

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Hepatocyty jako modelový systém pro studium poruch energetického metabolismu

DISERTAČNÍ PRÁCE



Autor práce: Mgr. Pavla Křiváková

Školitel: doc. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.

Školitel konzultant: RNDr. Zdeněk Drahota, DrSc.

Hradec Králové

2006

Charles University in Prague
Faculty of Medicine in Hradec Kralove

Hepatocytes as a model tool for the study of energetic metabolism disturbances.

PhD Thesis



Author: Mgr. Pavla Křiváková

Tutor: Doc. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.

Hradec Králové

2006

Na tomto místě bych ráda poděkovala lidem, kteří mi v průběhu práce nějakým způsobem pomohli, nebo které mám prostě ráda.

V první řadě děkuji své školitelce paní **doc. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc.** za skvělé vedení, čas, který mi věnovala, za přátelský přístup, trpělivost a rady nejen odborné.

Děkuji také svému školiteli konzultantovi panu **RNDr. Zdeňkovi Drahotovi, DrSc.** za to, že mě zasvětil do tajemného světa mitochondrií, bioenergetiky a bioenergetiků. Mé díky mu patří i za trpělivost, kterou se mnou měl, zejména ze začátku vzniku této práce. Říkal mi: „Piš a co nestihneš než přijedu, tak vytečkej.“ Takže má práce zpočátku připomínala spíš příručku mladých svišťů. Pane doktore ještě jednou - - / · / - - / · - / - - - / · /

Dále bych chtěla poděkovat **MUDr. Halce Lotkové, PhD., MUDr. Otíkovi Kučerovi, PhD. a Mgr. Tomáši Roušarovi** za výbornou spolupráci a za to, že jsme se nad hepatocyty často nasmáli. Děkuji také **Mgr. Monice Pospíšilové, Janě Ondrákové, Majce Vaculové a Jitce Pohorské** za to, že se smály s námi a za zázemí, které nám připravují.

Děkuji i kouzelnici s TPP⁺ elektrodou **Mgr. Aničce Lábajové.**

Mé díky patří také druhé **Aničce**, kamarádce, spolubydlící a kolegyni **Mgr. Potáčové**, která se mnou sdílí pracovnu. Víím, že to se mnou nemá vždy lehké, zejména v poslední době, kdy můj stůl přetéká nejen odbornou literaturou.

Můj dík si zaslouží také skvělá **Ivanka Altmannová**, bez které bych se v těch všech úředních papírech jistojistě ztratila.

Děkuji také celému **kolektivu Ústavu fyziologie LFHK** za příjemné pracovní prostředí a za naše kulturně-sportovní akce.

Dále děkuji svým kamarádům, hlavně **Sylvě, Vendě, Tomovi, Tarzanovi, Honzíkovi** a dalším a ráda tak plním slib ze začátku studií. Děkuji i své početné **rodině.**

Jelikož ve vědě moc neplatí „Nemít prachy, nevadí!“ děkuji i grantovým agenturám - **GAČR 303/03/H065, GAUK 126/04/C a MSM 0021620820**, bez jejichž přispění by tato práce vznikala daleko složitěji.

Co říci závěrem, snad jen „Hurá, dopsáno.“

OBSAH

1 SEZNAM ZKRATEK	- 4 -
2 ÚVOD	- 8 -
3 TEORETICKÁ ČÁST	- 9 -
3.1 Morfologie a fyziologie jater	- 9 -
3.1.1 Morfologie jater	- 9 -
3.1.2 Fyziologie jater	- 11 -
3.2 Hepatotoxiny – rozdělení, charakteristika	- 14 -
3.3 Toxické poškození jater	- 15 -
3.3.1 Mechanismus vzniku reaktivních intermediátů	- 15 -
3.3.2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku	- 16 -
3.3.3 Mechanizmy toxického poškození jater	- 17 -
3.4 Mitochondrie a jejich role při toxickém poškození jater	- 24 -
3.4.1 Struktura mitochondrií	- 25 -
3.4.2 Funkce mitochondrií	- 28 -
3.5 Ochranné mechanismy jater a jaterní regenerace	- 36 -
3.5.1 Redukce tvorby ROS	- 37 -
3.5.2 Omezení účinku již vytvořených ROS	- 37 -
3.5.3 Reparační procesy	- 40 -
3.5.4 Regenerační schopnost jater	- 41 -
3.6 Modely toxického poškození jater	- 42 -
3.6.1 <i>In vitro</i> modely	- 43 -
3.7 Terciární butylhydroperoxid jako modelová látka pro studium oxidačního poškození hepatocytů	- 48 -
3.8 S-adenosylmethionin jako látka s potenciálně hepatoprotektivním účinkem	- 50 -
4 CÍLE PRÁCE	- 53 -
5 METODIKY	- 54 -
5.1 Materiál	- 54 -
5.2 Pokusná zvířata	- 54 -
5.3 Izolace hepatocytů	- 54 -
5.3.1 princip dvoustupňové perfúze jater	- 54 -
5.3.2 postup izolace hepatocytů	- 54 -
5.4 Stanovení viability hepatocytů pomocí exkluze trypanové modře	- 57 -
5.4.1 Princip	- 57 -

5.4.2	Provedení	- 57 -
5.5	Počítání buněk	- 58 -
5.6	Kultivace hepatocytů <i>in vitro</i>	- 58 -
5.6.1	Suspenze hepatocytů <i>in vitro</i>	- 58 -
5.6.2	Primární kultury hepatocytů potkana	- 59 -
5.6.3	Morfologické znaky čerstvě izolovaných a kultivovaných hepatocytů	- 61 -
5.7	Izolace mitochondrií	- 62 -
5.8	Biochemické testy	- 63 -
5.8.1	Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy v supernatantu	- 63 -
5.8.2	Stanovení koncentrace malondialdehydu	- 65 -
5.8.3	Stanovení obsahu GSH a GSSG v hepatocytech a kultivačním médiu	- 66 -
5.8.4	Měření mitochondriálního membránového potenciálu	- 67 -
5.8.5	Měření bobtnání mitochondrií	- 71 -
5.8.6	Měření mitochondriální produkce ROS	- 72 -
5.8.7	Měření spotřeby kyslíku pomocí vysokoúčinné respirometrie	- 73 -
5.9	Statistické zpracování výsledků	- 76 -
6	VÝSLEDKY	- 77 -
6.1	Efekt terciálního butylhydroperoxidu na izolované potkaní hepatocyty	- 77 -
6.1.1	Morfologické změny hepatocytů po působení tBHP	- 77 -
6.1.2	Vliv tBHP na aktivitu LDH v médiu primární kultury hepatocytů	- 79 -
6.1.3	Vliv tBHP na lipoperoxidace v primární kultuře hepatocytů	- 80 -
6.1.4	Vliv tBHP na hladinu glutathionu v hepatocytech primárních kultur	- 81 -
6.1.5	Vliv tBHP na akumulaci Rho 123 hepatocyty v primární kultuře	- 82 -
6.1.6	Vliv tBHP na akumulaci TPP ⁺ hepatocyty v suspenzi permeabilizovaných digitoninem-	83 -
6.1.7	Vliv tBHP na respiraci hepatocytů v suspenzi permeabilizovaných digitoninem	- 86 -
6.1.8	Vliv tBHP na respiraci izolovaných mitochondrií a jaterního homogenátu	- 90 -
6.1.9	Vliv tBHP na mitochondriální produkci ROS	- 92 -
6.1.10	Vliv tBHP na bobtnání mitochondrií	- 93 -
6.2	Efekt SAME na potkaní hepatocyty poškozené tBHP	- 94 -
6.2.1	Efekt SAME na morfologii hepatocytů poškozených TBHP	- 95 -
6.2.2	Efekt SAME na na aktivitu LDH v médiu hepatocytů poškozených tBHP	- 97 -
6.2.3	Efekt SAME na na lipoperoxidaci hepatocytů poškozených tBHP	- 98 -
6.2.4	Efekt SAME na na hladinu glutathionu v hepatocytech poškozených tBHP	- 100 -
6.2.5	Efekt SAME na pokles mmp induvaný tBHP	- 101 -
6.2.6	Efekt SAME na respiraci permeabilizovaných hepatocytů poškozených tBHP	- 103 -
6.2.7	Efekt SAME na mitochondriální produkci ROS navozenou vlivem tBHP	- 104 -
7	DISKUZE	- 106 -

7.1	Model toxického poškození hepatocytů tert-butylhydroperoxidem	- 107 -
7.1.1	Efekt tBHP na hladinu glutathionu u potkaních hepatocytů	- 107 -
7.1.2	Efekt tBHP na mitochondrie	- 108 -
7.1.3	Efekt tBHP na lipoperoxidaci	- 115 -
7.1.4	Efekt tBHP na aktivitu LDH v médiu	- 116 -
7.1.5	Efekt tBHP na morfologii hepatocytů	- 116 -
7.2	Hepatoprotektivní účinek SAMe na oxidační poškození potkaních hepatocytů	- 118 -
8	ZÁVĚRY	- 121 -
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 123 -

1 SEZNAM ZKRATEK

AA	kyselina arachidonová
ADD	<i>adaptair protein with death domain</i>
ADP	adenosindifosfát
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
ALT	alaninaminotransferáza
AP-1	<i>transcription factors activator protein 1</i>
APAF-1	<i>apoptosis protease activating factor 1</i>
ANT	adeninukleotidtranslokáza
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAT	kataláza
CNS	centrální nervový systém
CM-DCF	5-(a 6-)chloromethyl-2',7'-dichlorofluorescein
CM-H ₂ DCF(DA)	5-(a 6-)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein(diacetát)
COX	cytochróm c oxidáza
CSA	cyklosporin A
CuZnSOD	cytozolová forma SOD
CYP	cytochróm P 450
DAG	diacylglycerol
DDA ⁺	dibenzyl dimethylamonium
DG	dimethylbiguanid
DHLA	redukovaná forma kyseliny lipoové
dig	digitonin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	extracelulární
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykoldiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	kináza regulovaná extracelulárním signálem

ESR	elektronspinová rezonance
ETF	elektrony přenášející flavoprotein
FAD	flavinadenindinukleotid
FCCP	karbonylkyanid-m-chlorofenylhydrazon
GC-MS	plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
GDP	guanosindifosfát
GPx	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
GSH	redukováný glutathion
GSSG	glutathiondisulfid
GTP	guanosintrifosfát
hep	hepatocyty
HGF	hepatocytární růstový faktor
HNE	4-hydroxynonenal
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC	intracelulární
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IM	vnitřní mitochondriální membrána
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfát
JC-1	5,5,9,6,6,9-tetramethylbenzimidazolkarbokyaniiniodid
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminální kináza
K-H médium	Krebs-Henseleitovo médium
LA	kyselina lipoová
LDH	laktátdehydrogenáza
LPO	lipoperoxidace
mal	malát
MAPK	mitogeny aktivované proteinkinázy
MAT	methioninadenosyltransferáza
MDA	malondialdehyd
MFO	systém smíšených funkčních oxidáz
MK	mastná kyselina
MMP	mitochondriální membránový potenciál
MnSOD	mitochondriální SOD
MPA	kyseliny metafosforečná

mt	mitochondriální
MPT	<i>mitochondrial permeability transition</i>
NAD(P)	nikotinamidadeninukleotid(fosfát)
NAD(P)H	redukovaný NAD(P)
NEM	N-ethylmaleinimid
NF-κB	nukleární faktor κB
nDNA	jaderná DNA
NK	přírození zabíječi (<i>natural killers</i>)
(i)NOS	(inducibilní)NO-syntáza
OM	vnější mitochondriální membrána
OPA	o-ftalaldehyd
OXPPOS	oxidační fosforylace
PDGF	destičkový růstový faktor
P _i	anorganický fosfor
PiP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PM	Petriho miska
PN	pyridinnukleotidy
POS	polarografický kyslíkový senzor
PTP	nespecifický pór v IM (<i>permeability transition pore</i>)
PUFA	polynenasycená mastná kyselina
RaM	rychlý typ kalciového transportéru v IM
RC	dýchací řetězec
RCI	index respirační kontroly
Rho123	rhodamin 123
(m,r,t)RNA	(messenger, ribozomální, transferová)ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	otáčky/minutu
SAHo	S-adenosylhomocystein
SAMe	S-adenosylmethionin
SAPK	stresem aktivované protein kinázy
SOD	superoxiddismutáza
suc	sukcinát
TBA	2-thiobarbiturová kyselina

TBARS	látky reagující s TBA (<i>thiobarbituric acid reactive compounds</i>)
tBHP (tert-BHP)	terciární butylhydroperoxid
TCA	trichloroctová kyselina
TGF- α,β	transformační růstový faktor α,β
TMRM	tetramethylrhodaminmethylester
TNF- α	tumor nektortizující faktor α
TPP ⁺	tetrafenylfosfonium
UCP	uncoupling protein
UDP	uridindifosfát
UV/VIS	ultrafialové/viditelné světlo
VDAC	napětově řízený aniontový kanál
WE	Williamsovo médium E
$\Delta\mu\text{H}^+$	elektrochemický gradient protonů ~ MMP
$\Delta\Psi$	elektrická složka MMP

2 ÚVOD

Játra vedle řady dalších funkcí 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. Mitochondrie hrají v mechanismu jaterního poškození velmi významnou roli. Tyto orgány plní v buňce celou řadu funkcí. Jsou největším producentem energie ve formě ATP, podílejí se na udržování redoxního potenciálu, termoregulaci, modulaci Ca^{2+} signálu, jsou zdrojem reaktivních forem kyslíku, 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.

