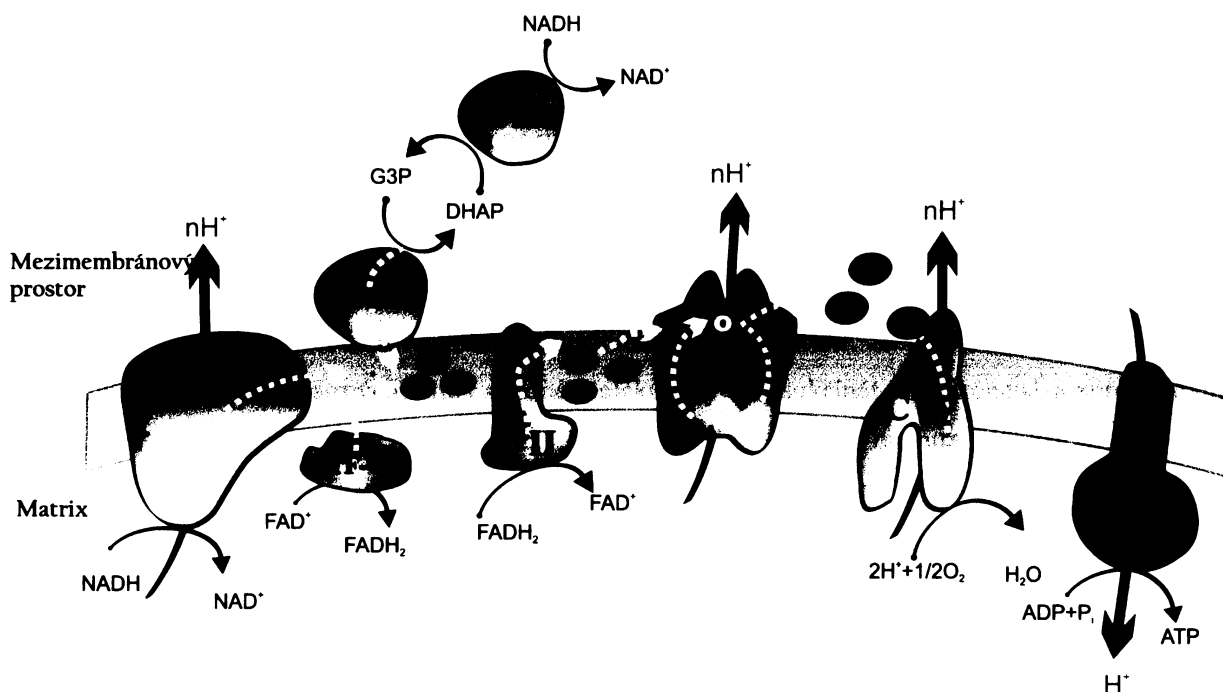
Obr. 1 Struktura mitochondrie [2].

- A. Snímek mitochondrie z elektronového mikroskopu. Šipky vyznačují cirkulární útvary odpovídající *cristae junctions* kruhového průřezu o průměru přibližně 28 nm.
- B. Trojrozměrný model mitochondrie vytvořený metodou elektronové tomografie. Vnější membrána průsvitně tmavě modrá, vnitřní hraniční membrána průsvitně světle modrá, kristy žluté.
- C. Trojrozměrný model mitochondrie s vyznačenými pouze 4 kristami, zobrazenými různou barvou. Pozorovány byly různé morfologické tvary krist, z nichž žlutá je nejtypičtější jako příklad lamelárního kompartmentu s mnohočetnými *cristae junctions* propojujícími kristu s vnitřní hraniční membránou.

1.2. Dýchací řetězec

Elektrony pocházející z oxidovaných substrátů jsou uloženy ve formě redukováných koenzymů. Čtyři enzymové komplexy dýchacího řetězce (NADH dehydrogenáza (I), sukcinát dehydrogenáza (II), komplex cytochromů bc_1 (III) a cytochrom *c* oxidáza (IV)), lokalizované na vnitřní mitochondriální membráně, přenášejí za spoluúčasti ubichinonu (koenzymu Q) a cytochromu *c* elektrony z redukováných koenzymů NADH a $FADH_2$ postupně až na molekulární kyslík (obr. 2). Přenos elektronů na komplexech dýchacího řetězce probíhá ve směru zvyšujícího se redoxního potenciálu, přičemž se uvolňuje přebytečná energie. Ta je ukládána ve formě protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně prostřednictvím pumpování protonů třemi enzymovými komplexy dýchacího řetězce, a to komplexem I, III a IV. Tento gradient protonů má jednak složku chemickou, jež odpovídá vyšší koncentraci protonů v mezimembránovém prostoru ve srovnání s matrix, a jednak složku elektrickou, potenciálovou –

kumulace kladného náboje protonů v mezimembránovém prostoru má za následek, že matrix se vůči mezimembránovému prostoru stává elektricky negativní. Tento elektrochemický protonový gradient ($\Delta\mu_{H^+}$), jehož existence je podmíněna neprostupností membrány pro ionty, je následně využit enzymem ATP syntázou, rovněž membránově vázanou a často označovanou jako komplex V dýchacího řetězce, k produkci ATP z ADP a anorganického fosfátu. Komplexy dýchacího řetězce společně s ATP syntázou tak dohromady tvoří tzv. systém oxidativní fosforylace (OXPHOS).



Obr. 2 Elektrontransportní řetězec na vnitřní mitochondriální membráně.

Elektrony do dýchacího řetězce vstupují na dvou místech - z NADH na komplexu I (NADH dehydrogenáza), ze sukcinátu přes kofaktor FADH₂ na komplexu II (sukcinát dehydrogenáza). Z těchto enzymových komplexů jsou přeneseny koenzymem Q na komplex III (komplex cytochromů bc₁) a odtud cytochromem c na komplex IV (COX), kde redukuje O₂ až na H₂O. V některých tkáních (především hnědý tuk, placenta, játra) mohou elektrony do dýchacího řetězce přicházet také přes mitochondriální glycerolfosfát dehydrogenázu, která společně s cytosolickou glycerolfosfát dehydrogenázou zajišťuje rychlou reoxidaci cytosolického NADH.

Komplexy dýchacího řetězce mohou laterálně difundovat membránou a asociují v tzv. superkomplexy dýchacího řetězce neboli „respirazomy“, jež byly objeveny jak v bakteriální plazmatické membráně, tak ve vnitřní mitochondriální membráně. V lidských mitochondriích byly identifikovány 2 hlavní typy superkomplexů, I₁III₂ a I₁III₂IV₁ (dolní index udává počet daných komplexů v superkomplexu), a zároveň byla nalezena esenciální stabilizace komplexu I interakcí s komplexem III. Existence superkomplexů zvyšuje efektivitu dýchacího řetězce, jelikož jsou výrazně redukovány vzdálenosti, které substráty, tj. koenzym Q a cyt c, musí překonat difuzí mezi jednotlivými enzymovými komplexy (tzv. *substrate channeling*). Také se ukazuje, že roli při asociaci komplexů dýchacího řetězce v superkomplexy mohou hrát některé jaderně kódované podjednotky COX [3].

1.2.1. Komplex I (NADH:koenzym Q oxidoreduktáza)

Komplex I dýchacího řetězce, často označovaný rovněž jako NADH dehydrogenáza, se u savců skládá ze 43 podjednotek (7 z nich kódováno mitochondriálním genomem, zbytek jaderným), což z něj při molekulové hmotnosti 750 kDa činí jeden z největších proteinových komplexů vnitřní mitochondriální membrány. Obsahuje jednu molekulu koenzymu FMN (flavinmononukleotid) a několik železosírných center, která se účastní přenosu 2 elektronů z redukovaného koenzymu NADH na další elektronový přenašeč, a to koenzym Q (ubichinon). Přenos je doprovázen translokací 4 H⁺ z matrix do intermembránového prostoru.

1.2.2. Komplex II (sukcinát:koenzym Q oxidoreduktáza)

Komplex II, složený ze 4 jaderně kódovaných podjednotek, je nejen článkem dýchacího řetězce, ale zároveň je zahrnut v Krebsově cyklu, kde je označován jako sukcinát dehydrogenáza. Díky své úloze v dýchacím řetězci je jediným enzymem Krebsova cyklu, který není lokalizován volně v matrix mitochondrie, nýbrž je zakotven ve vnitřní mitochondriální membráně. Za účasti kovalentně vázaného koenzymu FAD, tří železosírných center a jedné molekuly cyt *b*₅₆₀ sukcinát dehydrogenáza zprostředkuje přenos elektronů ze sukcinátu na koenzym Q, čímž sukcinát oxiduje na fumarát. Při tomto ději se neuvolňuje dostatečné množství energie pro transport protonů z matrix do mezimembránového prostoru, a tudíž se negeneruje protonový gradient potřebný pro syntézu ATP. Přesto elektrony dodané do dýchacího řetězce přispívají k tvorbě protonového gradientu, a to následnou činností komplexů III a IV.

1.2.3. Komplex III (koenzym Q:cytochrom c oxidoreduktáza)

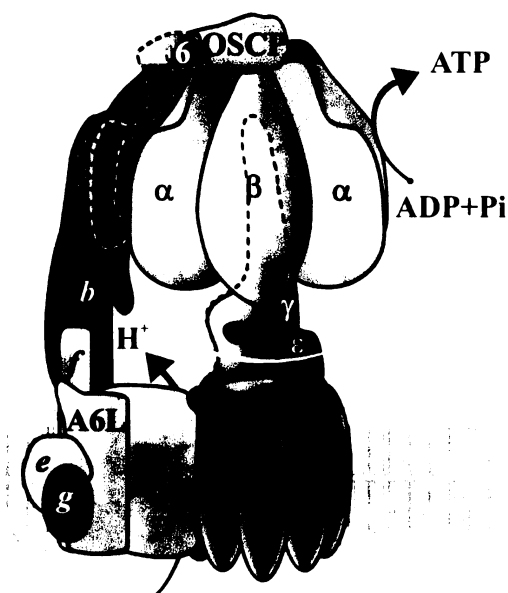
Komplex III, nebo také komplex cytochromů *b*_{c1}, se skládá z 11 podjednotek (s výjimkou cyt *b* jaderně kódovaných) a předává elektrony z koenzymu Q (ubichinolu) na cyt *c*. Na tomto procesu participují tři redoxní kofaktory - cyt *b* se dvěma hemy typu *b* (*b*_L a *b*_H), cyt *c*₁ a Rieskeho železosírné centrum. Elektrony při oxidaci koenzymu Q vstupují do tzv. Q cyklu, který umožňuje přenos elektronů z dvouelektronového donoru na jednoelektronový akceptor za vzniku intermediátu semiubichinolu (radikálová forma koenzymu Q s jedním elektronem) a kde dochází k translokaci protonů přes membránu. Cyt *c* je periferní membránový protein na vnějším povrchu vnitřní mitochondriální membrány. K membráně je poután pouze slabými nekovalentními interakcemi, proto při poškození vnější mitochondriální membrány (např. po zmrazení mitochondrií, či při indukci apoptózy) uniká z mezimembránového prostoru. Střídavě se váže k cyt *c*₁ komplexu III, kde je redukován, a na své vazebné místo na COX, kde je reoxidován.

1.2.4. Komplex IV (cytochrom c oxidáza)

Terminální enzym dýchacího řetězce, cytochrom *c* oxidáza, přijaté elektrony použije k redukci molekulárního kyslíku na vodu. COX je předmětem této práce a budou jí podrobně věnovány následující kapitoly.

