

Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

# Hepatocyty jako modelový systém pro studium poruch energetického metabolismu

Mgr. Pavla Křiváková

Autoreferát disertační práce



Hradec Králové 2006



Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

**Hepatocyty jako modelový systém  
pro studium poruch energetického  
metabolismu**

Mgr. Pavla Křiváková

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program  
fyziologie a patologická fyziologie

Hradec Králové

2006

Disertační práce byla vypracována v rámci studia v doktorském studijním programu fyziologie a patologická fyziologie na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

- Uchazeč: Mgr. Pavla Křiváková  
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové,  
Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec  
Králové
- Školitel: Doc. 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,  
Václavská 1083, 142 20 Praha 4
- Oponenti: Prof. RNDr. Jiří Mejsnar, DrSc.  
Oddělení obecné biologie a genetiky, 3. lékařská fakulta,  
Univerzita Karlova v Praze, Ruská 87, 100 00 Praha 10
- RNDr. Martin Kalous, CSc.  
Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie,  
Přírodovědecká fakulta,  
Univerzita Karlova v Praze, Viničná 7, 128 43 Praha 2

Tato práce vznikla za podpory grantů: GAČR 303/03/H065, GAUK 126/04/C a MSM 0021620820

Stanovisko k disertační práci vypracovalo vedení Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, Hradec Králové.

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

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| <b>SEZNAM ZKRATEK</b>   | 4  |
| <b>1 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>  | 4  |
| 1.1 <i>Toxické poškození jater</i>  | 4  |
| 1.2 <i>Úloha mitochondrií při toxickém poškození jater</i>                      | 4  |
| 1.3 <i>Ochrana jater před poškozením</i>  | 5  |
| 1.4 <i>Modelové systémy pro studium toxického poškození jater</i>               | 5  |
| 1.5 <i>tBHP jako modelová látka pro studium oxidačního poškození hepatocytů</i> | 5  |
| 1.6 <i>SAMe jako látka s potenciálně hepatoprotektivním účinkem</i>             | 6  |
| <b>2 CÍLE PRÁCE</b>   | 6  |
| <b>3 METODIKY</b>   | 6  |
| <b>4 VÝSLEDKY</b>   | 8  |
| 4.1 <i>Vliv tBHP na izolované potkaní hepatocyty a mitochondrie</i>             | 8  |
| 4.2 <i>Efekt SAMe na potkaní hepatocyty poškozené tBHP</i>                      | 11 |
| <b>5 DISKUZE</b>  | 12 |
| <b>6 ZÁVĚRY</b>   | 17 |
| <b>7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>  | 18 |
| <b>8 SOUHRN</b>   | 20 |
| <b>9 SUMMARY</b>  | 20 |
| <b>10 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY</b>   | 21 |

## SEZNAM ZKRATEK

|                           |   |
|---------------------------|---|
| ATP                       | adenosintrifosfát   |
| CM-H <sub>2</sub> DCF(DA) | 5-(a 6-)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein(diacetát) |
| GSH                       | redukováný glutathion   |
| GSSG                      | oxidovaný glutathion (glutathiondisulfid)                       |
| HPLC                      | vysokoučinná kapalinová chromatografie                          |
| LDH                       | laktátdehydrogenasa   |
| MDA                       | malondialdehyd  |
| MMP                       | mitochondriální membránový potenciál                            |
| PTP                       | <i>permeability transition pore</i>                             |
| Rho123                    | rhodamin 123  |
| RNS                       | reaktivní sloučeniny dusíku                                     |
| ROS                       | reaktivní sloučeniny kyslíku                                    |
| SAMe                      | S-adenosylmethionin   |
| TBARS                     | <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>                  |
| tBHP                      | terciární butylhydroperoxid                                     |
| WE                        | Williamsovo médium E  |

## 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 1.1 Toxické poškození jater

Játra mají centrální roli v metabolismu živin a jsou také hlavním orgánem biotransformace většiny exogenních látek. Jsou proto častým cílem toxického účinku mnoha látek, mezi něž patří i celá řada léků. Hepatotoxiny a jejich metabolity mění nebo vyvolávají různé biochemické reakce, které poškozují buněčné makromolekuly, což může vyústit v buněčnou smrt. Oxidační stres je jedním z nejvýznamnějších mechanismů, kterými hepatotoxiny vyvolávají poškození jater. Jedná se o komplexní proces, jehož mechanismus není zcela objasněn. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou známy jako toxické látky, které oxidují buněčné komponenty a poškozují buňky. Podle současných poznatků se některé ROS v nízkých subtoxických koncentracích jako druzí poslové účastní přenosu signálu a podílejí se na regulaci některých buněčných dějů (Thannickal at al., 2000). Primárním ROS je superoxidový radikál. Mezi ROS dále patří peroxid vodíku, hydroxylový radikál a peroxylový radikál. Zvláštní postavení má radikál oxidu dusnatého NO, který může reagovat se superoxidem za vzniku peroxodusitanu (ONOO<sup>-</sup>) (Valko et al., 2006). Porušení rovnováhy mezi vznikem reaktivních metabolitů a jejich detoxikací vede k toxickému poškození jater.

Reaktivní metabolity vyvolávají nebo mění různé biochemické reakce a ovlivňují proteiny, lipidy a DNA. Tyto biochemické změny mohou buď přímo zasáhnout buněčné organely, nebo je nepřímo ovlivnit prostřednictvím aktivace/inhibice signálních kináz, transkripčních faktorů a genové exprese. Následkem intracelulárního stresu může být buď přímé spuštění nekrotických, popřípadě apoptotických procesů, nebo senzitivizace buněk k letálnímu poškození složkami imunitního systému (Kaplowitz et al., 2002).

### 1.2 Úloha mitochondrií při toxickém poškození jater

Mitochondrie hrají v mechanismu jaterního poškození velmi významnou roli. Tyto organely plní v buňce celou řadu funkcí. Jsou největším producentem energie ve formě ATP, podílejí se na udržování redoxního potenciálu, termoregulaci, modulaci Ca<sup>2+</sup> signálu, jsou zdrojem ROS, podílejí se na buněčné signalizaci a v neposlední řadě spouští a regulují buněčnou smrt. Detailní posouzení energetického metabolismu buňky je tedy základní pro

pochopení mechanismu toxického účinku látek a eventuálně pro posouzení efektu látek s potenciálním hepatoprotektivním efektem.

### 1.3 Ochrana jater před poškozením

V hepatocytech našťestí existuje řada ochranných mechanismů a za fyziologických podmínek je tvorba ROS a RNS v dynamické rovnováze s jejich odstraňováním. Obecně lze říci, že existují 3 fáze antioxidační ochrany. V první fázi se uplatňují mechanismy, které omezují samotnou tvorbu ROS a RNS. Sem patří například mírné rozpražení „*mild uncoupling*“ mitochondriální respirace a fosforylace (Skulachev, 1999), chelatace iontů železa a inaktivace enzymových systémů zodpovědných za tvorbu reaktivních metabolitů (Červinková, 1999). Ve druhé fázi se uplatňují antioxidanty, které degradují již vytvořené ROS a RNS. Do této skupiny ochranných mechanismů patří antioxidační enzymy i neenzymové látky. Nejdůležitějšími antioxidačními enzymy jsou superoxid dismutáza (SOD), glutathionperoxidáza a kataláza. Neenzymové antioxidanty zahrnují vitamín C, vitamín E, karotenoidy, thiolové antioxidanty (glutathion, thioredoxin, lipová kyselina), přírodní flavinoidy, melatonin, bilirubin a další sloučeniny. Některé látky působí ve vodném prostředí, jiné v membránách a další v obou. Některé antioxidanty mohou regenerovat jiné antioxidanty a obnovovat jejich funkci. Do třetí skupiny zahrnujeme mechanismy reparace a regenerace poškozené tkáně.

### 1.4 Modelové systémy pro studium toxického poškození jater

Ke studiu hepatotoxicity různých látek se využívají *in vivo* a *in vitro* modely. Hlavními problémy studií *in vivo* jsou jejich vysoká ekonomická náročnost, etická a legislativní omezení spojená s použitím laboratorních zvířat a v neposlední řadě také omezení vyplývající z mezidruhových rozdílů. V poslední době se do popředí dostávají studie v podmínkách *in vitro*. Zatímco v podmínkách *in vivo* lze zachytit účinek nejen na úrovni buněčné nebo cílového orgánu, ale i vazby mezi jednotlivými orgány a vedlejší účinky, *in vitro* modely jsou účinné a cenově dostupné nástroje k zjištění specifických mechanismů za přesně kontrolovaných podmínek. Proto je nutné výsledky studií v podmínkách *in vitro* porovnat a doplnit o pokusy *in vivo*. Nespornou výhodou *in vitro* modelů je možnost použití lidských tkání a buněk. Výsledky studií prováděných na různých živočišných druzích *in vivo* totiž nemohou být s jistotou přeneseny na člověka (Kosina et al., 1999). Na našem pracovišti používáme izolované hepatocyty a izolované mitochondrie.

Izolované hepatocyty jsou dnes jedním z klíčových modelů experimentální toxikologie a farmakologie. Slouží pro studium toxicity a metabolismu xenobiotik, pro analýzu obecných i jaterních specifických funkcí, molekulárních mechanismů genové regulace a pro studium mechanismů jaterních onemocnění.

Izolované mitochondrie se používají ke studiu efektů chemických látek na oxidační fosforylaci, syntézu ATP a  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin.

### 1.5 tBHP jako modelová látka pro studium oxidačního poškození hepatocytů

Terciární butylhydroperoxid (tBHP) je modelová látka, která je často využívána pro studium mechanismu oxidačního stresu. Je to analog lipidových hydroperoxydů tvořených během oxidačního stresu v buňkách. Mechanismus účinku tBHP je částečně znám, je proto vhodný i pro zavádění metod hodnocení oxidačního poškození. Tert-BHP není narozdíl od peroxidu vodíku degradován katalázou a lze ho použít ke zkoumání závislosti oxidačního poškození na dávkě oxidantu. Tert-BHP snadno proniká do buňky, kde je pomocí různých cest metabolizován. Bylo zjištěno, že část volných radikálů indukovaných tBHP vzniká v mitochondriích a mitochondrie hrají klíčovou roli v mechanismu toxického účinku tBHP (Brambilla et al., 1998). Tert-BHP vyvolává rychlou oxidaci mitochondriálních pyridinových

nukleotidů, rozvrat kalciové homeostázy, zvýšení mitochondriální produkce ROS, oxidační poškození buněčných makromolekul a buněčnou smrt (Lemasters et al., 2002).