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. Vhodným biologickým modelem pro objasňování mechanismů toxického působení xenobiotik jsou izolované hepatocyty.

3 TEORETICKÁ ČÁST

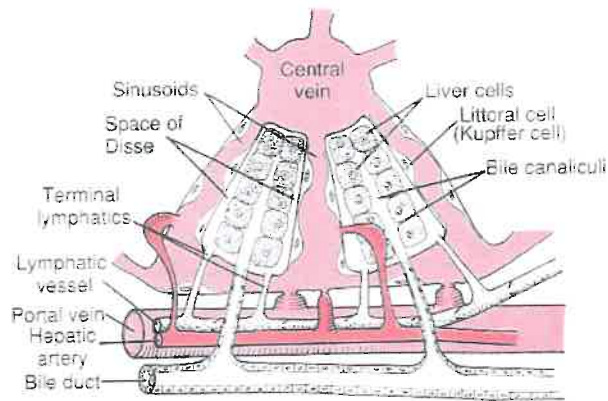
3.1 Morfologie a fyziologie jater

3.1.1 Morfologie jater

Játra jsou největší žlázou lidského těla. Tvoří asi 2,3 – 2,5 % tělesné hmotnosti. Jsou uložena v dutině břišní v pravé klenbě brániční. Dělí se na větší pravý a menší levý lalok. Oba laloky jsou na brániční ploše odděleny peritoneální řasou zvanou *ligamentum falciforme hepatis*. Tato řasa přechází kraniálně na pravé a levé *ligamentum coronarium*, které se na obou laterálních koncích rozšiřuje a vytváří *ligamentum triangulare*. Na spodní ploše jater se mezi *ligamentum teres* a lůžkem pro žlučník nachází *lobus quadratus*. Vzadu se od pravého laloku odštěpuje *lobus caudatus*. *Lobus quadratus* a *caudatus* tvoří mediální segment jater, který vzhledem k cévnímu zásobení patří k levému laloku (Brodanová a Kordač, 1993; Rutkauskas et al., 2006).

Játra jsou obalena tenkým vazivovým pouzdrzem zvaným *capsula Glissoni*. Pouzdro je zesíleno v hilu, kde do jater vstupuje *vena portae*, *arteria hepatica* a vystupuje pravý a levý *ductus hepaticus* a lymfatické cévy.

Jaterní parenchymové buňky – hepatocyty jsou uspořádány do ploten a trámců, které, jak lze pozorovat mikroskopicky, vytvářejí obraz jaterního lalůčku – lobulu (obr. č. 1). U prasete jsou jednotlivé lalůčky odděleny vazivem. U člověka se vazivo nachází jen v některých úsecích a obsahuje žlučovody, nervy, krevní a lymfatické cévy (portobiliární triády). Tyto úseky se nazývají portobiliární prostory. Hepatocyty jsou v lobulu uspořádány radiálně a tvoří vrstvu o síle jedné až dvou buněk. Plotny hepatocytů směřují od periferie k centru, volně spolu anastomozují a vytvářejí houbovitý labyrint. V prostoru mezi plotnami se nacházejí sinusoidy. Jsou to nepravidelně roztažené cévy, složené pouze z jedné vrstvy fenestrovaných endotelových buněk. *Lamina basalis* zde chybí. Sinusoidy jsou od hepatocytů odděleny Disseho prostorem. Tato subendotelová štěrbina obsahuje retikulární vlákna a mikrokly hepatocytů a začínají v ní lymfatické cévy. Plazma lehce prochází fenestracemi endotelové stěny a dostává se tak do přímého kontaktu s povrchem hepatocytů. Tím je usnadněna výměna makromolekul mezi krevním řečištěm a hepatocyty. Plocha kontaktu hepatocytů s krevním řečištěm je asi 600 m². Ztráta energie udržující potenciál na membráně hepatocytu vede velmi rychle k úniku cytozolových substancí do krve. To znamená, že ke zvýšení aktivity cytoplazmatických enzymů stačí jen velmi lehké poškození.



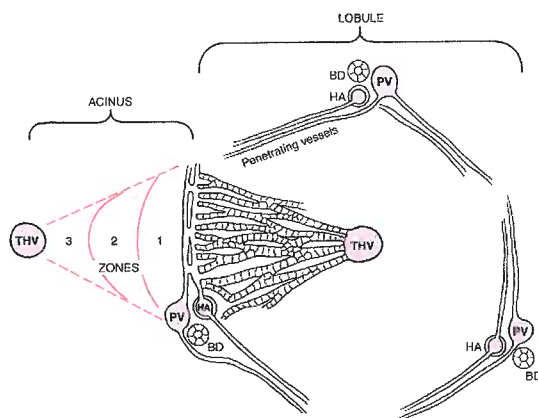
Obr. 1: Jaterní lalůček (Guyton a Hall, 1996)

V sinusoidech jsou kromě endotelových buněk jaterní makrofágy (Kupfferovy buňky), lipocyty (Itovy buňky) skladující tuk a tzv. *Pit cells* s tmavým jádrem neurosekrečního typu. Jedná se zřejmě o speciální T lymfocyty NK (*natural killers*) (Brodanová a Korďač, 1993).

Každý hepatocyt má svůj krevní pól přivrácený do Disseho prostoru a žlučový pól. Dva sousední hepatocyty spolu tvoří začátek žlučových cest. Kanalikulární membrána má odlišné transportní systémy a fyzikální vlastnosti než sinusoidální membrána. Spojení hepatocytů na okraji kanalikulární membrány je zprostředkováno junkčními komplexy. Uplatňují se zde především těsná spojení (*tight junctions*). Je tak zabráněno volnému pohybu molekul mezi intracelulárním prostředím a žlučovou kapilárou. Žlučové kapiláry v dalším průběhu získávají vlastní stěnu, postupně se spojují a vytvářejí pravý a levý *ductus hepaticus*. Jejich splynutím vzniká *d. hepaticus communis* a připojuje se *d. cysticus*, vedoucí žluč ze žlučníku. Jejich společné pokračování se nazývá *d. choledochus* a ústí do duodena ve Vaterově papile. Duodenální část choledochu je obkroužena Oddiho svěračem (Brodanová a Korďač, 1993).

Morfologická, klasická představa jaterního lobulu se však neshoduje s funkčním členěním. Funkční jednotkou jater je jaterní acinus (zavedl Rappaport) (obr. č. 2), v jehož středu se nachází portobiliární triáda. O enzymovém vybavení, funkčnosti a odolnosti buněk rozhoduje jejich vzdálenost od triády. Acinus se funkčně dělí na zónu 1 – periportální, která leží v blízkosti triády a ve které je krev bohatá na kyslík a nutriční substráty, zónu 2 – přechodnou intermediální zónu a na zónu 3 – perivenózní, v blízkosti centrální žíly. Periportální zóna má vysokou aktivitu respiračních a proteosyntetických enzymů. V perivenózní zóně je více biotransformačních enzymů a malá koncentrace ochranného

glutathionu. To vysvětluje selektivní charakteristické poškození při působení různých hepatotoxických látek s rozdílným mechanismem účinku.



Obr. 2: Lobulus a acinus (Guyton a Hall, 1996)

Celkový průtok krve játry tvoří asi $\frac{1}{4}$ klidového minutového objemu srdce. Asi 75 % krve je do jater přiváděno cestou *v. portae* a 25 % cestou *a. hepatica*. *Vena portae* přivádí odkysličenou krev z nepárových orgánů dutiny břišní bohatou na živiny, zatím co *a. hepatica* okysličenou krev z břišní aorty. *V. portae* i *a. hepatica* se větví na inter- a intralobulární vény a artérie, které ústí do portobiliárních triád. Krev přiváděná oběma cévami se mísí v sinusoidech. Krev ze sinusoidů odtéká centrální žilou do sublobulárních vén spojujících se ve *vv. hepaticae* a ústí do *v. cava inferior* (Brodanová a Kordač, 1993).

3.1.2 Fyziologie jater

Játra mají centrální roli v metabolismu živin a jsou pro organismus naprosto nepostradatelná. Játra plní funkci degradační, detoxikační, zásobní, sekreční a exkretční. Mají výrazný vliv na metabolismus proteinů (syntéza proteinů pro vlastní potřebu i pro potřeby organismu, tvorba močoviny), lipidů (β -oxidace mastných kyselin, syntéza fosfolipidů, apoproteinové části lipoproteinů, cholesterolu atd.) sacharidů (glukostatická funkce jater, konverze galaktózy a fruktózy na glukózu atd.), mají vliv na hemostázu (syntéza srážecích faktorů), skladuje se zde železo, vitamíny, podílejí se na vodním hospodářství (katabolismus mineralokortikoidů, tvorba angiotenzinogenu) a na udržování celkové homeostázy vnitřního prostředí. K vylučování látek dochází prostřednictvím žluči, což je exokrinní sekret jater významný také pro trávení a vstřebávání lipidů. Ve fetálním období byla játra důležitým místem krvetvorby. Játra plní celou řadu funkcí, o kterých bylo již hodně napsáno. Na tomto místě bych jen stručně připomněla detoxikační funkci jater.

Biotransformace

Látky lipofilního charakteru, které procházejí membránami a může tedy docházet k jejich kumulaci v organismu, nemohou být z těla vyloučeny přímo, ale musí být nejdříve zvýšena jejich polarita. Biotransformací rozumíme sled enzymových reakcí, kterými je exogenní lipofilní (apolární) látka přeměňována na formu polární. Biotransformace probíhá převážně v hladkém endoplazmatickém retikulu a cytoplazmě hepatocytů. Obvykle se rozděluje do dvou fází.