1.2.5. Komplex V (ATP syntáza)

Mitochondriální F_1F_0 -ATP syntáza spřahuje pumpování protonů komplexy dýchacího řetězce se syntézou ATP. Je to enzymový komplex, jenž v buňkách hovčezího srdce tvoří 16 různých podjednotek. Je složen ze dvou subkomplexů - F_0 části inkorporované ve vnitřní mitochondriální membráně, jež pracuje jako protonový kanál a je místem působení inhibitoru oligomycinu, a F_1 části orientované do matrix, která je katalytickou doménou komplexu. F_0 a F_1 část jsou spojeny jak tzv. centrální, tak periferní stopkou. Centrální stopka a tzv. c -kruh (9 - 12 do kruhu uspořádaných F_0 podjednotek c) tvoří rotor, který je roztočen průchodem protonů, zatímco periferní stopka tvoří stator, který fixuje polohu $(\alpha\beta)_3$ oligomeru, kde jsou jednotlivé podjednotky α a β uspořádány střídavě jako dílky pomeranče kolem koncové oblasti podjednotky γ (obr. 3). Katalytické podjednotky β zaujmají díky odlišným interakcím s asymetrickou podjednotkou γ různé konformace lišící se afinitou k jednotlivým nukleotidům. ATP syntáza může pracovat ve dvou funkčně i konformačně odlišných módech. V syntetickém módu transformuje elektrochemický gradient protonů na vnitřní mitochondriální membráně na mechanickou práci a následně na chemickou energii vazby v ATP připojením anorganického fosfátu na ADP. Naopak v hydrolytickém módu převádí chemickou energii hydrolýzy ATP na točivý moment, který využívá F_0 část pro přenos protonů přes vnitřní mitochondriální membránu proti elektrochemickému gradientu, a funguje tak vlastně jako H^+ -pumpa.



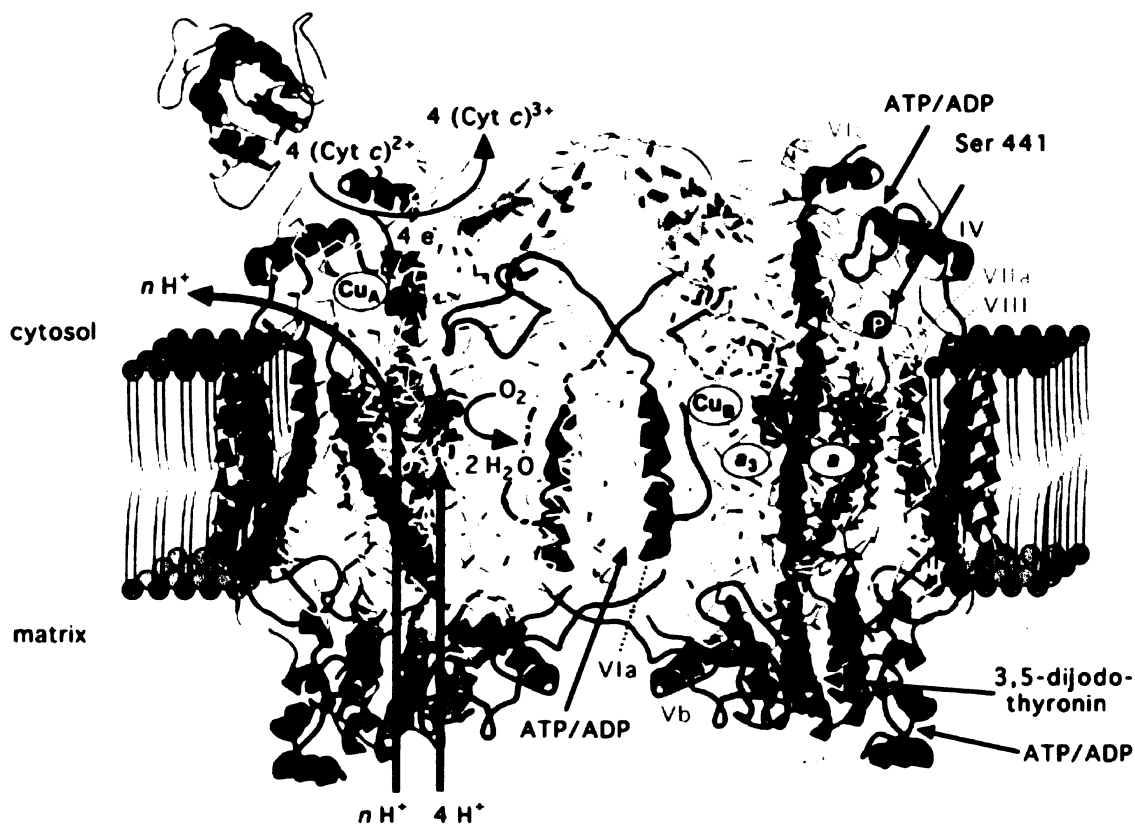
Obr. 3 Struktura komplexu mitochondriální F_1F_0 -ATP syntázy.

Žlutá šipka naznačuje směr rotace c -kruhu a podjednotky γ , první červená šipka naznačuje průchod protonů z intermembránového prostoru do matrix na rozhraní podjednotky a a c -kruhu, druhá syntézu ATP z ADP a anorganického fosfátu.

2. Struktura cytochrom c oxidázy

Cytochrom *c* oxidáza náleží k superrodině terminálních oxidáz obsahujících hem a kation mědi a fungujících jako protonové pumpy poháněné redoxním potenciálem, které redukci molekulárního kyslíku na vodu spřahují s translokací protonů přes membránu. Pro všechny členy této rodiny je charakteristická vysoká sekvenční homologie největší podjednotky I a přítomnost binukleárního aktivního centra sestávajícího z vysokospinového hemu a_3 a blízce asociovaného kationtu Cu_B .

Savčí COX (obr. 4) se skládá celkem ze 13 podjednotek, z nichž 3 největší jsou kódované mitochondriálním genomem (COX I - III) a tvoří evolučně konzervované katalytické jádro zahrnující 4 redoxní centra (Cu_A , cyt *a*, cyt a_3 a Cu_B). Jejich biosyntéza probíhá kompletně v mitochondriích a účastní se jí mitochondriální proteosyntetický aparát. Zbývajících 10 menších podjednotek je kódováno v buněčném jádře, syntetizováno v cytosolu a následně importováno do mitochondrií. Jaderně kódované podjednotky plní funkce asemblační a regulační, tj. účastní se skládání podjednotek ve funkční enzymový komplex a umožňují regulaci jeho aktivity [4].



Obr. 4 Struktura dimeru COX z mitochondrií hovězího srdce [4].

Mitochondriálně kódované podjednotky I, II a III (zobrazené žlutě) obsahují postupně 12, 2 a 7 transmembránových helixů. Vazebné místo pro cyt *c*, substrát COX, a centrum Cu_A jsou lokalizované na cytosolické straně podjednotky II, zatímco cyt *a* a binukleární centrum cyt a_3 - Cu_B vázající kyslík v hydrofobním vnitřku podjednotky I. 7z 10 jaderně kódovaných podjednotek tvoří jediný transmembránový helix a 3 podjednotky se nacházejí vně membrány, z nichž 2 na matrixové (Va a Vb) a 1 na cytosolické straně membrány (Vib). V monomeru nalevo je schematicky naznačena redoxní reakce katalyzovaná COX, v monomeru napravo jsou vyznačena vazebná místa pro různé alosterické regulátory COX – jedno vazebné místo pro 3,5-dijodothyronin, tři pro ADP/ATP a také cíl regulace fosforylací na podjednotce I (Ser 441).

Aminokyselinová sekvence a struktura tří podjednotek COX tvořících její katalytické jádro je vysoce konzervovaná a značně se podobá bakteriálnímu enzymu, nárůst počtu jaderně kódovaných podjednotek v evoluci eukaryotního enzymu má však význam pro rozšíření škály možností regulace vlastní katalytické činnosti komplexu - u bakterie *Paracoccus denitrificans*, jež slouží jako model prokaryotního enzymu, je pouze jedna regulační podjednotka, zato v savcích buňkách, kde je jako modelový používán enzym z hovězího srdce, je jich 10. Další zásadní evoluční změnou je, že COX není v eukaryotní buňce funkční ve formě monomeru jako u *P. denitrificans*, ale pouze ve formě dimeru, i když se zdá, že dimerní stav izolovaného enzymu není esenciální pro jeho funkci *in vitro*. Nicméně *in vivo* COX pumpuje protony přes vnitřní mitochondriální membránu pouze jako dimer [5].

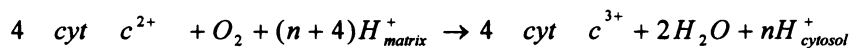
Zatímco mitochondriálně kódované podjednotky jsou kódovány unikátními geny, některé z jaderně kódovaných podjednotek COX byly v genomu nalezeny v několika kopiích, proto mohou být exprimovány v tkáňově specifických izoformách. Stejně tak byla u savců prokázána i existence vývojově specifických izoform COX. Výskyt tkáňově a vývojově specifických izozymů COX savců a vliv jaderně kódovaných podjednotek na katalytickou funkci jsou podpořeny i fenotypickými projevy lidských mitochondriálních myopatií zapříčiněných defektní COX - např. u fatální dětské mitochondriální myopatie COX ve svalech nevykazuje žádnou aktivitu, zatímco v ostatních tkáních (v játrech, srdci a mozku) je plně aktivní [5].

Kromě 4 redoxních kovových center esenciálních pro správnou katalytickou funkci COX jsou součástí enzymového komplexu ještě pevně vázaná neredoxní kovová centra - u bakteriálního enzymu Mg^{2+} a Ca^{2+} , u eukaryotního Mg^{2+} , Na^+ a Zn^{2+} (posledně jmenovaný je vázán jaderně kódovanou podjednotkou Vb na matrixové straně membrány, všechny ostatní jsou vázány uvnitř podjednotky I). Jejich funkce zatím zůstává neznámá a pouze v oblasti spekulací [6].

3. Funkce cytochrom c oxidázy

3.1. Katalytický cyklus cytochrom c oxidázy

Reakce katalyzovaná COX spočívá v přenosu 4 elektronů dodaných redukováným cyt *c* na kyslík, přičemž jsou spotřebovány 4 protony z matrix na tvorbu molekuly vody. Reakce, které se účastní 4 redoxní centra COX, je spřažena s translokací dalších protonů z matrix do mezimembránového prostoru a může být schematicky zapsána:



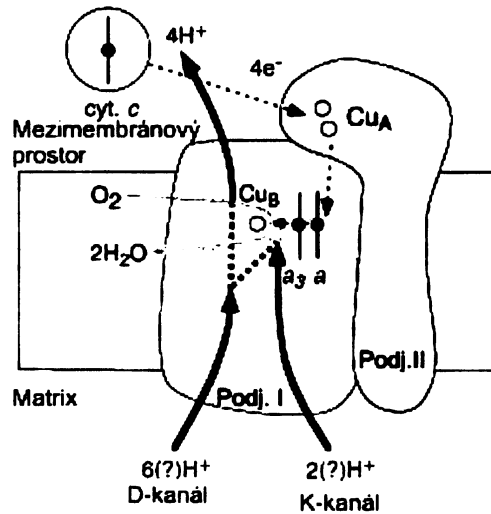
Cyt *c* interaguje s COX prostřednictvím elektrostatických interakcí mezi kladně nabitými ϵ -aminoskupinami sedmi až osmi vysoce konzervovaných lyzinů exponovaných na jeho povrchu a zřejmě stejným počtem záporně nabitých karboxylových skupin aspartátů a glutamátů v jeho vazebném místě. Vazebné místo se nachází mezi monomery COX a při vazbě je cyt *c* uvězněn jakoby v kleštích. S ohledem na vazbu cyt *c* jako substrátu COX se kinetika COX jeví jako bifazická, což dlouhou dobu nebylo uspokojivě vysvětleno. Při nízké iontové síle média (< 25 mM) rychlost reakce nesleduje jednoduchou Michaelis-Mentenovskou kinetiku, ale můžeme vynést hyperbolický Eadie-Hofstee plot, který popisuje dvě funkce prvního řádu reprezentující dvě oddělené kinetické konstanty pro vysokou afinitu (K_M nízké) a nízkou afinitu (K_M vysoké) COX k jejímu substrátu. Často se dvojí afinita COX k cyt *c* přičítala na vrub existenci dvou rozdílných vazebných míst, ale nakonec byla tato hypotéza zavržena. Podle nedávných studií se při vysokoafinní reakci cyt *c* váže na své vazebné místo na podjednotce II ($K_D = 10^{-8}$), zatímco nízkoafinní reakce ($K_D = 10^{-6}$) je vysvětlována vazbou cyt *c* na fosfolipid kardiolipin v membráně prostřednictvím elektrostatických interakcí, se kterými může interferovat vysoká iontová síla média, proto za těchto podmínek (které jsou mimochodem fyziologické) při vynesení Eadie-Hofstee grafu dostaneme přímkou, která je analogická s vysokoafinní reakcí při nízké iontové síle [7].