### 1.6 SAME jako látka s potenciálně hepatoprotektivním účinkem

S-adenosylmethionin (SAME) je biologicky aktivní sloučenina obsahující síru, která se nachází prakticky ve všech žijících organizmech (Friedel et al, 1989). SAME je po ATP druhým nejčastěji využívaným substrátem enzymových reakcí (Grillo a Colombatto, 2005) a účastní se transmetylací, transsulfurací a syntéz polyaminů. Přestože je jeho tvorby schopna většina lidských buněk, centrální úlohu v metabolismu SAME plní játra. Bylo zjištěno, že aktivita S-adenosyl-L-methionin syntázy, enzymu zodpovědného za syntézu SAME, je snižena u pacientů s jaterními poruchami a vlivem toxického poškození (Corrales et al., 1992). V různých experimentech bylo prokázáno, že exogenní SAME vykazuje hepatoprotektivní účinek při poškození některými hepatotoxiny (Stramentinoli et al, 1978; Lieber, 2002). Řada klinických studií u člověka rovněž popisuje jeho pozitivní účinek při léčbě některých jaterních onemocnění (Martinez-Chantar et al, 2002). Mechanismus účinku SAME není zcela znám. V buňce slouží jako donor methylových skupin v transmethylačních reakcích. Účastní se i methylace membránových fosfolipidů, což napomáhá udržení fluidity membrán. Transsulfurační reakce SAME jsou mimo jiné důležité při biosyntéze GSH. V některých studiích byl popsán pozitivní efekt exogenního SAME na hladinu glutathionu sniženou vlivem hepatotoxinů (Wu et al., 1996), tím může působit protektivně proti oxidačnímu poškození.

## 2 CÍLE-PRÁCE

- a) Zavedení metody měření spotřeby kyslíku na modelu izolovaných hepatocytů a izolovaných mitochondrií pomocí high-resolution oxygraphy.
- b) Studium změn membránového potenciálu jaterních mitochondrií
- c) Využití měření změn energetického metabolismu hepatocytů jako ukazatele toxického poškození jater modelovou látkou terciárním butylhydroperoxidem (tBHP) a zkoumání mechanismu jeho účinku *in vitro* na izolované potkaní hepatocyty.
- d) Využití modelu oxidačního poškození hepatocytů pro testování potenciálního hepatoprotektivního účinku s-adenosylmethioninu (SAME)

## 3 METODIKY

Hepatocyty a jaterní mitochondrie jsme izolovali z dospělých samců potkanů kmene Wistar o hmotnosti 180 až 240 g. Potkaní byli chováni za standardních podmínek. Protokoly pokusů 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.

Hepatocyty jsme izolovali metodou dvoustupňové perfúze jater pomocí kolagenázy (Seglen, 1976). Viabilita hepatocytů byla stanovena pomocí exkluze trypanové modři (Trypan blue, Sigma-Aldrich). Pro naše experimenty jsme použili jen hepatocyty s viabilitou vyšší než 90 %. Denzitu buněk jsme počítali v Burkerově komůrce. Část hepatocytů jsme použili pro měření respirace pomocí vysokoučinné respirometrie (Oxygraf Oroboros-2k) a pro detailní posouzení  $\Delta\psi_m$  (TPP<sup>+</sup> selektivní elektroda). Ostatní buňky jsme kultivovali buď v suspenzi, nebo v primokulturách.



Suspenze o denzitě 1 milión buněk v 1 ml média jsme kultivovali v lahvíčkách o objemu 50 ml v CO<sub>2</sub> inkubátoru (Sanyo, MCO-17AIC) v 5 % atmosféře CO<sub>2</sub> při 37 °C. Jako kultivační médium byl použit Krebs-Henseleitův roztok.

Pro účely kultivace hepatocytů v primokulturách jsme buňky nařadily na denzitu 1.10<sup>6</sup> buněk/ml Williamsova E (WE) média obohaceného o některé substráty. Do WE média bez L-glutaminu a fenolčerveně (Biotech) jsme přidali fetální bovinní sérum (10 %, Biotech), L-glutamin (2 mM, Biotech), penicilin (200 IU/ml, Biotech), streptomycin (0,2 mg/ml, Biotech), inzulin (0,08 IU/ml, Actrapid HM inj., Novo Nordisk), prednizolon (0,5 µg/ml, Solu-Decotin, Merck) a glukagon (0,008 µg/ml, Glukagen 1 mg inj HYPOKIT, Novo Nordik). Na kolagenované (Collagen Type I from Rat Tail, Sigma-Aldrich) Petriho misky jsme napipetovali 2 ml suspenze hepatocytů ve WE médiu. Hepatocyty jsme poté ponechali 2 hodiny v CO<sub>2</sub> inkubátoru (5% CO<sub>2</sub>) při 37 °C k přichycení ke kolagenu. Poté jsme médium včetně nepřichycených buněk odsáli a primární kultury jsme použili pro experimenty.

K hepatocytům v kontrolních skupinách dáváme kompletní WE médium (opět 2 ml), do ostatních pak stejné médium, které navíc obsahuje terciární butylhydroperoxid (Fluka) a/nebo SAME (Ademetionini hydrogenobutandisulfonas, Transmetil, Abbott). Misky jsou inkubovány při 37 °C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> po stanovenou dobu. Po jejím uplynutí se odebere médium na biochemická stanovení a buňky se pak buď dále kultivují nebo se využijí pro různá měření. Veškeré manipulace, jak s roztoky tak i s buňkami, jsou prováděny v laminárním boxu za sterilních podmínek.

Pro posouzení morfologických znaků hepatocytů jsme použili invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem Olympus CK 40, digitální fotografie byly pořízeny pomocí digitálního fotoaparátu Olympus, Camedia 4040.

Mitochondrie byly izolovány z potkaních jater metodou diferenční centrifugace (Schneider a Hogeboom, 1951).

Obsah proteinů byl stanoven Lowryho metodou (Lowry et al., 1951).

Jako marker integrity plazmatické membrány jsme měřili aktivitu LDH v médiu (*LD-L kit*, Sigma-Aldrich). Tvorba malondialdehydu (TBARS) byla měřena spektrofotometricky a sloužila jako ukazatel lipoperoxidace.

Obsah GSH a GSSG v hepatocytech jsme měřili pomocí HPLC (Discovery C18, Supelco) s fluorimetrickou detekcí (k derivatizaci slouží o-ftalaldehyd, Sigma-Aldrich) vycházející z metodiky Hissina a Hilfa (1976). Ke zpracování dat jsme použili program CSW32 System (DataApex).

Mitochondriální membránový potenciál (MMP) jsme hodnotili pomocí akumulace Rhodaminu 123 (Rho 123). Jeho koncentraci v médiu jsme měřili na spektrofluorimetru Perkin Elmer LS 50B. Pro vizualizaci MMP jsme buňky barvili sondou JC-1 (Molecular Probes). Buňky byly pozorovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E-400. Mikrofotografie jsou pořízeny digitální kamerou Nikon COOL 13000 CVDS a k jejich zpracování a analýze byl použit software *Image analysis system LUCIA LIM* (Laboratory Imaging). K detailnímu posouzení MMP jsme použili TPP<sup>+</sup> selektivní elektrodu. Měření jsme prováděli v K-médiu (100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 7,4) za laboratorní teploty při hustotě buněk 1,85 × 10<sup>6</sup> /ml. Elektroda byla připravena podle práce Kama et al. (1979) a příprava membrány byla modifikována dle metody Shinba et al. (1978). Kalibraci jsme prováděli postupným přidávkem TPP<sup>+</sup>. Hepatocyty byly permeabilizovány digitoninem, poté jsme k nim přidali respirační substráty, rotenon a eventuelně cyklosporin A (CSA).

Mitochondriální produkce ROS byla monitorována pomocí fluorescenční emise CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Molecular Probes), respektive CM-DCF. Mitochondrie (150 µg proteinu/ml) byly inkubovány v K-médiu s tBHP, SAME, respiračními substráty a 400 nM DCFDA. Fluorescence byla měřena na Spectrofluorimetru TECAN Infinite M200 po dobu 60 min.

Bobtnání mitochondrií, jako marker otevření PTP, bylo hodnoceno pomocí měření poklesu absorbance (Shimadzu UV – 1601) suspenze mitochondrií při 520 nm. Měření jsme prováděli ve swelling médiu (125 mM sacharóza, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,2).

K testování statistické významnosti byla použita jednofaktorová ANOVA, k porovnávání rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl použit Tukey-Kramerův test. Testování bylo provedeno pomocí statistického programu GraphPad InStat 3.06 a k vytvoření grafů byl použit MS Excel. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se směrodatnými odchylkami. Před započítím pokusů byla hladina statistické významnosti stanovena na  $\alpha = 0,05$ .

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Vliv tBHP na izolované potkaní hepatocyty a mitochondrie

#### 4.1.1 Morfologické změny hepatocytů po působení tBHP

Vzhledem k poměrně rychlému působení tBHP je možné studovat jeho účinek i na suspenzi hepatocytů, jejíž životnost je omezena na dobu několika hodin. Hepatocyty v suspenzi mají kulatý nebo oválný tvar. Vlivem tBHP došlo ke zvýšení počtu poškozených hepatocytů. Hepatocyty jsou výrazně granulované, vytvářejí bleby, nemají jasně ohraničené jádro a nejsou vidět jádérka.

Pro zachování specifických funkcí a viability jsou pro izolované hepatocyty nutné kontakty s různými substráty a rovněž se sousedními buňkami (Berry et al, 1991). V primokulturách dochází během několika hodin k obnovení polygonálního tvaru hepatocytů. Neporušené hepatocyty se ke kolagenu přichycují rychleji než částečně poškozené buňky. Narozdíl od suspenzí zde můžeme snadněji eliminovat hepatocyty poškozené během izolačního procesu. Buňky mají polygonální tvar, neporušenou plazmatickou membránu, níže granulovanou cytoplazmu, ostře ohraničené jádro s několika jádérky a vytvářejí mezibuněčné kontakty. Buňky inkubované 30 min s 1,5 mM tBHP mají porušenou integritu cytoplazmatické membrány, zvyšuje se u nich stupeň granulace cytoplazmy, jádro kondenzuje, přestávají být viditelná jádérka, hepatocyty se zakalují a odlučují od podkladu.