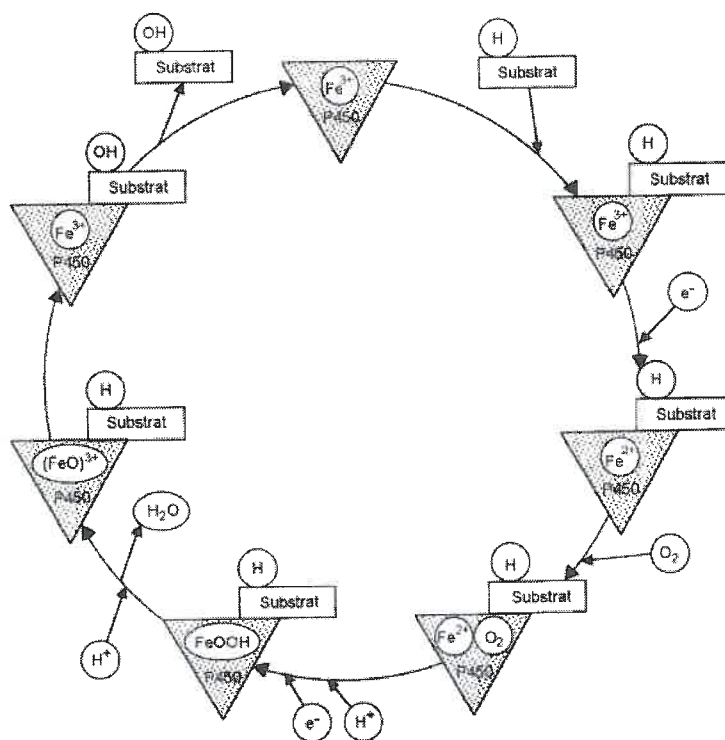
Fáze I biotransformace

Ve fázi I. dochází k přeměně látky na polárnější metabolit zavedením funkčních skupin (-OH, -NH₂, -SH, -COOH). Uplatňuje se zde především oxidace, méně často redukce nebo hydrolyza. Většina látek je oxidována mikrozomálním enzymovým systémem oxidáz se smíšenou funkcí (MFO). Hlavní roli zde zaujímá cytochróm P-450 (CYP). CYP se fylogeneticky vyvinul u zvířat jako prostředek k eliminaci xenobiotik. Jedná se o skupinu izoenzymů, jejichž společné oxidační centrum je tvořeno hemem. Izoenzymy se liší apoproteinovou složkou, čímž je dána určitá specifita k jednotlivým substrátům. Specifita je ovšem velmi nízká a překrývá se, stejně jako u ostatních enzymů biotransformace. Důvodem této velmi nízké specifity je kompenzace nízkého množství enzymů vzhledem k obrovskému množství substrátů, jejichž přeměny katalyzují (Červinková 1999; Horák 2000; Larrey a Pageaux, 1997). Izoenzymy se liší svou genovou lokalizací. U člověka je dnes známo 57 izoenzymů CYP, které jsou rozděleny do 17 rodin (sekvenční homologie vyšší než 40 %) a 43 podrodin (sekvenční homologie vyšší než 60 %). 90 % oxidací xenobiotik je připisováno šesti hlavním enzymům (CYP1A2, 2C9, 2C8, 2D6, 2E1 a 3A4) (Sweeney a Bromilow, 2006). Mutace genů mohou způsobovat deficit ve výbavě jednotlivých izoenzymů, a tím i významný polymorfismus. Mutace se většinou projevují ve dvou fenotypově odlišných modifikacích – fenotyp silně metabolicky aktivní a fenotyp slabě metabolicky aktivní. Tyto defekty mohou vést k poruše biotransformace metabolizované látky a k hromadění substrátu s toxickým účinkem, zejména když není k dispozici žádná jiná alternativní metabolická dráha. V takových případech již při podání běžné terapeutické dávky léku může docházet k závažným vedlejším účinkům. Genetické mutace jsou tedy spoluzodpovědné za interindividuální rozdíly v reakci na xenobiotika (Larrey a Pageaux, 1997).

Cytochróm P-450 je enzymem NADPH-cytochróm P-450 reduktázou nejprve redukován, což umožňuje vázat molekulární kyslík jako šestý ligand na železo hemu. Vzniká reaktivní Fe-oxo-komplex, který může oxidovat nejrůznější substráty. Důležitou součástí tohoto systému jsou též membránové lipidy, které vyvolávají konformační změny CYP

zvyšující jeho afinitu k substrátu, stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu a jsou zásobárnou hydrofóbních substrátů (Stiborová, 2002). Kromě monooxidáz obsahujících CYP se uplatňují i monooxygenázy obsahující jako prosthetickou skupinu flavinadeninindinukleotid (FAD) (Červinková, 1999).

Výsledkem fáze I jsou obvykle méně lipofilní premetabolity. Některé látky jsou pak pozměňovány a jejich konečné metabolity vyloučeny. Jiné látky jsou ve II. fázi biotransformace konjugovány s polárními molekulami. Vzniklé hydrofilní sloučeniny jsou vyloučeny z organismu močí nebo žlučí (Brodanová a Kordač, 1993). Metabolity vznikající v I fázi biotransformace nemusejí být jen netoxické biologicky inertní látky. V závislosti na chemické struktuře xenobiotika a enzymovém systému, který přeměňuje danou látku v organismu se naopak může jednat o látky značného biologického významu. Místo detoxikace tedy může docházet k aktivaci ať už v pozitivním (léky) či negativním (toxiny) smyslu (Stiborová, 2002; Sweeney adn Bromilow, 2006).



Obr. 3: Mechanismus monooxygenázové reakce cytochrómem P-450 (Guengerich, 1993)

Fáze II biotransformace

Ve druhé fázi dochází ke konjugaci. Premetabolit vzniklý v první fázi je vázán s různými látkami prostřednictvím transferáz. Nejčastěji se uplatňuje glukuronidace, vazba

s aminokyselinami (glycinem, taurinem, glutathionem, glutaminem, serinem, kyselinou merkaptovou), vazba s kyselinou sírovou, methylace, ethylace, hydroxymethylace a acethylace. Reakce druhé fáze probíhají mnohem rychleji než reakce fáze I. Při konjugaci s kyselinou glukuronovou je kyselina přenesena transferázou z aktivní sloučeniny uridindifosfátglukuronové kyseliny na metabolit. UDP-glukuronosyltransferáza je mikrozomální enzym, narozdíl od většiny enzymů fáze II, které se nacházejí v cytozolu. Potřebná energie pro konjugační reakce je čerpána z rezerv ATP (Brodanová a Kordač, 1993, Jakoby, 1998). Mezi enzymy II fáze biotransformace patří rovněž glutathion-S-transferázy, které jsou schopny vázat řadu kancerogenních látek a kazalyzovat jejich vazbu s glutathionem (Gallagher et al., 2006).

Většina biotransformačních enzymů vykazuje značnou inducibilitu. Mnoho xenobiotik indukujících enzymy I. fáze je schopno současně indukovat i enzymy fáze konjugační. Obecně je však indukce enzymů I. fáze vyšší a lze tedy předpokládat určitou nerovnováhu mezi rychlostí vzniku reaktivních meziproductů a rychlostí jejich inaktivace konjugací (Stiborová, 2002).

3.2 Hepatotoxiny – rozdělení, charakteristika

Játra jsou zejména díky své úloze v biotransformaci xenobiotik a také díky tomu, že jsou prvním orgánem, který přichází do kontaktu s látkami absorbovanými z GIT hlavním cílem toxického účinku mnoha substancí. Hepatotoxiny jsou chemické látky exogenního původu, které mohou způsobovat prakticky všechny typy jaterních lézí. Do organismu se dostávají různými cestami – gastrointestinálním traktem, nebo parenterálně (kůží, inhalačně, sliznicemi). V krvi jsou většinou vázány na proteiny a posléze metabolizovány játry.

Většina těchto látek je rozpustná v tucích. V organismu dosahují vyšších hladin, snadno procházejí membránami a pronikají do tkání s vysokým obsahem tuku (CNS, tuková tkáň), kde jsou stříhány a postupně uvolňovány do krevního oběhu. Tím je prodloužena doba jejich účinku. Podmínkou vyloučení je jejich přeměna z formy apolární na polární (biotransformace) (Brodanová a Kordač, 1993).

Hepatotoxiny můžeme dělit podle různých kritérií: podle jejich chemické struktury, typu poškození, které způsobují, podle buněčného nebo molekulárního mechanismu působení, podle cílové struktury v hepatocytu, nebo podle způsobu expozice. Z preventivního hlediska je důležité rozdělení na hepatotoxiny pravé (skutečné, obligátní, přímé, klasické) a potenciální (netypické, fakultativní, nepravé, nepřímé, senzitivující) (Kahl, 1992).

Skutečné hepatotoxiny se vyznačují následujícími vlastnostmi poškození (Brodanová a Kordač, 1993; Kahl, 1992):

- Reprodukovatelnost v experimentálních podmínkách
- Závislost na dávce
- Výskyt u všech osob vystavených dostatečné dávce
- Stejně, většinou krátké, latentní období
- Často charakteristická jaterní histologie

Pravé hepatotoxiny jsou téměř výhradně produkty chemického průmyslu a chemické látky zevního prostředí. U léků je pravá hepatotoxicita akceptovatelná jen za určitých podmínek, a to tehdy, jestliže mají vysoký terapeutický potenciál (chemoterapeutika), nebo když je pravá hepatotoxicita prokázána až při koncentracích vysoce převyšujících terapeutickou dávku (paracetamol) (Kahl, 1992). V takových případech jsou nezbytné studie pro stanovení nebezpečí pro člověka a v některých případech identifikace protektivních látek.

Potenciální hepatotoxiny vykazují následující charakteristiku (Brodanová a Kordač, 1993; Červinková, 1999; Kahl, 1992):

- Latentní období je značně variabilní
- Neexistuje adekvátní zvířecí model
- Není přítomna závislost na dávce
- Pouze u části jedinců dojde k poškození jater
- Jaterní histologie je necharakteristická, někdy normální

Individuální vnímavost vůči potenciálním hepatotoxinům je způsobena především změnou aktivitou enzymových systémů. Aktivita enzymů je ovlivňována celou řadou faktorů, mezi něž patří: genetické vlivy, věk, pohlaví, výživa, těhotenství, průtok krve játry, chorobné stavy, interakce léků a dalších xenobiotik (Brodanová a Kordač, 1993; Červinková, 1999).

3.3 Toxické poškození jater

3.3.1 Mechanismus vzniku reaktivních intermediátů

Během biotransformace jsou některé látky přeměňovány na stabilní metabolity, zatímco z jiných vznikají relativně toxické intermediáty. K tvorbě reaktivních metabolitů dochází různými cestami (Červinková, 1999).

- Cytochróm P-450 oxiduje látky na reaktivní elektrofilní metabolity. Příkladem je oxidace acetaminofenu na N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI), nebo tvorba

- alkyldiazohydroxidů z N-nitrosaminů. Tyto elektrofilní metabolity se mohou kovalentně vázat na nukleofilní centra buněčných složek (Červinková, 1999; Anders, 1988).
- Cytochróm P-450 katalyzuje reduktivní dehalogenaci některých haloalkanů. Dává tak vzniknout volným radikálům. Příkladem je dehalogenace tetrachlormethanu (Červinková, 1999, Anders, 1988).
 - NADPH-cyt-P450 reduktáza redukuje některé látky na volné radikály. Příkladem je tvorba semichinonových, popřípadě hydrochinonových radikálů z chinonů. Tyto radikály pak mohou redukovat molekulární kyslík na superoxidový radikál.
 - Také ve II. Fázi biotransformace může dojít k aktivaci xenobiotika na toxictější sloučeninu. Příkladem jsou konjugáty se sulfátem vznikající z N-hydroxylovaných aromatických aminů účinkem sulfotransferáz či N-cetyltransferáz (Stiborová, 2002)
 - Zdrojem volných radikálů mohou být dále, peroxizómy, xantinoxidáza, kaskáda kyseliny arachidonové, reakce zahrnující ionty přechodných kovů a imunologické reakce při zánětu a fagocytóze. Jedním z nejvýznamnějších zdrojů reaktivních forem kyslíku a také velmi častým cílem toxického účinku látek jsou mitochondrie.

3.3.2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Volný radikál se nazývá takový atom, neutrální molekula či iont, který obsahuje alespoň jeden orbital s nepárovým elektronem. Kromě volných radikálů se vyskytují i další reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku, které, přestože mají všechny elektrony spárované, jsou vysoce reaktivní. Společně s volnými radikály se pro ně používají termíny „*reactive oxygen species*“ (ROS) a „*reactive nitrogen species*“ (RNS).

Reaktivní formy kyslíku jsou známy jako toxické látky, které oxidují buněčné komponenty a poškozují buňky. Podle současných poznatků se některé ROS v nízkých subtoxických koncentracích účastní přenosu signálu jako druzí poslové a podílejí se na regulaci některých buněčných dějů (Thannickal at al., 2000). ROS jsou také velmi důležité při ničení cizorodých látek aktivovanými fagocyty, při oplození vajíčka a při biotransformaci.

Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) je označován za primární ROS. Superoxidový radikál je běžně tvořen jako produkt aerobních oxidačních procesů v různých buněčných kompartmentech. Jedná se o poměrně slabý oxidant s velmi krátkým poločasem účinku, který neprochází přes biologické membrány (Brent a Rumack, 1993). Superoxid většinou nereaguje s polypeptidy a nukleovými kyselinami, jeho role při lipoperoxidaci je předmětem debat (Valko et al., 2006). Superoxidismutáza (SOD) velmi rychle konvertuje superoxid na peroxid vodíku. Vznik různých ROS je úzce spjat s redoxním stavem přechodných kovů. Za fyziologických

podmínek je koncentrace volných iontů železa velmi přísně regulována a je udržována na téměř nulové hladině. Za stresových podmínek však může superoxid uvolnit železo z intracelulárních zdrojů, jako například z 4Fe-4S klastrů některých enzymů nebo z feritinu a v jejich přítomnosti reagovat s peroxidem vodíku za vzniku velmi reaktivního hydroxylového radikálu OH[•] (Haber-Weissova reakce) (Valko et al., 2006). Stejně jako železo se na tvorbě hydroxylového radikálu může podílet další přechodný kov skladovaný v játrech – měď (Letelier et al, 2005).

Peroxid vodíku (H₂O₂) je již silnější oxidační činidlo, má však delší reakční dobu. Může vyvolávat oxidační poškození přímo oxidací thiolů a DNA, nebo se může účastnit Haber-Weissovy reakce za vzniku hydroxylového radikálu (Brent a Rumack, 1993).

Hydroxylový radikál (OH[•]) je jedno z nejsilnějších oxidovadel v biologických systémech. Jeho poločas účinku je menší než 1 ns. *In vivo* tedy reaguje blízko místa vzniku. Může reagovat se všemi buněčnými molekulami a poškozovat je.

Mezi další významné ROS patří také **peroxylový radikál** ROO[•] vznikající například při oxidaci buněčných lipidů.

Zvláštní postavení v systému radikálů má radikál **oxidu dusnatého** NO[•]. NO[•] je velmi důležitá signální molekula, která se uplatňuje při celé řadě buněčných procesů, jako regulace krevního tlaku, neurotransmise, relaxace hladkého svalstva atd. V tkáních je tvořen pomocí NOSyntáz (NOS) z argininu za vzniku citrulinu a NO[•]. V játrech je NO[•] tvořen hepatocyty, Kupfferovými a endoteliálními buňkami. Nadměrná produkce NO[•] může vést k tzv. nitrosylačnímu stresu. NO[•] je rozpustný ve vodném prostředí i v nepolárních rozpustidlech a prochází přes membrány. Může reagovat se superoxidem za vzniku **peroxodusitanu** (ONOO⁻) (Radi et al, 1991; Valko et al., 2006).

3.3.3 Mechanizmy toxického poškození jater

Porušení rovnováhy mezi vznikem reaktivních metabolitů a jejich detoxikací (viz. dále) 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 nebo 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).

Elektrofilní metabolity se kovalentně váží na SH, nebo NH₂ skupiny proteinů. To může vést buď k metabolickému, nebo imunologickému poškození (Popper, 1988).

Některé hepatotoxiny působí jako prekancerogeny a po metabolické aktivaci se kovalentně váží na DNA (Kahl, 1992).

Další látky inhibují proteosyntézu. Houbový toxin α -amanitin vytváří komplex s RNA-polymerázou II, čímž ji inhibuje. Ve vyšších koncentracích inhibuje i RNA-polymerázu III (Kahl, 1992). Galaktosamin inhibuje proteosyntézu prostřednictvím deplece uracil nukleotidů (Mikhaylova et al., 1996). Výsledkem je zástava syntézy proteinů, což může vést k masivní steatóze popřípadě nekróze hepatocytu (Horák, 2000).

Většina hepatotoxinů ať už primárně nebo sekundárně vyvolává oxidační stres. Oxidační poškození je jedním z nejčastějších účinků hepatotoxinů.

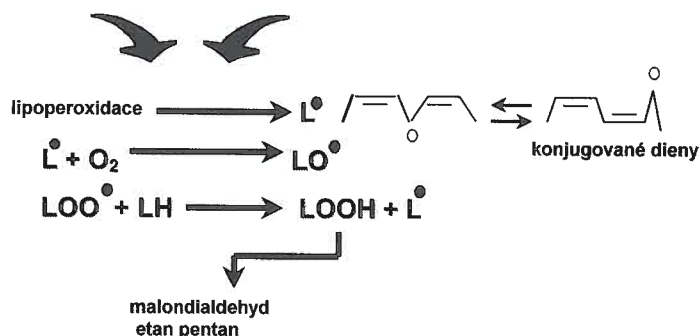
3.3.3.1 Oxidační stres

Oxidační stres je následkem porušení rovnováhy mezi oxidantem a antioxidantem ve prospěch oxidantu (Jakus a Lopuchová, 1999). Oxidační stres tedy nastává při zvýšené produkci volných radikálů, nebo při inhibici jejich odstraňování. Mezi biochemické následky oxidačního stresu patří lipoperoxidace, oxidace thiolových skupin proteinů, oxidace DNA a změny v poměru GSH/GSSG (Kaplowitz et al., 2002).

3.3.3.1.1 Lipoperoxidace

Lipoperoxidace je řetězová reakce. Reaktivní metabolit – radikál se váže na uhlík nenasycených mastných kyselin, nebo jim odebírá vodík. Vzniká tak lipidový radikál, který je oxidován na hydroperoxyradikál. Peroxylový radikál může reagovat s jinou molekulou lipidů za vzniku hydroperoxidu a nového lipidového radikálu. Současně se tvoří konjugované dieny, které vykazují typickou absorpenci při 233 nm a slouží jako ukazatel lipoperoxidace. Rozkladem hydroperoxidu vznikají další látky jako alkany a aldehydy (4-hydroxynonenal, malondialdehyd), které mohou rovněž sloužit ke kvantifikaci lipoperoxidace. MDA a HNE mají mutagenní účinky. HNE má velký vliv na signalizační kaskádu a ovlivňuje tak fenotypové charakteristiky buněk (Valko et al., 2006). Tyto štěpné fragmenty lipidů se mohou kovalentně vázat na proteiny a ireverzibilně je poškozovat. Modelovou látkou používanou při studiích mechanismu lipoperoxidací je CCl₄ (Kahl, 1992; Červinková, 1999; Horák 2000).

reaktivní intermediáty R[•]



Obr. 4: Schéma lipoperoxidace (Červinková, 1999)

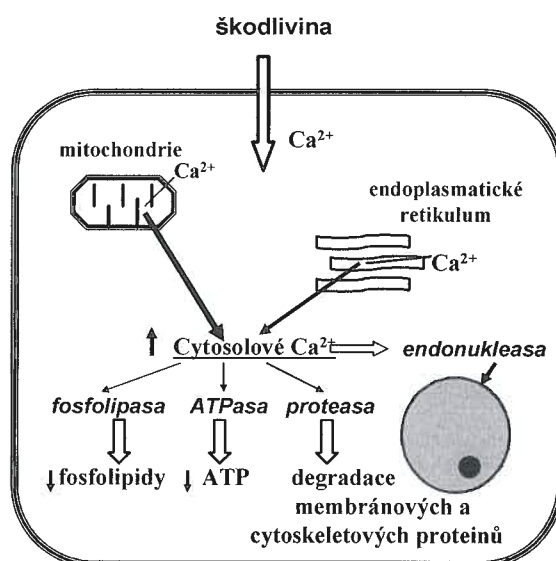
Důsledkem lipoperoxidace je změna biofyzikálních vlastností membrány (fluidita, elektrická rezistence), mění se počet SH skupin proteinů. Vznikem křížové vazby mezi zbytkem aminokyselin a proteinů a aldehydových produktů lipoperoxidace je snižená mobilita plazmatických proteinů. Následkem zvýšené propustnosti mohou i relativně velké molekuly intracelulárních enzymů vytékat z buňky (Jakus a Lopuchová, 1999).

Dochází k disociaci ribozómů, důsledkem je nahromadění lipidů pro neschopnost buňky syntetizovat lipoproteiny z triacylglycerolů. To vede ke steatóze jaterní buňky.

Lipoperoxidace mikrozómů je spojena se ztrátou aktivit určitých enzymů (CYP, glukóza-6-fosfatáza, UDP-glukuronidáza atd.).

Lipoperoxidace mitochondriální membrány může vyústit až v lýzu mitochondrie. Poškození mitochondrií má za následek poškození dýchacího řetězce a snížení tvorby ATP. (Jakus a Lopuchová, 1999; Kahl, 1992). Poškození kardiolipinu vede k uvolnění cytochromu c z vazby na tento fosfolipid.

Koncentrace volného Ca²⁺ v cytoplazmě [Ca²⁺]_c se pohybuje okolo 100 nmol/l. Koncentrace Ca²⁺ v extracelulárním prostředí je asi 1,2 mmol/l. Tento koncentrační gradient je udržován pomocí Ca²⁺-ATPáz a Ca²⁺/3 Na⁺ antiportu v cytoplazmatické membráně a Ca²⁺-ATPáz v endoplazmatickém retikulu, kde je největší intracelulární koncentrace těchto iontů. Vlivem porušení permeability membrán, oxidačního poškození Ca²⁺ translokáz a poklesu ATP dochází k velmi rychlému nárůstu cytozolového Ca²⁺. Zvýšená koncentrace cytozolového Ca²⁺ má za následek aktivaci nespecifických hydroláz.



Obr. 5: Změny v intracelulární koncentraci Ca²⁺ při poškození buňky

3.3.3.1.2 Oxidace proteinů

Proteiny mohou být oxidačním stresem poškozeny několika způsoby. Prvním z nich je přímá oxidace některých aminokyselinových zbytků. Nejochotněji je pomocí ROS oxidován methionin na sulfoxid, dále cystein a tryptofan. Oxidací prolinu dochází k rozštěpení aminokyselinového řetězce (Davies et al., 2005). Změna redoxní rovnováhy uvnitř hepatocytu významně ovlivňuje thiolové skupiny proteinů, tím se mění jejich terciární i kvarterní struktura, což ovlivňuje jejich funkci. Reakcí s hydroxylovým radikálem dochází k hydroxylaci molekul, s peroxyinitrem pak k nitraci. Oxidace hemového železa či jiného přechodného kovu v aktivním místě zbavuje enzym jeho aktivity. Poškození proteinů vede ke ztrátě či snížení enzymové aktivity, včetně selhání transportních funkcí, tedy i kalciových translokáz, poruše cytoskeletonu buňky a ovlivnění signálních molekul (Jakus a Lopuchová, 1999). Tvorbou *adduktů* či jinou modifikací mohou vznikat neoantigeny s možností vzniku imunoalergického poškození.

3.3.3.1.3 Oxidace DNA

ROS a zejména hydroxylový radikál reagují se všemi komponenty DNA, ničí purinové i pyrimidinové báze a deoxyribózovou kostru. Následkem jsou modifikace purinů a pyrimidinů, jedno- nebo dvouřetězcové zlomy DNA a DNA *cross-links*. Poškození DNA může vyústit v indukci nebo inhibici transkripce genů, dochází k replikačním chybám, spuštění různých signálních cest, nestabilitě genomu. Konečným důsledkem těchto změn je

indukce apoptózy či naopak kancerogeneze (Wang a Hu, 2000). Kromě ROS se na poškození podílejí i RNS.

V buňce naštěstí existuje řada opravných mechanismů. Exprese některých opravných enzymů je indukována přímo následkem oxidačního stresu. V porovnání s jadernou DNA (nDNA) je účinnost opravného systému v mitochondriích nižší. Navíc se mitochondriální DNA (mtDNA) nachází v blízkosti vzniku ROS a není chráněna histony. Změny mtDNA mohou vést k mitochondriálním dysfunkcím a k degenerativním onemocněním.

3.3.3.1.4 Změny v přenosu intracelulárního signálu

Regenerace a proliferace jsou přirozené odpovědi buněk na jaterní poškození. Tyto děje jsou aktivovány různými signálními cestami. Některé hepatotoxiny mohou tyto signály zesílit, inhibovat, nebo pozměnit. Mohou tedy inhibovat buněčné dělení a indukovat apoptózu, popřípadě nekrózu hepatocytu (Jones a Czaja, 1998).