Elektron odevzdaný cyt *c* vstoupí do komplexu COX přes konzervovaný tryptofan podjednotky II. Akceptorem elektronu je redoxní centrum Cu_A , které tvoří dva elektronicky spárované kationty smíšené valence Cu^I/Cu^{II} a je lokalizované poblíž vazebného místa pro cyt *c*. Elektron je následně předán na cyt *a* na podjednotce I. Tento tzv. nízkospinový hem je blíže Cu_A centru nežli cyt a_3 (obr. 5), proto je kineticky preferovaným akceptorem elektronu. Cyt *a* v nízkospinovém stavu udržují dva axiální histidinové ligandy.

Vysokospinový cyt a_3 (axiální histidinový ligand) a elektronicky spárované centrum Cu_B (3 histidinové ligandy) tvoří binukleární centrum enzymu. Zde se na COX váže molekula O_2 a dochází k její redukci na vodu. V bovinním enzymu se vzdálenost mezi cyt a_3 a Cu_B v binukleárním centru mění v závislosti na jejich redoxním stavu a vazbě ligandu, přičemž cyt a_3 je fixovaný a vzdálenost se mění změnou polohy Cu_B [6].

Revolučním přínosem tohoto enzymového komplexu pro buňky je to, že COX redukuje kyslík mechanismem, při němž nedochází k tvorbě a uvolnění kyslíkových radikálů (ROS - *reactive oxygen species*), jež by mohly letálně poškodit buněčné struktury. Důvodem je téměř současný přenos všech 4 elektronů na kyslík, který se váže na plně redukované aktivní centrum, přičemž 2 elektrony pocházejí

z cyt *c*, zbylé 2 jsou přechodně poskytnuty samotnou COX - atom železa cyt a_3 je formálně oxidován na Fe^{4+} a čtvrtý elektron dodá v těsné blízkosti binukleárního centra lokalizovaný tyrosin, čímž se dočasně mění na tyrosinový radikál. Tato unikátní struktura katalytického centra umožňuje COX rozštěpit vazbu v molekule O_2 , i když je opožděn přísun dalších elektronů z cyt *c*, aniž by vznikaly radikály, a rovněž přenos elektronů na O_2 probíhá velmi rychle, jelikož jsou všechny přítomny v aktivním centru enzymu.



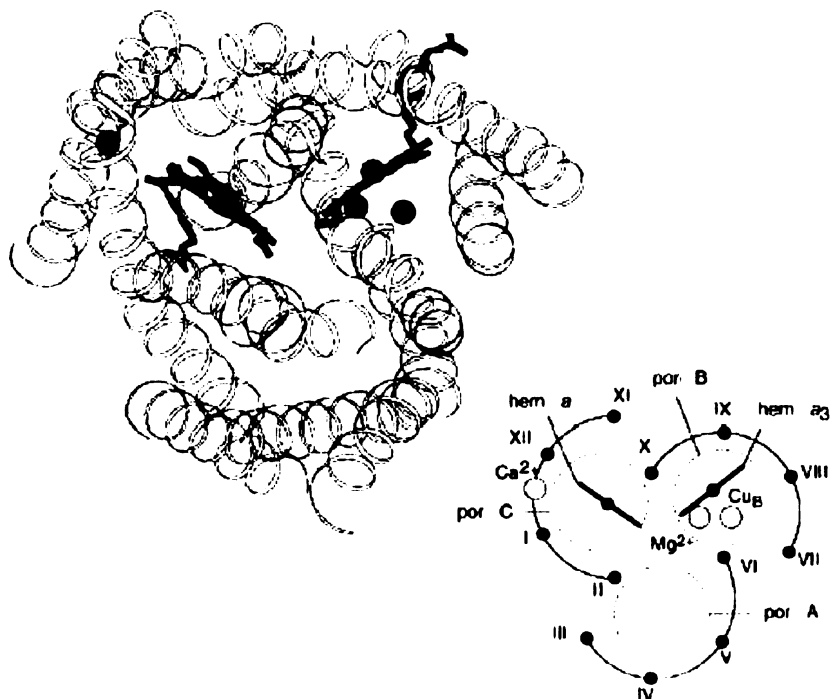
Obr. 5 Schematické zobrazení cesty elektronů mezi jednotlivými redoxními centry COX a translokace protonů z matrix do mezimembránového prostoru [6].

Elektrony z cyt c vstupují do komplexu COX v binukleárním centru Cu_A , odtud putují na cyt a a poté konečně do binukleárního centra $a_3 - Cu_B$, kde redukuje kyslík za vzniku dvou molekul vody.

3.2. Translokace protonů přes vnitřní mitochondriální membránu

Na rozdíl od názorně vysvětlené translokace protonů spojené se syntézou ATP u ATP syntázy mechanismus translokace protonů prostřednictvím COX není dosud zcela objasněn. V současnosti již obecně přijatým faktem je stechiometrické vyčíslení translokace jednoho H^+ na jeden transportovaný elektron. Během redukce molekulárního kyslíku na vodu v jednom katalytickém cyklu jsou spotřebovány celkem 4 H^+ z matrix (tzv. chemické protony) a zároveň jsou za využití energie uvolněné exergonní redukcí kyslíku 4 další H^+ translokovány z matrix přes vnitřní mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru (tzv. pumpované protony). Oba procesy svým způsobem přispívají ke zvyšování protonového elektrochemického gradientu na membráně.

Translokace protonů se děje přes hydrofobní jádro enzymu, a to konkrétně podjednotku I, která se skládá ze 12 transmembránových helixů, které jsou navzájem uspořádány tak, že vytváří 3 oblouky, jež vykazují jakousi pseudotrojčetnou symetrii (obr. 6). Každý oblouk je formován 4 transmembránovými helixy a spolu s posledním segmentem předchozího polokruhu tvoří pór. Tyto tři póry se liší ve své funkci - uvnitř póru B a C je lokalizováno binukleární centrum enzymu, resp. cyt *a*, vnitřní poloviny těchto pórů slouží jako D-, resp. K-protonová cesta pro translokaci protonů, vnější strana póru A je možnou přístupovou cestou kyslíku do binukleárního centra [6].



Obr. 6 Struktura podjednotky COX I z *P. denitrificans* – pohled z vnější strany membrány [6].

Červeně hem a, modře hem a₃ (červené kolečko – kation Fe), modré kolečko – Cu_B, fialové kolečko – Mg²⁺, zelené kolečko – Ca²⁺.

Translokace protonů skrz podjednotku COX I zřejmě probíhá dvěma různými cestami. Kanál K (pojmenovaný podle pro jeho funkci esenciálního lyzinového zbytku) je tím méně prozkoumaným – předpokládá se, že začíná na glutamátu podjednotky II a mimo další aminokyseliny zahrnuje hydroxylfarnesylový řetězec cyt a₃. Umožňuje přímý vstup prvního či možná prvních dvou protonů pórem B do binukleárního centra pro tvorbu vody. Všechny ostatní protony jsou transportovány D-kanálem (označený podle klíčového aspartátu u jeho cytoplazmatického vstupu v bakteriálním enzymu), jenž prochází pórem A hlouběji do podjednotky I velkou polární dutinou vyplněnou molekulami vody, které navzájem i s okolními polárními aminokyselinami vytvářejí síť vodíkových můstků, což umožňuje transportovat protony tímto kanálem prostřednictvím přeskoků mezi jednotlivými vodíkovými můstky. Za touto hydrofilní dutinou mezi cyt a a a₃ se nachází klíčový glutamát, jehož negativně nabitá postranní skupina by mohla fungovat jako usměrňovač protonů jednak do binukleárního centra k redukci kyslíku, a jednak do intermembránového prostoru, ale přesná cesta protonů od tohoto glutamátu není jasná [6]. Podle vysokého pK_a se zdá, že výše zmíněný glutamát je obvykle ve své protonizované formě a protony poskytuje podle požadavku jejich akceptorů, načež jsou doplněny rychlou reprotonací realizovanou přeskokem protonu v řetězci vodíkových můstků od aspartátu na povrchu enzymového komplexu [8]. Při studiu krystalové struktury COX z hovězího srdce byla popsána ještě třetí protonová cesta (kanál E nebo H), která však nebyla přítomna v bakteriálním typu enzymu, a navíc z počítačových simulací plyne, že se pravděpodobně vůbec nejedná o protonový kanál [6].

3.3. Funkce jaderně kódovaných podjednotek

Navzdory intenzivnímu pátrání zůstává funkce většiny jaderně kódovaných podjednotek COX zahalena tajemstvím. Připisuje se jim role při regulaci aktivity COX, jelikož rozdíly v podjednotkovém složení a aktivitě savčí COX byly nalezeny mezi různými tkáněmi, v rámci jedné tkáně mezi různými buněčnými typy a dokonce u stejných buněk za různých fyziologických podmínek či v různých fázích vývoje organismu. Přesný mechanismus regulace aktivity COX je znám pouze u některých podjednotek. Regulace je zprostředkována vazbou ADP/ATP, 3,5-dijodothyroninu či fosforylací (tab. 1) [9].

Podjednotka	Mechanismus regulace a funkce podjednotky
IV	vazba ATP - inhibiční efekt
Va	vazba 3,5-dijodothyroninu - blokuje inhibiční efekt ATP
Vb	fosforylace - zvyšuje inhibiční efekt ATP
VIa	L/H izoformy, moduluje poměr H^+/e^- , inhibiční efekt
VIb	stabilizuje dimer COX, inhibiční efekt
VIc	nízkoafinní vazebné místo pro cyt c (?)
VIIa	L/H izoformy
VIIb	?
VIIc	?
VIII	?

Tab. 1 Přehled jaderně kódovaných podjednotek lidské COX [9].

L/H izoformy znamenají, že se daná podjednotka vyskytuje ve dvou tkáňových izoformách, přičemž se jedná o tzv. jaterní (L) a srdeční typ (H). Rovněž podjednotka VIII se u některých druhů (pes, potkan, kráva) vyskytuje ve tkáňových izoformách.

V savčím komplexu COX bylo identifikováno 7 vysokoafinních vazebných míst pro ATP/ADP a 3 další pouze pro ADP pomocí radioaktivně značeného cholátu, který má podobnou strukturu jako ADP - v krystalové struktuře COX bylo napočítáno celkem 10 pevně vázaných cholátů a rovněž tam bylo identifikováno několik molekul kardiolipinu, z nichž jedna dokonce snad spojuje 2 monomery dimerního komplexu. Při vysokém intramitochondriálním poměru koncentrací ATP/ADP se snižuje respirace a pumpování protonů (tj. je snížena stechiometrie), a tedy i protonový gradient. Tato alosterická inhibice COX, jež je poloviční při poměru koncentrací ATP/ADP = 28, je „zapnuta“ výměnou ADP navázaného na vysokoafinním vazebném místě na matrixové doméně podjednotky IV za ATP. Tento jev je v literatuře označován jako druhý mechanismus respirační kontroly a jsou známy mechanismy jeho regulace či zablokování, kdy COX vykazuje stejnou aktivitu nezávisle na poměru ATP/ADP. To lze navodit mj. defosforylací podjednotky Vb či specifickou vazbou 3,5-dijodothyroninu na podjednotku Va, lokalizovanou na matrixové straně COX [8].