#### 4.1.2 Vliv tBHP na aktivitu LDH v médiu primární kultury hepatocytů

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytoplazmatický enzym, který je při poškození plazmatické membrány uvolňován z buněk. Hodnotili jsme časový i koncentrační efekt tBHP na aktivitu LDH uvolněné z hepatocytů v primokultuře do média. Hepatocyty byly exponovány 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 a 3 mM tBHP po dobu 30 minut. Poté bylo médium odebráno a použito jednak k měření aktivity LDH a také k měření koncentrace MDA. Při inkubaci s 0,1 a 0,5 mM tBHP nebylo zaznamenáno signifikantní poškození cytoplazmatické membrány. 1mM tBHP vyvolal více než 4násobný nárůst aktivity LDH v médiu oproti kontrolám. Nejdrastičtější nárůst aktivity LDH v médiu nastal v koncentračním rozmezí tBHP 0,5 – 1,0 mmol/l. Únik LDH do média pak dále narůstal, nárůst však již nebyl tak prudký. K testování časové závislosti vlivu tBHP na hepatocyty v primokultuře jsme použili 1,5 mM tBHP a médium jsme odebírali v časových intervalech 5; 10; 15; 20; 30 a 60 minut. Během prvních 15 minut inkubace s 1,5 mM tBHP nedošlo k signifikantnímu nárůstu aktivity LDH v médiu. Signifikantní nárůst nastal po 20 minutách inkubace. Aktivita LDH v médiu pak dále rostla s prodlužující se dobou inkubace a po hodině dosáhla více než 20násobku původních hodnot. Kontrolní hepatocyty byly rovněž inkubovány po dobu 15, 30 a 60 minut a délka inkubace neměla statisticky významný vliv na únik LDH do média.

#### 4.1.3 Vliv tBHP na lipoperoxidace v primární kultuře hepatocytů

Malondialdehyd vnika peroxidací polyneenasycených mastných kyselin. Změny koncentrace MDA slouží jako ukazatel lipoperoxidace. Hodnotili jsme koncentrační a časový efekt tBHP na lipoperoxidaci. Měřili jsme koncentraci MDA (resp. TBARS) v médiu po 30 minutové expozici hepatocytů 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 a 3 mM tBHP. K signifikantnímu nárůstu lipoperoxidace došlo u koncentrace tBHP 0,5 mmol/l. Nejvýraznější nárůst koncentrace MDA v médiu byl podobně jako u LDH zaznamenán po 30 min v rozmezí 0,5 – 1,0 mM tBHP kdy se koncentrace tBHP najednou zvýšila asi 5x. Poté nárůst koncentrace MDA pokračoval, avšak byl méně strmý. Všechny testované časové intervaly inkubace (5; 10; 15; 20; 30 a 60 minut) s 1,5 mM tBHP vyvolaly signifikantní zvýšení lipoperoxidace, kdy koncentrace MDA mezi 0 – 30 minutami rostla téměř lineárně.

#### 4.1.4 Vliv tBHP na hladinu glutathionu v hepatocytech primárních kultur

Glutathion se v buňce vyskytuje ve dvou formách - redukované (GSH) a oxidované (GSSG). Poměr mezi těmito formami informuje o redoxním stavu buňky. Při 30minutové inkubaci hepatocytů s tBHP došlo již při použití velmi nízké koncentrace tBHP (0,1 mM) k poklesu GSH asi na 80 % původních hodnot. Při inkubaci s 1,5 mM tBHP byl pokles ještě výraznější. Intracelulární koncentrace GSSG v obou případech vzrostla. Inkubace hepatocytů s tBHP měla v obou případech za následek signifikantní snížení intracelulárního obsahu celkového glutathionu. V případě 1,5 mM tBHP klesl obsah celkového intracelulárního glutathionu více než o polovinu. Úbytek intracelulárního glutathionu byl částečně způsoben transportem GSSG z buňky, o čemž svědčilo zvýšení GSSG v médiu. U hepatocytů inkubovaných s 1,5 mM tBHP došlo k signifikantnímu snížení celkového glutathionu (intracelulárního + extracelulárního).

#### 4.1.5 Vliv tBHP na akumulaci Rho 123 hepatocyty v primární kultuře

Hodnotili jsme vliv tBHP (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; a 3 mM; 30 min) na schopnost akumulace Rho 123 hepatocyty v primokultuře. Tert-BHP velmi významně snižuje schopnost hepatocytů akumulovat Rho 123. Tento pokles závisí na dávce tBHP. Již nejnižší použitá koncentrace tBHP (0,1 mM) navodila signifikantní pokles  $\Delta\mu\text{H}^+$ . K nejprudšímu poklesu došlo v koncentračním rozmezí 0,5 – 1 mmol/l tBHP. Ani při použití nejvyšší koncentrace tBHP (3 mM) po dobu 30 minut nebyl  $\Delta\mu\text{H}^+$  kompletně zničen a po odečtení nespecifické vazby Rho 123 se pohyboval okolo 20 % původních hodnot.

#### 4.1.6 Vliv tBHP na akumulaci $\text{TPP}^+$ hepatocyty v suspenzi permeabilizovaných digitoninem

K detailnějšímu posouzení mitochondriálního membránového potenciálu jsme využili akumulaci  $\text{TPP}^+$ .  $\text{TPP}^+$  je rovněž lipofilní kationt, který se podobně jako Rho 123 v závislosti na  $\Delta\mu\text{H}^+$  hromadí v mitochondriích.  $\text{TPP}^+$  není fluorescenční sonda a jeho koncentraci v médiu jsme měřili pomocí iontové selektivní elektrody. Z důvodů pomalého průchodu  $\text{TPP}^+$  a respiračních substrátů přes plazmatickou membránu jsme buňky permeabilizovali pomocí digitoninu. Tert-BHP snížil  $\Delta\mu\text{H}^+$  hepatocytů energizovaných substráty pro komplex I i pro komplex II. Cyklosporin A (CSA), inhibitor nespecifického póru ve vnitřní mitochondriální membráně, neovlivnil pokles  $\Delta\mu\text{H}^+$  vyvolaný tBHP u hepatocytů energizovaných substráty komplexu I. Pokud jsme jako respirační substrát použili sukcinát, efekt tBHP na  $\Delta\mu\text{H}^+$  byl kompletně inhibován CSA i za použití vysoké koncentrace tBHP (3mM).

#### 4.1.7 Vliv tBHP na respiraci hepatocytů v suspenzi permeabilizovaných digitoninem

Protože je známo, že oxidační stres ovlivňuje funkci mitochondrií a ničí  $\Delta\mu\text{H}^+$ , zajímal nás vliv tBHP na respiraci. Jak již bylo řečeno výše, z důvodů pomalé prostupnosti respiračních substrátů přes plazmatickou membránu byly hepatocyty permeabilizovány

digitoninem. Kromě dalších parametrů jsem hodnotili koncentrační a časový vliv tBHP na aktivitu respiračního komplexu I a komplexu II. Při testování koncentrační závislosti jsme hepatocyty inkubovali s tBHP 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 a 3 mmol/l po dobu 30 minut. Všechny testované koncentrace vyvolaly signifikantní pokles aktivit obou komplexů. Komplex I je však daleko citlivější k oxidačnímu poškození tert-butylhydroperoxidem. Nejvýraznější pokles aktivity komplexu I nastal v koncentračním rozmezí tBHP 0,1 - 0,5 mmol/l, kdy respirace klesla asi na 30 % kontrolních hodnot. Respirace pak dále mírně klesla přibližně na 20 %. Rovněž aktivita komplexu II byla nejvýrazněji snížena při použití 0,1 - 0,5 mM tBHP. Pokles byl však menší a ani při aplikaci 3 mM tBHP nedošlo ke snížení aktivity komplexu II pod 50 % původních hodnot. Časovou závislost jsme hodnotili po 5; 10; 15; 20 a 30 minutových inkubacích s 1,5 mM tBHP. Aktivita komplexu I klesala rychleji a výrazněji než aktivita komplexu II.

#### *4.1.8 Vliv tBHP na respiraci izolovaných mitochondrií a jaterního homogenátu*

Při studiu energetického metabolismu se velmi často využívají izolované mitochondrie. Tkáňové homogenáty obsahují rozbité buňky a řadu látek, které mohou interferovat s některými metodami, nicméně vzhledem k poměrně nenáročné přípravě jsou také využívány. Proto nás zajímala možnost použití i těchto modelů při studiu energetického metabolismu. V obou modelových systémech je zachováno spřažení respirace a fosforylace, což svědčí o dobrém stavu mitochondrií. tBHP ovlivňoval aktivitu respiračních komplexů podobně ve všech třech systémech. Respirační komplex I je více citlivý k oxidačnímu působení tBHP, než komplex II. Všechny tři modely se zdají být vhodné pro studium energetického metabolismu jater.

#### *4.1.9 Vliv tBHP na mitochondriální produkci ROS*

tBHP je metabolizován na volné radikály a zvyšuje endogenní produkci ROS. Za nejvýznamnější endogenní zdroj ROS v buňce jsou považovány mitochondrie. Vliv tBHP na mitochondriální produkci ROS jsme hodnotili u izolovaných mitochondrií s využitím sondy CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Tato sonda proniká přes membrány do buněk a do mitochondrií, kde je hydrolyzována a po reakci s ROS vzniká fluorescenční produkt. Sledovali jsme nárůst fluorescence v suspenzi mitochondrií v K médiu vyvolaný vlivem 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 a 3,0 mM tBHP. Fluorescenci jsme měřili každých 5 minut po dobu 1 hodiny. Zjistili jsme, že tBHP v závislosti na době inkubace zvyšuje mitochondriální produkci ROS. Nejvyšší použitá koncentrace tBHP (3mM) však nebyla spjata s nejvyšší koncentrací ROS. Maximální produkce ROS nastala při inkubaci mitochondrií s 1,0 mM tBHP. Hodnotili jsme také vliv respiračních substrátů na mitochondriální produkci ROS. Přidavek glutamátu+malátu i sukcinátu (bez rotenonu) k mitochondriím poškozeným 1,5 mM tBHP zvýšil fluorescence DCF. Se substráty pro komplex I bylo zvýšení produkce ROS navozeno vlivem 1,5 mM tBHP výraznější než se sukcinátem.

