

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**Studium změn energetického metabolismu hepatocytů:
působení oxidačního stresu a trijodtyroninu**

René Endlicher

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program

Fyziologie a patologická fyziologie

Hradec Králové, 2010

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního a kombinovaného* studia doktorského studijního programu fyziologie a patologická fyziologie na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. René Endlicher
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze,
Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel: Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze,
Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel konzultant: RNDr. Zdeněk Drahoš, DrSc.
Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20
Praha 4

Oponenti: Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.
Katedra buněčné biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze,
Viničná 7, 128 00 Praha 2

MUDr. Hana Rauchová, CSc.
Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i. a Centrum výzkumu
chorob srdce a cév, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Tato práce vznikla na základě finanční podpory vnitřního grantu Lékařské fakulty s podporou firmy Roche a grantu MSM VZ 0021620820, GAČR 303/03/H065 a GAUK 90/2006 C

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu fyziologie a patologická fyziologie

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	4
1. SOUHRN	5
2. SUMMARY	6
3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	7
3.1. Toxické poškození jater	7
3.2. Mitochondrie a ROS	7
3.3. <i>Mitochondrial permeability transition pore</i>	8
3.4. MPTP a buněčná smrt	9
4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	9
5. MATERIÁL A METODIKA	10
6. VÝSLEDKY	12
6.1. Peroxidační poškození kultivovaných hepatocytů t-BHP	12
6.2. Vliv oxidačního stresu na energetický metabolismus hepatocytů	12
6.3. Působení oxidačního stresu na funkci respiračního řetězce izolovaných mitochondrií	12
6.4. Mitochondriální pór přechodné permeability (<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore - MPTP</i>) jako součást mechanismů, indukujících poškození hepatocytů	13
7. DISKUZE	15
8. ZÁVĚRY	20
9. POUŽITÁ LITERATURA	21
10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA	25
Původní články	25
Statě ve sbornících	26
Přednášky na odborných setkáních	27

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
ANT	adeninnukleotidový translokátor
APAF-1	<i>apoptosis protease activating factor 1</i>
ATP	adenosintrifosfát
COX	cytochrom c oxidáza
CsA	cyklosporin A
dATP	deoxyadenosintrifosfát
EGTA	kyselina ethylenglykoldiamintetraoctová
FAD	flavinadenindinukleotid
LDH	laktátdehydrogenasa
MDA	malondialdehyd
MMP	mitochondriální membránový potenciál
MPT	<i>mitochondrial permeability transition</i>
MPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
NAD ⁺	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
O ₂ ⁻	superoxidový radikál
Pi	anorganický fosfát
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
RNS	reaktivní sloučeniny dusíku (<i>reactive nitrogen species</i>)
T ₃	trijodtyronin
TBA	2-thiobarbiturová kyselina
t-BHP	terciární butylhydroperoxid
UCP	<i>uncoupling protein</i>
VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i>

1. SOUHRN

Studium změn energetického metabolismu hepatocytů: působení oxidačního stresu a trijodtyroninu

Játra jsou životně důležitým orgánem, vzhledem ke svému postavení v cirkulaci se dostávají ve zvýšené míře do styku s řadou toxických látek, které mohou způsobit poškození hepatocytů. Mechanismy odpovědné za poškození hepatocytů jsou různé, avšak jedním z nejvýznamnějších mechanismů hepatotoxického účinku je oxidační stres způsobený zvýšenou produkcí volných radikálů. Jedním z cílů působení toxických látek je respirační řetězec mitochondrií s následným narušením energetického metabolismu buňky. Působení oxidačního stresu na buňky je velmi komplexní a jeho mechanismy nejsou dosud zcela objasněny.

Cílem naší práce bylo proto sledovat dopad oxidačního stresu na energetický metabolismus hepatocytů na modelu izolovaných buněk a izolovaných mitochondrií. Hodnotili jsme vliv oxidačního stresu na aktivitu enzymů dýchacího řetězce a na funkci mitochondriálního póru přechodné permeability (MPTP - *mitochondrial permeability transition pore*), jehož otevření indukuje kaskádu apoptotických a nekrotických procesů. Získané výsledky prokázaly selektivní působení oxidačního stresu na aktivitu enzymů dýchacího řetězce. Tert-butylhydroperoxid (t-BHP) signifikantně inhibuje oxidaci NADH-dependentních substrátů, zatímco oxidace flavoprotein-dependentního substrátu sukcinátu není narušena. Podstatné rozdíly jsme pozorovali i v případě oxidace jednotlivých NADH-dependentních substrátů.

Pro posouzení funkce MPTP jsme zavedli novou metodu hodnocení, která dosud nebyla v literatuře publikována. Tato metoda převádí klasické křivky bobtnání, znázorňující pokles absorbance suspenze mitochondrií, do derivované formy. To umožňuje lépe hodnotit kinetiku procesu bobtnání. Pomocí této metody lze získat přesné údaje o maximální rychlosti bobtnání mitochondrií a o době, kdy je této maximální rychlosti dosaženo. Touto metodou jsme hodnotili především interakci různých faktorů, o kterých je známo, že ovlivňují MPTP (Ca^{2+} , PO_4^{3-} , t-BHP a T_3 (trijodtyronin)). Získali jsme přesnější údaje o vzájemném působení vápníku a fosfátu na rychlost bobtnání a o aktivačním účinku t-BHP na tento děj. Doplnili jsme i údaje o vlivu T_3 na aktivaci MPTP. Bobtnání indukované Ca^{2+} , t-BHP a T_3 , popř. kombinací těchto faktorů lze zcela inhibovat cyklosporinem A - specifickým inhibitorem MPTP, což prokazuje, že toto bobtnání vzniká v důsledku otevření MPTP.

2. SUMMARY

Changes of energy metabolism of hepatocytes: The effect of oxidative stress and triiodothyronine

Liver is a vital organ performing numerous essential functions. Due to its position in the blood circulation, liver is the first organ incessantly exposed to a great number of toxic substances. Respiratory chain located in mitochondria is a frequent target of toxic action of these substances. There are various mechanisms that participate in hepatocyte damage, nevertheless the most important mechanism of hepatotoxic effect is oxidative stress induced by increased production of free radicals. Impact of oxidative stress on hepatocytes is very complex and still not fully elucidated.

The aim of my thesis was to investigate the effect of oxidative stress on energy metabolism of rat hepatocytes using isolated hepatocytes and isolated mitochondria. We evaluated the effect of oxidative stress on the activity of mitochondrial enzymes and function of mitochondrial permeability transition pore (MPTP), respectively. Opening of this pore induces activation of apoptotic and necrotic processes. Our results document selective action of oxidative stress on the activity of various mitochondrial enzymes. Tert-butylhydroperoxide (t-BHP) causes significant inhibition of NADH-dependent substrates, while oxidation of flavoprotein-dependent substrate - succinate is not impaired. We also found substantial differences in the inhibition of various NADH-dependent substrates tested.

To evaluate function of MPTP we introduced a new method, which was not published yet. This method converts classical swelling curves depicting decrease of absorbance in mitochondrial suspension to derivation form. Such conversion enables better evaluation of kinetics of mitochondrial swelling; we can obtain data about maximal velocity of the swelling process and time required to reach this maximal rate. Using this method we assessed interaction of different factors that affect MPTP opening. We obtained more accurate data about mutual interactions of calcium and phosphate on the swelling rate and about potentiating effect of t-BHP and triiodothyronine. Using Cyclosporine A – a specific inhibitor of MPTP we confirmed that all described activating effects on mitochondrial swelling are connected to the opening of MPTP.

3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

3.1. Toxické poškození jater

Játra jsou místem biotransformace a eliminace řady látek exogenního i endogenního původu. Jsou tak významně exponována případnému toxickému účinku těchto látek. Mezi modelové hepatotoxické látky patří např. tetrachlormethan, galaktosamin, thioacetamid, acetaminofen a další. Biotransformačními procesy vznikají někdy toxičtější intermediáty ve srovnání s původní molekulou. Často jediným nebo významně participujícím mechanismem hepatotoxického účinku je zvýšená tvorba reaktivních radikálů.

Většina volných radikálů jsou deriváty kyslíku – reactive oxygen species (ROS) a deriváty dusíku – reactive nitrogen species (RNS). Jsou to velmi reaktivní látky, které obsahují jeden, nebo více nepárových elektronů a jsou schopné nezávislé existence (Southorn a Powis, 1988). Tyto látky jsou velmi heterogenní a vznikají ve velké míře při patologických procesech. Volné radikály vznikají všude tam, kde dochází k buněčnému poškození, ale velké množství vzniká v organismu i za fyziologických podmínek (Dröge, 2002). Jsou to látky, které velmi ochotně reagují s různými organickými molekulami (mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, nukleovými kyselinami, ale i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a dalších látek).

Díky jejich reaktivitě se volné radikály staly velmi významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitního systému a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky, které oxidují buněčné komponenty a vedou k poškození nebo až ke smrti buněk (Thannickal a Fanburg, 2000).

3.2. Mitochondrie a ROS

Bylo prokázáno, že většina hepatotoxických látek způsobuje peroxidační poškození buněk (Jaeschke et al., 2002). Buňky produkují ROS různými enzymovými i neenzymovými reakcemi. Mitochondrie jsou považovány za jednoho z největších zdrojů ROS v buňce (Boveris a Chance, 1973; Turrens, 2003). Uvádí se, že 1 - 2% O_2 konzumovaného mitochondriemi podléhá jedoelektronové redukci za vzniku superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), což je prekurzor ostatních ROS (Boveris a Chance, 1973). Produkce ROS je komplexně regulovaná elektrochemickým membránovým potenciálem a závisí na aktivitě respirace (Brookes et al., 2005; Nohl et al., 2005; Starkovet a Fiskum, 2003). Za nejvýznamnější producenty ROS jsou považovány komplex I, který tvoří $O_2^{\cdot-}$ na matrixové straně, a komplex III, který produkuje $O_2^{\cdot-}$ autooxidací ubisemichinonu na obou stranách membrány (Brookes et al., 2005; Han et al., 2003; St-Pierre et al., 2002). $O_2^{\cdot-}$ vznikající na matrixové straně neproniká membránou a zůstává v matrix. $O_2^{\cdot-}$ produkovaný na vnější straně se může do cytosolu dostat přes VDAC (voltage dependent anion channel) (Han et al., 2003). Za vysokého membránového potenciálu je respirace inhibována, prodlužuje se životnost redukováných elektronových přenašečů a roste produkce ROS. Mírné rozpřažení oxidativní fosforylace stimuluje respiraci a snižuje produkci ROS. Toto rozpřažení je zřejmě zprostředkováno mastnými kyselinami ve spolupráci s různými transportními komplexy (adeninnukleotidovým translokátorem (ANT), glutamát/malát antiportem, uncoupling proteinem (UCP)) (Brookes et al., 2004; Skulachev, 1999). Mírné rozpřažení je pravděpodobně první obrannou linií před vznikem ROS. $O_2^{\cdot-}$ může být v mezimembránovém prostoru oxidován solubilním cytochromem c, který je následně reoxidován cytochrom c oxidázou (COX). Elektron se tak vrací zpět do dýchacího řetězce (Skulachev, 1999).

V literatuře existuje mnoho údajů, které popisují peroxidační poškození jednotlivých enzymatických reakcí probíhajících v jaterních mitochondriích (Kennedy et al., 1992; Kmoníčková et al., 2001; Kowaltowski a Vercesi, 1999; Křiváková et al., 2007; Nieminen et al., 1997; Nulton-Presson a Szweda, 2001). Byly též prezentovány výsledky (Drahota et al., 2005), které ukazují, že existuje různá citlivost NADH a FAD dependentních substrátů k peroxidačnímu poškození. Nicméně doposud chybí dostatečné množství důkazů, které by porovnaly a dostatečně vysvětlily citlivost různých enzymových reakcí, které jsou zodpovědné za peroxidační poškození mitochondrií.