U savců nacházíme u většiny druhů 2 tkáňově specifické izoformy podjednotek VIa, VIIa (u potkana pouze jedna) a VIII (u člověka pouze jedna). Srdeční izoformy (VIaH, VIIaH, VIIIH) jsou

exprimovány v srdci a kosterních svalech, kdežto jaterní izoformy (VIaL, VIIaL, VIII) jsou všudypřítomné, např. srdeční COX dospělého potkana je ze dvou třetin tvořena podjednotkou VIaH a z jedné VIaL, zatímco v kosterních svalech téměř 100% zaujímá VIaH. Ve fetálním srdci a kosterních svalech je exprimována hlavně izoforma VIaL a VIIaL, po narození se zastoupení izoform mění. V jaterním izozymu COX je trvale nezávisle na poměru ATP/ADP a bez defosforylace zvýšená protonmotivní síla a snížená stechiometrie H^+/e^- , což zprostředkuje podjednotka VIaL, v srdečním izozymu při vysokém poměru ATP/ADP (podjednotka VIaH). Na základě těchto poznatků byla postulována hypotéza, že pokles stechiometrie H^+/e^- vlivem srdečního typu podjednotky VIa v savcích kosterních svalech se účastní termogeneze v klidu (např. během spánku), kdy intramitochondriální poměr koncentrací ATP/ADP je vysoký, zatímco všudypřítomný jaterní typ nezávislý na poměru ATP/ADP se účastní permanentně termogeneze savců, kteří jako teplokrevní musí udržovat svou tělesnou teplotu [9].

Pěkným příkladem proměny COX během ontogeneze, u které se předpokládá významný podíl jaderně kódovaných podjednotek, je postnatální vývoj aktivity COX v srdečních mitochondriích potkana, kdy se aktivita COX postupně zvyšuje. To souvisí s tím, že prenatální primárně anaerobní srdce přechází na plně aerobní metabolismus. Aktivita COX dosáhne své „dospělé“ hodnoty velmi brzy po narození (mezi 5. a 15. dnem, přičemž k dosažení pohlavní dospělosti dochází přibližně 60. den po narození). Srovnáme-li tyto údaje s postnatálním vývojem aktivity citrát syntázy solubilizované v matrix, jejíž aktivita se postupně zvyšuje až do 60. dne, dojdeme k hypotéze, že v neonatálních mitochondriích se nachází nadbytek COX, ovšem díky regulaci, na které se s největší pravděpodobností podílí i různé izoformy jaderně kódovaných podjednotek COX, nejsou tyto enzymy plně aktivní. V rámci postnatálního vývoje se pak tato regulace snižuje [10].

Tuto hypotézu podporuje i experiment stimulace aktivity COX ze srdce potkana účinkem detergentu, který narušuje strukturní i funkční integritu vnitřní mitochondriální membrány. Aktivita COX pak není omezena rychlostí vyčerpávání elektrochemického protonového gradientu ATP syntázou, mohlo by docházet i k úniku nekovalentně asociovaných regulačních podjednotek. Stimulace aktivity COX aplikací detergentu rovněž dokládá, že v intaktních mitochondriích velká část enzymatické kapacity COX není využívána. Při bližším studiu účinků detergentu na COX potkanů různého věku bylo zjištěno, že detergent zvýší aktivitu COX potkanů 1 den po narození až 20krát, kdežto u 60tidenních (tedy pohlavně dospělých) potkanů byl naměřen nárůst aktivity pouze sedminásobný [11].

Jedna z osmi jaderně kódovaných podjednotek u kvasinek, podjednotka V (sekvenčně korespondující s podjednotkou IV savců), zprostředkuje regulaci katalytických vlastností COX kyslíkem. Koncentrace kyslíku totiž u kvasinek reguluje na úrovni transkripce expresi dvou izoform podjednotky V, Va je exprimována za aerobních ($[O_2] > 1 \mu M$) a hypoxická Vb za anaerobních podmínek ($[O_2] < 1 \mu M$), přičemž se účastní transkripční faktor obsahující hem. Isoformy Va a Vb jsou sekvenčně homologní ze 66% a v délce polypeptidového řetězce se liší o jedinou aminokyselinu. Obě jsou tvořeny jedním transmembránovým helixem a mají podobnou sekundární strukturu. Tyto izoformy pozměňují strukturu proteinového okolí binukleárního centra, a tím ovlivňují kinetiku COX změnou rychlosti intramolekulárního transferu elektronů mezi cyt *a* a binukleárním reakčním centrem enzymu, čímž mění

maximální číslo obratu (maximum turnover number). Tato změna je zprostředkována interakcí transmembránového helixu podjednotky V s transmembránovým helixem XII podjednotky I. V případě hypoxického Vb izoenzymu je elektronový transfer třikrát až čtyřikrát rychlejší ve srovnání s aerobním Va izoenzymem, zatímco aktivační energie reakce je pro oba enzymy stejná [12]. Po objevení regulace aktivity COX koncentrací kyslíku se předpokládala její existence i u savců, ale přesný mechanismus popsal až v roce 2006 Semenza et al. [13]. Kyslíkové regulaci podléhá exprese izoform jaderně kódované podjednotky IV – COX IV-1 a COX IV-2, přičemž za podmínek snížené dostupnosti kyslíku transkripční faktor HIF-1 (*hypoxia-inducible transcription factor 1*) indukuje v buněčném jádře transkripci mj. izoformy COX IV-2 a mitochondriální proteázy LON, jež zprostředkuje degradaci normoxické izoformy COX IV-1. Celková přeměna buňky za hypoxie prostřednictvím HIF-1 optimalizuje účinnost respirace.

4. Inhibice cytochrom c oxidázy

Je obecně přijatým faktem, že COX je v nadbytku nad ostatními komplexy dýchacího řetězce (tj. komplexy I, II a III) a tedy určitý podíl COX může být specificky inhibován bez ovlivnění celkové rychlosti respirace. Je známo několik inhibitorů COX, které se liší vazebným místem na COX, tedy i mechanismem inhibice její funkce a možné reverze, rozdílná je rovněž účinnost inhibice a množství inhibitoru mající letální účinek na organismus.

Nejvýznamnějším inhibitorem COX je kyanid, jehož inhibiční účinek je za určitých podmínek reverzibilní. Kyselina kyanovodíková (HCN) je velice těkává kapalina, proto se nejčastěji používá její draselná sůl – kyanid draselný (KCN). Již od 50. let 20. století bylo známo, že kyanid nedokáže inhibovat COX v přítomnosti oxokyselin, které vyvážou kyanid, čímž vzniká kyanohydrin [14].

4.1. Inhibice cytochrom c oxidázy kyanidem

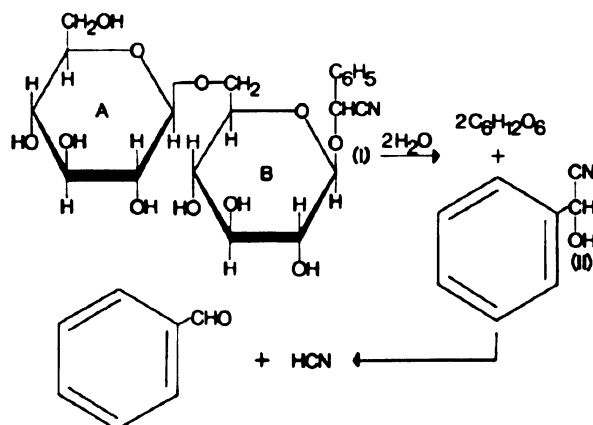
Kyanid působí na více enzymů, ale jeho toxicita se projevuje hlavně inhibicí COX. Inhibice COX se projevuje cytotoxickou hypoxií, jejímž důsledkem je vyčerpání buněčných zásob ATP. Kyslíku je sice k dispozici dostatek, ale nemůže být spotřebováván, proto jedním z příznaků kyanidové otravy je jasně červená barva venózní krve, jelikož kyslík není absorbován při průchodu tkáněmi. Dalším ukazatelem kyanidové otravy je laktózová acidóza, jež pramení z využití anaerobních metabolických cest k redukci pyruvátu, který nemůže být dále využíván Krebsovým cyklem, jenž je blokován inhibicí dýchacího řetězce [15].

4.1.1. Zdroje kyanidu

Nejznámějším prekurzorem toxického kyanidového aniontu je plynň kyanovodík (kyselina kyanovodíková je bezbarvá kapalina, jejíž nízký bod varu 25,5 °C ji činí vysoce těkávou), který za tuto proslulost vděčí tomu, že byl zneužit nacisty během druhé světové války v plynových komorách k vyhlazení milionů lidí ve formě tzv. cyklonu B. Toxická je také jakákoliv rozpustná anorganická sůl kyseliny kyanovodíkové (nejčastěji se lze setkat s kyanidem sodným a draselným, známým pod triviálním názvem cyankáli). Inhalace kyanovodíku (HCN) patří společně s intravenózním podáním kyanidu k nejúčinnějším a nejrychleji postupujícím otravám kyanidem, plynň kyanovodík se totiž přes plicní sliznici vstřebává mnohem rychleji, než probíhá absorpce v gastrointestinálním traktu. Čím rychleji se v tkáni zvyšuje obsah kyanidu, tím rychleji se projeví příznaky otravy, přičemž je nutná menší dávka k projevu daného symptomu. Letální pro člověka je při inhalaci HCN přibližně 50 mg, zatímco orálně požitého NaCN či KCN musí být k docílení letality asi 200 – 300 mg [16].

Přirozeným prekurzorem kyanidu v přírodě je amygdalin, což je kyanogenní β -glukosid nacházející se v malém množství v semenech některých plodů – meruněk, broskví, třešní, hrušek, jablek, švestek a nelze opomenout mandle, jejichž vůně je charakteristická pro kyanid. Ovšem vůni kyanidu je schopno rozpoznat z genetických příčin pouze asi 40 – 60 % populace. Amygdalin sám o sobě nepředstavuje nebezpečí, pokud je uschován uvnitř semene. Jestliže je však obal semene narušen (např.

rozkousnutím) a dovnitř se dostane voda (ve slinách), aktivuje se kaskáda tří hydrolytických enzymů přítomných uvnitř semene, jejímž výsledným produktem je HCN (obr. 7).



Obr. 7 Hydrolyza amygdalinu probíhající ve 3 krocích [16].

První krok, katalyzovaný β -glukosidázou zvanou amygdalin lyáza, a druhý krok, katalyzovaný jinou β -glukosidázou, a to prunasin lyázou, jsou shrnuty do jednoho a jejich výsledkem je rozštěpení postupně obou β -glykosidických vazeb amygdalinu (I) (intermediát se nazývá prunasin) za vzniku 2 molekul glukózy a jedné molekuly mandelonitrilu (II). V posledním kroku hydroxynitril lyáza urychluje konverzi mandelonitrilu na benzaldehyd a HCN, která měřitelnou rychlostí probíhá i samovolně.