Některé růstové faktory a další látky působí prostřednictvím cAMP jako druhého posla. Po navázání příslušného ligandu na receptor asociovaný s trimerním G proteinem dojde k výměně GDP za GTP. Takto aktivovaný G protein se odpojí od receptoru. Od pevného dimeru $\beta\gamma$ se odpojí podjednotka α nesoucí GTP. Ta aktivuje další enzymy jako adenylcyklázu. Vznikající cAMP dále aktivuje proteinkinázu A. Proteinkináza A fosforyluje další enzymy (Jones a Czaja, 1998, Hořejší a Bartůňková, 1998). Etanol *in vivo* inhibuje G protein a tím snižuje citlivost hepatocytů k některým hormonům a růstovým faktorům (Diehl et al., 1992).

Dalším důležitým principem mnoha signalizačních dějů je využití vápenatých iontů. Po navázání látky na membránový receptor asociovaný s G proteinem je aktivována fosfolipáza C, která stěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PiP₂) na inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG). IP₃ indukuje otevření Ca²⁺-iontových kanálů v cytoplazmatické membráně, respektive v membráně endoplazmatického retikula. Výsledkem je zvýšení hladiny cytoplazmatického Ca²⁺. Ca²⁺ se váže na kalmodulin a aktivuje celou řadu cytoplazmatických enzymů. (Jones a Czaja, 1998; Hořejší a Bartůňková, 1998). Ethanol snižuje hladinu IP₃ v odpovědi na epidermální růstový faktor, vazoprezin a fenyleprin (Zhang et al., 1996).

Mnoho receptorů např. pro inzulín, PDGF, TGF- β , má cytoplazmatické domény nesoucí proteinkinázovou aktivitu, nebo jsou kovalentně spojeny s cytoplazmatickými proteinkinázami. Po navázání příslušného ligandu na receptor se změní konformace receptorového komplexu a tím se ovlivní aktivita proteinkinázy. Aktivovaná proteinkináza

fosforyluje další proteinkinázy (Hořejší a Bartůňková, 1998). V procesu proliferace a buněčné smrti hrají důležitou roli zejména mitogeny aktivované proteinkinázy (MAPK). Patří mezi serin/treonin kinázy (Jones a Czaja, 1998) Jejich úplná aktivace vyžaduje fosforylaci serinu i treoninu. Serin/treonin kinázy mají delší poločas účinku než tyrozin kinázy. Mohou tedy aktivovat regulační proteiny genů (elk-1, c-jun atd.) přímo v jádře (Alberts et al., 1993). Mezi MAPK patří kináza regulovaná extracelulárním signálem (ERK), c-Jun-NH₂-terminální kináza (JNK) a p38. MAPK jsou stimulovány oxidačním stresem, proto se jim někdy říká stresem aktivované proteinkinázy (SAPK) (Jones a Czaja, 1998).

Membránové sfingolipidy vykazují také signální aktivitu. TNF- α , Fas ligand a některá chemoterapeutika indukují hydrolýzu sfingomyelinu na ceramid, který dále aktivuje fosfatázy a kinázy (Jones a Czaja, 1998). Ceramid může indukovat apoptózu přes aktivaci JNK. Ceramidem vyvolaná apoptóza nebyla zastavena inhibicí kaspáz (Kanzler a Galle, 2000).

Cílem všech těchto signálních cest je aktivace transkripčních faktorů, které se vážou na regulační oblast určitého genu a zahajují jeho transkripci.

Růstové faktory a další látky indukují dvě skupiny genů. Tak zvaně rychle reagující geny, které jsou aktivovány do patnácti minut po spuštění signálu a pomalu reagující geny, které spouští závěrečnou proteosyntézu. Mezi rychle reagující geny patří myc, fos a jun geny. Produkty jun a fos genů se kombinují a vytvářejí aktivní geny regulující protein 1 (AP-1). AP-1 a myc proteiny aktivují pomalu reagující geny (Alberts et al., 1993). Po podání galaktosaminu nebyla pozorována zvýšená exprese AP-1 genu a c-myc ani po 6 hodinách, což vedlo ke snížení míry proliferace a k jejímu pozdnímu nástupu (Schmiedeberg et al., 1993). Prozánětlivé cytokiny aktivují další transkripční faktor NF- κ B. NF- κ B se rovněž uplatňuje při stimulaci proliferace a inhibici apoptózy. Následkem chronického požívání alkoholu je inhibována aktivita NF- κ B (Jones a Czaja, 1998; Zeldin et al., 1996).

3.3.3.1.5 Nekróza a apoptóza

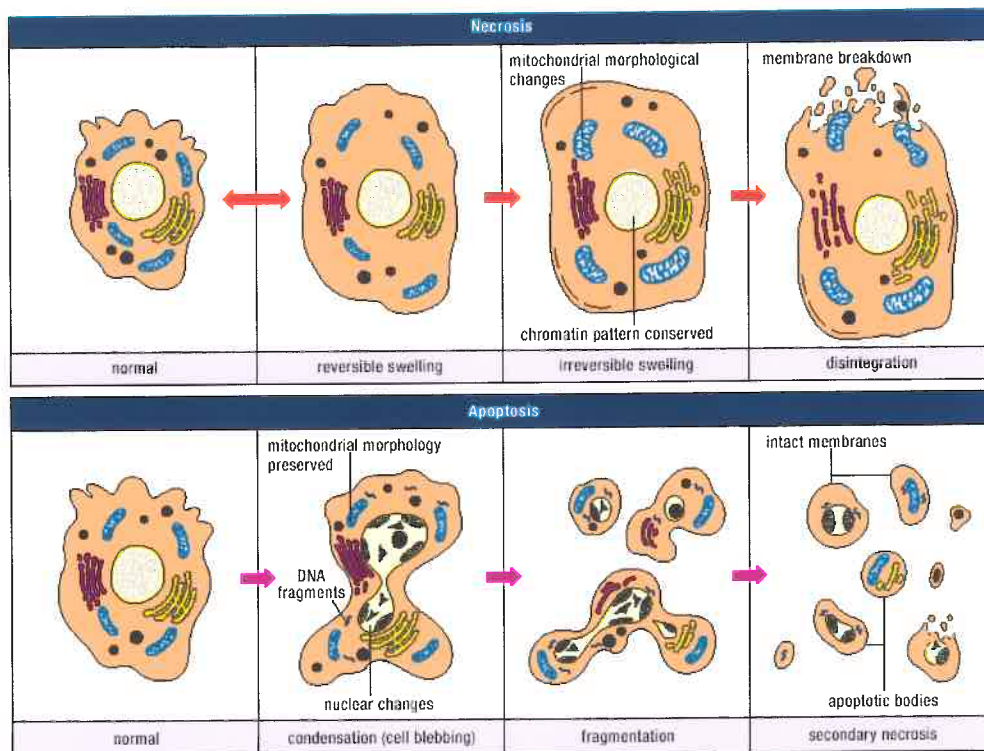
Reaktivní metabolity buď přímo naruší rovnováhu mezi faktory podporující přežití a buněčnou smrt a výsledkem je bezprostřední ztráta viability, nebo tuto rovnováhu modifikují tak, že dochází k senzibilizaci hepatocytů k letálnímu efektu vnitřního jaterního imunitního systému. Výsledný efekt se pohybuje mezi zachováním viability a indukcí apoptózy nebo nekrózy v závislosti na druhu látky, době expozice, genetických faktorech, stavu hepatocytů před expozicí a celé řadě vnějších vlivů (Kaplowitz et al., 2002).

Apoptóza a nekróza jsou považovány za dva rozdílné typy buněčné smrti s odlišnými morfologickými a biochemickými znaky. Zatímco nekróza je často vyvolána vnějšími vlivy,

apoptóza představuje striktně regulovaný proces zodpovědný za odstranění starých, poškozených nebo nepotřebných buněk. V současné době se tento názor mění. Zdá se, že nekróza a apoptóza reprezentují dva extrémní případy kontinuálního procesu buněčné smrti. Znak nekrózy i apoptózy můžeme současně pozorovat nejen v jedné tkáni, ale dokonce v jedné buňce (Kim et al., 2003; Lemasters, 1999; Lemasters et al., 2002).

Apoptóza je charakterizována rozpadem buňky na apoptická tělíška bez porušení integrity cytoplazmatické membrány a tedy bez vyplavení prozánětlivých faktorů. Základními znaky apoptózy jsou: exprese fosfatidylserinu na povrchu buněčné membrány, změny cytoplazmatické membrány (blebs), ztráta oxidačních funkcí mitochondrií, internukleozomální kondenzace chromatinu a fragmentace DNA (Červinka, 1998; Wyllie et al., 1998). Apoptóza je aktivní proces, který vyžaduje energii ve formě ATP. Za fyziologických podmínek slouží apoptóza k odstranění starých a poškozených buněk a brání malignímu zvrhnutí. Apoptóza je nezbytná v procesu vývoje, růstu a diferenciaci jater a dále se uplatňuje při optimálním udržení počtu buněk v játrech (např. při regeneraci). Pokud se však vlivem reaktivních metabolitů vymkne kontrole, může způsobit závažné poškození. Masivní apoptóza vyvolává sekundární nekrózu (Kanzler a Galle, 2000; Malhi et al., 2006). Apoptóza může být buď přímo zpuštěna intracelulárním stresem, nebo navázáním ligandu (Fas, TNF- α) na příslušný receptor asociovaný s adaptérovým proteinem se smrtící doménou (ADD). Následně dochází k permeabilizaci mitochondrií a k uvolnění proapoptotických proteinů (cytochróm c, Smac, IAF, některé prokaspázy). Apoptóza závisí na kaskádové aktivaci iniciačních a efektorových kaspáz. Poslední efektorová kaspáza je kaspáza-3 (Kanzler a Galle, 2000; Kaplowitz, 2002; Grattagliano et al., 2002).

Nekróza je následkem hluboké ztráty mitochondriálních funkcí spojených s deplecí ATP. Nastává ztráta iontové homeostázy a zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} , což vede k aktivaci nesespecifických hydroláz. Dochází k aktivaci anaerobní glykolýzy a k acidóze. Je porušena aktivita Na^+/K^+ ATPázy a Na^+ se akumuluje uvnitř buňky. Následná osmotická zátěž spolu se zvýšenou aktivitou hydrolytických enzymů vyústí v prasknutí cytoplazmatické membrány (Grattagliano et al., 2002).



Obr. 6: Nekróza a apoptóza (Wyllie et al., 1998)

V obou typech buněčné smrti se významnou měrou uplatňují mitochondrie.

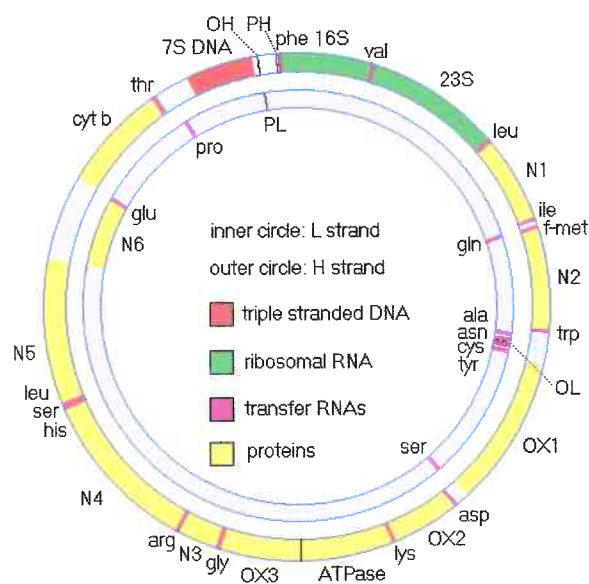
3.4 Mitochondrie a jejich role při toxickém poškození jater

Mitochondrie jsou subcelulární orgány endosymbiotického původu. Kromě syntézy ATP se podílejí na termoregulaci, udržování redoxního potenciálu, modulaci Ca^{2+} signálu, jsou zdrojem reaktivních forem kyslíku, podílejí se na buněčné signalizaci a v neposlední řadě spouští a regulují buněčnou smrt. Probíhá zde β -oxidace mastných kyselin a syntéza řady látek. V jaterních mitochondriích je syntetizována urea, takže plní i roli detoxikační. Porušení mitochondriálního metabolismu není jen znakem dědičných mitochondriálních nemocí, ale je spojeno s různými degenerativními chorobami a stárnutím.