#### *4.1.10 Vliv tBHP na bobtnání mitochondrií*

Vysoká intramitochondriální koncentrace Ca<sup>2+</sup>, Pi, ROS a dalších látek má za následek nespecifické zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány pro ionty a substráty do 1,5 kDa. Zvýšená permeabilita je způsobena otevřením PTP. Jednou z metod hodnocení otevření PTP je sledování poklesu absorbance suspenze mitochondrií v důsledku změn jejich objemu. Sledovali jsme vliv tBHP na otevření PTP. 3 mM tBHP vyvolal pokles absorbance. Zvýšená koncentrace Ca<sup>2+</sup> (400 μM) vedla rovněž k bobtnání mitochondrií. Pokud jsme kombinovali vliv tBHP a Ca<sup>2+</sup> došlo ke znásobení efektu a k daleko masivnějšímu snížení absorbance. Přidavkem Cyklosporinu A (CSA), inhibitoru PTP před tBHP a Ca<sup>2+</sup> jsme bobtnání mitochondrií téměř úplně zablokovali.

## 4.2 Efekt SAME na potkání hepatocytů poškozené tBHP

Model toxického poškození hepatocytů tBHP jsme se rozhodli využít pro testování látky s potenciálně hepatoprotektivním účinkem. Zvolili jsme s-adenosylmethionin (SAME). Hepatocytů po přichycení jsme nejprve po dobu 30 minut inkubovali se SAME v koncentracích 5, 25 a 50 mg/l, poté jsme médium vyměnili za médium obsahující 1,5 mM tBHP a inkubovali po dalších 30 minut.

### 4.2.1 Efekt SAME na morfologii hepatocytů poškozených tBHP

Hepatocytů inkubované po dobu 30 minut s 1,5 mM tBHP vykazují četná poškození plazmatické membrány a dochází k úniku cytozolu z buněk. Cytoplazma je vysoce granulovaná, jádra špatně viditelná se ztrátou kontrastu proti cytoplazmě, jádérka nejsou vidět. Buňky se zakulacují a odchlípují se od kolagenu. Preinkubace se SAME v dávce 50 mg/l vedla k redukci morfologických změn navozených tBHP.

### 4.2.2 Efekt SAME na aktivitu LDH v médiu hepatocytů poškozených tBHP

Inkubace hepatocytů se samotným SAME v koncentracích 5; 25 a 50 mg/l po dobu 30 minut neměla vliv na aktivitu LDH v médiu. Po 30 min inkubaci s 1,5 mM tBHP došlo k více než trojnásobnému zvýšení aktivity LDH. Preinkubace se SAME vedla u všech použitých koncentrací k významnému snížení cytotoxicity tBHP.

### 4.2.3 Efekt SAME na lipoperoxidaci hepatocytů poškozených tBHP

Zjistili jsme, že samotný SAME neovlivňuje významně koncentraci TBARS v médiu hepatocytů. Tert-butylhydroperoxid (1,5 mM, 30 min) indukuje výrazné zvýšení koncentrace TBARS. Všechny testované koncentrace SAME významně snížily stupeň lipoperoxidace navozené tBHP, koncentrace TBARS však oproti kontrolám zůstala výrazně zvýšená.

### 4.2.4 Efekt SAME na hladinu glutathionu v hepatocytech poškozených tBHP

Stejně jako v předchozích případech jsme nejprve testovali efekt samotného SAME v koncentracích 5; 25 a 50 mg/l po dobu 30 minut na obsah intracelulárního glutathionu intaktních hepatocytů v primokulturách SAME v koncentracích 25 a 50 mg/l za 30 minut významně zvýšil obsah intracelulárního glutathionu. Na nárůstu se podílel jak GSH tak GSSG. SAME v koncentraci 5 mg/l neměl na hladinu glutathionu vliv. Po 30 minutové inkubaci hepatocytů s 1,5 mM tBHP došlo k výraznému poklesu intracelulární koncentrace GSH. Velmi výrazně se snížil také obsah celkového glutathionu. SAME v našich podmínkách nijak neovlivnil snížení hladiny glutathionu navozené 1,5 mM tBHP.

### 4.2.5 Efekt SAME na pokles MMP induvaný tBHP

#### Vliv SAME na akumulaci Rho 123

Akumulace Rho 123 závisí na mitochondriálním membránovém potenciálu. Třicetiminutová Inkubace s 1,5 mM tBHP snížila schopnost akumulace Rho 123 hepatocytů v primokulturách asi na 20 % původních hodnot. Preinkubace s 25 a 50 mg/l SAME po dobu 30 minut významně zvyšovala MMP. Nižší koncentrace SAME neměla na snížení potenciálu vlivem tBHP efekt.

#### Vliv SAME na akumulaci JC-1

Pro vizualizaci MMP jsme použili akumulaci JC-1, která v závislosti na koncentraci a tedy na MMP emituje světla dvou vlnových délek. Při vysokém MMP dochází k tvorbě tzv. J-agregátů a k emisi oranžového světla. Při nižší koncentraci JC-1 tvoří agregáty. Sonda pak emituje zelené světlo. Inkubace s 1,5 mM tBHP vedla téměř k vymizení oranžové fluorescence. Preinkubace s SAME v koncentraci 50 mg/l nepatrně podíl oranžové

fluorescence zvýšila. Pro zvýraznění efektu SAME jsme hepatocyty preinkubovali i s velmi vysokou dávkou SAME 1000 mg/l. Tato preinkubace výrazně omezila efekt tBHP na MMP a oranžová fluorescence je téměř na úrovni kontrolních hodnot.

#### 4.2.6 Efekt SAME na respiraci permeabilizovaných hepatocytů poškozených tBHP

Pro hodnocení aktivit enzymových komplexů dýchacího řetězce jsme využili permeabilizované hepatocyty. SAME v koncentraci nižší než 50 mg/l nevykazoval znatelný účinek na snížení aktivit respiračních komplexů navozené 1,5 mM tBHP. SAME v koncentraci 50 mg/l zvýšil respiraci asi o 25% oproti poškozeným hepatocytům. Nutnost permeabilizace trochu komplikuje interpretaci výsledků, protože mitochondrie jsou vystaveny výrazně vyšší koncentraci SAME, než v intaktních buňkách.

#### 4.2.7 Efekt SAME na mitochondriální produkci ROS navozenou vlivem tBHP

Pokud jsme k hepatocytům přidali samotný SAME v koncentraci 50 mg/l, nedošlo po dobu 1 hodiny k ovlivnění produkce ROS. 1,5 mM tBHP produkci ROS výrazně zvýšil již v prvních minutách inkubace. SAME v kombinaci s tBHP zvýraznil efekt samotného tBHP a došlo ke zvýšení produkce ROS vyvolané vlivem tBHP.

## 5 DISKUZE

Játra jsou hlavním místem detoxikačních procesů a centrálním orgánem metabolismu, proto jsou vhodným modelovým orgánem pro studium toxicity. Pro odhadnutí rizika a léčbu toxického poškození jater je důležité znát mechanismus účinku látky a typ jaterního poškození, který způsobuje. Jedním z nejčastěji využívaných *in vitro* modelů pro studium toxického účinku látek jsou izolované hepatocyty kultivované v suspenzích nebo v primokulturách. Pro hodnocení efektu tBHP jsme zvolili primokultury hepatocytů. I přes jisté nevýhody jsou však suspenze hepatocytů častým a nenahraditelným modelovým systémem pro studium některých dějů. Při objasňování stupňů jednotlivých metabolických reakcí a interakcí na molekulární úrovni se rovněž často využívají subcelulární frakce. Izolované mitochondrie jsou frekventovaným modelovým systémem, neboť mají velmi významnou roli v regulaci buněčné smrti.

Většina hepatotoxinů, ať už primárně nebo sekundárně, vyvolává oxidační stres. Je známo, že častým cílem oxidačního poškození jsou mitochondrie. Oxidační stres je dnes velmi intenzivně studován, neboť se uplatňuje nejen při toxickém poškození, ale také při ischemicko-reperfučních stavech, neurodegenerativních onemocněních, maligních procesech a stárnutí. Přesto přesný mechanismus vzniku a účinku ROS není znám.

Terciární butylhydroperoxid (tBHP) není typický hepatotoxin, ale využívá se jako modelová látka pro zkoumání mechanismů oxidačního stresu u různých typů buněk. Mechanismus účinku tBHP je částečně znám, je proto vhodný i pro zavádění metod hodnocení oxidačního poškození. Tert-BHP snadno proniká přes membrány do buňky, kde je metabolizován pomocí různých cest. Hlavním systémem zodpovědným za přeměnu tBHP je glutathionperoxidáza, která jako substrát využívá redukovaný glutathion. To má za následek depleci intracelulárního GSH a hromadění GSSG. Tert-BHP je také pomocí cytochromu P450 přeměňován na peroxylové a alkoxylové radikály, což prohlubuje pokles GSH (Haidara et al., 2002).

Glutathion má v buňce velmi významnou roli, jednak jako kofaktor enzymových reakcí, a také jako hlavní thiol/disulfidový redoxní pufr. Za fyziologických podmínek se v buňce nachází více než 99% glutathionu ve formě GSH. Tento vysoký poměr GSH/GSSG je udržován pomocí glutathionreduktázy s NADPH jako kofaktorem. Po 30minutové inkubaci s tBHP došlo již při inkubaci s 0,1 mM tBHP k poklesu GSH asi na 80 % kontrolních hodnot. Při inkubaci s 1,5 mM tBHP klesl obsah GSH až na 20 %, což je v souladu s literárními údaji

(Fernandes et al., 2003). Intracelulární koncentrace GSSG v obou případech nepatrně vzrostla. Poměr GSH/GSSG, který odráží redoxní stav buňky však klesl velmi dramaticky. Inkubace hepatocytů s tBHP měla za následek signifikantní snížení intracelulárního obsahu celkového glutathionu. Buňka v rámci zachování redoxní rovnováhy může GSSG aktivně exportovat do extracelulárního prostředí, nebo GSSG může reagovat se sulfhydrilovými skupinami proteinů (Lu, 1999). Zvýšený export potvrdil nárůst GSSG v inkubačním médiu. Při použití 0,1 mM tBHP nedošlo k signifikantní změně hodnot celkového glutathionu (rozuměj intracelulárního + extracelulárního GSH a GSSG). V případě inkubace s 1,5 mM tBHP byl celkový glutathion snížen asi o 30 %. Důvodem může být zvýšená aktivita  $\gamma$ -glutamyltransferázy a vazba GSSG na proteiny.