Toxicita kyanidu byla instinktivně rozpoznána již v době antiky, a proto se používal často jako jed, kyselina kyanovodíková byla ale poprvé izolována až v roce 1782, a to z barviva jménem pruská (berlínská) modř, od čehož byl odvozen také její název (řecké slovo *kyan* je označením pro modrou barvu), a o čtyři roky později švédský chemik Scheele demonstroval její toxicitu. Dnes už traviči kyanid nepoužívají kvůli jeho malé účinnosti, ale v chemickém průmyslu se ho spotřebovává obrovské množství, proto se náhodně mohou vyskytnout i otravy kyanidem. Největší množství kyanidu se používá na výrobu methylnmethakrylátu (ve formě polymeru plexisklo) a adiponitrilu, což je prekurzor nylonu. Oběti požárů domů či automobilů mají proto často v krvi zvýšenou hladinu kyanidu, jelikož dochází k uvolňování HCN při spalování organických polymerů obsahujících nitrilové skupiny [15]. Sodné a draselné soli se používají k extrakci zlata z rud, přičemž se ne vždy daří zacházet s nimi opatrně a dochází k únikům do životního prostředí. To se často rovná ekologické katastrofě. V posledních letech se udála především velká katastrofa v rumunském dole Baia Mare (2000), kdy došlo k úniku do řeky Tisy.

4.1.2. Mechanismus inhibice COX kyanidem

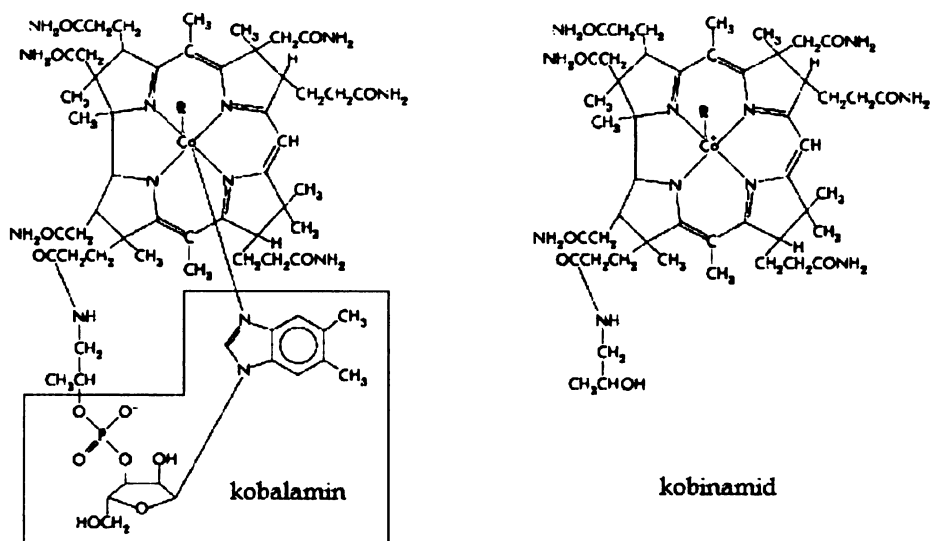
Obecně panuje shoda v tom, že kyanid se váže na plně oxidovanou COX velmi pomalu, kdežto na částečně redukovaný enzym, jenž se vyskytuje během katalytického cyklu, se váže s vysokou afinitou a velmi rychle [17]. Pro vazbu kyanidu na COX stačí vstup jednoho (1 - 1,3) elektronu do komplexu COX. Tento elektron se v inhibovaném enzymu nachází převážně v redoxních centrech cyt *a* a Cu_A , a to se stejnou pravděpodobností, protože jsou vždy v dynamické rovnováze, a proto cyt a_3 zůstává oxidován (3+), stejně tak Cu_B (2+) [17]. Za prvotní vazebné místo kyanidu na COX je považováno redoxní centrum Cu_B^{2+} , kde navázaný kyanid brání vstupu elektronů do binukleárního reakčního centra a následně

redukci kyslíku. Mezi kyanidem a kyslíkem nedochází ke kompetici, i když primárně oba ligandy interagují s Cu_B , jelikož se vážou na jeho odlišné oxidační stavy (kyslík se na rozdíl od kyanidu váže na plně redukované binukleární centrum COX) [18]. Tato fakta popírají již dříve publikované údaje, že kyanid se váže na oxidovaný cyt a_3^{3+} a že k tomu velmi rychle dochází, pouze pokud redoxní centra cyt a a Cu_A jsou redukována [17, 19].

4.1.3. Léčba kyanidové otravy založená na endogenních mechanismech detoxifikace organismu

Existuje několik typů antidot, která jsou založena na různých principech. Nejvýznamnější jsou tři skupiny - oxidační činidla generující methemoglobin, donory síry (např. thiosíran sodný), které podporují vlastní detoxifikační mechanismus organismu, jímž je konverze kyanidu na thiokyanatan enzymem sulfurtransferázou neboli rodanázou, a „scavengerová“ („vychytávací, odklízecí“) činidla, která jsou založena na kobaltu a váží se přímo na kyanid. Dosud nepanuje celosvětově jednotný názor na jejich účinnost, proto se jednotlivé státy liší v postupu léčby otravy kyanidem [15].

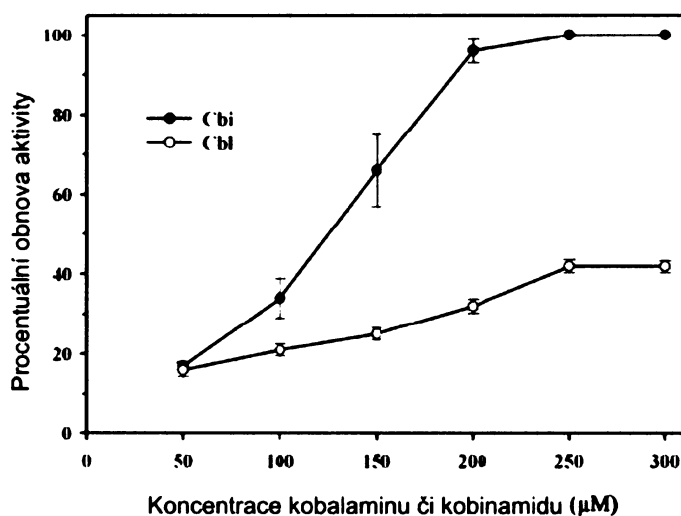
Před tím, než kyanid pronikne do nitra buněk, může být odstraněn z krevního řečiště navázáním na oxidovaný hemoglobin, tzv. methemoglobin, za vzniku netoxického kyanomethemoglobinu. Proto se jako antidotum podává dusitan sodný (intravenózně) či amylnitrit (k inhalaci), který oxiduje železnatý kation Fe^{2+} určité frakce hemoglobinu na kation železitý Fe^{3+} , a tím generuje methemoglobin, který má sice výrazně redukovanou afinitu ke kyslíku a není jej schopen transportovat, ale na druhou stranu silně váže kyanid přes Fe^{3+} . Při tomto postupu je nutné sledovat poměr hemoglobinu a methemoglobinu v krvi, při hladinách methemoglobinu nad 40 % totiž dochází k ohrožení života kvůli nedostatečnému transportu kyslíku ke tkáním. Ovšem test na methemoglobin nedetekuje kyanomethemoglobin, což ztěžuje použití dusitanů či jiných oxidantů hemoglobinu [20].



Obr. 8. Strukturální rozdíly kobalaminu a kobinamidu [21].

Také vitamin B_{12} neboli kobalamin s poměrně vysokou afinitou váže kyanid. Broderick et al. [21] zjistili, že kobinamid, což je předposlední prekurzor v biosyntéze kobalaminu, váže kyanid s asi 10^{10} krát

větší afinitou než samotný kobalamin a že rovněž při reverzi kyanidové inhibice oxidativní fosforylace v savčích buňkách *in vitro* byl kobinamid několikrát účinnějším detoxifikačním agens. Kobinamid se od kobalaminu strukturně liší tím, že postrádá dimethylbenzimidazolový nukleotid koordinovaný s centrálním kationtem kobaltu v dolní axiální pozici (obr. 8), v důsledku čehož má kobinamid horní i dolní stranu volnou pro vazbu ligandu, zatímco kobalamin pouze horní, a navíc dimethylbenzimidazolová skupina snižuje afinitu kobalaminu k ligandu. Celkový efekt rozdílu struktur je takový, že kobinamid má mnohem větší afinitu ke kyanidovému aniontu než kobalamin ($K_A \approx 10^{22} \text{ M}^{-1}$ vs. 10^{12} M^{-1}). Tento efekt se projevil rovněž tehdy, když vystavili permeabilizované buňky čínského křečka působení $250 \mu\text{M KCN}$, který téměř kompletně inhibuje respirační řetězec. Po přidání kobinamidu pozorovali vzrůst aktivity až k ekvimolární koncentraci kobinamidu a KCN, kdy došlo ke stoprocentní obnově respirační aktivity. Kobalamin při ekvimolární koncentraci obnovil respiraci na pouhých 42 % původní aktivity (obr. 9).



Obr. 9 Zvrat kyanidové inhibice respirace prostřednictvím kobalaminu (Cbl) a kobinamidu (Cbi) vyjádřený v procentech původní rychlosti respirace [21].

Na ose x koncentrace kobalaminu nebo kobinamidu (μM), v závislosti na ní vynesena obnova respirační aktivity v % původní hodnoty. Aktivita byla měřena jako spotřeba kyslíku kyslíkovou elektrodou v přítomnosti substrátů.

Hlavní cestou detoxifikace samotného organismu je činnost enzymu thiosíran/kyanid sulfurtransferázy (rodanázy) v mitochondriích, jež konvertuje kyanid na netoxický thiokyanatan SCN^- , který je posléze vyloučen z těla močí. Rodanáza je soustředěna především v játrech a ledvinách, kde je lokalizována v matrix mitochondrií. Podle všeho je v těle dostatečné množství tohoto enzymu na to, aby zabránilo letální inaktivaci COX, ovšem jako substrát vyžaduje sloučeniny obsahující síru, thiosírany, jejichž nedostatečný přísun značně snižuje kapacitu sulfurtransferázové reakce. Aktivitu intramitochondriálně lokalizované rodanázy lze zvýšit intravenózním podáním roztoku thiosíranu sodného, i když z teoretického hlediska je tento postup sporný, jelikož je známo, že thiosíran špatně prochází přes membrány [16].

Detoxifikační efekt vyvolaný podáním thiosíranu není uspokojivý, proto se Nagasawa et al. [22] pokusili vyvinout nová účinnější antidota využívající sulfurtransferázové reakce, konkrétně enzym

3-merkaptopyruvát/kyanid sulfurtransferázu. Jedná se o všudypřítomný enzym, lokalizovaný jak v cytoplazmě, tak v mitochondriích, jehož přirozeným substrátem je 3-merkaptopyruvát (3-MP), meziproduct degradace cysteinu. 3-MP je však chemicky velmi nestabilní, tudíž jako antidotum nepoužitelný. Problém nestability 3-MP je vyřešen podáním jeho prekurzorů, tj. derivátů 3-MP, které jsou modifikovány různými protektivními skupinami zvyšujícími jejich stabilitu. Experimenty provedené na myších vykazovaly velmi uspokojivé výsledky – prekurzory měly velmi dobré profylaktické účinky, pokud byly podány až hodinu před vystavením myši neletální dávce kyanidu (čím později, tím lepší účinky). Rovněž 5 minut po vystavení kyanidu vykazovaly lepší detoxifikační efekt než obecně užívané kobalamin a kombinace dusitanu a thiosíranu. Profylaktické účinky by mohly být využity zejména v případě hasičů a záchranářů, kteří se mají setkat s požárem. Výhodou prekurzorů 3-MP je, že jsou syntetizovány z dostupných materiálů, a proto by mohly být vyráběny ve velkém množství a široce k dispozici.