Jako modelovou látku pro hodnocení oxidačního stresu lze použít terciární butylhydroperoxid (t-BHP). Je to látka, která navozuje oxidační poškození buněk. Jedná se o organický hydroperoxid,

který ale není odbouráván mitochondriální katalázou, takže se hodí pro objektivní hodnocení stupně poškození buněk (Chance et al., 1979). V závislosti na době působení a použité dávce vede až ke smrti buněk (Imberti et al., 1993). t-BHP je v hepatocytech metabolizován glutathion-peroxidázovým systémem, což vede k oxidaci glutathionu a následně pyridin nukleotidů (NAD(P)H) a ke změně redoxního stavu buněk (Ahmed-Choudhury et al., 1998; Červinková et al., 2002). Druhá cesta odbourávání je pomocí cytochromu P450, kterou je t-BHP přeměněn na peroxylové a akoxyllové radikály. Tyto radikály opět vedou k poškození buňky (Davies, 1989). t-BHP snadno prochází biologickými membránami a tak v buňkách působí na různé kompartmenty. Mechanismus poškození hepatocytů t-BHP spočívá v poruše homeostázy Ca^{2+} , indukci lipoperoxidačních reakcí a poškození mitochondrií provázené inhibicí tvorby ATP (Masaki et al., 1989; Nieminen et al., 1995). Zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} vede k poruše permeability membrán, narušení osmotické rovnováhy a k bobtnání mitochondrií (Lemasters et al., 1999). Tyto účinky t-BHP vedou k letálnímu poškození buněk (Červinková et al., 2002).

Účinky hormonů štítné žlázy na buněčný metabolismus jsou známy řadu let. Dřívější studie ukázaly, že tyto hormony zvyšují syntézu komponent dýchacího řetězce kodovaných jak v jádře, tak i v mitochondriích. Trijodtyronin indukuje děje, které vedou ke změnám ve složení lipidů mitochondriálních membrán, zvyšuje aktivitu adenin nukleotidových translokáz a stimuluje buněčnou respiraci (Kalderon et al., 2005; Venditti et al., 2006). Je obecně uznáváno, že aerobní metabolismus zvyšuje tvorbu ROS a také skutečnost, že hormony štítné žlázy zvyšují aktivitu respiračního řetězce. Hypertyreóza vede ke zvýšení bazálního metabolismu, který je asociován se zvýšením buněčného dýchání v cílových tkáních, jako jsou játra, ledviny, srdce a kosterní svalovina (Schwarz a Oppenheimer, 1978; Venditti et al., 2003). V nedávné době se podařilo prokázat, že hypermetabolický stav indukovaný hypertyreózou má za následek oxidační poškození tkání. Schopnost hormonů štítné žlázy navodit oxidační stres lze demonstrovat zvýšenou lipoperoxidací v játrech, srdci a ve svalech u hyperthyreózních potkanů (Tapia et al., 1999). Naopak jsou práce, které uvádí, že trijodtyronin (T_3) působí spíše jako antioxidant (Grant, 2007).

3.3. Mitochondrial permeability transition pore

Primární rolí mitochondrií je tvorba ATP, který je nezbytný pro zajištění fyziologických funkcí buněk. V posledních letech se středem zájmu stala centrální role mitochondrií v procesu řízení buněčné smrti. Role mitochondrií v procesu buněčné smrti je velmi komplexní. Nicméně klíčovou rolí jak v procesu apoptózy, tak i nekrózy hraje jev zvaný *Mitochondrial permeability transition* (MPT). Koncem 90. let minulého století byl MPT charakterizován jako Ca^{2+} -indukovaná propustnost vnitřní membrány mitochondrií. Indukce MPT vede k volné propustnosti vnitřní mitochondriální membrány pro protony s následným rozpřažením oxidativní fosforylace a úniku iontů a substrátů do velikosti 1,5 kDa do cytosolu. Příčinou MPT je otevření *Mitochondrial permeability transition pore* (MPTP). Tento pór ovlivňuje celá řada faktorů, mezi něž patří např. porucha homeostázy Ca^{2+} nebo anorganického fosfátu či zvýšená tvorba ROS (Byrne et al., 1999; Lemaster, 1999).

MPT je spojený s masivním bobtnáním mitochondrií, které je doprovázené vysokou koncentrací Ca^{2+} v matrix mitochondrií. MPT byl zpočátku považován za důsledek nespécifického poškození vnitřní mitochondriální membrány vlivem fosfolipáz. Nicméně, počáteční studie prokázaly, že jde o pór, který je zodpovědný za tento proces (Crompton et al., 1987; Haworth a Hunter, 1979; Hunter a Haworth 1979). MPT vzniká v důsledku zvýšené koncentrace Ca^{2+} v matrix mitochondrií, nebo v důsledku působení oxidačního stresu, což vede k otevření nespécifického póru ve vnitřní mitochondriální membráně (MPTP). MPTP umožňuje průchod molekul menších než 1,5 kDa přes vnitřní membránu. Při otevření tohoto póru dochází k vyrovnání koncentrací všech solutů rozpuštěných v roztoku, které prochází přes vnitřní membránu. Vysoká koncentrace proteinů v matrix mitochondrií, které nemohou procházet touto membránou pak způsobuje zvýšení koloidně osmotického tlaku, který vede k rozsáhlému bobtnání mitochondrií (Crompton, 1999; Halestrap, 1999).

V podmínkách *in vitro*, otevření MPTP vede primárně k depolarizaci membrán a sekundárně k bobtnání mitochondrií. V podmínkách *in vivo* se MPTP podílí na regulaci koncentrace Ca^{2+} v matrix, pH, transmembránového potenciálu, a objemu. V tomto případě otevření tohoto póru hraje důležitou

roli při toxickém, hypoxickém, či oxidačním poškození buňky (Bernardi, 1996). MPT je zapojen jak do procesu apoptózy, tak nekrózy buněk (Crompton, 1999, Kroemer et al., 2000).

Zvýšená koncentrace Ca^{2+} , anorganického fosfátu (Pi) v matrix mitochondrií, oxidační stres a deplece adenin nukleotidů vede k otevření MPTP. Otevření póru je za jistých podmínek reverzibilní a pravděpodobně představuje fyziologický mechanismus odstranění nebezpečných látek z mitochondrií (Montero et al., 2001; Zorov et al., 2000). Může též jít o signál, který vysílají poškozené mitochondrie a vede k odstranění těchto mitochondrií procesem zvaným mitoptóza (Lyamzaev et al., 2004; Skulachev et al., 2004; Skulachev, 1999). Následkem delšího otevření póru je ale kolaps membránového potenciálu a porušení osmotické rovnováhy. V důsledku vyrovnání iontových gradientů dojde k přestupu vody. Osmotická rovnováha se stává závislou na vysokomolekulárních látkách, které nemohou procházet pórem. Jelikož je koncentrace těchto látek vyšší v matrix, dochází k masivnímu nabobtnání mitochondrií a prasknutí vnější mitochondriální membrány (Lemasters, 1999, Skulachev, 1999). To vede k uvolnění intermembránových komponent do cytoplazmy a indukci apoptózy. Dále zde dochází k depolarizaci mitochondriálních membrán, která má za následek inhibici oxidační fosforylace a stimulaci ATP hydroláz (Halestrap et al., 2002).

3.4. MPTP a buněčná smrt

Mitochondrie mohou ovlivnit smrt buňky celou řadou mechanismů. Tyto mechanismy se navzájem překrývají. Dýchací řetězec je jedním z největších endogenních zdrojů ROS. Poškození dýchacího řetězce vede ke zvýšené tvorbě ROS a vyčerpání kapacity antioxidačního ochranného systému (Wallace, 1999). Snížená tvorba ATP, porušení permeability mitochondriální membrány a oxidační poškození Ca^{2+} translokáz vede ke zvýšení cytoplazmatické koncentrace Ca^{2+} a následné aktivaci nespecifických hydroláz. Zvýšená produkce ROS aktivuje otevření MPTP a může vést k apoptóze (Jakus a Lopuchová, 1999; Kadenbach, 2003; Kaplowitz, 2002; Wallace, 1999; Wallace et al., 1997; Zhang et al., 2001).

Apoptóza a nekróza jsou dva rozdílné typy buněčné smrti s odlišnými morfologickými a biochemickými znaky. Zatímco nekróza je často vyvolána vnějšími vlivy, apoptóza představuje striktně regulovaný proces zodpovědný především za odstranění starých, poškozených nebo nepotřebných buněk (Kim et al., 2003; Lemasters, et al., 2002; Lemasters, 1999;). Role mitochondrií v procesu buněčné smrti je velmi komplexní. Vysoká intramitochondriální koncentrace Ca^{2+} , Pi, ROS a dalších látek má za následek nespecifické zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány pro ionty a substráty do 1,5 kDa (Lemasters, 1999; Orrenius, 2004; Scheffler, 2001). Otevření pórů však souvisí i s apoptózou. Při prasknutí vnější mitochondriální membrány jsou z mitochondrií uvolněny různé proteiny včetně cytochromu c. Cytochrom c se v cytoplazmě váže s APAF1 a dATP za vzniku apoptozomu, ten následně aktivuje kaspázu 9. Některé proteiny jako AIF procházejí do jádra, kde aktivují endonukleázy (Bernardi et al., 1999; Honda et al., 2004; Lemasters, 1999; Orrenius et al., 2004).

4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Oxidační stres je jedním z nejvýznamnějších mechanismů, kterým toxické látky působí na hepatocyty. Mitochondrie jsou nejen častým cílem oxidačního poškození, ale jsou považovány za hlavní buněčný zdroj ROS. Studium dopadu oxidačního stresu na buněčné úrovni je věnována již řadu let značná pozornost, detailní mechanismy odpovědné za poškození buněk nejsou však dosud zcela objasněny.

Tato práce navazuje na předchozí studie naší laboratoře věnované vlivu modelové prooxidační látky (t-BHP). Cílem práce bylo detailní posouzení změn energetického metabolismu izolovaných buněk, izolovaných mitochondrií a kultivovaných hepatocytů po působení t-BHP. Významnou roli v poškození mitochondrií zaujímá jev zvaný *mitochondrial permeability transition* (MPT). Další část práce byla zaměřena na studium tohoto jevu a póru (MPTP), který je zodpovědný za tyto změny v propustnosti mitochondriálních membrán.

Specifické cíle:

1. Posouzení peroxidačního poškození hepatocytů v primární kultuře.
2. Studium vlivu t-BHP na změny aktivit enzymů respiračního řetězce na izolovaných mitochondriích jater potkana *in vitro*.
3. Optimalizace turbidimetrické metody pro měření bobtnání izolovaných mitochondrií jako ukazatele MPT.
4. Studium přímého účinku t-BHP a T₃ na Ca²⁺ dependentní MPTP *in vitro*.
5. Posoudit, zda zvýšená tvorba ROS indukovaná podáním T₃ potkanům *in vivo* ovlivňuje propustnost mitochondriálních membrán (MPT).
6. Studium citlivosti Ca²⁺-dependentního MPTP na úrovni tkání.

5. MATERIÁL A METODIKA

Pokusy byly provedeny na dospělých potkanech, samcích kmene Wistar o hmotnosti 200 až 240 g. Potkani byli chováni za standardních podmínek při konstantní teplotě $23 \pm 1^\circ\text{C}$, relativní vlhkosti vzduchu $55 \pm 10\%$, výměně vzduchu 12x za hodinu a při 12ti hodinovém světelném režimu. Potkani byli ustájeni v klecích po šesti. Potkani měli volný přístup k vodě a potravě. Dieta pro potkany byla použita komerčně vyráběná ST-1 dieta od firmy Velaz, Praha. Protokoly pokusů jak *in vitro*, tak *in vivo* byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání podle zákona č. 246/92 Sb. v platném znění, §17, 3c. při Lékařské fakultě v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Pro izolaci hepatocytů jsme použili dvoustupňovou kolagenázovou perfuzi jater, která byla zavedena v roce 1969 (Berry a Friend, 1969). Tento postup později modifikoval Seglen (Seglen, 1976). Jde o metodu, při které se játra nejprve promývají pufrem bez obsahu Ca²⁺ iontů a následně jsou perfundována roztokem s obsahem kolagenázy a Ca²⁺ iontů. Absence vápenatých iontů v izolačním médiu při prvním kroku perfuze je nezbytná pro rozrušení desmozomálních spojů mezi buňkami, v dalším kroku je přítomnost Ca²⁺ nutná pro funkci kolagenázy, která rozruší extracelulární matrix.

Hepatocyty pro krátkodobou inkubaci s testovanými chemikáliemi nevyžadují kultivaci buněk adheovaných na vhodném povrchu. Pro tyto pokusy jsme použili suspenzi izolovaných hepatocytů. Dostatečná viabilita a funkční aktivita hepatocytů v suspenzi však přetrvává pouze po dobu několika hodin (4 - 6 hod). Suspenze hepatocytů jsme kultivovali v kultivačních lahvičkách (Tissue Culture Flasks 50 ml, Becton-Dickinson) o objemu 50 ml v CO₂ inkubátoru (Sanyo, MCO-17AIC) v atmosféře s 5% CO₂ při 37°C. Jako kultivační médium jsme používali Krebs-Henseleitův roztok.