Mitochondrie jsou považovány za významný zdroj ROS v buňce, jsou však také cílem jejich toxického účinku. Bylo prokázáno, že tBHP proniká do mitochondrií a poškozuje je (Brambilla et al., 1998). Deplece glutathionu je díky glutathionreduktáze úzce spjata s deplecí NAD(P)H. Ve vnitřní mitochondriální membráně jsou lokalizované enzymové komplexy dýchacího řetězce a oxidační fosforylace. U izolovaných digitoninem permeabilizovaných hepatocytů jsme měřili vliv tBHP na respiraci aktivovanou substráty pro komplex I (glutamát+malát) a pro komplex II (sukcinát). Zjistili jsme, že tBHP v závislosti na koncentraci a době inkubace snižuje respiraci aktivovanou glutamátem a malátem i respiraci aktivovanou sukcinátem. Respirační komplex I je však daleko citlivější k oxidačnímu poškození tBHP. Naše výsledky jsou ve shodě se zjištěním, že k poklesu aktivity komplexu I dochází během stárnutí a stárnutí je spojeno s vyšší produkcí ROS (Lenaz et al., 2006). Částečným vysvětlením větší citlivosti komplexu I k tBHP může být deplece NADH. To zřejmě nebude jediná příčina. Bylo zjištěno, že respirace aktivovaná NADH-dependentními substráty se snižuje i v dostatečném množství NADH následkem otevření nespecifického proteinového póru ve vnitřní mitochondriální membráně – PTP (Fontaine et al., 1998). Podjednotky komplexu I na vnitřní straně mitochondriální membrány obsahují -SH skupiny citlivé k reakcím s NO, ROS a GSSG, což vede k reverzibilní inaktivaci komplexu I (Gostimskaya et al., 2006). U srdečních mitochondrií izolovaných z myši infikovaných *Trypanozoma cruzi*, která způsobuje oxidační poškození myokardu, byla prokázána karbonylace podjednotek respiračního komplexu I (Wen a Garg, 2004). Pokles respirace aktivované glutamátem a malátem a aktivity komplexu I byl pozorován i u srdečních mitochondrií izolovaných z potkanů vystavených ischemii a reperfúzi. Kromě aktivity komplexu I byl pozorován úbytek kardiolipinu, fosfolipidu lokalizovaném ve vnitřní mitochondriální membráně. Tento fosfolipid je nezbytný pro správné fungování komplexu I. Díky vysokému obsahu nenasyčených mastných kyselin je náchylný k oxidačnímu poškození. Kardiolipin má zřejmě katalytickou funkci a kromě toho hraje velmi významnou roli při asociaci komplexu I, III a IV do superkomplexu, neboli respirozómů (Lenaz et al., 2006). Za fyziologických podmínek je většina komplexu I asociována s komplexem III. Formování superkomplexu je zřejmě nezbytné pro stabilitu komplexu I, ale není zcela nezbytné pro aktivitu komplexu III a IV (Lenaz et al., 2006). Komplex II není součástí respirozómu a jeho asociace s ostatními komplexy nebyla prokázána. Snížení respirace aktivované sukcinátem, může být ovlivněno sníženou aktivitou komplexu III a komplexu IV. Aktivita obou komplexů může být rovněž snížena díky oxidačnímu poškození Fe-S klastřů, které jsou k oxidačnímu poškození velmi citlivé (Vasquez-Vivar et al., 2000). Efekt tBHP na respiraci aktivovanou substráty pro komplex I a pro komplex II jsme zkoumali i u izolovaných mitochondrií a jaterního homogenátu. Aktivita komplexu I byla v obou případech citlivější k oxidačnímu poškození, než aktivita komplexu II. Efekt tBHP na respiraci tedy nezávisí na cytoplazmatických faktorech.

Energii uvolněnou při průchodu elektronů využívá komplex I, III a IV k pumpování protonů ( $H^+$ ) z matrix do mezimembránového prostoru. Tím vzniká na vnitřní mitochondriální

membráně elektrochemický potenciál  $\Delta\mu\text{H}^+$ . Rhodamin 123 je fluorescenční lipofilní kationtová barva, která se v závislosti na  $\Delta\mu\text{H}^+$  akumuluje v mitochondriích. Tert-BHP velmi významně snižuje schopnost hepatocytů akumulovat Rho 123. Tento pokles závisí na dávce tBHP. Pro vizualizaci  $\Delta\mu\text{H}^+$  jsme použili akumulaci JC-1. U kontrolních hepatocytů byla výrazná oranžová fluorescence značící vysoký  $\Delta\mu\text{H}^+$  lokalizovaná zejména v blízkosti cytoplazmatické membrány. To je v souladu s literárními údaji (Collins et al., 2002). Po 30 minutové inkubaci s 1,5 mM tBHP došlo téměř k úplnému vymizení oranžové fluorescence. Tert-butylhydroperoxid může snižovat  $\Delta\mu\text{H}^+$  pomocí různých mechanismů. K objasnění tohoto problému jsme využili akumulaci  $\text{TPP}^+$ .  $\text{TPP}^+$  je rovněž lipofilní kationt, který se podobně jako Rho 123 v závislosti na  $\Delta\mu\text{H}^+$  hromadí v mitochondriích (Lábajová et al., 2006). Zjistili jsem, že mechanismus účinku tBHP na  $\Delta\mu\text{H}^+$  závisí na použitém substrátu. Pokud jsme mitochondrie energovali substráty pro komplex I, tBHP indukoval snížení  $\Delta\mu\text{H}^+$  a cyklosporin A (CSA) – inhibitor PTP, neměl na toto snížení vliv. Tert-butylhydroperoxid rovněž snížil  $\Delta\mu\text{H}^+$ , když byly mitochondrie energovány sukcinátem. V tomto případě však CSA plně inhiboval snížení  $\Delta\mu\text{H}^+$  vyvolané tBHP. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že tBHP vyvolává snížení  $\Delta\mu\text{H}^+$  nejméně pomocí dvou mechanismů. Jedním z nich je pokles respirace následkem inhibice komplexu I a druhým je otevření PTP. Fontaine et al. (1998) zjistili, že u svalových a jaterních mitochondrií je otevření PTP závislé na substrátu a pravděpodobnost otevření póru se zvyšuje při respiraci substrátů komplexu I. Otevření póru indukovali přidavkem  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{P}_i$ . Následkem bylo vyplavení pyridinnukleotidů a pokles respirace aktivované substráty pro komplex I. To, že při působení tBHP CSA neměl vliv na snížení  $\Delta\mu\text{H}^+$ , může být vysvětleno oxidací pyridinnukleotidů před otevřením PTP, popřípadě oxidační modifikací komplexu I. Naše výsledky tedy naznačují, že pokles aktivity komplexu I vlivem tBHP není jen důsledkem otevření PTP, ale otevření PTP předchází. Kmoníčková et al. (2001) nepozorovali efekt CSA na snížení akumulace Rho 123 intaktními hepatocyty. To je v souladu s našimi výsledky, neboť v intaktních buňkách je většinou nižší koncentrace sukcinátu, než NADH-dependentních substrátů (Starkov a Fiskum, 2003).

Mitochondrie jsou považovány za jednoho z největších zdrojů ROS v buňce. Zjistili jsme, že tBHP v závislosti na době inkubace zvyšuje mitochondriální produkci ROS. Nejvyšší hladina ROS však nebyla naměřena u nejvyšší použité koncentrace tBHP (3 mM). Důvodem může být otevření PTP (Batandier et al., 2004). Hodnotili jsme i vliv respiračních substrátů na produkci ROS indukovanou tBHP. Zjistili jsme, že přidavek glutamátu+malátu umocňuje efekt tBHP na tvorbu ROS, obdobně i přidavek sukcinátu (bez rotenonu). Udává se, že mitochondriální produkce ROS se sukcinátem je asi 10x vyšší než s glutamátem a malátem, díky zpětnému toku  $\text{e}^-$  z komplexu II na komplex I (Starkov a Fiskum, 2003; Batandier et al., 2004). Naše výsledky tomu nenasvědčují, obdobně jako výsledky Barja a Herrero (1998). Důvodem může být to, že sukcinát dependentní tvorba ROS je velmi citlivá k poklesu  $\Delta\mu\text{H}^+$  (Starkov a Fiskum, 2003; Grivennikova a Vinogradov, 2006).

Jak již bylo řečeno dříve, vysoká intramitochondriální koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$ , ROS a dalších látek má za následek nespecifické zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány pro ionty a substráty do 1,5 kDa (Lemasters et al., 2002). Výsledkem otevření póru je depolarizace mitochondrií, deplece pyridinnukleotidů, hydrolyza ATP  $\text{F}_1\text{F}_0$  ATPázou. Osmotická rovnováha se stává závislou na vysokomolekulárních látkách, které nemohou procházet pórem. Jelikož je koncentrace těchto látek vyšší v matrix, dochází k nabobtnání mitochondrií a prasknutí vnější membrány (Lemasters et al., 2002). Sledovali jsme vliv tBHP na otevření PTP pomocí měření poklesu absorbance suspenze mitochondrií při 520 nm v důsledku změny jejich objemu. Přidavek 3 mM tBHP způsobil bobtnání mitochondrií, obdobně jako zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  (400  $\mu\text{M}$ ). Pokud jsme kombinovali vliv tBHP a  $\text{Ca}^{2+}$  došlo ke



znásobení efektu a k daleko masivnějšímu bobtnání. To značí spolupráci mezi zvýšenou hladinou  $\text{Ca}^{2+}$  a ROS při otevření PTP. Pokud byly mitochondrie nejdříve inkubovány s CSA, snížení absorbance v důsledku bobtnání nebylo zaznamenáno. Bobtnání mitochondrií navozené vlivem tBHP a  $\text{Ca}^{2+}$  bylo tedy vyvolané otevřením CSA senzitivního PTP.

Tert-BHP je známý induktor lipoperoxidací buněčných membrán. K lipoperoxidaci není náchylná jen cytoplazmatická membrána, ale také membrány buněčných organel. ROS produkované mitochondriemi se mohou podílet na lipoperoxidaci jednak mitochondriální membrány, tak i ostatních membrán. Tert-butylhydroperoxid zvyšuje lipoperoxidace v závislosti na dávce a době inkubace.

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytoplazmatický enzym, který je uvolňován z buněk při poškození plazmatické membrány. Hodnotili jsme časový i koncentrační efekt tBHP na aktivitu LDH uvolněné z hepatocytů v primokultuře do média. K signifikantnímu poškození plazmatické membrány došlo až při inkubaci hepatocytů (30 min) s 1 mM tBHP. Nejprudší vzestup aktivity LDH byl obdobně jako u MDA zaznamenán v koncentračním rozmezí tBHP 0,5 – 1,0 mmol/l. To je v souladu s Haidara et al., 2001, kteří zjistili, že koncentrace tBHP 0,4–0,5 mmol/l je u hepatocytů přechodným bodem mezi apoptózou a nekrotózou. Signifikantní nárůst aktivity LDH nastal až po 15 minutách inkubace s 1,5 mM tBHP. Tyto výsledky značí, že lipoperoxidace předchází a urychluje uvolnění LDH do média.