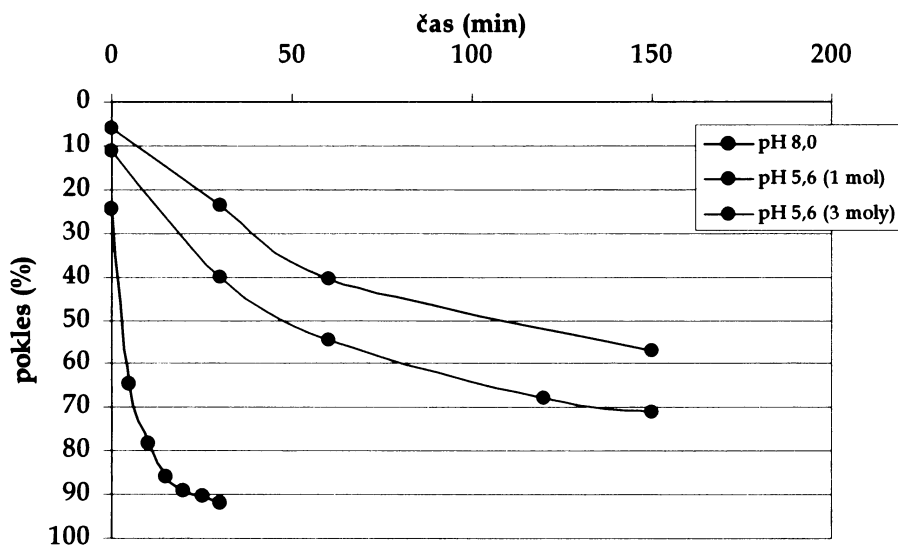
4.1.4. Reverzibilita kyanidové inhibice COX působením 2-oxokyselin

Jako první se tímto fenoménem zabýval Slater již v roce 1955 [14]. Nejprve titroval intaktní sarkozomy srdečního svalu potkana kyanidem, aby zjistil závislost rychlosti respirace vyjádřené jako spotřeba kyslíku na koncentraci kyanidu. Při dalších měřeních pozoroval, že rychlost respirace v médiu s 5 mM 2-oxoglutarátem (2-OG) a kyanidem o celkové koncentraci 0,875 mM koresponduje s rychlostí respirace při koncentraci volného kyanidu 0,0595 mM, tedy že přibližně 93 % kyanidu muselo být za vzniku kyanohydrinu vyvázáno 2-OG, přičemž reakce mezi 2-OG a kyanidem probíhala velmi pomalu. Po 3 min od přidání 2-OG byl úbytek kyanidu téměř nedetekovatelný, k ustavení rovnováhy došlo přibližně po 20 min.

Následně v roce 1955 Nosek et al. [24] sledovali polarograficky v čase úbytek kyanidu v roztoku jeho reakcí s různými sloučeninami nesoucími oxoskupiny, při které vznikají kyanohydriny. Ve dvou různých prostředích – kyselém (pH 5,6) a alkalickém (pH 8,0) – prověřili askorbát, glukózu, dihydroxyaceton a pyruvát. U všech sloučenin kromě pyruvátu byla reakce s kyanidem pomalá nebo až zanedbatelná a rozhodně nedostačující pro léčení otrav kyanidem. Pyruvát se ukázal být neúčinnější z této sestavy sloučenin, přičemž kinetika reakce mezi kyanidem a pyruvátem byla závislá na pH a v alkalickém prostředí probíhala téměř čtyřikrát rychleji (obr. 10). V experimentech na zvířatech poté ověřili zvýšení LD₅₀ (LD₅₀ je dávka, která je smrtelná pro 50 % experimentálních zvířat) kyanidu při současném podání pyruvátu (smíchan v ekvimolární koncentraci s KCN 60 min před podáním), který byl podáván krysám v roztocích opět o pH kyselém i alkalickém – při pH podávaného roztoku 3,2 hodnota LD₅₀ stoupla na 0,020 mg KCN/g, při pH 8,0 dokonce na 0,056 mg KCN/g (kontrolní LD₅₀ 0,011 mg KCN/g živé váhy), tedy přibližně pětikrát oproti kontrole.

Reverzi kyanidové inhibice COX pomocí 2-oxokyselin v *in vitro* experimentech s COX purifikovanou z hovězího srdce prověřovali Delhumeau et al. [25]. Oxalacetát v neutrálním pH nereagoval s kyanidy (reakce probíhá pouze za alkalických podmínek), pyruvát se ukázal být účinnější než 2-oxoglutarát. Po aplikaci 0,25 mM KCN, který kompletně inhibuje aktivitu purifikovaného enzymu, dosáhli maximální obnovy aktivity COX (tj. 25 – 30 % aktivity kontroly) účinkem 48 mM pyruvátu.

Následkem inhibice COX jako posledního článku dýchacího řetězce je také vyčerpání elektrochemického gradientu protonů na vnitřní mitochondriální membráně, a tedy inhibice ATP syntézy, jejíž obnovu proměřili na mitochondriích z potkaního srdce, jater a varlat. Při těchto experimentech se ukázalo, že by míra reverze aktivity COX pomocí 2-oxokyselin mohla záviset na koncentraci přítomného kyslíku – při vysoké koncentraci kyslíku byla ATP syntéza obnovena na 77 % původní hodnoty, při nízké koncentraci pouze na 15 %. To by mohlo vysvětlit lepší efekt 2-oxokyselin při léčbě obětí kyanidových otrav, pokud se současně použije kyslíková maska. Přímý vliv kyslíku na reakci kyanidu s 2-oxokyselinami je však velmi nepravděpodobný, důvodem spíše bude to, že je k dispozici vyšší koncentrace kyslíku pro neinhibované enzymy.



Obr. 10 Procentuální pokles koncentrace kyanidu reakcí s pyruvátém v čase [24].

Sledována reakce 1 molu KCN s pyruvátém – při pH 5,6 přidán 1 a 3 moly pyruvátu, při pH 8,0 přidán 1 mol pyruvátu. Polarograficky stanoven pokles koncentrace kyanidu oproti kontrole (samotný kyanid).

Clark et al. [26] provedli experimenty s obnovou aktivity COX po inhibici kyanidem sodným působením pyruvátu v mitochondriích intaktního hladkého svalstva. V médiu obsahujícím 10 mM glukózu jako substrát naměřili EC_{50} (EC_{50} je efektivní koncentrace kyanidu, která inhibuje 50 % respirace) pro inhibici kyanidem $0,11 \pm 0,02$ mM v hladkém svalstvu z karotidy prasete a $0,14 \pm 0,02$ mM v hladké svalovině žaludku morčete. Pokud byl v médiu jako substrát místo glukózy přítomen 10 mM pyruvát, EC_{50} se signifikantně zvýšilo na $6,52 \pm 0,11$ mM, resp. $1,95 \pm 0,30$ mM, stejně jako byl signifikantní rozdíl mezi těmito dvěma tkáněmi, což potvrzuje existenci tkáňových rozdílů v citlivosti COX k inhibici kyanidem, jež bývají pozorovány jako různá míra poškození jednotlivých orgánů u obětí kyanidové otravy a které nejspíše budou způsobeny různými tkáňovými izoformami jaderně kódovaných podjednotek.

V medicínské praxi se dnes nejčastěji používá kombinace thiosíranu a dusitanu, ale i tato léčba s sebou přináší vlastní negativní účinky, zmínit lze např. hypotenzi způsobenou dusitany. Proto Bhattacharya et al. [27] navrhli jako účinné kyanidové antidotum podávané perorálně 2-OG, se kterým provedli *in vivo* experimenty na potkanech. Protektivní efekt 2-OG byl nejvyšší při dávce 2 g/kg

hmotnosti a ještě byl zvýrazněn současným podáním thiosíranu sodného [28]. Tato dávka není toxická (LD_{50} 5 - 10 g/kg) a 2-OG proto může být uvažován jako vhodné antidotum. Jeho nevýhoda spočívá v tom, že musí být podán předem či současně s kyanidem, pokud byl podán již 5 minut po kyanidu, nevykazoval žádné protektivní účinky. 2-OG se tedy lépe uplatní spíše než u léčení akutních kyanidových otrav v prevenci chronického vystavení subletálním dávkám KCN, jež se může týkat pracovníků v chemickém průmyslu, kuřáků, či jedinců, v jejichž potravě se dlouhodobě vyskytují kyanogenní složky (např. amygdalin), a které Tulsawani et al. [29] simulovali na potkanech. Potkanům po dobu 14 dnů podávali denně 7 mg KCN/kg živé váhy, což je polovina LD_{50} . Jedné skupině experimentálních zvířat současně podávali 2-OG (1 g/kg), dalším thiosíran sodný (1 g/kg), anebo 2-OG a thiosíran současně. Ve všech případech vystavení kyanidu byly zjištěny zvýšené hladiny thiokyanatanu v krvi, jelikož přirozeným obranným mechanismem organismu je konverze kyanidu na thiokyanatan, která může být stimulována podáním thiosíranu. 2-OG, který reaguje s kyanidem za vzniku kyanohydrinů, a tím snižuje koncentraci volného kyanidu, který inhibuje COX, a thiosíran samy o sobě vykazaly určitý protektivní efekt vůči účinkům kyanidu, ale jejich současné použití bylo neefektivnější.

4.2. Další inhibitory cytochrom c oxidázy

4.2.1. Oxid dusnatý

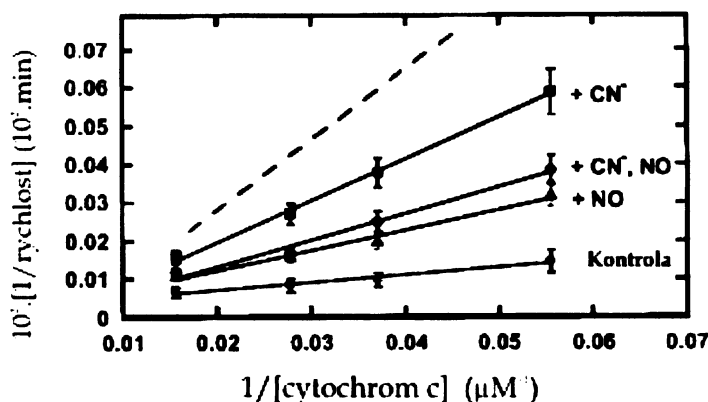
Oxid dusnatý (NO) je důležitou endogenní signální molekulou, ale zároveň může být za určitých podmínek toxický - jedním z cílů jeho toxicity je rovněž COX. Počáteční stádium inhibice NO má velice rychlý průběh, přičemž míra inhibice nezávisí na absolutní koncentraci NO, nýbrž na poměru koncentrací O_2/NO . NO se váže na reakční intermediát COX s částečně redukováným binukleárním centrem cyt a_3-Cu_B . Vazba s největší pravděpodobností zahrnuje tvorbu komplexu s redukováným atomem Fe^{2+} cyt a_3 . Rychlostní konstanty pro vazbu O_2 i NO na plně redukovanou COX mají podobnou hodnotu ($k_{O_2} = 2.10^8 M^{-1}s^{-1}$, $k_{NO} = 4.10^7 M^{-1}s^{-1}$). Jednoduchá kompetice mezi O_2 a NO při vazbě na plně redukovanou COX by navíc byla ve sporu s počáteční vysokou rychlostí inhibice. Proto byla předpovězena a poté také prokázána existence intermediátu, jehož afinita vůči NO je výrazně vyšší než vůči O_2 . Poloviční inhibice COX při „steady-state“ podmínkách je dosažena při poměru koncentrací $O_2/NO \sim 30$. V přítomnosti kyslíku dochází ke zvratu inhibice, ale mechanismem není přímá reakce kyslíku s NO vázaným v binukleárním centru enzymu, jelikož obnova aktivity probíhá rychlostí disociace NO ($k = 0,13 s^{-1}$). Jinými slovy, disociace NO z redukováného cyt a_3 probíhá stejnou rychlostí v přítomnosti i nepřítomnosti kyslíku. Teprve disociovaný NO je zneškodňován reakcí s O_2 ($4 NO + O_2 + 2 H_2O \rightarrow 4 NO_2 + 4 H^+$), takže se nemůže opět navázat na COX [30].