Pro pokusy, které jsou časově náročné je potřeba zajistit přežívání hepatocytů po dobu delší než několik hodin. Pokud chceme udržet specifické funkce a viabilitu hepatocytů, je nutné zajistit pro izolované hepatocyty kontakty se sousedními buňkami a dodat specifické substráty (Berry et al., 1991). Hepatocyty pro naše pokusy jsme kultivovali na kolagenovaných Petriho miskách (sterilní polystyrenové misky o průměru 60 mm), (Tissue Culture Dish 60 mm, Iwaki) potažených kolagenem typu I.

K izolaci mitochondrií jsme použili metodu opakované centrifugace v sacharózovém médiu podle Bustamante et al. (1977). Izolace mitochondrií je založena na několika po sobě jdoucích centrifugacích se zvyšujícím se počtem otáček. Při každé z nich dochází k sedimentaci jednotlivých frakcí původního jaterního homogenátu a v konečném sedimentu zůstávají izolované mitochondrie. Ostatní buněčné složky a rozpuštěné bílkoviny jsou odstraněny po jednotlivých centrifugacích.

Laktátdehydrogenáza (LDH) je enzym, který se nachází v cytoplasmě, kde katalyzuje přeměnu kyseliny pyrohroznové na kyselinu mléčnou a zpět podle převahy substrátu. V podmínkách *in vitro* jsme ho používali jako citlivý ukazatel poškození plazmatické membrány buněk. V primárních kulturách hepatocytů se LDH uvolňuje z poškozených hepatocytů a kumuluje se v mediu (Berry et al., 1991). LDH katalyzuje přeměnu laktátu a NAD^+ na pyruvát a NADH a H^+ . Rychlost přeměny NAD^+ na NADH lze stanovit fotometricky při 340 nm jako nárůst absorbance NADH .

Pro stanovení míry lipoperoxidace jsme používali stanovení koncentrace malondialdehydu (MDA) pomocí kyseliny 2-thiobarbiturové (TBA). Princip stanovení MDA je založen na spektrofotometrickém měření absorbance kondenzačního produktu, který vzniká reakcí MDA se dvěma molekulami TBA (Fenaille et al., 2001).

Pro stanovení spotřeby kyslíku izolovaných mitochondrií nebo suspenzí hepatocytů jsme použili *High Resolution Oxygraph OROBOROS 2k*. Jde o měření spotřeby kyslíku pomocí modifikované Clarkovy kyslíkové elektrody. Stanovení se provádí v uzavřené, temperované (30°C) komůrce o objemu 2 ml. Měříme množství kyslíku, které biologický materiál spotřebuje během své metabolické aktivity (Gnaiger, 2001; Gnaiger et al., 2002; Hütter et al., 2006).

Pro měření jsme používali buď suspenzi digitoninem permeabilizovaných hepatocytů nebo izolované mitochondrie. Do komůrky jsme napipetovali 2,1 ml K-média. Komůrku jsme uzavřeli a po ustálení signálu jsme pomocí Hamiltonovy pipety přidali biologický materiál. Hepatocyty jsme přímo v komůrce permeabilizovali digitoninem o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ média. Výsledné množství buněk, které jsme pro měření používali bylo 250 000 buněk v 1 ml. Následovalo přidání specifických substrátů či inhibitorů komplexů dýchacího řetězce a měření aktivit jednotlivých respiračních komplexů.

K měření mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) kultivovaných hepatocytů jsme použili Rhodaminu 123. Rhodamin 123 je fluorescenční sonda, která se v důsledku negativního náboje akumuluje v mitochondriích. Tato akumulace se mění v závislosti na MMP (Emaus et al., 1986; Nuydens et al., 1999).

Měření MMP izolovaných mitochondrií bylo prováděno pomocí Safraninu O. (Akerman et al., 1976).

Měření bobtnání mitochondrií (funkci MPTP) jsme hodnotili turbidimetrickou metodou, při které jsme sledovali pokles absorbance suspenze mitochondrií (Nicholls a Ferguson, 2001). Mitochondrie jsme vystavili postupnému nebo současnému účinku řady faktorů (Ca^{2+} , PO_4^{3-} , t-BHP, T_3), které mohou způsobit změny v propustnosti membrán. Tyto změny v propustnosti se projevují depolarizací mitochondriálních membrán, rozpojením oxidativní fosforylace a bobtnáním mitochondrií (Byrne et al., 1999).

Pokusy s trijodtyroninem v podmínkách *in vivo* byly opět prováděny na dospělých potkanech, samcích kmene Wistar o hmotnosti 180 až 240 g. Potkanům byl aplikován jednorázově či opakovaně T_3 . Po indukci enzymů respiračního řetězce trijodtyroninem v podmínkách *in vivo* byla provedena izolace mitochondrií. Zvířata byla rozdělena do 3 skupin po třech zvířatech: První skupina byli kontrolní potkani, u kterých nebyl aplikován T_3 . Druhé skupině byl jednorázově aplikován intraperitoneálně T_3 v dávce 200 $\mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti. Zvířata byla usmrcena po 24 hodinách po aplikaci T_3 . U třetí skupiny byl T_3 aplikován opakovaně (3x ve 24 hod. intervalech v dávce 200 $\mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti) opět intraperitoneálně. Zvířata byla usmrcena po 24 hodinách po poslední aplikaci T_3 . Pro naši práci jsme použili krev a jaterní mitochondrie. Z odebraných vzorků krve bylo získáno sérum, ve kterém byla stanovena koncentrace volného a celkového trijodtyroninu. U takto ovlivněných jaterních mitochondrií jsme sledovali, zda dochází ke změnám MPT po aktivaci buněčné respirace jednorázovým či opakovaným podáním T_3 v podmínkách *in vivo*.

K hodnocení statistické významnosti jsme použili jednofaktorový ANOVA test. Pro porovnávání rozdílů mezi jednotlivými skupinami jsme použili Tukey-Kramerův test. Testování jsme provedli pomocí statistického programu Prism 4.03 a k vytvoření grafů použili MS Excel (Microsoft). Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se směrodatnými odchylkami. Hladina statistické významnosti byla stanovena na $\alpha = 0,05$.

6. VÝSLEDKY

6.1. Peroxidační poškození kultivovaných hepatocytů t-BHP

6.1.1. Peroxidační poškození plazmatické membrány

LDH je cytoplazmatický enzym, který je při poškození plazmatické membrány uvolňován z buněk. Hodnotili jsme jak časovou, tak koncentrační závislost účinku t-BHP na vyplavování LDH z buněk do kultivačního média. Působením t-BHP dochází k vzestupu aktivity LDH v inkubačním mediu. Signifikantní vzestup LDH v inkubačním mediu lze pozorovat po 30ti minutové inkubaci (37°C, 95% O₂, 5% CO₂) s 1 mM t-BHP. Vyšší koncentrace t-BHP (1 - 3 mM) zvyšují uvolňování LDH již mnohem méně. K dramatickému vzestupu aktivity LDH v mediu však dochází při delší době inkubace s 1,5 mM t-BHP. Po 60ti minutové inkubaci dochází k trojnásobnému vzestupu aktivity LDH ve srovnání s hodnotami zjištěnými po 30minutové inkubaci s t-BHP.

6.1.2. Indukce lipoperoxidace t-BHP v kultivovaných hepatocytech

Za stejných experimentálních podmínek jsme hodnotili vzestup koncentrace MDA jako indikátoru lipoperoxidačních dějů. Opět jsme hodnotili jak časovou, tak koncentrační závislost účinku t-BHP na množství vzniklého MDA. K maximálnímu vzestupu koncentrace MDA po 30ti minutové inkubaci dochází v koncentračním rozmezí 0,5 - 1,0 mM t-BHP, vyšší koncentrace peroxidačního agens vedly k dalšímu, avšak již pozvolnějšimu nárůstu množství MDA. Při testování časové závislosti tvorby MDA při inkubaci s 1,5 mM t-BHP jsme zaznamenali signifikantní vzestup již po 5 minutách inkubace. Koncentrace MDA se téměř lineárně zvyšovala po dalších 20 minut inkubace; další nárůst byl pozvolnější. Hodnoty zjištěné po 60ti minutové inkubaci s 1,5 mM t-BHP byly téměř shodné s hodnotami, které jsme změřili po 30ti minutách inkubace s 3 mM t-BHP. Výsledky těchto pokusů ukazují, že jak porušení integrity cytoplazmatické membrány, tak tvorba MDA vykazují shodně nejvyšší nárůst v koncentračním rozmezí t-BHP 0,5 - 1 mM.

6.2. Vliv oxidačního stresu na energetický metabolismus hepatocytů

V dalších pokusech jsme sledovali vliv t-BHP na respiraci při oxidaci glutamátu + malátu ve srovnání s oxidací sukcinátu u permeabilizovaných hepatocytů v suspenzi. Zjistili jsme, že oxidace glutamátu + malátu je citlivější vůči působení peroxidu, než oxidace sukcinátu. Po 30ti minutové inkubaci hepatocytů s t-BHP došlo k maximální inhibici oxidace glutamátu + malátu při koncentraci 0,5 mM, kdy aktivita komplexu I byla snížena o 80%. Při aplikaci vyšších koncentrací t-BHP (0,5 - 3,0 mM) se již inhibiční efekt výrazněji nezvyšoval. Také oxidace sukcinátu byla po 30ti minutové inkubaci inhibována 0,5 mM t-BHP, avšak inhibiční efekt byl výrazně nižší. Aktivita komplexu II byla redukována přibližně o 40%. Časová závislost inhibičního působení 1,5 mM t-BHP, při němž dochází v obou případech k maximální inhibici, ukázala, že oxidace sukcinátu není během 15ti minutové inkubace hepatocytů s t-BHP signifikantně inhibována, zatímco ve stejném časovém intervalu dosahuje inhibice glutamátu + malátu již maximálních hodnot.

6.3. Působení oxidačního stresu na funkci respiračního řetězce izolovaných mitochondrií

6.3.1. Vliv t-BHP na aktivitu mitochondriálních enzymů: koncentrační a časová závislost

Hodnotili jsme citlivost pěti různých mitochondriálních substrátů vůči peroxidačnímu stresu. U všech substrátů jsme měřili spotřebu kyslíku za přítomnosti ADP, která udává maximální hodnoty respirace pro daný substrát (pikomoly kyslíku/s/mg proteinu). Výsledky působení t-BHP na izolované mitochondrie v podmínkách *in vitro* ukazují vysokou citlivost NADH-dependentních dehydrogenáz na působení peroxidu ve srovnání s flavoprotein-dependentní sukcinát dehydrogenázou. Při hodnocení oxidace pěti různých NADH-dependentních substrátů se ukázalo, že i v této skupině existují značné rozdíly v citlivosti na peroxid. Nejvyšší citlivost vykazovala oxidace palmitylkarnitinu a oxoglutarátu + malátu (10 - 30 μM t-BHP), zatímco inhibiční efekt t-BHP na oxidaci pyruvátu a glutamátu se projevoval až při 10x vyšších koncentracích.

6.3.2. Vliv t-BHP na mitochondriální membránový potenciál

Různou citlivost mitochondriálních enzymů vůči peroxidačnímu stresu jsme testovali i pomocí dalšího indikátoru charakterizujícího neporušenost mitochondriálního systému oxidativní fosforylace, a to pomocí hodnot mitochondriálního membránového potenciálu. Přidání mitochondrií do media se safraninem O vedlo k jeho akumulaci v mitochondriích a k poklesu v mediu což ukazuje na vysoký membránový potenciál mitochondrií. Po přidání 1,5 mM t-BHP došlo k poklesu membránového potenciálu za přítomnosti endogenních substrátů, pyruvátu či glutamátu. V přítomnosti sukcinátu zůstával membránový potenciál nezměněn. Což svědčí na nižší citlivost flavoprotein-dependentní sukcinát dehydrogenázou vůči peroxidačnímu poškození.

6.4. Mitochondriální pór přechodné permeability (Mitochondrial Permeability Transition Pore - MPTP) jako součást mechanismů, indukujících poškození hepatocytů

Naším úkolem bylo optimalizovat metodu pro hodnocení MPT a pomocí této metody sledovat vliv řady faktorů, které ovlivňují funkci MPTP izolovaných jaterních mitochondrií v podmínkách *in vitro*. Izolované mitochondrie byly vystaveny postupnému či současnému účinku Ca^{2+} , PO_4^{3-} , T_3 , t-BHP) a byl sledován jejich vliv na průběh bobtnání.