Tert-butylhydroperoxid vyvolává sled reakcí, které vedou k poškození hepatocytů. Poškození je doprovázeno morfologickými změnami.

Účinek tBHP na buňku je velmi komplexní. Tert butylhydroperoxid vyvolává depleci glutathionu a pyridinnukleotidů. Na mitochondriální úrovni inhibuje respiraci. Respirační komplex I je velmi citlivý k oxidačnímu účinku tBHP. Inhibice komplexu I tBHP zřejmě předchází otevření PTP. V první fázi je respirace substrátů komplexu I inhibována díky depleci NADH. Na inhibici se však zřejmě podílí řada dalších faktorů, jako reakce podjednotek komplexu I s GSSG, poškození kardiolipinu atd. Zjistili jsme rovněž, že účinek tBHP na  $\Delta\mu\text{H}^+$  závisí na substrátu a tBHP ovlivňuje snížení  $\Delta\mu\text{H}^+$  nejméně pomocí dvou mechanismů. Jedním je otevření PTP a druhý souvisí se sníženou aktivitou komplexu I. Díky otevření PTP dochází zřejmě k další modifikaci komplexu I. Tert-butylhydroperoxid rovněž zvyšuje mitochondriální produkci ROS. Následkem zvýšené produkce ROS a vzniku butoxylového butylperoxylového radikálu dochází k porušení kalciové rovnováhy, uvolnění železa z vazby na proteiny, lipoperoxidaci buněčných membrán a k buněčné smrti. Efekt tBHP závisí na koncentraci a na době působení. K nejvýraznějším změnám došlo u většiny parametrů při použití tBHP v koncentračním rozmezí 0,5 – 1,0 mmol/l. Nejvýraznější změny aktivity komplexu I byly zaznamenány již v koncentračním rozmezí tBHP 0,1 – 0,5 mmol/l. Mitochondrie mají v mechanismu účinku tBHP na potkaní hepatocyty velmi významnou roli. Naše výsledky jsou v souladu se zjištěním, že při použití koncentrace tBHP nižší než 0,5 mmol/l převládá u hepatocytů apoptóza a při vyšších koncentracích nekrotóza (Haidara et al., 2001).

S-adenosylmethionin (SAME) se nachází téměř ve všech savčích buňkách. Játra zaujímají centrální úlohu v metabolismu SAME. Bylo zjištěno, že aktivita S-adenosyl-L-methioninsyntázy je snížena u pacientů s jaterními poruchami a vlivem toxického poškození (Corrales et al., 1992). V různých experimentech bylo prokázáno, že exogenní SAME vykazuje hepatoprotektivní účinek při poškození některými hepatotoxiny (Stramentinoli et al., 1978; Lieber, 2002; Lotková et al., 2005). Řada klinických studií u člověka rovněž popisuje jeho pozitivní účinek při léčbě některých jaterních onemocnění (Ponsoda et al., 1991; Martinez-Chantar et al., 2002). Mechanismus účinku SAME není zcela znám. Testovali jsme tedy potenciální efekt SAME na oxidační poškození hepatocytů vyvolané tBHP.

Nejdříve jsme hodnotili efekt SAME na hladinu glutathionu u kontrolních hepatocytů. Zjistili jsme, že SAME v koncentraci 25 mg/l a 50 mg/l zvyšuje obsah intracelulárního

glutathionu. Na nárůstu se podílel jak GSH tak GSSG, jejich poměr se však neměnil. Inkubace se SAME v koncentraci 5 mg/l nemělo na hladinu glutathionu vliv. Tato dávka je zřejmě příliš malá, aby SAME mohlo penetrovat do hepatocytů (Bontemps a van den Bergh, 1997). Tert-BHP způsobil pokles jak GSH, tak celkového glutathionu. Koncentrace GSSG ovlivněna nebyla, zřejmě díky exportu GSSG do extracelulárního prostředí a vazbou na proteiny. Přestože SAME v koncentracích vyšších než 10 mg/ml zvyšoval intracelulární obsah glutathionu, preinkubace se SAME neovlivnila pokles intracelulárního GSH ani celkového glutathionu indukovaný tBHP. To může být částečně vysvětleno zvýšeným exportem GSSG do média. Zdá se, že SAME neovlivňuje depleci GSH a tedy i depleci pyridinnukleotidů navozenou tBHP.

Proto jsme hodnotili i efekt SAME na respiraci. SAME sám o sobě respiraci nijak neovlivňoval. Zdá se však, že preinkubace se SAME měla vliv na snížení respirace navozené vlivem tBHP. Musíme však být velmi opatrní v interpretaci výsledků, zejména co se týká použitých koncentrací SAME, neboť respirace byla hodnocena u permeabilizovaných hepatocytů. Permeabilizace umožňuje snadný vstup SAME do buněk a mitochondrie jsou vystaveny daleko vyšší koncentraci SAME než v intaktních buňkách. Zajímá nás tedy vliv SAME na  $\Delta\mu\text{H}^+$  u intaktních buněk.  $\Delta\mu\text{H}^+$  jsme hodnotili pomocí akumulace Rho 123. Samotná inkubace se SAME  $\Delta\mu\text{H}^+$  neovlivňovala. Preinkubace s 25 a 50 mg/l SAME významně redukovala snížení  $\Delta\mu\text{H}^+$  navozené tBHP. Nižší koncentrace SAME neměla na snížení potenciálu vlivem tBHP efekt. Jelikož stejné koncentrace neovlivňovaly hladinu glutathionu, lze předpokládat jiný mechanismus ochrany mitochondrií. Tím může být inkorporace methylových skupin do fosfolipidů mitochondriálních membrán. Pro vizualizaci efektu SAME na  $\Delta\mu\text{H}^+$  jsme použili JC-1. Při použití SAME v koncentraci 50 mg/l jsme zaznamenali jen nepatrný efekt na snížení potenciálu vlivem tBHP. Pokud jsme ovšem použili velmi vysokou koncentraci SAME (1000 mg/l), hepatocyty po preinkubaci se SAME a vystavení tBHP vypadaly podobně jako kontrolní a došlo k obnově oranžové fluorescence značící vysoký  $\Delta\mu\text{H}^+$ . Výsledky z respirace permeabilizovaných hepatocytů a použití této velmi vysoké koncentrace svědčí o ochranném účinku tBHP na mitochondrie. Tento účinek je však podmíněn dostatečnou koncentrací SAME v buňce a je limitován přestupem SAME přes plazmatickou membránu. Podle Bontempe a van den Bergho (1997) se koncentrace dostatečná pro vstup do buněk pohybuje okolo 200  $\mu\text{M}$  ( $\approx 80 \text{ mg/l}$ ). SAME pak může přispívat nejen k novotvorbě GSH, ale i k transmethylovaním uvnitř buňky či k syntéze polyaminů, která je za některých stavů snižena.

Zpočátku nás překvapilo zjištění, že SAME v kombinaci s tBHP umocňuje vliv samotného tBHP na produkci ROS u izolovaných jaterních mitochondrií. Pokud byly mitochondrie inkubovány pouze s SAME nedošlo ke zvýšení produkce ROS. Potenciální efekt SAME na produkci ROS vyvolanou tBHP můžeme zřejmě částečně vysvětlit tím, že izolované mitochondrie byly v porovnání s mitochondriemi v intaktních buňkách vystaveny příliš vysoké koncentraci SAME. Navíc po demethylaci SAME pomocí methyltransferáz vzniká s-adenosylhomocystein (SAHo) a následně homocystein a adenosin. Enzymem, který umožňuje vstup homocysteinu do transsulfuračních reakcí je cystathionin- $\beta$ -syntáza. Tento enzym se však nachází v cytoplazmě (Skovby et al., 1984). U izolovaných mitochondrií, tedy zdá se, dochází k akumulaci homocysteinu, který může být zodpovědný za zvýšení mitochondriální produkci ROS (Tyagi et al., 2005).

Hodnotili jsme také efekt SAME na lipoperoxidaci navozenou tBHP u hepatocytů v primokulturách. Všechny testované koncentrace SAME významně snížily stupeň lipoperoxidace navozené tBHP, koncentrace TBARS však oproti kontrolám zůstala zvýšena. Cytotoxicita byla hodnocena pomocí měření aktivity LDH v médiu. SAME poměrně výrazně snižoval aktivitu LDH po inkubaci hepatocytů s tBHP. Tyto výsledky potvrzují protektivní vliv SAME na poškození hepatocytů vyvolané tBHP. Vzhledem k tomu, že jsme nepozorovali

vliv SAME na snížení hladiny GSH vlivem tBHP, lze tento efekt přičíst spíše transmetylačním reakcím, zejména transmetylací membránových fosfolipidů lokalizovaných na vnější straně plazmatické membrány, kde byla detekována methyltransferázová aktivita (Schanche et al, 1981). To potvrzují i výsledky Bontemps a van den Bergheho (1997).

Závěrem lze říci, že hepatocyty poškozené tBHP jsou vhodným modelovým systémem pro studium látek s potenciálním hepatoprotektivním účinkem. Pokud používáme permeabilizované buňky popřípadě izolované organely musíme být opatrní při interpretaci výsledků, a to zejména u těch hepatoprotektiv, která mají omezený průchod přes cytoplazmatickou membránu. Je třeba také zvážit přítomnost metabolických drah v daném modelovém systému.