Játra patří mezi orgány s vysokými energetickými nároky a obsahují velký počet mitochondrií (Malhi et al., 2006). Mitochondrie jsou velmi citlivé k účinku některých toxinů, zejména k oxidantům, elektrofilním látkám, lipofilním kationtům a slabým kyselinám (Wallace et al., 1997). Mitochondrie tedy hrají velmi významnou roli v mechanismu toxického poškození jater.

3.4.1 Struktura mitochondrií

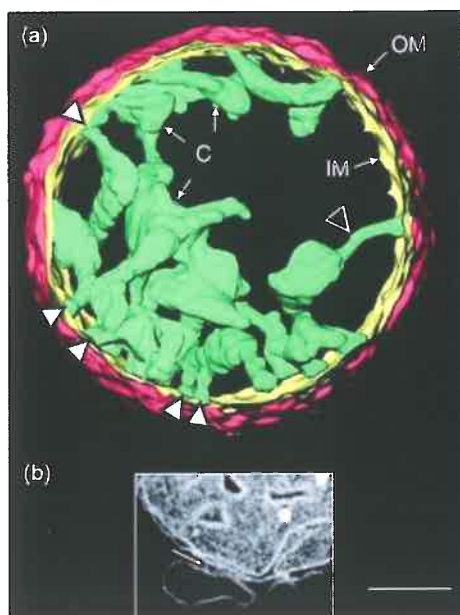
Endosymbiotický původ mitochondrií se odráží v jejich struktuře. Jsou obaleny dvojitou membránou, mají vlastní DNA (mtDNA) a proteosyntetický aparát. Savčí mtDNA je cirkulární dvouřetězcová molekula kódující 13 polypeptidů, 22 tRNA a 2 rRNA (obr. 7). Všechny 13 polypeptidů tvoří podjednotky enzymových komplexů dýchacího řetězce. Ostatní mitochondriální proteiny jsou kódovány jadernou DNA (nDNA), syntetizovány v cytozolu a importovány do mitochondrií (Lee and Wei, 2005; Scheffler, 2001; Wallace, 1999; Ballard a Whithlock, 2004). Počet kopií mtDNA závisí na typu buňky a v průměru se pohybuje v rozmezí 10^3 - 10^4 . Jedna mitochondrie má přibližně 2-10 kopií mtDNA (Lee and Wei, 2005). Mitochondriální DNA se dědí po matce (Wallace, 1999) a vykazuje několikanásobně vyšší stupeň mutací než nDNA.



Obr. 7: Mitochondriální DNA

Mitochondrie jsou velmi dynamické organely se složitou stavbou vnitřní membrány. Vnější membrána (OM) odděluje organelu od cytoplazmy, zatímco vnitřní membrána (IM) se vchlipuje do středu mitochondrií a odděluje vnitřní mitochondriální prostor – matrix od mezimembránového prostoru. Membrány se liší svou strukturou, chemickým složením a vlastnostmi. Vnější membrána je propustná pro ionty a menší molekuly a není propustná pro bílkoviny. Vnitřní membránou proniká jen O_2 , CO_2 a lipofilní látky (Scheffler, 2001). Podobně jako bakteriální membrány obsahuje IM poměrně vysokou koncentraci kardiolipinu a nižší obsah cholesterolu (Scheffler, 1999; Skulachev, 1999). V obou membránách se

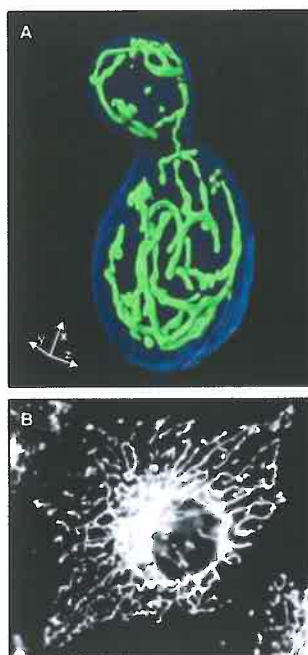
nachází řada transportních komplexů. Vývoj nových technik, zejména skenovací elektronové mikroskopie s vysokým rozlišením a elektronové tomografie, vedl k přehodnocení názoru na vnitřní strukturu mitochondrií. Zjistilo se, že struktura je podstatně složitější. Kristy tvoří cisterny nebo váčky, které jsou pomocí úzkých, různě dlouhých tubulárních struktur (*cristae junction, pediculi cristae*) spojeny s částí vnitřní membrány procházející podél vnější membrány (vnitřní vazebná membrána). Některé kristy si uchovávají tubulární tvar po celé své délce, jiné vzájemně splývají a vytvářejí různě složité struktury (Frey a Mannella, 2000; Perkins a Frey, 2000). Počet a morfologie krist závisí na typu buňky a na jejím aktuálním stavu. Vnitřní membrána je velmi dynamická struktura schopná měnit tvar v závislosti na osmotických nebo metabolických podmínkách. Otázkou zůstává, zda úzké tubulární spojení krist s vnitřní vazebnou membránou tvoří bariéru volné difuzi iontů mezi intrakristálním a mezimembránovým prostorem. Pokud je difuze limitována, mohou vznikat lokální gradienty iontů, což by znamenalo přehodnocení současných představ o regulaci mitochondriálních enzymových reakcí. Počet, tvar a objem kristálních spojení a krist může regulovat stupeň syntézy ATP a ovlivnit difuzi cytochromu c mezi kristami a mezimembránovým prostorem. Spoje mohou tvořit bariéru pro difuzi membránových proteinů, což by vedlo k rozdílnému složení proteinů ve vnitřní vazebné membráně a v kristální membráně (Gilkerson et al., 2003; Frey a Mannella, 2000).



Obr. 8: Struktura mitochondrií (Frey a Mannella, 2000)

Počet mitochondrií se velmi liší v závislosti na typu buňky, fyziologických podmínkách a patologických stavech. Mitochondrie nejsou v cytozolu umístěny náhodně, ale jsou udržovány v jistých pozicích. Tyto pozice nejsou statické a mitochondrie mohou být přenášeny na místa potřeby (Dimmer et al., 2002; Skulachev, 2001). Mitochondrie v buňce existují ve dvou základních formách. Buď jako malé izolované sférické částice, nebo vytvářejí elektricky vodivou vysoce dynamickou mitochondriální síť. Mitochondrie v síti konstantně prodělávají fúzi a dělení a jsou schopny přenosu energie ve formě elektrochemického membránového potenciálu ($\Delta\mu\text{H}^+$, MMP) (Skulachev, 2001; Zorov et al., 2000). Mitochondrie na periferii se pravděpodobně aktivněji účastní respirace, vytvářejí $\Delta\mu\text{H}^+$, zatím co mitochondrie v centru $\Delta\mu\text{H}^+$ spíše konzumují a syntetizují ATP. To usnadňuje dodávku energie do centra buňky a také snižuje koncentraci O_2 v blízkosti jádra. Oblast neaktivnější respirace a produkce ROS je tak lokalizována na periferii (Skulachev, 2001). Vodivé spojení může být reverzibilně inaktivováno. Pokud část sítě začne ve zvýšené míře produkovat ROS může dojít k rozložení sítě a odstranění poškozených mitochondrií procesem mitoptózy (Skulachev, 2004).

Mitochondrie a mitochondriální síť jsou v úzkém kontaktu s ostatními buněčnými organelami, zejména s endoplazmatickým retikulem a cytoskeletem (Scheffler, 1999; Frey a Mannella, 2000). Mitochondrie, které se v cytozolu vyskytují ve formě izolovaných částic zřejmě představují transportní formu organel. Mitochondrie se pohybují pomocí molekulárních motorů podél mikrotubulů či podél svazku aktinových vláken (Rube a Blied, 2004; Skulachev, 1999).



Obr. 9: Mitochondriální síť (Weber a Senior, 2003; Egner et al., 2002)

3.4.2 Funkce mitochondrií

3.4.2.1 *Dýchací řetězec a oxidační fosforylace*

Mitochondrie produkují 90 – 95 % ATP procesem oxidační fosforylace. Enzymové komplexy dýchacího řetězce (RC) a oxidační fosforylace (OXPHOS) jsou lokalizovány ve vnitřní mitochondriální membráně. RC se skládá ze čtyř enzymových lipoproteinových komplexů, které obsahují 4 – 46 peptidových podjednotek. Podjednotky jsou kódovány částečně mtDNA a částečně nDNA. Výjimku tvoří komplex II, jehož 4 podjednotky jsou kódovány výhradně nDNA. Sestavení podjednotek do komplexu je velmi složitý děj, regulovaný a zprostředkovaný řadou dalších genů a jejich produktů. Komplexy tvoří soustavu oxidoredukčních článků s postupně se zvyšujícím redoxním potenciálem. NADH koenzym-Q oxidoreduktáza (komplex I) přijímá vodíky od NADH-dependentních dehydrogenáz a předává je na koenzym Q. Redukovaný koenzym Q přenáší vodíky na komplex III (bc₁-komplex). Komplexu III předává elektrony cytochrómu c a ten je přenáší na komplex IV (cytochróm c oxidáza - COX). COX reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku vody. Koenzym Q přebírá vodíky i od mitochondriálních dehydrogenáz flavoproteinového typu, mezi něž patří komplex II (sukcinát-koenzym Q-oxidoreduktáza), glycerofosfátdehydrogenáza a ETF-oxidoreduktáza. 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

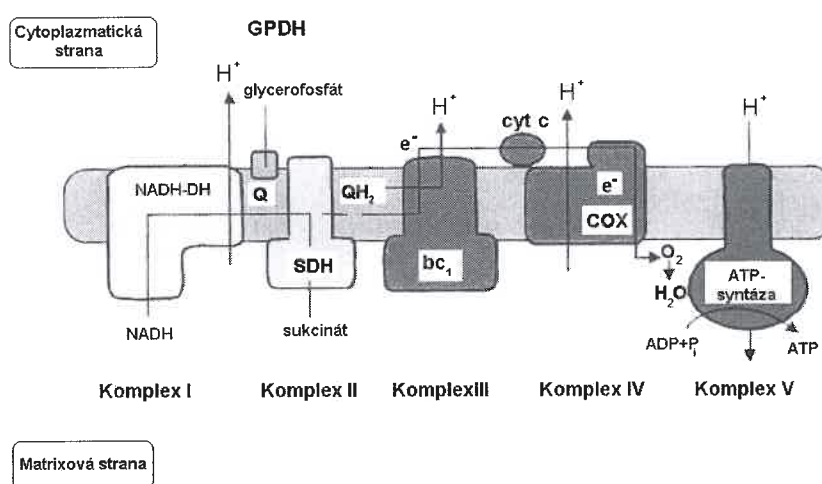
elektrochemický potenciál $\Delta\mu\text{H}^+$ ($\Delta\mu\text{H}^+$ obsahuje elektrickou $\Delta\Psi$ a chemickou ΔpH složku). Tento potenciál pak využívá ATP-syntáza (komplex V) pro tvorbu ATP. Funkce RC je tak spřažena s oxidační fosforylací. Tuto chemiosmotickou teorii formuloval Peter Mitchell v roce 1961. ATP-syntáza se skládá z F_0 membránové domény a s F_1 katalytické části. H^+ pronikají F_0 kanálem ATP-syntázy zpět do matrix a vyvolávají rotaci jeho podjednotek. Rotace je přenesena do F_1 katalytické části, kde je využita k syntéze ATP z ADP a anorganického fosfátu (Pi) (Weber a Senior, 2003; Senior et al., 2002). Za jistých okolností může F_1 část katalyzovat hydrolýzu ATP a vyvolávat opačnou rotaci podjednotek F_0 . Enzym pak funguje jako protonová pumpa. ATP syntáza je tedy komplexem dvou rotačních motorů – F_1 motoru aktivovaného hydrolýzou ATP a F_0 motoru aktivovaného $\Delta\mu\text{H}^+$ (Oster a Wang, 2003). Většina ATP je z mitochondrií exportována pomocí ATP/ADP antiportu (ANT – adeninnukleotidový translokátor). $\Delta\mu\text{H}^+$ netvoří jen hnací sílu pro syntézu ATP, ale také řídí transport iontů, substrátů a proteinů. NAD(P)⁺ transhydrogenázy ve vnitřní mitochondriální membráně využívají $\Delta\mu\text{H}^+$ k přenosu vodíku z NADH na NADP⁺ a podílejí se na udržování redoxního stavu buňky (Lemasters a Nieminen, 2001).