6.4.1. Vliv Ca^{2+} na funkci MPTP

V prvních experimentech jsme pomocí námi upravené metody zopakovali dřívější nálezy dokazující, že Ca^{2+} je induktorem otevírání membránového póru a Pi ionty působení Ca^{2+} aktivují. Nejprve jsme testovali vliv samotného Ca^{2+} na bobtnání mitochondrií. Roztok Ca^{2+} byl v každém experimentu dávkován mezi 50 a 60 s od počátku měření. Jak vyplývá z našich výsledků, samotné Ca^{2+} ve fyziologických koncentracích (5 - 12 μM) má na bobtnání mitochondrií jen minimální vliv. Teprve až vyšší koncentrace Ca^{2+} (100 - 400 μM) indukují bobtnání mitochondrií. Nástup bobtnání je velmi pomalý. Maximální hodnota rychlosti bobtnání je dosažena až u nejvyšší použité koncentrace 400 μM Ca^{2+} . Tato měření jsme doplnili srovnáním aktivace Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM při aplikaci 15 a 150 μM CaCl_2 . Je zřejmé, že za přítomnosti 0,1 mM Pi se zvyšuje jak rychlost bobtnání, tak se i zkracuje doba, kdy po přidání kalciových iontů dosahuje rychlost bobtnání maximálních hodnot.

6.4.2. Vliv PO_4^{3-} na funkci MPT

Nepřítomnost Pi v reakční směsi je v literatuře popisována jako faktor vedoucí k inhibici funkce MPTP. Vzhledem k těmto poznatkům jsem se rozhodl doplnit naše měření i o sledování samotného Pi na bobtnání mitochondrií. MPT je závislá na koncentraci Pi v inkubačním mediu. Rostoucí koncentrace Pi v reakční směsi zvyšuje bobtnání a tím i větší pokles absorbance suspenze mitochondrií. V naší studii jsme použili 0,05; 0,10; 0,50; 1,00 mM Pi . Vzhledem k přítomnosti stopového množství Ca^{2+} v inkubačním mediu, které je přítomno ve vodě a v chemikáliích, bylo toto měření doplněno o měření, kdy do inkubačního média s 1,00 mM Pi bylo přidáno chelatační činidlo EGTA (o výsledné koncentraci 250 μM), které vyváže v mediu veškeré Ca^{2+} . Ze záznamu měření je patrné, že za těchto podmínek je samotný vliv 1 mM Pi na bobtnání mitochondrií prakticky nulový. Z tohoto měření je patrné, že samotný Pi bez Ca^{2+} není schopen navodit MPT.

6.4.3. Interakce Ca^{2+} a Pi při aktivaci MPTP

Cílem této části bylo sledovat průběh Ca^{2+} -indukovaného bobtnání a hodnotit působení různých aktivačních faktorů (Pi , ROS, T_3) při různých koncentracích Ca^{2+} a při různých koncentracích jednotlivých aktivátorů. Hodnotili jsme nejprve koncentrační závislost Ca^{2+} v přítomnosti 0,1 mM Pi , které samo o sobě, jak jsme zjistili v předešlých pokusech, indukuje bobtnání minimálně, ale vykazuje již značný aktivační efekt za přítomnosti Ca^{2+} . Výsledky ukazují, že zvyšování Ca^{2+} v inkubačním mediu vede jak k růstu rychlosti bobtnání, tak i ke zkracování doby nástupu maximální rychlosti.

V druhé sérii měření byl použit Pi o výsledné koncentraci 1,0 mM. Pro měření jsme použili Ca^{2+} o výsledné koncentraci 5,0 až 150,0 μM . Z výsledků je patrné, že při vyšší koncentraci fosfátu (1 mM) byl charakter změn při rostoucí koncentraci Ca^{2+} v reakční směsi přibližně stejný, hodnoty

rychlosti bobtnání však byly přibližně dvojnásobné. Můžeme tedy uzavřít, že fosfátové ionty ovlivňují především rychlost bobtnání mitochondrií.

6.4.4. Aktivace kalcium indukovaného bobtnání jaterních mitochondrií t-BHP. Peroxidační stres aktivuje Ca^{2+} -indukované bobtnání

Řada prací v literatuře ukazuje, že oxidační stres významně aktivuje Ca^{2+} -indukované bobtnání mitochondrií (Venditti et al., 2003). Někteří autoři předpokládají, že oxidační stres může být i hlavním induktorem tohoto procesu (Lemasters et al., 1998). Snažili jsme se proto tyto nálezy zopakovat v našich experimentálních podmínkách. Naše záznamy ukazují, že t-BHP výrazně aktivuje rychlost bobtnání jaterních mitochondrií indukovanou 25 μM $CaCl_2$. Protože jsme chtěli prokázat, že aktivační efekt t-BHP ovlivňuje nespecifický MPTP, použili jsme CsA jako jeho specifický inhibitor funkce MPTP. Bobtnání indukované 25 μM $CaCl_2$ a 0,1 mM Pi stejně jako bobtnání indukované 25 μM $CaCl_2$ a 1,5 mM t-BHP lze zcela inhibovat 5 μM CsA, což ukazuje, že toto bobtnání je důsledkem otevření MPTP.

6.4.5. Účinek in vitro aplikace trijodtyroninu na Ca^{2+} -indukované bobtnání jaterních mitochondrií

V první fázi pokusů jsme sledovali účinek různých koncentrací T_3 na bobtnání mitochondrií. K inkubačnímu médiu, které neobsahovalo Pi, jsme přidávali T_3 o výsledné koncentraci: 1,25; 2,50; 5,00; 15,00 a 25,00 μM . Jako induktor bobtnání jsme použili 50,0 μM Ca^{2+} . Zjistili jsme, že zvyšující se koncentrace T_3 aktivuje bobtnání indukované 50 μM Ca^{2+} . V dalším pokuse jsme indukovali bobtnání vyšší koncentrací Ca^{2+} (200,0 μM). Koncentrace T_3 byla v tomto pokuse: 1,25; 2,50; 5,00; 7,50 a 10,00 μM . Rostoucí koncentrace T_3 v reakčním médiu způsobila rostoucí intenzitu bobtnání. Koncentrace T_3 v rozmezí 2,5 - 25 μM se liší jak dobou nástupu bobtnání, tak i maximální rychlostí. V průběhu bobtnání však celkový rozsah tohoto jevu dosáhne přibližně stejných hodnot. Podrobněji a daleko přesněji lze tyto parametry vyhodnotit pomocí naší optimalizované metody. Z derivovaných křivek lze zcela přesně odečíst jak maximální hodnotu rychlosti bobtnání, tak i dobu, kdy je této rychlosti dosaženo po aplikaci Ca^{2+} . T_3 aktivuje rychlost bobtnání i bez přítomnosti Ca^{2+} na 157% hodnoty bez T_3 . Při všech použitých koncentracích Ca^{2+} se aktivace rychlosti bobtnání pohybuje v rozmezí 180 - 220%.

6.4.6. Vliv PO_4^{3-} na aktivační efekt trijodtyroninu Ca^{2+} -indukovaného bobtnání jaterních mitochondrií

V další fázi pokusů s T_3 jsme sledovali vliv 0,1 mM Pi v inkubačním médiu na aktivační efekt trijodtyroninu. V této části jsme opět použili různé koncentrace Ca^{2+} pro indukci bobtnání. Nejprve jsem zjišťovali, jak dalece aktivuje T_3 bobtnání za přítomnosti 0,1 mM Pi v nepřítomnosti Ca^{2+} . Ze záznamů je patrné, že samotný Pi není schopen navodit bobtnání v nepřítomnosti Ca^{2+} a T_3 vykazuje malý aktivační efekt. Přítomnost Pi jej zdvojnásobí a urychlí nástup bobtnání. Po přidání 50 μM Ca^{2+} , jak vyplývá z našich dřívějších pozorování, je v médiu bez Pi bobtnání minimální; přidání T_3 bobtnání jen mírně aktivuje. Ca^{2+} v přítomnosti Pi indukuje bobtnání a kombinace všech tří komponent: Ca^{2+} , Pi a T_3 poskytuje nejvyšší hodnoty bobtnání a také výrazně zkracuje dobu jeho nástupu. Při indukci bobtnání vyšší koncentrací Ca^{2+} (200 μM) bylo vidět, že aktivační efekt T_3 se příliš neliší od předešlého experimentu s 50 μM Ca^{2+} , avšak efekt samotného Ca^{2+} je podstatně vyšší při použití tak vysoké dávky kalcia. Přidání T_3 vede pak jen k minimální další aktivaci. Z těchto pokusů můžeme uzavřít, že pro sledování aktivačního efektu T_3 je třeba používat pro indukci bobtnání nižší koncentrace Ca^{2+} , kdy rychlost a rozsah bobtnání nedosahuje maximálních hodnot, takže je poskytnut prostor pro sledování aktivačního účinku T_3 .

Protože jsme chtěli prokázat, zda T_3 ovlivňuje nespecifický MPTP, použili jsme CsA jako jeho specifický inhibitor. Reakční směs obsahovala: médium, suspenzi mitochondrií, sukcinát a T_3 o výsledné koncentraci 25,0 μM . Po přidání Ca^{2+} o výsledné koncentraci 50,0 μM bylo zaznamenáno bobtnání mitochondrií, které bylo následně porovnáno s měřením bobtnání mitochondrií za stejných podmínek s přidavkem CsA o výsledné koncentraci 5,0 μM . CsA zcela inhiboval průběh MPT. Můžeme proto uzavřít, že i aktivace bobtnání působením T_3 je důsledkem otevřením MPTP.

6.4.7. Vliv Pi a Ca²⁺ na průběh MPTP po aplikaci T₃ in vivo (1x T₃ a 3x T₃)

Předmětem této část práce bylo porovnat aktivační vliv Pi a Ca²⁺ na MPTP po aplikaci T₃ v podmínkách *in vivo*. Potkany jsme utratili za 24 hodin po jednorázové aplikaci T₃ v dávce 200 µg/kg tělesné hmotnosti i. p., izolované mitochondrie jsme inkubovali ve standardním mediu se sukcinátem a s přídatkem Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM a sledovali průběh bobtnání. Toto bobtnání jsme následně porovnali s bobtnáním mitochondrií izolovaných z potkanů neovlivněných T₃. Obdobně jsme porovnali kontrolní mitochondrie s mitochondriemi, které byly izolované z potkanů, kterým byl aplikován 3x ve 24 hodinových intervalech T₃ v dávce 200 µg/kg tělesné hmotnosti i. p., poslední dávka byla podána 24 hodin před izolací mitochondrií. Při inkubaci izolovaných mitochondrií za přítomnosti samotného fosfátu (0,1 mM) jsme ani u kontrol ani u mitochondrií po aplikaci 1x T₃ nebo 3x T₃ žádné bobtnání neprokázali. Jestliže jsme však bobtnání indukovali ve standardním mediu (sukcinát a Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM) přidáním 50 µM Ca²⁺, pak byla indukce bobtnání vyšší jak u mitochondrií izolovaných z potkanů s jednou dávkou T₃, tak se třemi dávkami T₃ a v obou případech byl po aplikaci T₃ nástup bobtnání rychlejší ve srovnání s kontrolními mitochondriemi. Rychlost nástupu bobtnání byla významně vyšší po opakovaném podávání T₃.

6.4.8. Tkáňová specifita citlivosti MPTP vůči Ca²⁺ iontům

Panov et al. (2007) prokázali, že mitochondrie izolované z mozku vykazují menší citlivost MPTP vůči Ca²⁺ iontům než mitochondrie srdeční. Autoři pak spekulují o tom, že existuje druhová i tkáňová specifita tohoto jevu a že různé orgány tak volí různou strategii zřejmě z hlediska, jak dalece je kalciový inzult nebezpečný pro funkční aktivitu daného orgánu a jak intenzivně probíhá v daném orgánu buněčná regenerace. Snažili jsme se tyto nálezy rozšířit a doplnit srovnáním citlivosti MPTP mitochondrií jater a srdečního svalu vůči Ca²⁺ iontům. Zjistili jsme, že jaterní mitochondrie reagují na stejnou koncentraci CaCl₂ mnohem intenzivnějším bobtnáním než mitochondrie srdeční. Jestliže u obou preparátů mitochondrií vyhodnotíme rozsah poklesu optické denzity, který indikuje bobtnání mitochondrií, za 4 minuty po aplikaci CaCl₂, kdy bobtnání dosahuje maximálních hodnot, je tento rozdíl u nízké koncentrace (25 µM CaCl₂) sedminásobný, při aplikaci vyšší koncentrace (100 µM CaCl₂) je trojnásobný. Signifikantní vzestup bobtnání lze u jaterních mitochondrií pozorovat již při 2,5 µM koncentraci CaCl₂, maximální hodnoty rozsahu bobtnání v rozmezí koncentrace CaCl₂ 10 - 30 µM. U srdečních mitochondrií stoupá rozsah bobtnání až do 100 µM koncentrace CaCl₂. Naše výsledky doplňují nálezy Panova et al. (2007) a ukazují, že nejen mozkové, ale i srdeční mitochondrie mají ve srovnání s jaterními mitochondriemi menší citlivost a tím i lepší protekci vůči Ca²⁺-indukovanému otevření MPTP, a tak i iniciaci apoptických procesů.