4.2.2. Reakce COX v přítomnosti kyanidu i NO současně

Pearce et al. [31] studovali efekt současného působení kyanidu a NO na COX, přičemž se ukázalo, že inhibiční efekt NO a kyanidu na COX není aditivní, nýbrž NO ve skutečnosti eliminuje kyanidovou inhibici COX, a to v přítomnosti nadbytku redukováného cyt c a kyslíku (obr. 11). Přidání

NO k částečně redukované bovinní COX inhibované kyanidem vede k záměně kyanidu na oxidovaném cyt a_3 za NO při současné redukci hemu, čímž vzniká tzv. nitrosylferrohem a_3 .

Při experimentech s NO i kyanidem se projevila bifazická kinetika COX - v počáteční fázi srovnatelné rychlosti jako v přítomnosti pouze NO, zatímco později identické s rychlostmi pozorovanými pouze s kyanidem (data nejsou na obr. 11). Tuto skutečnost lze vysvětlit tak, že NO vytěsňuje vázaný kyanid, ten však v médiu zůstává a jakmile je veškerý dostupný NO oxidován COX, projeví se pouze inhibiční účinky kyanidu na kinetiku COX. Podle Pearce et al. [31] by to mohlo vysvětlit výsledky z jiných laboratoří, podle nichž ledviny obětí kyanidové otravy nevykazují žádné signifikantní ireverzibilní poškození a v mitochondriích mozkových buněk letální dávky kyanidu inhibují aktivitu COX pouze z 50 %. Ovšem může jít také jen o přítomnost nadbytku COX jako „funkční rezervy“. Nicméně objevení mitochondriální NO syntázy vyvolalo řadu otázek ohledně možné regulace dýchacího řetězce oxidem dusnatým. NO vznikající v mitochondriích by mohl chránit COX odstraněním vázaného kyanidu, který by pak mohl být odstraněn relativně pomalou sulfurtransferázovou reakcí, nebo by mohl difundovat do krevního řečiště, kde by byl odstraněn navázáním na methemoglobin.



Obr. 11 Enzymatická aktivita COX v přítomnosti NO a kyanidu vyjádřená Lineweaverovým-Burkovým výnosem, měřená spektrofotometricky jako úbytek redukováného cyt c při 550 nm [31] (COX 50 nM, 22 °C, 0,1 M fosfátový pufr, 0,05% laurylmaltosid, pH 7,4).

■ 100 nM kyanid inhibuje výrazně aktivitu COX ve srovnání s kontrolou (●), ▲ 1 μM NO v menší míře. Když je 1 μM NO přidán do reakční směsi se 100 nM kyanidem (◆), aktivita se oproti samotnému kyanidu zvýší, tudíž NO působí proti inhibičnímu účinku kyanidu. Čárkovaná čára zobrazuje očekávaný výsledek pro aditivní inhibiční efekt NO a kyanidu.

K poněkud odlišným výsledkům došli Leavesley et al. [32]. IC_{50} kyanidu (tj. koncentrace kyanidu, která inhibuje aktivitu z 50%) pro spotřebu kyslíku ($13,2 \pm 1,8 \mu\text{M}$) byla vyšší než IC_{50} kyanidu pro aktivitu COX ($7,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$), což odpovídá tomu, že je potřeba zainhibovat 60% aktivity COX, aby se to projevilo snížením spotřeby kyslíku. Přidání vysokých koncentrací exogenního NO zmírnilo kyanidovou inhibici jak COX, tak celkové respirace. Pokud naopak byla blokována produkce endogenního NO prostřednictvím inhibitoru NO syntázy, IC_{50} kyanidu pro respiraci i COX se zvýšilo na $59,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$, resp. $102 \pm 10 \mu\text{M}$, tedy konstitutivní produkce malého množství endogenního NO podporuje kyanidovou inhibici.

4.2.3. Částečné a nespecifické inhibitory COX

COX je inhibována rovněž sulfidy, azidy, hydroxylaminem a oxidem uhelnatým (CO). Sulfidy jsou stejně účinné inhibitory COX jako kyanid, ale na rozdíl od něj nereagují s oxokyselinami; azidy, hydroxylamin a CO inhibují pouze částečně [23].

Dikarbanonaboráty, lipofilní anionty, které se snadno inkorporují do membrán, inhibují mj. aktivitu mitochondriálních membránově vázaných komplexů ATPázy, sukcinát dehydrogenázy, glycerolfosfát dehydrogenázy a v neposlední řadě COX, přičemž se uplatňují u různých enzymů různé mechanismy inhibice, jak se zdá z kinetických studií. Na rozdíl od ATPázy a glycerolfosfát dehydrogenázy se v případě COX nejedná o kompetitivní inhibici, kdy by se dikarbanonaboráty vázaly na vazebné místo pro cyt *c*, ale zřejmě nespecificky interagují s komplexem COX či pozměňují jeho fosfolipidové okolí, a tím inhibují aktivitu COX [33].

Závěr

Při léčbě kyanidových otrav se vychází z mechanismů přirozené detoxifikace v organismu (využití sulfurtransferázové reakce, vazba kyanidu na methemoglobin či na kobalamin a jeho deriváty). V současnosti je vynakládána snaha již zavedené postupy zdokonalit. Jednotlivé státy se liší v léčbě kyanidových otrav, které se nejčastěji vyskytují v průmyslové výrobě, protože nepanuje jednotný názor na to, která ze zavedených antidot jsou nejúčinnější. Nejčastěji se používá kombinace dusitanu sodného oxidujícího hemoglobin na methemoglobin, který má vysokou afinitu ke kyanidu, a thiosíranu sodného, jenž stimuluje sulfurtransferázovou reakci transformující kyanid na thiokyanatan. Na ověření čekají nově vyvinutá antidota, kobinamid přímo vyvazující volný kyanid a 3-MP, substrát pro jiný typ sulfurtransferázy, která by měla mít výrazně vyšší detoxifikační účinek. Zásadní úlohu při kyanidových otravách ovšem hraje čas – aby byla antidota účinná, musí být podána velmi brzy po otravě. Obecně lze také říci, že jednotlivá antidota sama o sobě nevykazují tak dobrý účinek, jako když jsou podána současně, čímž je stimulováno více detoxifikačních mechanismů najednou.

Reakce 2-oxokyselin s kyanidem, při níž dochází ke vzniku kyanohydrinů, je sice známa již od 50. let minulého století, ale teprve v posledním desetiletí se začaly provádět *in vitro* i *in vivo* experimenty kladoucí si za cíl zodpovědět otázku, zda by 2-oxokyseliny mohly být využity k účinné léčbě při kyanidových otravách. Velmi dobré protektivní účinky 2-OG vykazoval v případě, že byl podáván před vystavením kyanidu. 2-OG by tedy mohl nalézt využití v prevenci chronického vystavení subletálním dávkám KCN, jež se může týkat pracovníků v chemickém průmyslu, kuřáků, či jedinců, v jejichž potravě se dlouhodobě vyskytují kyanogenní složky (např. amygdalin). Stále však není zcela objasněn mechanismus působení 2-oxokyselin při kyanidových otravách. Nabízí se totiž otázka, zda 2-oxokyseliny reagují pouze s volným kyanidem v médiu, či mají schopnost vyvázat kyanid z vazebného místa na COX. Užitečné by rovněž bylo zodpovědět otázku nastolenou Delhumeau et al. [25], zda na reakci kyanidu s 2-oxokyselinami má vliv koncentrace kyslíku, případně jaký.

Navíc Arun et al. [34] poukázali na to, že může docházet k samovolnému úniku kyanidu z média ve formě plynného kyanovodíku. Během jejich *in vitro* experimentů, ve kterých buněčnou kulturu vystavovali působení NaCN, zjistili, že kyanid interaguje s některými složkami kultivačního média (především s glukózou a aminokyselinami), jež poskytují proton ke zformování HCN. HCN je rozpustný při vyšším pH, ale při poklesu pH k hodnotě 7 se jeho rozpustnost dramaticky snižuje. Koncentrace kyanidu v médiu byla proto při fyziologickém pH 7,4 a teplotě 37 °C snížena o 80 – 90 % během 2 hodin. Ztrátu kyanidu z roztoku lze redukovat inkubací v uzavřených zkumavkách. Nicméně předchází *in vitro* studie s kyanidem s dlouhou inkubační dobou provedené v otevřených nádobách, kde tudíž byla umožněna výměna plynů mezi médiem a atmosférou, vyžadují přehodnocení, jelikož efektivní koncentrace kyanidu v médiu byla mnohem nižší, než bylo uvedeno.

V této práci jsem se snažila nastínit, že v oblasti kyanidové inhibice COX se vyskytuje mnoho zajímavých a dosud nezodpovězených otázek, přičemž odpovědi na ně by mohly zlepšit a zefektivnit léčbu kyanidových otrav.

Seznam použité literatury

1. Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F., *Mitochondrial evolution*. Science, 1999. 283(5407): p. 1476-81.
2. Frey, T.G., Renken, C.W., and Perkins, G.A., *Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1555(1-3): p. 196-203.
3. Schagger, H., *Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1555(1-3): p. 154-9.
4. Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Huttemann, M., Lee, I., and Kadenbach, B., *Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation*. ChemBiochem, 2001. 2(6): p. 392-403.
5. Kadenbach, B., Kuhn-Nentwig, L., and Büge, U., *Evolution of a Regulatory Enzyme: Cytochrome-c Oxidase (Complex IV)*. Current topics in bioenergetics, 1987. 15: p. 113 - 161.
6. Abramson, J., Svensson-Ek, M., Byrne, B., and Iwata, S., *Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2001. 1544(1-2): p. 1-9.
7. Vijayarathy, C., Biunno, I., Lenka, N., Yang, M., Basu, A., Hall, I.P., and Avadhani, N.G., *Variations in the subunit content and catalytic activity of the cytochrome c oxidase complex from different tissues and different cardiac compartments*. Biochim Biophys Acta, 1998. 1371(1): p. 71-82.
8. Hosler, J.P., Ferguson-Miller, S., and Mills, D.A., *Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes*. Annu Rev Biochem, 2006. 75: p. 165-87.
9. Kadenbach, B., Huttemann, M., Arnold, S., Lee, I., and Bender, E., *Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase*. Free Radic Biol Med, 2000. 29(3-4): p. 211-21.
10. Drahota, Z., Milerova, M., Stieglerova, A., Houstek, J., and Ostadal, B., *Developmental changes of cytochrome c oxidase and citrate synthase in rat heart homogenate*. Physiol Res, 2004. 53(1): p. 119-22.
11. Drahota, Z., Milerova, M., Stieglerova, A., Skarka, L., Houstek, J., and Ostadal, B., *Development of cytochrome-c oxidase activity in rat heart: downregulation in newborn rats*. Cell Biochem Biophys, 2005. 43(1): p. 87-94.
12. Burke, P.V. and Poyton, R.O., *Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase*. J Exp Biol, 1998. 201(Pt 8): p. 1163-75.
13. Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J.W., Shimoda, L., Dang, C.V., and Semenza, G.L., *HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells*. Cell, 2007. 129(1): p. 111-22.
14. Slater, E.C., *Phosphorylation coupled with the oxidation of alpha-ketoglutarate by heart-muscle sarcosomes. 3. Experiments with ferricytochrome c as hydrogen acceptor*. Biochem J, 1955. 59(3): p. 392-405.
15. Cummings, T.F., *The treatment of cyanide poisoning*. Occup Med (Lond), 2004. 54(2): p. 82-5.
16. Labianca, D.A., *On the Nature of Cyanide Poisoning*. J. Chem. Educ., 1979. 56: p. 788 - 791.
17. Jones, M.G., Bickar, D., Wilson, M.T., Brunori, M., Colosimo, A., and Sarti, P., *A re-examination of the reactions of cyanide with cytochrome c oxidase*. Biochem J, 1984. 220(1): p. 57-66.