Krystalická struktura je dnes známa u všech komplexů, s výjimkou komplexu I. Průchod elektronů v RC je poměrně dobře popsán. Mechanismus pumpování protonů a poměr přenesených H^+ na jeden e^- je stále předmětem debat (Scheffler, 2001). Ve stěně aerobních bakterií jsou lokalizovány respirační enzymové komplexy podobné jako u savců. Kromě komplexu II jsou savčí komplexy složeny z více podjednotek. Větší množství podjednotek mají tedy jen protonové pumpy. Některé přídatné proteiny jsou zřejmě nezbytné pro katalytickou funkci enzymu, jiné se mohou účastnit složité komplexní regulace respirace a oxidační fosforylace (Kadenbach, 2003). Aktivita COX je alostericky ovlivňována ATP a ADP (Frank a Kadenbach, 1996). Podjednotky COX se liší v různých tkáních. Aktivita COX tak může být regulována v různých tkáních rozdílně. Podjednotky komplexů RC mohou být také fosforylovány pomocí specifických kináz (Kadenbach, 2003).

Stupeň respirace závisí na $\Delta\mu\text{H}^+$. Při vysokém $\Delta\mu\text{H}^+$ respirační komplexy nemohou pumpovat H^+ a respirace je inhibovaná. ADP aktivuje ATP-syntázu, což vede k poklesu $\Delta\mu\text{H}^+$ a ke stimulaci respirace (první respirační kontrola). $\Delta\mu\text{H}^+$ může být také snížen díky rozpřažení OXPHOS. H^+ tak obchází ATP-syntázu, a respirace se stává částečně nezávislou na syntéze ATP. Stupeň spřažení dýchacího řetězce a fosforylace může být hodnocen pomocí měření spotřeby kyslíku. Jestliže jsou mitochondrie inkubovány v médiu, které obsahuje respirační substráty a fosfát, přídavek ADP aktivuje respiraci. Respirace v přítomnosti ADP

se označuje jako stav 3 a bez přítomnosti ADP stav 4. Poměr respirace ve stavu 3 a 4 se nazývá index respirační kontroly (RCI) a informuje nás o stupni spřažení. Typický RCI se pohybuje v rozmezí 3-10 a liší se v závislosti na typu buňky/mitochondrie, substrátu a kvalitě izolace.

Respirační komplexy pravděpodobně nejsou v membráně umístěny náhodně a nezávisle na sobě, ale jsou uspořádány do supramolekulárních komplexů – respirozomů (Schagger, 2002).



Obr. 10: Dýchací řetězec

3.4.2.2 Termogeneze

Teplokrevní živočichové mají kromě třesové termogeneze ještě další mechanismy, které se podílejí na udržování tělesné teploty. Jedním z nich je zvýšení propustnosti vnitřní mitochondriální membrány pro H⁺. Energie uvolněná během respirace je tak přímo přeměněna na teplo. Zvýšení propustnosti pro H⁺ je zprostředkováno mastnými kyselinami (MK) a aniontovými transportéry - ANT, glutamát/malát antiportem, *uncoupling proteiny* (UCP) (Skulachev, 1999). Aniontový transportér usnadňuje přenos aniontu MK z matrixové strany do mezimembránového prostoru. Na vnější straně vnitřní membrány anion MK naváže proton a membránou difunduje zpět do matrix, kde dochází k deprotonaci (Skulachev, 1999; Kowaltowski, 2000). U hibernujících zvířat, novorozenců a jedinců adaptovaných na chlad adrenergní stimulace zvyšuje průtok krve v hnědé tukové tkáni. Mitochondrie hnědé tkáně mají omezený stupeň syntézy ATP, nižší $\Delta\mu\text{H}^+$ a velmi aktivní respiraci. Ve vnitřní mitochondriální membráně obsahují velké množství speciálního aniontového transportéru UCP-1. UCP-1 byl dlouho dobu považován za unikátní protein specifický pro hnědou tukovou tkáň. V poslední době však byly objeveny další UCP. UCP-2 se vyskytuje téměř ve všech tkáních, UCP-3 je specifický pro kosterní svalstvo a UCP-4 a UCP-5 byly objeveny

v mozku. UCP-2 – UCP-5 se ve vnitřní membráně vyskytují v daleko menším množství než UCP-1 a výrazněji se na termoregulaci nepodílejí. Jejich funkce je pravděpodobně spojena s antioxidační ochranou a s regulací tělesné hmotnosti (Kowaltowski, 2000; Ježek, 2002).

3.4.2.3 Mitochondrie a vápník

Za klidových podmínek je mitochondriální koncentrace Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ podobná $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ (Hajnoczky et al., 2003). Mitochondrie tedy nejsou primární organelou regulující $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$, nicméně se velmi výrazně podílejí na modulaci Ca^{2+} signálu (Kowaltowski, 2000; Hajnoczky et al., 2003).

Ca^{2+} je důležitá signální molekula. Různé hormony a některé další stimuly zvyšují $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ vyplavením Ca^{2+} z ER a zvýšením propustnosti cytoplazmatické membrány. Zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ je časově a prostorově omezené a šíří se v buňce v podobě vlny. V mnoha typech buněk se Ca^{2+} signály projevují jako série přechodných oscilací, jejichž frekvence závisí na intenzitě stimulu. Zvýšená $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ aktivuje specifické proteiny vázající kalcium a ty následně aktivují mnoho proteinkináz.

Mitochondrie mají ve své vnitřní membráně transportní systém pro Ca^{2+} a mohou je velmi aktivně vychytávat. Ca^{2+} vstupují do mitochondrií prostřednictvím uniportu v závislosti na $\Delta\mu\text{H}^+$. Afinita tohoto uniportu je za nízké $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ malá a pro svou aktivaci vyžaduje $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ minimálně 200-300 nmol/l (Kowaltowski, 2000). Během vyplavení Ca^{2+} z ER a vstupu z extracelulárního prostředí se $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ v závislosti na typu buňky zvyšuje na hodnotu okolo 1 $\mu\text{mol/l}$ a dochází k aktivaci uniportu. Mitochondrie jsou v úzkém kontaktu s ER, a mohou tak rychle reagovat na lokální změnu $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ (Kowaltowski, 2000; Lemasters a Nieminen, 2001). Na základě rozdílné kinetiky byl identifikován ještě jeden rychlý typ transportéru, tzv. rapid mode (RaM). Pro RaM je charakteristická vyšší afinita pro Ca^{2+} za nižší $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ a velmi rychlá absorpce Ca^{2+} na začátku pulsu. Při vyšší koncentraci $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ je inaktivován. Neví se, zda jde o jiný transportér nebo zda se jedná o rozdílnou konformaci uniportu (Kowaltowski, 2000; Hajnoczky et al., 2003; Gunter et al., 2004).

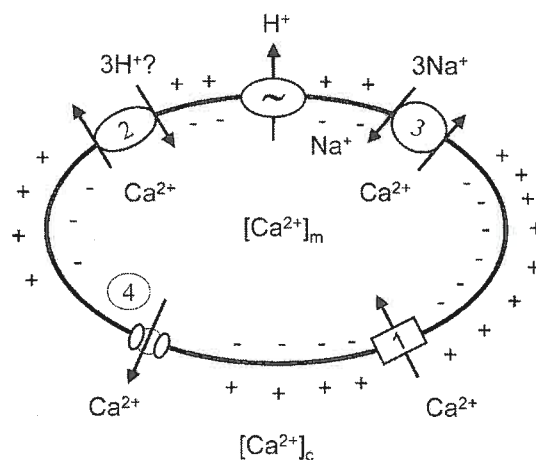
Celková kapacita akumulace Ca^{2+} mitochondriemi může být velmi vysoká, pokud je s Ca^{2+} akumulován i anorganický fosfát. Mitochondrie mají dva transportní systémy umožňující vypuzení Ca^{2+} z matrix do cytozolu proti elektrochemickému gradientu, $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ a $\text{Ca}^{2+}/x\text{Na}^+$ ($x = 2 - 3$) antiporty závislé na ATP (Ballard a Whitlock, 2004, Kowaltowski, 2000, Hajnoczky et al., 2003; Gunter et al., 2004). Maximální aktivita uniportu je asi 10x vyšší než aktivita obou antiportů a Na^+ závislý eflux je za vysoké $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ inhibován

(Hajnoczky et al., 2003, Gunter et al., 2004). Mitochondrie tedy mohou vycytávat poměrně velké množství Ca^{2+} .

V mitochondriích zvýšená $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ stimuluje pyruvátdehydrogenázu, izocitrátdehydrogenázu a α -ketoglutarátdehydrogenázu, což vede k aktivaci Krebsova cyklu a zvýšené produkci NADH. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ rovněž stimuluje ATP-syntázu a ANT. Komplexně tedy zvyšuje mitochondriální syntézu ATP (Kowaltowski, 2000; Hajnoczky et al., 2003; Gunter et al., 2004).

Mitochondrie moduluji Ca^{2+} signál snížením Ca^{2+} pulsu a prodloužením jeho účinku. Jsou také schopny reverzibilně vypudit větší množství Ca^{2+} , a ovlivnit tak frekvenci pulsů. Vysoká $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ následována dalším zvýšením $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ má za následek rychlé uvolnění Ca^{2+} do cytozolu. Tento fenomén se nazývá „ Ca^{2+} induced- Ca^{2+} release“ a předpokládá se, že Ca^{2+} je z matrix vypuzeno díky otevření nesespecifických pórů ve vnitřní mitochondriální membráně (PTP – *permeability transition pore*) (Jouaville et al., 1998). Otevření PTP je do jisté míry reverzibilní v závislosti na energetickém stavu buňky a schopnosti odstranit Ca^{2+} z cytoplazmy (Lemasters, 2001; Gunter et al., 2004). Dlouhodobé otevření póru je spojeno s uvolněním proapoptických faktorů a ztrátou mitochondriálních funkcí.

Otázkou zůstává, zda mitochondrie spojené v mitochondriální síť jsou schopny přenosu Ca^{2+} na větší vzdálenost, podobně jako přenosu elektrochemického potenciálu (Collins et al., 2002; Skulachev, 1999). Modulace Ca^{2+} signálu mitochondriemi je zřejmě způsob komunikace mitochondrie se zbytkem buňky. Zvýšená $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ má za následek také zvýšenou produkci ROS (Jouaville et al., 1998).



Obr. 11: Mitochondriální transportní systém Ca^{2+} (Rizzuto et al., 2000)

3.4.2.4 Mitochondrie a ROS

Buňky produkují ROS různými enzymovými i neenzymovými reakcemi. Mitochondrie jsou považovány za jednoho z největších zdrojů ROS v buňce. Uvádí se, že 1-2 % O_2 konzumovaného mitochondriemi podléhá jednoelektronové redukci za vzniku superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), prekursoru ostatních ROS (Boveris a Chance, 1973). Všechny enzymové komplexy dýchacího řetězce kromě terminální COX jsou termodynamicky schopné produkovat $O_2^{\cdot-}$ (Turrens, 2003). Relativní příspěvek jednotlivých komplexů k celkové produkci $O_2^{\cdot-}$ se v různých orgánech liší. Produkce ROS je komplexně regulovaná elektrochemickým membránovým potenciálem a závisí na aktivitě respirace. (Starkov a Fiskum, 2003; Nohl et al., 2005). Za nejvýznamnější producenty 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 (Han et al., 2003; Brookes, 2005). $O_2^{\cdot-}$ vznikající na matrixové straně neproniká membránou a zůstává v matrix. $O_2^{\cdot-}$ produkovaný na vnější straně se může do cytozolu dostat přes VDAC (*voltage dependent anion channel*) (Han et al., 2003). $O_2^{\cdot-}$ je následně konvertován na H_2O_2 nebo může reagovat s NO za vzniku peroxodisitanu ($ONOO^{\cdot-}$). V přítomnosti redukováných přechodných kovů vzniká z H_2O_2 hydroxylový radikál OH (Fentonova reakce), jedno z nejsilnějších oxidačních činidel.