7. DISKUZE

Játra jsou multifunkčním orgánem, který má významnou roli v intermediárním a energetickém metabolismu, v syntetických i biotransformačních procesech, v sekreci a exkreci řady látek endogenního i exogenního původu. Všechny tyto procesy jsou energeticky velmi náročné, takže fyziologická funkční aktivita jater vyžaduje intenzivní aktivitu energetického metabolismu. Na jaterní buňky působí široké spektrum hepatotoxických látek vnějšího prostředí (xenobiotik), protože játra jsou místem jejich degradace a exkrece. Permanentní expozice jater toxickým látkám je pravděpodobně příčinou mimořádné regenerační schopnosti jaterní tkáně. Jedná se o evolučně konzervativní děj; regenerace jater byla popsána u všech savců včetně člověka (Červinková et al., 2007).

Všeobecně je dnes přijímáno, že hlavní roli v mechanismu poškození jater nejrůznějšími hepatotoxickými látkami představuje indukce peroxidačních procesů (Jaeschke et al., 2002), a že peroxidační poškození primárně zasahuje funkci mitochondriální přeměny energie. Mitochondrie tak představují nejen místo, kde kyslíkové radikály mohou vznikat, ale i cílovou strukturu jejich působení (Boveris a Chance, 1973; Hyslop et al., 1988; Mehendale, 1994; Turrens, 2003). Ve světové literatuře je tomuto problému věnovaná mimořádná pozornost (Kennedy et al., 1992; Kowaltowski a Vercesi,

1999; Nulton-Presson a Szweda, 2001). Stále však není dostatek údajů o kinetice působení prooxidačních agens na jednotlivé buněčné struktury a různé enzymové funkce, což je nezbytné především pro správnou volbu strategie antioxidační prevence a pro stanovení optimálních podmínek pro reparaci poškozené tkáně.

Mechanismus působení ROS je velmi komplexní. Mohou jimi být inhibovány různé enzymy a to buď přímo modifikací redox-senzitivních molekul nebo v důsledku peroxidačního poškození buněčných membrán, které vyvolává změny jejich fluidity a s tím spojené konformační změny bílkovinných molekul. Peroxidační poškození může zahrnovat lipoperoxidaci cytoplazmatických membrán (Higuchi et al., 1998; Klauning et al., 1998; Masaki et al., 1989), poškození jaderné či mitochondriální DNA (Sandström a Marklund, 1990), oxidaci pyrimidinových nukleotidů a glutathionu (Nulton-Persson et al., 2003). Peroxidační stres narušuje funkci mitochondrií (především tvorbu ATP nezbytnou pro zabezpečení nejrůznějších funkcí hepatocytů) na mnoha úrovních: (a) inhibicí mitochondriálních dehydrogenáz, (b) inhibicí transportu elektronů respiračním řetězcem, (c) rozprážením oxidativní fosforylace v mitochondriích. V důsledku rozprážení oxidativní fosforylace dochází ke kolapsu membránového potenciálu buď ireverzibilně porušením nepropustnosti vnitřní mitochondriální membrány pro protony, nebo reversibilně aktivací vápníkem indukovaného membránového póru, jehož funkce je regulovatelná, takže pokles membránového potenciálu může být reversibilní. Všechny tyto reakce mají významnou úlohu při indukci apoptotických a nekrotických procesů v jaterní tkáni.

Proto jsme se snažili některé dosud ne zcela vyjasněné otázky týkající se mechanismu působení ROS zodpovědět našimi experimenty. V pokusech jsme používali jako prooxidant t-BHP, protože není degradován katalázou (Chance et al., 1979), a tak je vhodný pro kinetické studie koncentrační a časové závislosti peroxidačního působení. Kombinovali jsme působení t-BHP na intaktní hepatocyty v primární kultuře, na hepatocyty v suspenzi permeabilizované digitoninem, kdy se mitochondrie nacházejí v kontaktu s ostatními cytosolovými komponentami, a na izolované mitochondrie, zbavené protekčního působení cytosolových antioxidačních komponent.

Zvláštní pozornost jsme věnovali mechanismu, který indukuje apoptotické a nekrotické procesy po peroxidačním ataku a to funkci nespecifického mitochondriálního póru přechodné permeability, jehož otevření indukované Ca^{2+} ionty vede k bobtnání mitochondrií, poruše vnější mitochondriální membrány a k následnému vyplavování cytochromu c z mezimembránového prostoru a vnitřní mitochondriální membrány. To vede následně k inhibici transportu elektronů respiračním řetězcem, ke zvýšenému redukčnímu stavu mitochondriálních oxidoredukčních komponent a tím k aktivaci tvorby ROS mitochondriemi.

V první části práce jsme se soustředili na doplnění dřívějších nálezů prováděných na hepatocytech v suspenzi hodnocením peroxidačního působení na hepatocyty v primární kultuře přisedlé na kolagenní podložce. Hodnotili jsme časovou i koncentrační závislost působení t-BHP na cytoplazmatickou membránu z hlediska její propustnosti, intenzitu lipoperoxidace buněčných membrán a poškození funkce mitochondrií. Na hepatocytech v kultuře jsme hodnotili schopnost mitochondrií generovat a udržovat membránový potenciál. Na hepatocytech v suspenzi, permeabilizovaných digitoninem, jsme hodnotili peroxidační poškození respirace mitochondrií při použití NADH- a flavoprotein-dependentního substrátu. Na izolovaných mitochondriích jsme hodnotili působení t-BHP na aktivitu různých mitochondriálních enzymů a na schopnost izolovaných mitochondrií generovat a udržovat membránový potenciál při působení peroxidačního stresu.

Naše výsledky na intaktních hepatocytech ukázaly, že tvorba lipoperoxidů se prudce zvyšuje v rozmezí 0,5 - 1 mM t-BHP. V tomto koncentračním rozmezí také dochází ke ztrátě integrity buněčné membrány hodnocené uvolňováním LDH do kultivačního média. Časová závislost působení t-BHP ukazuje, že zatímco vzestup koncentrace MDA pokračuje téměř lineárně v průběhu 60ti min inkubace, vzestup propustnosti pro LDH se dramaticky zvyšuje mezi 30. a 60. min inkubace. Vzestup množství lipoperoxidů v koncentračním rozmezí do 1 mM t-BHP zřejmě zahrnuje i lipoperoxidační poškození mitochondrií, protože ve stejném koncentračním rozmezí paralelně klesá i mitochondriální membránový potenciál. Při hodnocení respirační aktivity permeabilizovaných hepatocytů se ukázalo, že při stejné koncentraci t-BHP je daleko více inhibována oxidace NADH-dependentních substrátů

glutamátu + malátu než oxidace flavoprotein-dependentního sukcinátu. Inhibiční efekt t-BHP byl patrný bezprostředně po přidání 0,5 mM t-BHP, zatímco oxidace sukcinátu nebyla ovlivněna ani 3 mM t-BHP.

Tyto výsledky naznačují vyšší citlivost komplexu I na peroxidační poškození ve srovnání s citlivostí komplexu II. Pokles respirace obou komplexů lze pozorovat v koncentračním rozmezí t-BHP do 0,5 mM. Při této koncentraci ale nedochází ještě k maximálnímu poklesu mitochondriálního potenciálu zřejmě proto, že flavoprotein-dependentní substráty jsou jen minimálně inhibovány a jsou schopné generovat membránový potenciál.

V této práci jsme navázali na dřívější experimenty prováděné na hepatocytech v suspenzi (Kmoníčková et al., 2001) a prokázali jsme, že t-BHP vykazuje obdobný inhibiční účinek i u hepatocytů v primární kultuře adherentních ke kolagenu. Dále jsme podrobněji hodnotili časový průběh a koncentrační závislost peroxidačního poškození jednotlivých buněčných struktur a metabolických drah.

Pokusy na hepatocytech ukázaly, že existuje rozdílná citlivost jednotlivých mitochondriálních komponent vůči peroxidačnímu poškození. Proto jsme tyto nálezy doplnili studiem inhibičního působení t-BHP na oxidaci pěti NADH-dependentních substrátů oxidovaných izolovanými mitochondriemi. Srovnávali jsme peroxidační poškození oxidace palmityl karnitinu + malátu, pyruvátu + malátu, glutamátu + malátu, oxoglutarátu + malátu a sukcinátu. Získané výsledky prokázaly, že oxidace všech NADH-dependentních substrátů je t-BHP inhibována při mnohem nižších koncentracích než oxidace sukcinátu. Avšak i mezi jednotlivými NADH-dependentními substráty jsme pozorovali podstatné rozdíly. Oxidace palmityl karnitinu a oxoglutarátu byla inhibována podstatně nižšími koncentracemi t-BHP než oxidace pyruvátu a glutamátu.

V souladu s těmito nálezy i s nálezy na hepatocytech bylo i měření změn membránového potenciálu mitochondrií působením t-BHP za přítomnosti různých substrátů. Použitá koncentrace t-BHP (1,5 mM) výrazně snížila během inkubace hodnoty membránového potenciálu za přítomnosti pyruvátu + malátu a glutamátu + malátu, avšak nijak neovlivnila schopnost mitochondrií udržovat vysoký membránový potenciál za přítomnosti sukcinátu.

Tyto nálezy získané na hepatocytech i na mitochondriích by mohly přispět k účinnější strategii při léčení jaterní tkáně poškozené působením různých hepatotoxických látek, indukujících peroxidační stres. Naše výsledky ukazují, že pro jaterní tkáň poškozenou peroxidačním agens je sukcinát daleko účinnějším substrátem při zajišťování energetické homeostázy buněk než glukóza či mastné kyseliny. V literatuře se již objevily práce, které prokazují pozitivní účinek sukcinátu aplikovaného *in vivo* při některých patologických stavech (Chen et al., 2003). Obdobně na pozitivní efekt sukcinátu upozorňují Fedotcheva et al. (2006) a Brooks et al. (2006), kteří zjistili, že inhibice aktivity Krebsova cyklu působením ROS (inhibice oxidace oxoglutarátu) může být kompenzována neenzymovou konverzí oxoglutarátu na sukcinát. Tímto mechanismem může být částečně udržována funkce Krebsova cyklu i při inhibici oxoglutarát dehydrogenázy.

Jak bylo výše zmiňováno, při indukci apoptotických a nekrotických procesů působením peroxidačního stresu hraje významnou roli otevření nesespecifického Ca^{2+} -dependentního membránového póru přechodné permeability, které vede k bobtnání mitochondrií a uvolňování cytochromu c do cytosolu. Tento nesespecifický pór se otevírá při zvýšení koncentrace kalciových iontů v cytosolu buď jejich uvolňováním z intracelulárních zásob, nebo zvýšením transportu kalcia přes cytoplazmatickou membránu. Kanál se může opět zavřít, jestliže dojde k poklesu koncentrace kalcia v cytosolu. Studiu tohoto mechanismu byla v posledních letech věnována mimořádná pozornost. Byla identifikována řada komponent, které jej tvoří, a popsána úloha cyklofilinu, bílkovinné molekuly přítomné v intramitochondriálním prostoru. Ten se musí navázat na komplex proteinů, které tvoří MPTP, aby mohl být pór otevřen. Byla také objevena funkce imunomodulátoru CsA, který vazbě cyklofilinu zamezí a membránový pór tak nelze aktivovat. Hlavním problémem studia MPTP je skutečnost, že původní schéma, které pór definovalo jako kalcie aktivovaný a cyklosporinem A inhibovaný systém, se v průběhu let značně zkomplikovalo, protože se stále hromadily další látky, endogenní i exogenní, které citlivost póru ke kalciovým iontům výrazně (positivně i negativně) ovlivňovaly. Takže detailní popis mechanismů regulujících funkci MPTP byl stále obtížnější. Problém

byl a je i v metodické oblasti. Hlavní metodou používanou pro hodnocení funkce MPTP již více než 40 let (viz např. Lehninger, 1960) je spektrofotometrické či spektrofluorometrické sledování indukce Ca^{2+} -dependentního a CsA-senzitivního bobtnání izolovaných mitochondrií. K bobtnání dochází po otevření póru důsledkem toku vody z cytosolu do mitochondriálního prostoru, který má vyšší osmolaritu. Tato metoda turbidimetrického hodnocení objemu mitochondrií je velmi jednoduchá. Poskytuje však výsledky ve formě křivek, ze kterých lze sice odvodit rozdíly v rychlosti a rozsahu bobtnání, avšak z těchto křivek lze jen velmi obtížně získat přesné číselné údaje o kinetice sledované reakce nezbytné pro hodnocení řady různých faktorů, které funkci kanálu ovlivňují. Proto jsme značnou část práce věnovali dopracování nové metody pro hodnocení funkce MPTP, kterou na našem pracovišti začal používat v rámci své diplomové (magisterské) práce Tichý (2006). Pomocí této metody, která dosud nebyla v literatuře popsána, jsme mohli získat celou řadu údajů, které nám umožnily charakterizovat proces bobtnání. Metoda nám umožnila: (a) přesně vyhodnotit maximální rychlost bobtnání v daných experimentálních podmínkách jako změnu absorbance za časovou jednotku, (b) stanovit čas, kdy je dosaženo maximální rychlosti bobtnání, (c) určit celkový rozsah bobtnání jako celkovou změnu absorbance daného množství mitochondrií.

