

Abstrakt

Aktivita mitochondriální cytochrom *c* oxidasy (COX, EC 1.9.3.1) může být ovlivněna jak faktory exogenními, tak endogenními. Nejúčinnější a v prostředí se nejhojněji vyskytující látkou, jež inhibuje COX, je kyanid. Velmi častá příčina lidské deficiencie COX je představována defektem v genu *SURF1*.

Mechanismus inhibičního účinku kyanidu na COX stejně jako podmínky jeho zvratu nejsou zcela vysvětleny. Tři parametry funkce COX, jmenovitě transport elektronů (spotřeba kyslíku), transport protonů (mitochondriální membránový potenciál, $\Delta\psi_m$) a afinita ke kyslíku (hodnota p_{50}), byly studovány s ohledem na inhibici KCN a její zvrát pyruvátém. Analyzována byla funkce COX v intaktních izolovaných mitochondriích jak v rámci dýchacího řetězce, tak jako samostatný enzym za použití sukcinátu nebo arteficiálního elektronového donoru askorbát + TMPD. 250 μ M KCN zcela inhiboval elektron- i protontransportní funkci COX a tato inhibice byla plně reverzibilní, což se projevilo plnou aktivitou po promytí mitochondrií. Přidání 60 mM pyruvátu vyvolalo maximální obnovu obou parametrů pouze na 60 – 80 % původních hodnot. KCN o nízkých koncentracích do 5 μ M způsobil výrazný, třicetinásobný pokles afinity COX ke kyslíku. Tento pokles byl opět plně reverzibilní promytím mitochondrií, zatímco podání pyruvátu vedlo jen k částečné, přesto signifikantní obnově afinity ke kyslíku. Tyto výsledky ukazují reverzibilní podstatu inhibice COX kyanidem a odhalují omezený potenciál pyruvátu působit jako kyanidové antidotum. Rovněž vyplývá, že afinita COX ke kyslíku je nejcitlivějším ukazatelem pro detekci toxického efektu kyanidu.

Funkce proteinu Surf1, asemblačního faktoru COX, je stále diskutována. Vliv defektu Surf1 na všechny tři funkční parametry COX byl analyzován v kultivovaných imortalizovaných fibroblastech získaných z myší s knockoutem v genu *SURF1*. V *SURF1*^{-/-} fibroblastech byl obsah COX snížen na 58 % kontroly, a korespondoval tak s 38% poklesem aktivity COX, jež byla měřena spektrofotometricky a normalizována na aktivitu citrát synthasy. V rychlosti endogenní respirace ani respirace s askorbátem a TMPD permeabilizovaných buněk však nebyla pozorována žádná změna. $\Delta\psi_m$ generovaný COX dosáhl 92 % maximálního $\Delta\psi_m$ v kontrolních buňkách, ale pouze 73 % v *SURF1*^{-/-} buňkách. Proton-translokační funkce COX tedy byla částečně snížena. Jelikož hodnota p_{50} u *SURF1*^{-/-} buněk byla alespoň dvakrát zvýšena oproti kontrole ve všech měřených metabolických

stavech, afinita ke kyslíku se opět ukázala jako nejcitlivější a nejvíce ovlivněný funkční parametr COX. Ve srovnání s buňkami Surf1-deficientních pacientů vykazovaly myši *SURF1*^{-/-} buňky mnohem mírnější funkční projevy poškození COX, což svědčí o tom, že assembly faktor Surf1 není u myši tolik esenciální jako u člověka.