## 6 ZÁVĚRY

Vzhledem ke zhoršujícímu se životnímu prostředí a dalším vlivům (vzrůstající konzumace alkoholu, zneužívání léků a drog) je dnes toxické poškození jater vážným zdravotním problémem. Oxidační stres je jedním z nejvýznamnějších mechanismů, kterými hepatotoxiny vyvolávají buněčnou smrt. Mitochondrie mají velmi důležitou roli v rozvoji jaterního poškození. S využitím tBHP jako modelové látky k indukci oxidačního stresu se nám na naše pracoviště podařilo zavést a optimalizovat metody měření parametrů energetického metabolismu (měření respirace, MMP, produkce ROS, bobtnání mitochondrií) na modelu izolovaných potkaních hepatocytů resp. jaterních mitochondrií. Tyto metody jsme následně použili ke zkoumání mechanismu toxického účinku tBHP. Zjistili jsme že:

- 1) tBHP v závislosti na dávce a době působení inhibuje mitochondriální respiraci.
- 2) Aktivita respiračního komplexu I je mnohem citlivější k oxidačnímu účinku tBHP ve srovnání s aktivitou respiračního komplexu II.
- 3) Pokles aktivity komplexu I účinkem tBHP spíše předchází, než následuje otevření nespecifického póru ve vnitřní mitochondriální membráně – PTP.
- 4) tBHP zvyšuje mitochondriální produkci ROS
- 5) tBHP velmi výrazně snižuje mitochondriální membránový potenciál
- 6) tBHP snižuje MMP různými mechanismy. Jedním z nich je inhibice respiračního komplexu I nezávislá na cyklosporinu A a druhým je otevření PTP.
- 7) tBHP vyvolává lipoperoxidaci, která předchází a urychluje destrukci buněčných membrán.
- 8) Tert-butylhydroperoxid pro svůj toxický efekt nevyžaduje metabolickou přeměnu v cytoplazmě.

Dalším cílem mé práce bylo využití modelu toxického poškození izolovaných potkaních hepatocytů tBHP ke studiu potenciálně hepatoprotektivního účinku SAME.

- 9) Naše výsledky potvrzují protektivní vliv SAME na poškození hepatocytů vyvolané tBHP.
- 10) Vzhledem k tomu, že jsme nepozorovali vliv SAME na snížení hladiny GSH účinkem indukované tBHP, lze tento efekt přičíst spíše transmetylačním reakcím, než reakcím transulfuračním
- 11) Pro příznivý vliv na buněčné organely je třeba použít dostatečné koncentrace SAME, které umožní jeho vstup do buněk přes plazmatickou membránu.

- 12) Pokud používáme permeabilizované buňky, popřípadě izolované orgány, musíme být opatrní při interpretaci výsledků, neboť orgány vystavujeme daleko vyšším koncentracím SAME v porovnání s intaktními buňkami. Tyto vysoké koncentrace nemusí být prospěšné.
- 13) Je třeba zvážit přítomnost metabolických drah v daném modelovém systému.

V poslední době se izolované hepatocyty uplatňují také v klinické praxi při léčbě akutního jaterního selhání. Posouzení energetického metabolismu hepatocytů může významně přispět k výběru optimálních izolačních médií a podmínek pro uchování a pěstování hepatocytů.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Barja G, Herrero A. *Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon.* J Bioenerg Biomembr **1998**;30(3):235-43.
2. Batandier C, Lerverve 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):197-204.
3. Bontemps F, Van Den Berghe G. *Metabolism of exogenous S-adenosylmethionine in isolated rat hepatocyte suspensions: methylation of plasma-membrane phospholipids without intracellular uptake.* Biochem J **1997**;327:383-9.
4. Brambilla L, Sestili P, Guidarelli A, Palomba L, Cantoni O. *Electron transport-mediated wasteful consumption of NADH promotes the lethal response of U937 cells to tert-butylhydroperoxide.* J Pharmacol Exp Ther **1998**;284(3):1112-21.
5. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. *Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells.* EMBO J **2002**;21(7):1616-27.
6. Corrales F, Gimenez A, Alvarez L, Caballeria J, Pajares MA, Andreu H, Pares A, Mato JM, Rodes J. *S-adenosylmethionine treatment prevents carbon tetrachloride-induced S-adenosylmethionine synthetase inactivation and attenuates liver injury.* Hepatology **1992**;16(4):1022-7.
7. Červinková Z. *Toxické poškození jater.* Postgrad Med **1999**;2: 20-23.
8. Fernandes E, Carvalho M, Carvalho F, Silva AM, Santos CM, Pinto DC, Cavaleiro JA, de Lourdes Bastos M. *Hepatoprotective activity of polyhydroxylated 2-styrylchromones against tert-butylhydroperoxide induced toxicity in freshly isolated rat hepatocytes.* Arch Toxicol **2003**;77:500-5.
9. Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P. *Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex I.* J Biol Chem **1998**;273(20):12662-8.
10. Friedel HA, Goa KL, Benfield P. *S-adenosyl-L-methionine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in liver dysfunction and affective disorders in relation to its physiological role in cell metabolism.* Drugs **1989**;38:389-416.
11. Gostimskaya IS, Cecchini G, Vinogradov AD. *Topography and chemical reactivity of the active-inactive transition-sensitive SH-group in the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I).* Biochim Biophys Acta **2006**;1757(9-10):1155-61.
12. Grillo MA, Colombatto S. *S-adenosylmethionine and protein methylation.* Amino Acids **2005**;28(4):357-62.
13. Grivennikova VG, Vinogradov AD. *Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I.* Biochim Biophys Acta **2006**;1757(5-6):553-61.
14. Haidara K, Morel I, Abalca V, Gascon Barre M, Denizeau F. *Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum.* Biochim Biophys Acta **2002**;1542:173-85.
15. Hissin PJ, Hilf R. *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues.* Anal Biochem **1976**;74:214-26.
16. Kamo N, Muratsugu M, Hongoh R, Kobatake Y. *Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state.* J Membr Biol. **1979**;49(2):105-21.
17. Kaplowitz N. *Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury.* Semin Liver Dis **2002**;22:137-44.

18. Kmonickova E, Drahota Z, Kamenikova L, Cervinkova Z, Masek K, Farghali H. *Modulatory effect of cyclosporin A on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in hepatocytes*. Immunopharmacol Immunotoxicol **2001**;23(1):43-54.
19. Kosina P, Dvořák Z, Walthová D, Lidský hepatocyt I: Model pro studium metabolismu a toxicity xenobiotik. Čs a Slo Farm **1999**;48:65-71.
20. Labajova A, Vojtiskova A, Krivakova P, Kofranek J, Drahota Z, Houstek J. *Evaluation of mitochondrial membrane potential using a computerized device with a tetraphenylphosphonium-selective electrode*. Anal Biochem **2006**;353(1):37-42.
21. Lemasters JJ, Qian T, He L et al. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. Antioxid Redox Signal **2002**;4(5):769-81.
22. Lenaz G, Baracca A, Fato R, Genova ML, Solaini G. *New insights into structure and function of mitochondria and their role in aging and disease*. Antioxid Redox Signal **2006**;8(3-4):417-37.
23. Lieber CS. S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. Am J Clin Nutr **2002**;76(5):1183S-7S.
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem **1951**;193(1):265-75.
25. Lu SC. *Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies*. FASEB J **1999**;13(10):1169-83.
26. Lotková H, Červinková Z, Kučera O, Kriváková P. *Protective effect of S-adenosylmethionine on cellular and mitochondrial membranes of rat hepatocytes against tert-butylhydroperoxide-induced injury in primary culture*. Chem Biol Interact **2005**;156(1):13-23.
27. Martinez-Chantar ML, Garcia-Trevijano ER, Latasa MU, Perez-Mato I, Sanchez del Pino MM, Corrales FJ, Avila MA, Mato JM. Importance of a deficiency in S-adenosyl-L-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury. Am J Clin Nutr **2002**;76:1177-82.
28. Ponsoda X, Jover R, Gomez-Lechon MJ, Fabra R, Trullenque R, Castell JV. *Intracellular glutathione in human hepatocytes incubated with S-adenosyl-L-methionine and GSH-depleting drugs*. Toxicology **1991**;70:293-302.
29. Schanche JS, Schanche T, Ueland PM. *Inhibition of phospholipid methyltransferase(s) from rat liver plasma membranes by analogues of S-adenosylhomocysteine*. Mol Pharmacol **1981**;20:631-6.
30. Shinbo T, Kamo N, Kurihara K, Kobatake Y. A PVC-based electrode sensitive to DDA<sup>+</sup> as a device for monitoring the membrane potential in biological systems. Arch Biochem Biophys **1978**;187(2):414-22.
31. Schneider WC, Hogeboom GH. *Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation*: Cancer Res **1951**;11(1):1-22.
32. Skovby F, Kraus JP, Rosenberg LE. Biosynthesis and proteolytic activation of cystathionine beta-synthase in rat liver. J Biol Chem **1984**;259(1):588-93.
33. Skulachev VP. Mitochondrial physiology and pathology: concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. Mol Aspects Med **1999**;20(3):139-84.
34. Starkov AA, Fiskum G. *Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)<sup>+</sup>H redox state*. J Neurochem **2003**;86(5):1101-7.
35. Stramentinoli G, Gualano M, Ideo G. *Protective role of S-adenosyl-L-methionine on liver injury induced by D-galactosamine in rats*. Biochem Pharmacol **1978**;27:1431-3.
36. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **2000**;279(6):L1005-28.
37. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. *Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress*. Am J Physiol Heart Circ Physiol **2005**;289(6):H2649-56.
38. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol **2006**;Aug4:v tisku
39. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy MC. *Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation*. J Biol Chem **2000**;275(19):14064-9.
40. Wen JJ, Garg N. *Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of Trypanosoma cruzi infection*. Free Radic Biol Med **2004** 15;37(12):2072-81.
41. Wu J, Soderbergh H, Karlsson K, Danielsson A. Protective effect of S-adenosyl-L-methionine on bromobenzene- and D-galactosamine-induced toxicity to isolated rat hepatocytes. Hepatology **1996**;23:359-65.

## 8 SOUHRN

Játra jsou cílovým orgánem toxického účinku mnoha látek. Příčin je několik. Hlavní roli zde hraje především dominantní postavení jater v metabolismu a biotransformaci většiny endogenních i exogenních látek. Hepatotoxiny mohou reagovat se základními složkami buněk a vyvolávat tak téměř všechny typy jaterního poškození. Izolované hepatocyty jsou vhodným modelovým systémem pro testování toxicity xenobiotik. Mitochondrie slouží jako častý cíl hepatotoxinů. Izolované mitochondrie jsou tedy také vhodným systémem pro studium účinku xenobiotik. Oxidační stres je jedním z nejvýznamnějších mechanismů, kterými hepatotoxiny vyvolávají buněčnou smrt. Pro zajištění účinné ochrany buněk před poškozením je třeba více informací o reakcích, které se účastní tohoto procesu. Terciální butylhydroperoxid (tBHP) se velmi často využívá pro navození oxidačního stresu u různých typů buněk. Tento organický hydroperoxid je v buňkách metabolizován na volné radikály a vyvolává jejich poškození. S-adenosyl-L-methionin (SAME) se v organismu účastní transmethylačních a transsulfuračních reakcí, včetně syntézy glutathionu. Studie na zvířatech prokázaly, že SAME vykazuje hepatoprotektivní efekt na jaterní poškození vyvolané řadou hepatotoxinů. Cílem této práce bylo charakterizovat toxické poškození izolovaných potkaních hepatocytů a mitochondrií navozené tBHP a ověřit potenciální hepatoprotektivní účinek SAME proti oxidačnímu poškození hepatocytů.