Pomocí tohoto přístupu jsme pak hodnotili závislost bobtnání na koncentraci kalciových iontů, interakci kalcia a fosfátu, T_3 a t-BHP. V literatuře nejvíce studovaným faktorem, který ovlivňuje MPTP jsou Ca^{2+} ionty (Baumgartner et al., 2009; Ruiz-Meana et al., 2007; Wilson et al., 1991). Ca^{2+} jako induktor MPTP se v mitochondriích váže na proteinové komplexy a na kardiolipin. Zvýšení hladiny Ca^{2+} v cytosolu stimuluje produkci ROS. ROS oxidují volné thiolové skupiny membránových komplexů včetně ANT a mění jejich konformaci. Mohou také oxidovat kardiolipin, což má mimo jiné za následek uvolnění cytochromu c z vazby na tento fosfolipid. Ca^{2+} a ROS jsou navíc signální molekuly, které ovlivňují transkripci genů. Ca^{2+} a ROS spolu při otevírání pórů spolupracují a vzájemně zvyšují svůj účinek (Brookes et al., 2004; Gordeeva et al., 2003; Lemasters, 1999).

Jako nezbytný faktor, nutný k tomu, aby bylo možno vyvolat jev MPT, se potvrdila i přítomnost PO_4^{3-} v reakční směsi. MPT je závislý na koncentraci anorganického fosfátu v inkubačním médiu. Rostoucí koncentrace PO_4^{3-} v reakční směsi způsobuje rostoucí intenzitu jevu MPT. Vzhledem k přítomnosti stopového množství Ca^{2+} v inkubačním médiu bylo toto měření též doplněno o měření, kdy do inkubačního média s 1,0 mM Pi byla přidána EGTA o výsledné koncentraci 250 μM . Po vysycení zbytků Ca^{2+} přítomných ve vodě a v chemikáliích pomocí EGTA, bylo vidět, že vlastní vliv PO_4^{3-} na bobtnání mitochondrií je prakticky nulový. Z tohoto měření bylo patrné, že samotný PO_4^{3-} , bez Ca^{2+} (i stopového množství) není v daných koncentracích schopen indukovat bobtnání. CsA a nepřítomnost PO_4^{3-} v reakční směsi jsou v literatuře často popisovanými faktory vedoucími k inhibici jevu MPT. Je zřejmé, že chybí-li v reakční směsi fosfát, dochází k nástupu bobtnání až při vyšších koncentracích Ca^{2+} . Nutnost přítomnosti fosfátu v reakční směsi může souviset s činností Ca^{2+} -dependentních dehydrogenáz, které jsou odpovědné za syntézu ATP z ADP a fosfátu. Nedostatek fosfátu se může projevit vyřazením činnosti těchto dehydrogenáz, jež mohou hrát určitou roli v nástupu bobtnání. Nám se podařilo prokázat, že samotný Ca^{2+} bez PO_4^{3-} má na bobtnání mitochondrií jen minimální vliv. Teprve až značně vysoké (100 a více μM) koncentrace Ca^{2+} navozují bobtnání mitochondrií. Tato měření jsme doplnili srovnáním aktivace MPT pomocí PO_4^{3-} o výsledné koncentraci 0,1 mM při aplikaci 15 a 150 μM CaCl_2 . Za přítomnosti 0,1 mM PO_4^{3-} se zvyšuje jak rychlost bobtnání, tak se i zkracuje doba, kdy po přidání kalciových iontů dosahuje rychlost bobtnání maximálních hodnot. Je zřejmé, že 0,1 M PO_4^{3-} značně potencuje bobtnání indukované jak 15 tak 150 μM CaCl_2 . Dále jsme sledovali koncentrační závislost Ca^{2+} v přítomnosti 0,1 a 1,0 mM PO_4^{3-} . Při vyšší koncentraci fosfátu (1 mM) byl charakter změn při rostoucí koncentraci Ca^{2+} v reakční směsi přibližně stejný, hodnoty rychlosti bobtnání však byly přibližně dvojnásobné.

K zajímavým výsledkům jsme dospěli poté, co jsme do reakční směsi přidali t-BHP, látku která navozuje oxidační stres a svými účinky ovlivňuje funkci Ca^{2+} -dependentního membránového póru. Přídavek t-BHP měl zásadní účinek na nástup a zejména velikost rozsahu bobtnání. Bylo prokázáno, že t-BHP indukuje otevření MPTP i v intaktních buňkách (Kmoníčková et al., 2001; Nieminen et al., 1997). Indukci bobtnání předchází zvýšení Ca^{2+} v mitochondriální matrix a zvýšená produkce ROS. t-BHP zvyšuje koncentraci Ca^{2+} zejména vyplavením z intracelulárních zásob (Martínez-Burgos et al.,

2006) a oxiduje SH skupiny. Je třeba též zdůraznit, že ne všechny mitochondrie v buňce jsou stejně náchylné k otevření MPTP a jeho otevření nemusí být vždy synchronní proces (Batandier et al., 2004; Collins et al., 2002). Tato různá citlivost mitochondrií (MPTP) k oxidačnímu poškození (t-BHP) byla prokázána i na úrovni orgánů (Endlicher et al., 2009; Panov et al., 2007).

Hormony štítné žlázy svými účinky významně zasahují do energetického metabolismu mitochondrií. Již dřívější studie prokázaly, že tyto hormony indukují děje, které vedou ke změnám ve složení lipidů mitochondriálních membrán, zvyšují aktivitu adenin nukleotidových translokáz a stimulují buněčnou respiraci, zvyšují koncentraci Ca^{2+} v cytosolu a mohou vést až k rozpřažení oxidativní fosforylace (Kadenbach, 2003). V nedávné době se podařilo prokázat, že T_3 v přítomnosti Ca^{2+} indukuje oxidaci SH skupin membránových proteinů (Venditti et al., 2003), což vede ke změně v produkci ROS a vyčerpání kapacity antioxidačních systémů. Jak je patrné z našich výsledků, rostoucí koncentrace T_3 v reakční směsi zvyšuje míru bobtnání mitochondrií. Vyšší koncentrace Ca^{2+} v inkubačním médiu též značně zvyšuje rychlost nástupu bobtnání i jeho rozsah a to hlavně při použití nižších koncentrací T_3 . Jak je patrné z našich výsledků, bobtnání mitochondrií je závislé nejen na koncentraci Ca^{2+} , T_3 , ale též na přítomnosti PO_4^{3-} v reakční směsi. PO_4^{3-} výrazně potencuje účinek T_3 a Ca^{2+} . Pro porovnání jsme přidali měření, kde jsme sledovali samotný vliv Pi a T_3 na intenzitu bobtnání bez přídavku kalcia. Při porovnání těchto záznamů je velmi dobře patrný vliv PO_4^{3-} na bobtnání mitochondrií. Podařilo se nám tedy jednoznačně prokázat, že PO_4^{3-} výrazně potencuje i efekt T_3 na bobtnání mitochondrií.

Jak bylo už výše zmíněno, je CsA považován za inhibitor funkce MPTP. Součástí MPTP je cyklofilin D. Cyklofilin D se nachází v matrix mitochondrií a během indukce bobtnání se váže na vnitřní mitochondriální membránu. Cyklofilin D je mitochondriální peptidyl prolyl-cis-trans-isomeráza, která má rozhodující roli při prostorovém uspořádání bílkovin. CsA (specifický inhibitor cyklofilinů) se specificky váže na cyklofilin D, čímž mění jeho schopnost navázat se na vnitřní mitochondriální membránu a tím inhibuje funkci MPTP (Li, et al., 2004). Inhibiční účinek CsA jsme v našich pokusech využívali k potvrzení toho, že sledované bobtnání mitochondrií indukované Ca^{2+} , PO_4^{3-} , T_3 a t-BHP je spojené právě s funkcí MPTP. Z měření, která jsme prováděli je dobře patrný inhibiční účinek CsA na Ca^{2+} -indukované bobtnání. Pokud byly mitochondrie inkubovány s CsA, pokles absorbance nebyl zaznamenán. CsA se choval jako totální inhibitor. Na jeho inhibiční účinek neměla vliv prakticky žádná z námi testovaných látek. Reakční směsi s přídavkem CsA nevykazovaly žádné známky bobtnání ani po stimulaci vysokými koncentracemi iontů Ca^{2+} , t-BHP či T_3 , popř. kombinací těchto faktorů. Tím jsme jednoznačně potvrdili, že bobtnání mitochondrií navozené vlivem Ca^{2+} , t-BHP, a T_3 bylo vyvolané právě otevřením CsA-senzitivního MPTP. Působení trijodthyroninu na funkci MPTP se nám podařilo prokázat i při *in vivo* aplikaci jedné i tří dávek trijodthyroninu.

V závěrečné části naší práce jsme doplnili nálezy Panova a spol. (2007), který srovnával bobtnání mitochondrií mozku a jater indukované kalciovými ionty. Prokázal, že mitochondrie mozku mají vyšší resistenci vůči indukci bobtnání ionty Ca^{2+} . V našich pokusech jsme srovnávali bobtnání jaterních mitochondrií a mitochondrií srdečního svalu. Jak ukazují naše výsledky i mitochondrie srdečního svalu obdobně jako mitochondrie mozku vykazují vyšší resistenci vůči Ca^{2+} -indukovanému bobtnání. Tyto nálezy tak podporují a rozšiřují představu, že různé buněčné populace mají specifické strategie, jak čelit následkům peroxidačního poškození. Hepatocyty, zřejmě v souladu s vysokou regenerační schopností, mají méně vyvinutou antioxidační ochranu než buňky mozku či srdečního svalu. Tuto představu však bude třeba ještě doplnit dalšími údaji o aktivitě antioxidačních enzymů případně i o resistenci lipoproteinových struktur buňky vůči působení kyslíkových radikálů.

8. ZÁVĚRY

1. Vliv peroxidačního poškození na kultivované hepatocyty

Doplňili jsme naše dřívější nálezy peroxidačního poškození hepatocytů v suspenzi o hodnocení peroxidačního poškození hepatocytů v primární kultuře. Zjistili jsme, že v obou případech působí t-BHP ve stejném koncentračním rozmezí, a to 0,5 - 1 mM. Srovnání změn propustnosti plazmatické membrány, tvorby MDA, změn membránového potenciálu a enzymových aktivit mitochondrií ukázalo, že nejcitlivěji na oxidační stres reaguje oxidace NADH-dependentních substrátů a tvorba MDA.

2. Vliv t-BHP na oxidaci různých substrátů enzymy respiračního řetězce

Působení oxidačního stresu jsme dále hodnotili na izolovaných jaterních mitochondriích. Potvrdili jsme nálezy získané na hepatocytech, které prokázaly vyšší citlivost NADH-dependentních substrátů vůči t-BHP ve srovnání s flavoprotein-dependentním substrátem sukcinátem. Srovnání míry oxidace čtyř NADH-dependentních substrátů ukázalo, že i mezi těmito substráty (palmityl karnitin, pyruvát, glutamát, oxoglutarát) existují rozdíly v citlivosti vůči peroxidačnímu působení t-BHP.