18. Wilson, M.T., Antonini, G., Malatesta, F., Sarti, P., and Brunori, M., *Probing the oxygen binding site of cytochrome c oxidase by cyanide*. J Biol Chem, 1994. 269(39): p. 24114-9.
19. Jensen, P., Wilson, M.T., Aasa, R., and Malmstrom, B.G., *Cyanide inhibition of cytochrome c oxidase. A rapid-freeze e.p.r. investigation*. Biochem J, 1984. 224(3): p. 829-37.
20. Beasley, D.M. and Glass, W.I., *Cyanide poisoning: pathophysiology and treatment recommendations*. Occup Med (Lond), 1998. 48(7): p. 427-31.
21. Broderick, K.E., Potluri, P., Zhuang, S., Scheffler, I.E., Sharma, V.S., Pilz, R.B., and Boss, G.R., *Cyanide detoxification by the cobalamin precursor cobinamide*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. 231(5): p. 641-9.
22. Nagasawa, H.T., Goon, D.J., Crankshaw, D.L., Vince, R., and Patterson, S.E., *Novel, orally effective cyanide antidotes*. J Med Chem, 2007. 50(26): p. 6462-4.
23. Slater, E.C., *Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation*. Methods Enzymol, 1967. 10: p. 48 - 57.
24. Nosek, J., Chmelar, V., and Ledvina, M., *[Antide in cyanide poisoning; effect of ascorbic acid, ferronate C, glucose, dioxycetone and pyrrolic acid on the course of experimental poisoning.]*. Cesk Fysiol, 1957. 6(1): p. 87-94.
25. Delhumeau, G., Cruz-Mendoza, A.M., and Gomez Lojero, C., *Protection of cytochrome c oxidase against cyanide inhibition by pyruvate and alpha-ketoglutarate: effect of aeration in vitro*. Toxicol Appl Pharmacol, 1994. 126(2): p. 345-51.
26. Clark, J.F., Matsumoto, T., and Nakayama, S., *Intact smooth muscle metabolism: its responses to cyanide poisoning and pyruvate stimulation*. Front Biosci, 2000. 5: p. A18-23.
27. Bhattacharya, R., Kumar, D., Sugendran, K., Pant, S.C., Tulsawani, R.K., and Vijayaraghavan, R., *Acute toxicity studies of alpha-ketoglutarate: a promising antidote for cyanide poisoning*. J Appl Toxicol, 2001. 21(6): p. 495-9.
28. Bhattacharya, R., Rao, P.V., and Vijayaraghavan, R., *In vitro and in vivo attenuation of experimental cyanide poisoning by alpha-ketoglutarate*. Toxicol Lett, 2002. 128(1-3): p. 185-95.
29. Tulsawani, R.K., Debnath, M., Pant, S.C., Kumar, O., Prakash, A.O., Vijayaraghavan, R., and Bhattacharya, R., *Effect of sub-acute oral cyanide administration in rats: protective efficacy of alpha-ketoglutarate and sodium thiosulfate*. Chem Biol Interact, 2005. 156(1): p. 1-12.
30. Brunori, M., Forte, E., Arese, M., Mastronicola, D., Giuffre, A., and Sarti, P., *Nitric oxide and the respiratory enzyme*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1757(9-10): p. 1144-54.
31. Pearce, L.L., Bominaar, E.L., Hill, B.C., and Peterson, J., *Reversal of cyanide inhibition of cytochrome c oxidase by the auxiliary substrate nitric oxide: an endogenous antidote to cyanide poisoning?* J Biol Chem, 2003. 278(52): p. 52139-45.
32. Leavesley, H.B., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J.L., and Isom, G.E., *Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity*. Toxicol Sci, 2008. 101(1): p. 101-11.
33. Drahota, Z., Vrbacky, M., Rauchova, H., and Kalous, M., *Inhibition of mitochondrial cytochrome C oxidase by dicarbanonorates*. Biochem Mol Biol Int, 1996. 39(6): p. 1267-73.
34. Arun, P., Moffett, J.R., Ives, J.A., Todorov, T.I., Centeno, J.A., Namboodiri, M.A., and Jonas, W.B., *Rapid sodium cyanide depletion in cell culture media: outgassing of hydrogen cyanide at physiological pH*. Anal Biochem, 2005. 339(2): p. 282-9.

Příloha

Obnova aktivity cytochrom *c* oxidázy inhibované kyanidem prostřednictvím pyruvátu

*Reversal of cyanide inhibition of cytochrome *c* oxidase by pyruvate*

Nůsková H., Pecina P., Drahotka Z., Houštěk J.

Oddělení Bioenergetiky, Fyziologický ústav AV ČR, Praha

Aktivita terminálního enzymu dýchacího řetězce cytochrom *c* oxidázy (COX) je inhibována kyanidem. Tato inhibice je reverzibilní při podání 2-oxokyselin, které s kyanidem reagují za vzniku kyanohydrinů.

Na mitochondriích izolovaných z jater potkana jsme se pokusili získat další informace o obnově aktivity COX inhibované KCN prostřednictvím pyruvátu. Pomocí oxygrafu OROBOROS jsme vyšetřovali rychlost respirace závislé jak na sukcinátu, tak na askorbátu + TMPD. Sukcinátovou respiraci inhibovanou kyanidem o koncentraci 0,25 mM, který kompletně inhibuje aktivitu COX, lze pyruvátem obnovit na 100 % původní rychlosti. Zato vlastní aktivita COX vyjádřená jako respirace závislá na askorbátu + TMPD je obnovitelná maximálně na 40 % původní aktivity. Tyto hodnoty odpovídají tomu, že COX je v nadbytku nad ostatními enzymy dýchacího řetězce a inhibice COX se neprojeví snížením rychlosti sukcinátové respirace, pokud COX není inhibována více než ze 70 %. 40% obnova aktivity COX tedy plně dostačuje k úplné obnově rychlosti sukcinátové respirace.

Dále jsme vyloučili vliv koncentrace kyslíku na účinnost zvratu kyanidové inhibice COX pyruvátem. Stanovením p_{50} (tj. parciálního tlaku kyslíku, při němž je aktivita COX 50% vzhledem k maximální aktivitě) na sukcinátové respiraci jsme zjistili, že vazba kyanidu ovlivňuje enzymatickou kinetiku COX. Po obnově aktivity COX pyruvátem byla hodnota p_{50} zvýšena až desetinásobně. Je tedy možné, že kyanohydrin vytvořený reakcí pyruvátu a KCN je stále vázán v aktivním centru COX a ovlivňuje vazbu kyslíku.

REVERSAL OF CYANIDE INHIBITION OF CYTOCHROME C OXIDASE BY PYRUVATE

Hana Nářková, Petr Pech, Zdeněk Drahoš, Josef Houšťák

Department of Bioenergetics, Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

INTRODUCTION

The cytochrome c oxidase (COX) is the terminal enzyme of the mitochondrial electron transport chain, which transfers electrons from reduced cytochrome c to molecular oxygen. Its activity is strongly inhibited by KCN. The inhibition of COX activity by KCN is reversible in the presence of high concentrations of pyruvate. The reversal of KCN inhibition of COX activity was observed also in *in vivo* experiments as an increase in LDH activity in heart mitochondria (Drahoš et al., 1987).

We studied rat liver, heart and brain mitochondria. Differences in activity showed that COX was present only in heart mitochondria. The reversal of KCN inhibition of COX activity by pyruvate was observed in heart mitochondria. The reversal of KCN inhibition of COX activity by pyruvate was observed in heart mitochondria. The reversal of KCN inhibition of COX activity by pyruvate was observed in heart mitochondria.

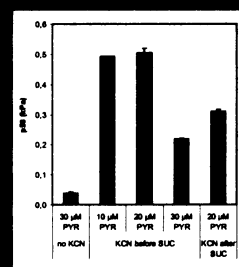
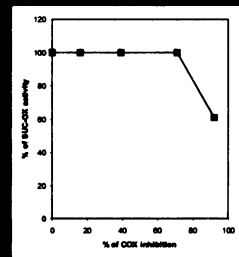
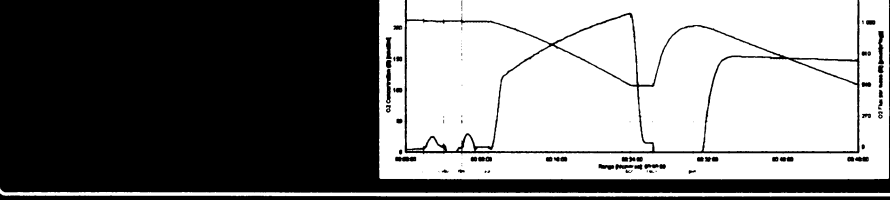
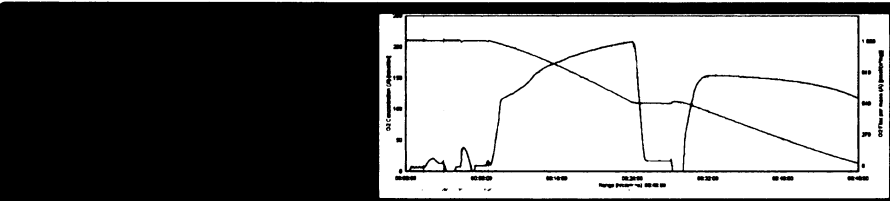
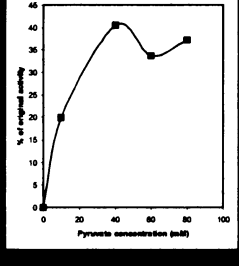
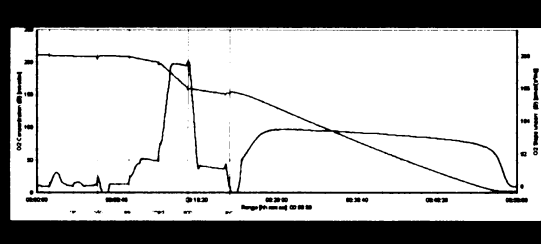
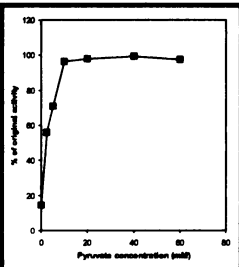
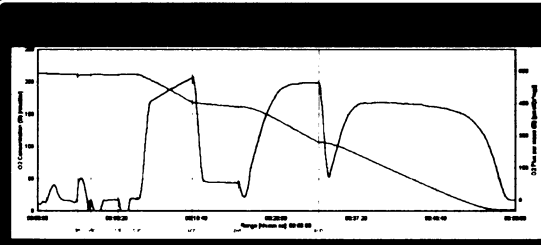
As determined by electron microprobe analysis, the concentration of pyruvate in heart mitochondria was 100 μM. The concentration of pyruvate in heart mitochondria was 100 μM. The concentration of pyruvate in heart mitochondria was 100 μM.

MATERIALS AND METHODS

Organic solvents and reagents were of the highest quality available. KCN was from Fluka, pyruvate from Sigma. The heart mitochondria were isolated from rat heart as described previously (Drahoš et al., 1987). The protein content was determined by the method of Lowry (1956). The activity of COX was measured by the method of Chance and Williams (1956). The activity of LDH was measured by the method of Bergmeyer (1970). The activity of COX was measured in the presence of KCN and pyruvate. The activity of COX was measured in the presence of KCN and pyruvate.

RESULTS

Figure 1 shows the effect of pyruvate on the activity of COX in heart mitochondria. The activity of COX was measured in the presence of KCN and pyruvate. The activity of COX was measured in the presence of KCN and pyruvate. The activity of COX was measured in the presence of KCN and pyruvate.



DISCUSSION

The results of this study show that pyruvate reverses the inhibition of COX by KCN in heart, liver, and brain mitochondria. The reversal of KCN inhibition of COX activity by pyruvate was observed in heart mitochondria. The reversal of KCN inhibition of COX activity by pyruvate was observed in heart mitochondria.