Hepatocyty jsme izolovali ze samců potkanů kmene Wistar metodou dvoustupňové perfúze pomocí kolagenázy. Část buněk byla využita pro měření spotřeby kyslíku (Oxygraf Oroboros-2k) a k posouzení mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) s využitím elektrody selektivní pro tetrafenylfosfonium ( $\text{TPP}^+$ ). Zbýlé hepatocyty byly kultivovány v suspenzi, nebo na Petriho miskách potažených kolagenem. Morfologické změny buněk byly sledovány pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Olympus CK 40). K charakterizaci poškození hepatocytů sloužila aktivita laktátdehydrogenázy (LDH) v kultivačním médiu. Míra lipoperoxidace byla posuzována z produkce malondialdehydu. MMP jsme měřili pomocí akumulace Rho 123 a barvením fluorescenční sondou JC-1. Redoxní stav uvnitř buněk byl posuzován ze změn obsahu GSH resp. GSSG. Mitochondrie byly izolovány z jater potkanů metodou diferenční centrifugace. Mitochondriální produkci ROS jsme sledovali pomocí fluorescenční sondy CM-H<sub>2</sub>DCFDA (FDA) a bobtnání mitochondrií bylo hodnoceno spektrofotometricky jako úbytek absorbance při 520 nm.

Tert-butylhydroperoxid v závislosti na dávce a době působení zvyšuje produkci ROS a lipoperoxidaci, což předchází uvolnění LDH, a snižuje aktivitu respiračního komplexu I a II, MMP a GSH/GSSG. Aktivita respiračního komplexu I je daleko citlivější k oxidačnímu účinku tBHP než aktivita respiračního komplexu II. Zjistili jsme, že účinek tBHP na MMP závisí na respiračních substrátech, a lze předpokládat minimálně dva mechanismy účinku tBHP na MMP. Jedním je inhibice respiračního komplexu I a druhým otevření nespecifického póru ve vnitřní mitochondriální membráně. Zdá se, že SAME působí protektivně proti oxidačnímu poškození vyvolanému tBHP. Tento efekt lze zřejmě přičíst spíše transmethylačním reakcím, než transsulfuračním, neboť jsme neprokázali protektivní účinek SAME na pokles GSH.

## 9 SUMMARY

Liver is the main target organ for toxic effect of various compounds. This is due to a number of reasons, but it is generally related to drug clearance and metabolism. Hepatotoxins may react with the basic cellular constituents and induce almost all types of lesion of the liver. Isolated hepatocytes are a suitable model system for toxicity testing of xenobiotics.

Mitochondria and mitochondrial energy providing system serve as a common target for hepatotoxic drugs. Experiments on isolated mitochondria are thus also useful model system for evaluation of the toxic effect of various hepatotoxins. Oxidative stress is one of the most important mechanisms through which hepatotoxins induce cell death. Effective protection of cellular damage induced by oxidants requires more information about reactions involved in this process. Tert-butylhydroperoxide (tBHP) has been widely used as a model compound to mimic the effect of oxidative stress in various cell types. This organic hydroperoxide is metabolized in cells into free radicals which cause cellular injury. S-adenosyl-L-methionine (SAME) is involved in transmethylation and transsulfuration reactions including synthesis of glutathione. Acute toxicity studies in animals have shown that SAME is capable to prevent damage induced by various hepatotoxins. The aim of this study was to characterize toxic injury of isolated rat hepatocytes and mitochondria induced by tBHP and to evaluate a possible protective effect of SAME against oxidative damage of hepatocytes.

Hepatocytes were isolated from male Wistar rats by two-step collagenase perfusion. A portion of cells was used for measurement of oxygen consumption (Oxygraph Oroboros-2k, Aut) and for evaluation of mitochondrial membrane potential (MMP) by tetraphenylphosphonium (TPP<sup>+</sup>) selective electrode. Remaining hepatocytes were cultivated in suspension or on collagen coated Petri dishes. Changes of morphological features were observed using phase contrast microscopy (Olympus CK 40). The rate of hepatocytes injury was evaluated by lactate dehydrogenase (LDH) activity in the culture medium. The level of lipid peroxidation was determined from malondialdehyde production. Mitochondrial membrane potential was evaluated by measuring the accumulation of Rhodamine 123 (Rho123) and from uptake of fluorescence probe JC-1. Redox state of cells was assessed by GSH and GSSG content. Mitochondria were isolated from rat liver by differential centrifugation. Mitochondrial ROS production was monitored by fluorescence emission of CM-H<sub>2</sub>DCFDA (FDA) and mitochondrial swelling was measured spectrophotometrically by monitoring of the decrease in absorbance at 520 nm.

Tert-butylhydroperoxide increases ROS production and lipoperoxidation which precedes LDH leakage, and decreases activity of respiratory Complex I and Complex II, MMP and GSH/GSSG. These changes are in proportional relation to the tBHP concentration and to the time of incubation. Respiratory Complex I activity is significantly more sensitive to the peroxidative action of tBHP than the activity of Complex II. We also found that the mechanism of the tBHP effect on mitochondrial membrane potential depends on the respiratory substrates and we can suppose at least two different mechanisms. The first is inhibition of respiratory Complex I and the second one is opening of mitochondrial permeability transition pore. We found that SAME presents protective effect against toxic injury of rat hepatocytes induced by tBHP. Since the protective effect of SAME against GSH depletion was not confirmed, it seems that this effect is ascribed more to transmethylation reactions than to transsulfurations.

## 10 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY

### Původní práce a přehledové články

- 1) Drahotová Z, Křiváková P, Červinková Z, Kmoníčková E, Lotková H, Kučera O, Houšťek J. *Tert-Butyl Hydroperoxide Selectively Inhibits Mitochondrial Respiratory-Chain Enzymes in Isolated Rat Hepatocytes*. *Phys Res* **2005**;54(1):67-72.
- 2) Lotková H, Červinková Z, Kučera O, Křiváková P. *Protective effect of S-adenosylmethionine on cellular and mitochondrial membranes of rat hepatocytes against*

*tert-butylhydroperoxide-induced injury in primary culture.* Chem Biol Interact **2005**;156(1):13-23.

- 3) Mracek T, Jesina P, Krivakova P, Bolehovska R, Cervinkova Z, Drahota Z, Houstek J. *Time-course of hormonal induction of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase biogenesis in rat liver.* Biochim Biophys Acta **2005** ;1726(2):217-23.
- 4) Roušar T, Červinková Z, Mužáková V, Kučera O, Lotková H, Křiváková P. *Glutathion a metody stanovení.* Acta Medica (Hradec Králové) Suppl **2005**;1:15-20.
- 5) Křiváková P, Červinková Z, Lotková H, Kučera O, Roušar T. *Mitochondrie a jejich úloha v buněčném metabolismu.* Acta Medica (Hradec Králové) **2005**;48(2Spl):57-67.
- 6) Labajova A, Vojtiskova A, Krivakova P, Kofranek J, Drahota Z, Houstek J. *Evaluation of mitochondrial membrane potential using a computerized device with a tetraphenylphosphonium-selective electrode.* Anal Biochem **2006** 1;353(1):37-42.
- 7) Kučera O, Červinková Z, Lotková H, Křiváková P, Roušar T, Mužáková V, Héžová R, Kandár R, Rudolf E. *Protective effect of S-adenosylmethionine against galactosamine-induced injury of rat hepatocytes in primary culture.* Phys Res **2006**, v tisku.
- 8) Kučera O, Lotková H, Křiváková P, Roušar T, Červinková Z. *Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro.* Československá fyziologie **2006**/3 – v tisku.
- 9) Krivakova P., Labajova A., Cervinkova Z., Drahota Z. *Inhibitory Effect of t-Butyl Hydroperoxide on Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Isolated Rat Hepatocytes.* Phys Res **2007**;1 v tisku
- 10) Labajova A, Kofranek J, Krivakova P, Cervinkova Z, Drahota Z. *TTP<sup>+</sup> -selective Electrode as a Tool for Evaluation of Mitochondrial Membrane Permeability Pore Function in Isolated Rat Hepatocytes.* General Physiology and Biophysics **2007** v tisku

#### **Publikovaná abstrakta**

- 1) Kučera O, Lotková H, Červinková Z, Křiváková P, Kandár R. *Protective effect of S-adenosylmethionine against thioacetamide-induced injury of rat hepatocytes in primary culture.* Phys Res **2004**;53:19P.
- 2) Červinková Z, Křiváková P, Lotková H, Kučera O, Drahota Z. *Estimation of energy metabolism of isolated rat hepatocytes using high-resolution respirometry.* Clin Nutrition **2004**;23(6):1469-1470.
- 3) Lotková H, Červinková Z, Kučera O, Křiváková P, Kandár R. *Protective effect of exogenous S-adenosyl methionine on thioacetamide-induced injury of hepatocytes in primary culture.* Clin Nutrition **2004**;23 (6):1462.
- 4) Roušar T, Červinková Z, Mužáková V, Kučera O, Lotková H, Kandár R. *Stanovení glutathionu v primární kultuře hepatocytů.* Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie **2005**;59(5):272.
- 5) Kučera O, Červinková Z, Lotková H, Křiváková P. *Účinek S-adenosylmethioninu na regenerační odpověď jater po podání thioacetamidu.* Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie **2005**;59(5):271.



- 6) Lotková H, Červinková Z, Kučera O, Křiváková P. *Vliv S-adenosylmethioninu na regeneraci jater po parciální hepatektomii*. Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie **2005**;59(5):271.
- 7) Křiváková P, Červinková Z, Kučera O, Lotková H, Roušar T, Kandár R, Drahota Z. *Selektivní působení tBHP na enzymy dýchacího řetězce hepatocytů a protektivní účinek SAME*. Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie **2005**; 59(5):270-1.
- 8) Červinková Z, Křiváková P, Lotková H, Kučera O, Červinka M, Drahota Z. *High-resolution respirometry – an important tool to evaluate energy metabolism of isolated hepatocytes*. ALTEX – Alternatives to Animal Experimentation **2005**;22(Special Issue):187P.