3. Zavedení nové metody pro hodnocení rozsahu a kinetiky bobtnání mitochondrií

Rozpracovali jsme nový postup pro hodnocení funkce MPTP. Klasické křivky bobtnání – změny absorbance suspenze mitochondrií – jsme derivovali. Z derivovaných křivek lze přesně odečítat maximální hodnoty rychlosti bobtnání i dobu, kdy je této rychlosti dosaženo. Pomocí této metody tak lze přesněji hodnotit kinetiku otevírání MPTP.

4. Vzájemné interakce Ca^{2+} , PO_4^{3-} , T_3 a t-BHP na MPTP

Touto novou metodou jsme hodnotili interakci různých faktorů, které ovlivňují MPTP. Získali jsme přesnější údaje o vzájemném působení vápníku, fosfátu a T_3 na rychlost bobtnání a o aktivačním účinku t-BHP na tento děj. Bobtnání indukované Ca^{2+} , t-BHP a T_3 , popř. kombinací těchto faktorů lze zcela inhibovat 2 μM Cyklosporinem A – specifickým inhibitorem MPTP, což prokazuje, že toto bobtnání vzniká v důsledku otevření MPTP.

5. Vliv T_3 podaný potkanům *in vivo* na funkci MPTP

Aktivační vliv trijodtyroninu na MPTP byl prokazatelný i po aplikaci T_3 *in vivo*. Mitochondrie izolované z potkanů, kterým byl aplikován T_3 *in vivo*, jsou citlivější k působení Ca^{2+} iontům ve srovnání s mitochondriemi izolovanými z kontrolních potkanů.

6. Tkáňová specifita citlivosti MPTP vůči Ca^{2+} iontům

Zjistili jsme, že jaterní mitochondrie reagují na stejnou koncentraci CaCl_2 mnohem intenzivnějším bobtnáním než mitochondrie srdeční. Signifikantní vzestup bobtnání lze u jaterních mitochondrií pozorovat již při 2,5 μM koncentraci CaCl_2 a maximální rychlosti je dosaženo při koncentraci 20 - 30 μM . U srdečních mitochondrií je rychlost i rozsah bobtnání mnohem menší, při 25 μM CaCl_2 je u jaterních rychlost bobtnání 7x vyšší než u mitochondrií srdečních.

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Ahmed-Choudhury J, Orsler DJ, Coleman R. *Hepatobiliary effects of tertiary-butylhydroperoxide (tBOOH) in isolated rat hepatocyte couplets*. Toxicol Appl Pharmacol 1998;152(1):270-5.
2. Akerman KE, Wikström MK. *Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential*. FEBS Lett 1976;68(2):191-7.
3. Batandier C, Leverve X, Fontaine E. *Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I*. J Biol Chem 2004;279(17):17197-204.
4. Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne C, Ferdek P, Pozzan T, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R, Watson AJ, Gerasimenko OV. *Calcium elevation in mitochondria is the main Ca^{2+} requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening*. J Biol Chem 2009;284(31):20796-803.
5. Bernardi P. *Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition*. Physiol Rev 1999;79(4):1127-55.
6. Bernardi P. *The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death*. Biochim Biophys Acta 1996;1275(1-2):5-9.
7. Berry MN, Friend DS. *High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study*. J Cell Biol 1969;43(3):506-20.
8. Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ. *Isolated hepatocytes preparation, properties and application*. In: *Biochemistry and Molecular Biology* (R. H. Burdon and P. H. van Knippenberg, eds), New York, Oxford: Elsevier Amsterdam, 1991:1-460.
9. Boveris A, Chance B. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochem J 1973;134(3):707-16.
10. Brookes PS, Freeman RS, Barone MC. *A shortcut to mitochondrial signaling and pathology: a commentary on "Nonenzymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress"*. Free Radic Biol Med 2006;41(1):41-5.
11. Brookes PS. *Mitochondrial H^+ leak and ROS generation: an odd couple*. Free Radic Biol Med 2005;38(1):12-23.
12. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. *Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle*. Am J Physiol Cell Physiol 2004;287(4):C817-33.
13. Bustamante E, Soper JW, Pedersen PL. *A high-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria*. Anal Biochem 1977;80(2):401-8.
14. Byrne AM, Lemasters JJ, Nieminen AL. *Contribution of increased mitochondrial free Ca^{2+} to the mitochondrial permeability transition induced by tert-butylhydroperoxide in rat hepatocytes*. Hepatology 1999;29(5):1523-31.
15. Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. *Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals*. J Biol Chem 1979;254(11):4764-71.
16. Chen Q, Crosby M, Almasan A. *Redox Regulation of Apoptosis before and after Cytochrome C Release*. Korean J Biol Sci 2003;7(1):1-9.
17. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. *Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells*. EMBO J 2002;21(7):1616-27.
18. Crompton M. *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. Biochem J 1999;341 (Pt 2):233-49.
19. Crompton M, Costi A, Hayat L. *Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria*. Biochem J. 1987;245(3):915-8.
20. Červinková Z, Lotková H, Křiváková P, Roušar T, Kučera O, Tichý L, Červinka M, Drahotka Z. *Evaluation of mitochondrial function in isolated rat hepatocytes and mitochondria during oxidative stress*. Altern Lab Anim 2007;35(3):353-61.

21. Červinková Z, Kučera O, Lotková H, Drahotka Z, Houštěk J. *Hodnocení ergetického metabolismu izolovaných hepatocytů pomocí oxygrafie*. Acta Medica (Hradec Kralové) 2002;45(Supp2):65-76.
22. Davies MJ. *Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions*. Biochem J 1989;257(2):603-6.
23. Drahotka Z, Milerová M, Stieglerová A, Škarka L, Houštěk J, Ošťádal B. *Development of cytochrome-c oxidase activity in rat heart: downregulation in newborn rats*. Cell Biochem Biophys 2005;43(1):87-94.
24. Drahotka Z, Křiváková P, Červinková Z, Kmoníčková E, Lotková H, Kučera O, Houštěk J. *Tert-butyl hydroperoxide selectively inhibits mitochondrial respiratory-chain enzymes in isolated rat hepatocytes*. Physiol Res 2005;54(1):67-72.
25. Dröge W. *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev 2002;82(1):47-95.
26. Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. *Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties*. Biochim Biophys Acta 1986;850(3):436-48.
27. Endlicher R, Křiváková P, Lotkova H, Milerová M, Drahotka Z, Červinková Z. *Tissue specific sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺ ions*. Acta Medica (Hradec Kralove) 2009;52(2):69-72.
28. Fenaille F, Mottier P, Turesky RJ, Ali S, Guy PA. *Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders*. J Chromatogr A 2001;921(2):237-45.
29. Gnaiger E, Kuznetsov AV. *Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c*. Biochem Soc Trans 2002;30(2):252-8.
30. Gnaiger E. *Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply*. Respir Physiol 2001;128(3):277-97.
31. Gordeeva AV, Zvyagil'skaya RA, Labas YA. *Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells*. Biochemistry (Mosc) 2003;68(10):1077-80.
32. Grant N. *The role of triiodothyronine-induced substrate cycles in the hepatic response to overnutrition: thyroid hormone as an antioxidant*. Med Hypotheses 2007;68(3):641-9.
33. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. *The permeability transition pore complex: another view*. Biochimie 2002;84(2-3):153-66.
34. Halestrap AP. *The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury*. Biochem Soc Symp 1999;66:181-203.
35. Han D, Canali R, Rettori D, Kaplowitz N. *Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria*. Mol Pharmacol 2003;64(5):1136-44.
36. Haworth RA, Hunter DR. *The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site*. Arch Biochem Biophys 1979;195(2):460-7.
37. Honda H, Kondo T, Zhao QL, Feril LB Jr, Kitagawa H. *Role of intracellular calcium ions and reactive oxygen species in apoptosis induced by ultrasound*. Ultrasound Med Biol 2004;30(5):683-92.
38. Hunter DR, Haworth RA. *The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms*. Arch Biochem Biophys 1979;195(2):453-9.
39. Hütter E, Unterluggauer H, Garedew A, Jansen-Dürr P, Gnaiger E. *High-resolution respirometry-a modern tool in aging research*. Exp Gerontol 2006;41(1):103-9.
40. Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey WA Jr, Schraufstatter IU, Sauerheber RD, Spragg RG, Jackson JH, Cochrane CG. *Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide*. J Biol Chem 1988;263(4):1665-75.
41. Imberti R, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. *Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine*. J Pharmacol Exp Ther 1993;265(1):392-400.

42. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. *Mechanisms of hepatotoxicity*. Toxicol Sci 2002;65(2):166-76.
43. Jakus V, Lopuchová M. *Role of free radicals, oxidative stress and antioxidant system in liver diseases*. Bratisl Lek. Listy 1999;100:548-559.
44. Kadenbach B. *Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation*. Biochim Biophys Acta 2003;1604(2):77-94.
45. Kalderon B, Hermesh O, Bar-Tana J. *Mitochondrial permeability transition is induced by in vivo thyroid hormone treatment*. Endocrinology 1995;136(8):3552-6.
46. Kaplowitz N. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. Semin Liver Dis 2002;22(2):137-44.
47. Kennedy CH, Church DF, Winston GW, Pryor WA. *tert-Butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria*. Free Radic Biol Med 1992;12(5):381-7.
48. Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. *Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes*. Curr Mol Med 2003;3(6):527-35.
49. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr. *The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis*. Environ Health Perspect 1998;106 Suppl 1:289-95.
50. Kmoníčková E, Drahotka Z, Kameníková L, Červinková Z, Mašek K, Farghali H. *Modulatory effect of cyclosporin A on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in hepatocytes*. Immunopharmacol Immunotoxicol 2001;23(1):43-54.
51. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. *Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress*. Free Radic Biol Med 1999;26(3-4):463-71.
52. Kroemer G, Reed JC. *Mitochondrial control of cell death*. Nat Med 2000;6(5):513-9.
53. Křiváková P, Lábajová A, Červinková Z, Drahotka Z. *Inhibitory effect of t-butyl hydroperoxide on mitochondrial oxidative phosphorylation in isolated rat hepatocytes*. Physiol Res 2007;56(1):137-40.
54. Lehninger AL. *Thyroxine and the swelling and contraction cycle in mitochondria*. Ann N Y Acad Sci 1960;86:484-93.
55. Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA. *Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy*. Antioxid Redox Signal 2002;4(5):769-81.
56. Lemasters JJ. V. *Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis*. Am J Physiol 1999;276(1 Pt 1):G1-6.
57. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. *The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy*. Biochim Biophys Acta 1998;1366(1-2):177-96.
58. Li Y, Johnson N, Capano M, Edwards M, Crompton M. *Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis*. Biochem J 2004;383(Pt 1):101-9.
59. Lyamzaev KG, Pletjushkina OY, Saprunova VB, Bakeeva LE, Chernyak BV, Skulachev VP. *Selective elimination of mitochondria from living cells induced by inhibitors of bioenergetic functions*. Biochem Soc Trans 2004;32(Pt 6):1070-1.
60. Martínez-Burgos MA, Granados MP, González A, Rosado JA, Yago MD, Salido GM, Martínez-Victoria E, Mañas M, Pariente JA. *Involvement of ryanodine-operated channels in tert-butylhydroperoxide-evoked Ca²⁺ mobilisation in pancreatic acinar cells*. J Exp Biol 2006;209(Pt 11):2156-64.
61. Masaki N, Kyle ME, Serroni A, Farber JL. *Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide*. Arch Biochem Biophys 1989;270(2):672-80.

62. Mehendale HM. *Amplified interactive toxicity of chemicals at nontoxic levels: mechanistic considerations and implications to public health*. Environ Health Perspect 1994;102 Suppl 9:139-49.
63. Montero M, Alonso MT, Albillos A, García-Sancho J, Alvarez J. *Mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mediated by the Ca²⁺ uniporter*. Mol Biol Cell 2001;12(1):63-71.
64. Nicholls AG, Ferguson SJ. *Bioenergetics 3*, Academic Press, 2001
65. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. *Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species*. Am J Physiol 1997;272(4 Pt 1):C1286-94.
66. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. *Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide*. Biochem J 1995;307 (Pt 1):99-106.
67. Nohl H, Gille L, Staniek K. *Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria*. Biochem Pharmacol 2005;69(5):719-23.
68. Nulton-Persson AC, Starke DW, Mieyal JJ, Szveda LI. *Reversible inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in response to alterations in the mitochondrial glutathione status*. Biochemistry 2003;42(14):4235-42.
69. Nulton-Persson AC, Szveda LI. *Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide*. J Biol Chem 2001;276(26):23357-61.
70. Nuydens R, Novalbos J, Dispersyn G, Weber C, Borgers M, Geerts H. *A rapid method for the evaluation of compounds with mitochondria-protective properties*. J Neurosci Methods 1999;92(1-2):153-9.
71. Orrenius S. *Mitochondrial regulation of apoptotic cell death*. Toxicol Lett 2004;149(1-3):19-23.
72. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Hemendinger R, Greenamyre JT, Rosenfeld J. *Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice*. Am J Physiol Cell Physiol 2007;292(2):C708-18.
73. Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Garcia-Dorado D. *Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca²⁺ overloaded cardiac myocytes*. Basic Res Cardiol 2007;102(6):542-52.
74. Scheffler IE. *Mitochondria make a come back*. Adv Drug Deliv Rev 2001;49(1-2):3-26.
75. Schwartz HL, Oppenheimer JH. *Physiologic and biochemical actions of thyroid hormone*. Pharmacol Ther B 1978;3(3):349-76.
76. Seglen PO. *Preparation of isolated rat liver cells*. Methods Cell Biol 1976;13:29-83.
77. Skulachev VP, Bakeeva LE, Chernyak BV, Domnina LV, Minin AA, Pletjushkina OY, Saprunova VB, Skulachev IV, Tsyplenkova VG, Vasiliev JM, Yaguzhinsky LS, Zorov DB. *Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis*. Mol Cell Biochem 2004;256-257(1-2):341-58.
78. Skulachev VP. *Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms*. Mol Aspects Med 1999;20(3):139-84.
79. Southorn PA, Powis G. *Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions*. Mayo Clin Proc 1988;63(4):381-9.
80. Starkov AA, Fiskum G. *Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state*. J Neurochem 2003;86(5):1101-7.
81. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. *Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain*. J Biol Chem 2002;277(47):44784-90.
82. Tapia G, Cornejo P, Fernández V, Videla LA. *Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation*. Toxicol Lett 1999;106(2-3):209-14.
83. Thannickal VJ, Fanburg BL. *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000;279(6):L1005-28.

84. Tichý L. *Posouzení energetického metabolismu izolovaných hepatocytů a mitochondrií v průběhu oxidačního stresu*. Diplomová práce, Univerzita Pardubice, Fakulta Chemicko-technologická, 2006
85. Turrens JF. *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol 2003;552(Pt 2):335-44.
86. Venditti P, Pamplona R, Portero-Otin M, De Rosa R, Di Meo S. *Effect of experimental and cold exposure induced hyperthyroidism on H₂O₂ production and susceptibility to oxidative stress of rat liver mitochondria*. Arch Biochem Biophys 2006;447(1):11-22.
87. Venditti P, De Rosa R, Di Meo S. *Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues*. Free Radic Biol Med 2003;35(5):485-94.
88. Wallace DC. *Mitochondrial diseases in man and mouse*. Science 1999;283(5407):1482-8.
89. Wallace KB, Eells JT, Madeira VM, Cortopassi G, Jones DP. *Mitochondria-mediated cell injury*. Fundam Appl Toxicol 1997;38(1):23-37.
90. Wilson JA, Lau YS, Gleeson JG, Wilson JS. *The action of MPTP on synaptic transmission is affected by changes in Ca²⁺ concentrations*. Brain Res 1991;541(2):342-6.
91. Zhang JG, Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Fariss MW. *Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid peroxidation-dependent and -independent cell death: protective role of antioxidants*. Arch Biochem Biophys 2001;393(1):87-96.
92. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. *Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes*. J Exp Med 2000;192(7):1001-14.

10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

Původní články

1. **Endlicher R**, Křiváková P, Rauchová H, Nůšková H, Červinková Z, Drahoť Z. Peroxidative damage of mitochondrial respiration is substrate-dependent. Physiol Res. 2009;58(5):685-92. **IF** v roce 2008 **1,653**
2. **Endlicher R**, Křiváková P, Lotková H, Milerová M, Drahoť Z, Červinková Z. Tissue specific sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺ ions. Acta Medica (Hradec Kralove). 2009;52(2):69-72.
3. Červinková Z, Křiváková P, Lábajová A, Roušar T, Lotková H, Kučera O, Endlicher R, Cervinka M, Drahoť Z. Mechanisms participating in oxidative damage of isolated rat hepatocytes. Arch Toxicol. 2009;83(4):363-72. **IF** v roce 2008 **2,626**
4. Lotková H, Kučera O, Roušar T, Endlicher R, Křiváková P, Garnol T, Červinková Z. Effect of S-adenosylmethionine on acetaminophen-induced toxic injury of rat hepatocytes *in vitro*. ACTA VET. BRNO. 2009;78: 603-613. **IF** v roce 2008 **0,395**

Statě ve sbornících

1. Endlicher R., Staňková P., Kučera O., Červinková Z., Drahotka Z. The effect of triiodothyronine on swelling of isolated mitochondria in *in vitro* and *in vivo* conditions. 27th annual Workshop of the Scandinavian Society for cell toxicology 16. - 19. 9. 2009, Sedmihorky (poster), publikovaný abstrakt, Proceedings ISBN 978-80-7399-818-9, str. 24
2. Staňková P., Kučera O., Roušar T., Lotková H., Endlicher R., Gunčová I., Červinková Z. The effect of thioacetamide on rat liver *in vitro* and *in vivo*. 27th annual Workshop of the Scandinavian Society for cell toxicology 16. - 19. 9. 2009, Sedmihorky (poster), publikovaný abstrakt, Proceedings ISBN 978-80-7399-818-9, str. 34
3. Křiváková P, Endlicher R, Kučera O, Lotkova H, Červinkova Z, Drahotka Z. Peroxidative damage of mitochondrial respiration is substrate-dependent. 45th Congress of the European Societies of Toxicology, Rhodos, 5. - 8. 10. 2008, Greece (poster), abstrakt publikován v Toxicology Letters 180S (2008) S109
4. Endlicher R, Křiváková P, Drahotka Z, Červinková Z. Trijodtyronin zvyšuje propustnost vnitřní mitochondriální membrány (mitochondrial permeability transition pore) u potkanů v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. XXXVII. Májové hepatologické dny; 13. – 15. 5. 2009, Karlovy Vary (poster), abstrakt publikován v časopise: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2009; 63 (3); str 152-154
5. Křiváková P, Kučera O, Roušar T, Lotková H, Endlicher R, Gunčová I, Červinková Z. Účinek thioacetamidu na potkaní játra v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. XXXVII. Májové hepatologické dny; 13. – 15. 5. 2009, Karlovy Vary (poster), abstrakt publikován v časopise: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2009; 63 (3); str 152-154
6. Endlicher R., Křiváková P., Drahotka Z., Červinková Z. Vliv trijodtyroninu na citlivost mitochondrial permeability transition póru u izolovaných mitochondrií; XXXVI. Májové hepatologické dny; 14. – 16. 5. 2008, Karlovy Vary (přednáška), abstrakt publikován v časopise: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2008; 62 (2); str. 123-124
7. Kučera O., Lotková H., Křiváková P., Kotraš T., Garnol T., Endlicher R., Mazurová Y., Roušar T., Červinková Z. Zavedení modelu nealkoholického ztukovatění jater na potkanech; XXXVI. Májové hepatologické dny; 14. – 16. 5. 2008, Karlovy Vary (přednáška), abstrakt publikován v časopise: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2008; 62 (2); str. 123-124
8. Křiváková P., Kučera O., Roušar T., Lotková H., Endlicher R., Červinková Z. Vliv acetaminofenu na respiraci potkaních hepatocytů; XXXVI. Májové hepatologické dny; 14. – 16. 5. 2008, Karlovy Vary (přednáška), abstrakt publikován v časopise: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2008; 62 (2); str. 123-124
9. Endlicher R., Tichý L., Křiváková P., Drahotka Z., Červinková Z. Bobtnání (swelling) mitochondrií jako indikátor působení oxidačního stresu a indukce apoptických a nekrotických procesů. XXXV. Májové hepatologické dny, 12. 5. 2007, Karlovy Vary (přednáška), abstrakt publikován v časopise: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2007; 61 (3); str 181-182
10. Kučera O., Lotková H., Roušar T., Endlicher R., Červinková Z. Vliv s-adenosylmethioninu na toxické poškození hepatocytů acetaminofenem *in vitro* XXXV. Májové hepatologické dny, 12. 5. 2007, Karlovy Vary (přednáška), abstrakt publikován v časopise: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2007; 61 (3); str 181-182

Přednášky na odborných setkáních

1. Endlicher R., Staňková P., Kučera O., Červinková Z., Drahotka Z. The effect of triiodothyronine on swelling of isolated mitochondria in *in vitro* and *in vivo* conditions. 27th annual Workshop of the Scandinavian Society for cell toxicology 16. - 19. 9. 2009, Sedmihorky (poster)
2. Staňková P., Kučera O., Roušar T., Lotková H., Endlicher R., Gunčová I., Červinková Z. The effect of thioacetamide on rat liver *in vitro* and *in vivo*. 27th annual Workshop of the Scandinavian Society for cell toxicology 16. - 19. 9. 2009, Sedmihorky (poster)
3. Křiváková P, Endlicher R, Kučera O, Lotkova H, Červinkova Z, Drahotka Z Peroxidative damage of mitochondrial respiration is substrate-dependent. 45th Congress of the European Societies of Toxicology, Rhodos, 5. - 8. 10. 2008, Greece (poster)
4. Endlicher R, Křiváková P, Drahotka Z, Červinková Z. Trijodtyronin zvyšuje propustnost vnitřní mitochondriální membrány (mitochondrial permeability transition pore) u potkanů v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. XXXVII. Májové hepatologické dny; 13. – 15. 5. 2009, Karlovy Vary (poster)
5. Křiváková P, Kučera O, Roušar T, Lotková H, Endlicher R, Gunčová I, Červinková Z. Účinek thioacetamidu na potkaní játra v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. XXXVII. Májové hepatologické dny; 13. – 15. 5. 2009, Karlovy Vary (poster)
6. Endlicher R., Tichý L., Křiváková P., Drahotka Z., Červinková Z. Bobtnání (swelling) mitochondrií jako indikátor působení oxidačního stresu; Závěrečná konference doktorského projektu: GAČR 303/03/H065; 18. 6. 2007, Praha (poster)
7. Endlicher R., Křiváková P., Kučera O., Drahotka Z., Červinková Z. Vliv trijodtyroninu a dalších faktorů na citlivost mitochondrial permeability transition pore u izolovaných mitochondrií; 464. plenární zasedání Fyziol. Sekce ,ČLS J. Ev. Purkyně v HK a pobočky Československé biol. Spol. v HK; 7. 5. 2008, Hradec Králové (přednáška)
8. Endlicher R., Křiváková P., Kučera O., Drahotka Z., Červinková Z. Vliv trijodtyroninu a dalších faktorů na citlivost mitochondrial permeability transition pore u izolovaných mitochondrií; přednáška v rámci cyklu odborných seminářů II. ročníku doktorského studia - akademický rok 2007/08; 12. 5. 2008, Hradec Králové (přednáška)
9. Endlicher R., Křiváková P., Drahotka Z., Červinková Z. Vliv trijodtyroninu na citlivost mitochondrial permeability transition pór u izolovaných mitochondrií; XXXVI. Májové hepatologické dny; 14. – 16. 5. 2008, Karlovy Vary (přednáška)
10. Kučera O., Lotková H., Křiváková P., Kotraš T., Garnol T., Endlicher R., Mazurová Y., Roušar T., Červinková Z. Zavedení modelu nealkoholického ztukovatění jater na potkanech; XXXVI. Májové hepatologické dny; 14. – 16. 5. 2008, Karlovy Vary (přednáška)
11. Křiváková P., Kučera O., Roušar T., Lotková H., Endlicher R., Červinková Z. Vliv acetaminofenu na respiraci potkaních hepatocytů; XXXVI. Májové hepatologické dny; 14. – 16. 5. 2008, Karlovy Vary (přednáška)
12. Endlicher R., Tichý L., Křiváková P., Drahotka Z., Červinková Z. Bobtnání (swelling) mitochondrií jako indikátor působení oxidačního stresu a indukce apoptických a nekrotických procesů. XXXV. Májové hepatologické dny, 12. 5. 2007, Karlovy Vary (přednáška)

13. Kučera O., Lotková H., Roušar T., Endlicher R., Červinková Z. Vliv s-adenosylmethioninu na toxické poškození hepatocytů acetaminofenem in vitro XXXV. Májové hepatologické dny, 12. 5. 2007, Karlovy Vary (přednáška)
14. Endlicher R., Tichý L., Křiváková P., Dražota Z., Červinková Z. Swelling mitochondrií jako jedna z metod pro hodnocení působení oxidačního stresu Bioenergetika 2007, 9. 6. 2007, Rejvíz, Jeseníky (přednáška)