Mitochondrie jsou nejenom zdrojem ROS, ale také cílem jejich toxického účinku. Jejich hladina musí být udržována na nízké úrovni a je regulována pomocí antioxidantních systémů.

Za vysokého membránového potenciálu je respirace inhibována, prodlužuje se životnost redukováných elektronových přenašečů a roste produkce ROS. Mírné rozpřažení OXPHOS stimuluje respiraci a snižuje produkci ROS. Toto rozpřažení je zřejmě zprostředkováno mastnými kyselinami (MK) ve spolupráci s různými transportními komplexy (ANT, glutamát/malát antiportem, UCP) (Brookes et al., 2004; Skulachev, 2001). Mírné rozpřažení je pravděpodobně první obrannou linií před vznikem ROS. $O_2^{\cdot-}$ může být v mezimembránovém prostoru oxidován solubilním cytochrómem c, který je následně reoxidován COX. Elektron se tak vrací zpět do RC (Skulachev, 2001). Mitochondriální Mn-superoxiddismutáza (MnSOD) rychle konvertuje $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 . V cytozolu a v menší míře i v mezimembránovém prostoru se nachází CuZnSOD. H_2O_2 může narozdíl od $O_2^{\cdot-}$ pronikat membránami. V mitochondriích je H_2O_2 konvertován pomocí glutathionperoxidázy (GPx) na H_2O . Kataláza se zde příliš neuplatňuje. Oxidovaný glutathion je regenerován glutathionreduktázou (GR) za současné oxidace NADPH. Mitochondriální antioxidantní

system dále zahrnuje tokoferol, ubichinol, askorbát, karotenoidy atd. (Skulachev, 1999; 2001, Raha a Robinson, 2001).

Většina pokusů, které sledovaly mitochondriální produkci ROS, byla prováděna na izolovaných mitochondriích. Produkce H_2O_2 *in vivo* je pravděpodobně nižší. V současné době probíhají diskuze, zda vůbec jsou mitochondrie za fyziologických podmínek kontinuálním zdrojem ROS (St-Pierre et al., 2002; Nohl et al., 2005). Produkce ROS se zvyšuje za různých patologických stavů a může vést k buněčnému poškození. Mitochondriální DNA se vyskytuje v blízkosti zdroje ROS a je méně chráněna než nDNA. Kumulace poškození mtDNA s věkem vede ke snížení mitochondriálních funkcí, masivnější produkci ROS a tím se podílí na procesu stárnutí (Perez-Campo et al., 1998; Szibor a Holtz, 2003).

Jak již bylo řečeno výše, ROS nejsou jen toxické vedlejší produkty metabolismu, ale mají i fyziologickou funkci. Stupeň produkce ROS se zvyšuje, když je zpomalen tok elektronů v RC. K tomu dochází za klidových podmínek, kdy klesá spotřeba ATP, nebo za stresových podmínek, které vedou k poškození komplexů respiračního řetězce (Nulton-Persson a Szweda, 2001). V mitochondriích byla nalezena mitochondriální NOsyntáza (Giulivi et al., 1998, Bates et al., 1995). NO se může reverzibilně vázat na COX a zvyšovat produkci ROS (Brookes et al., 2002, Brown, 1995). Některé ligandy jsou po navázání na receptor rovněž schopny specificky zvýšit mitochondriální produkci ROS. Hladina ROS je také závislá na antioxidačním systému. Mitochondrie jsou schopny měnit koncentraci H_2O_2 v odpovědi na změny metabolismu a reagovat tak na různé stimuly (Nulton-Persson a Szweda, 2001). ROS jsou důležité signální molekuly. Změna jejich produkce vede ke změně redoxního stavu a k aktivaci transkripčních faktorů jako NF- κ B a AP1 a k expresi určitých genů (Brookes et al., 2002). Následkem může být indukce antioxidačního systému, proliferace mitochondrií, oprava poškozených proteinů a mtDNA (Barbouti et al., 2002; Kim et al., 2005; Lee a Wei, 2005). ROS mohou reverzibilně modifikovat některé proteiny, a měnit tak jejich enzymovou aktivitu (Orrenius, 2004). Delší porušení redoxní rovnováhy vede k poškození a smrti buňky. ROS a Ca^{2+} jsou pravděpodobně prostředky komunikace mezi mitochondriemi, jádrem a zbytkem buňky (Lee a Wei, 2005). Zdá se, že tyto dva signály jsou velmi propojené (Brookes et al., 2004; Gordeeva et al., 2003).

3.4.2.5 *Mitochondrie a buněčná smrt*

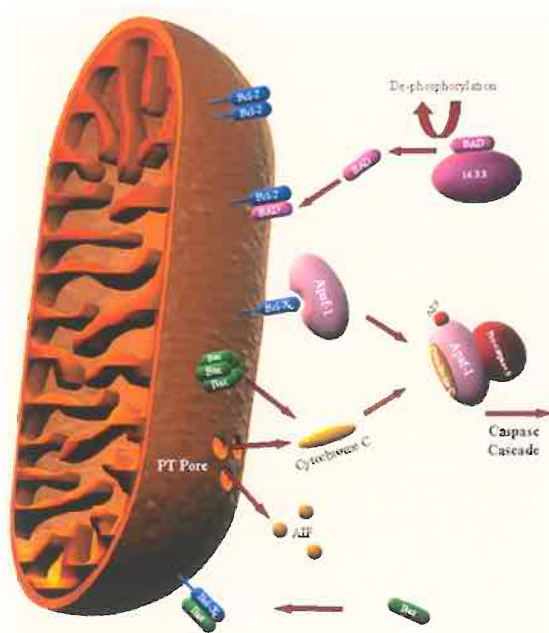
Role mitochondrií v procesu buněčné smrti je velmi komplexní. Vysoká intramitochondriální koncentrace Ca^{2+} , Pi, ROS a dalších látek má za následek nespecifické zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány pro ionty a substráty do 1,5 kDa

(Lemasters, 1999; Orrenius, 2004). Zvýšená permeabilita je způsobena otevřením PTP. PTP je definován na základě farmakologických a biochemických vlastností a jeho přesné molekulární složení není známo. Součástí póru je zřejmě ANT vnitřní membrány a VDAC vnější membrány. Řada dalších proteinů, například cyklofilin D, hexokináza, Bax, Bid a kreatinkináza, může být buď součástí komplexu, nebo ovlivňovat jeho funkci a propustnost. Pór pravděpodobně spojuje obě membrány a vyskytuje se v kontaktních místech. Součástí póru mohou být i komplexy importu proteinů (Lemasters a Nieminen, 2001; Zoratti et al., 2005). Důležitou roli zde hraje také kardiolipin (Petrosillo et al., 2004). Je třeba vzít v úvahu, že zřejmě existují PTP různého složení, které mohou mít za různých podmínek rozdílnou vodivost. Rozdílné stimuly v různých tkáních mohou rozdílně modifikovat stejný protein (Zoratti et al., 2005). 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 to být také signál k odstranění poškozených mitochondrií procesem zvaným mitoptóza (Lyamzaev et al., 2004; Skulachev et al., 2004). Následkem delšího otevření póru je kolaps membránového potenciálu a porušení osmotické rovnováhy. 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, 1999; Skulachev, 1999). Výsledkem může být deplece ATP, iontová dysbalance, aktivace degradačních enzymů a prasknutí buňky. Otevření pórů však souvisí i s apoptózou. Při prasknutí vnější mitochondriální membrány jsou z mitochondrií uvolněny různé proteiny včetně cytochrómu c, AIF, Smac/Diablo a některých prokaspáz. Cytochróm c se v cytoplazmě váže s APAF1 a dATP za vniku apoptozómu, ten následně aktivuje kaspázu 9. Některé proteiny jako AIF procházejí do jádra, kde aktivují endonukleázy (Lemasters, 1999; Orrenius, 2004; Honda et al., 2004; Bernardi et al., 1999). Nejznámějšími induktory PTP jsou Ca^{2+} a ROS. Ca^{2+} se v mitochondriích váže na proteinové komplexy a na kardiolipin (Lemasters a Nieminen, 2001; Petrosillo et al., 2004). Zvýšení hladiny Ca^{2+} 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 cytochrómu c z vazby na tento fosfolipid (Petrosillo et al., 2004). 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; Iverson a Orrenius, 2003; Kanno et al., 2004).

Apoptózu spouští také navázání některých ligandů na specifické receptory v plazmatické membráně (FAS, Apo-1, CD95, TNF-R atd.). Po navázání ligandu je aktivována kaspáza 8 a do mitochondriální membrány jsou integrovány proapoptické členy Bcl-2 rodiny (Bid, Bax). TNF zvyšuje produkci ROS. V některých typech buněk apoptóza nevyžaduje účast mitochondrií.

V současnosti se vedou spory, zda je otevření porů, kolaps membránového potenciálu a prasknutí vnější membrány nezbytnou podmínkou uvolnění cytochromu c do cytozolu (Scheffler, 1999, Petrosillo et al., 2004). To zda otevření PTP předchází nebo následuje uvolnění cytochromu c, může záviset na intenzitě stimulu a citlivosti tkáně k otevření PTP (Andreyev a Fiskum, 1999). Mechanismus uvolnění cytochromu c bez prasknutí vnější membrány není jasný. Předpokládá se účast proapoptických členů Bcl-2 rodiny a VDAC. Vzhledem k tubulárnímu uspořádání krist je možné, že nabobtnání matrix a narovnání krist je podmínkou masivnějšího uvolnění cytochromu c do cytozolu (Petrosillo et al., 2004).

PTP se tedy uplatňuje jak při nekróze, tak apoptóze. Jaký faktor rozhoduje o tom, který typ buněčné smrti převládne? Tato otázka není zcela vyřešena, ale zdá se, že limitujícím faktorem je dostupnost ATP. Pokud poškození mitochondrií není masivní, nebo buňka dokáže část syntézy ATP nahradit glykolýzou, převládá apoptóza (Tatsumi et al., 2003; Kirveliēne et al., 2003).



Obr. 12: Mitochondrie a buněčná smrt

3.5 Ochranné mechanismy jater a jaterní regenerace

V hepatocytech naštěstí 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, ve druhé antioxidanty, které degradují již vytvořené ROS a RNS a ve třetí mechanismy reparace a regenerace poškozené tkáně.

3.5.1 Redukce tvorby ROS

Vzhledem ke klíčové roli volných iontů železa či jiného přechodného kovu při vzniku volných radikálů je vysoká hladina volných přechodných kovů nežádoucí. Proto je železo vázané ve formě železitých oxyhydroxy fosfátových komplexů na feritin (de Silva et al., 1993). Podobně je skladována i měď. Tím je zabráněno jejich účasti ve Fentonově reakci (Welch et al., 2002).

Významným zdrojem ROS jsou mitochondrie a dýchací řetězec. Mírné rozpřažení (*mild uncoupling*) dýchacího řetězce a oxidační fosforylace je první obranou linií snižující tvorbu ROS (Skulachev et al., 1999).

Při toxických poškozeních jater bývá často hlavním zdrojem volných radikálů bioaktivace xenobiotika. Zvláštním typem negativní zpětné regulace tvorby reaktivních intermediátů je jejich vazba na enzymy, kterými jsou tvořeny. Cytochróm P-450 může být inaktivován právě vytvořenými reaktivními intermediáty. Ty se kovalentně vážou buď na apoprotein cytochrómu P-450, nebo na dusík hemové skupiny, vytvářejí komplex se železem hemu, nebo mohou indukovat kovalentní vazbu hemu na apoprotein CYPu (Červinková, 1999; Horák, 2000; Halpert et al., 1983; Franklin, 1977; Davis et al., 1986).

Jiným způsobem ovlivnění tvorby ROS je regulace exprese enzymů (např. inducibilní NOsyntházy), které se podílejí na jejich tvorbě.

3.5.2 Omezení účinku již vytvořených ROS

Do této skupiny ochranných mechanismů patří antioxidační enzymy a neenzymové látky. Nejdůležitějšími antioxidačními enzymy jsou superoxiddismutáza (SOD), glutathion peroxidáza a kataláza. Neenzymové antioxidanty zahrnují vitamín C, vitamín E, karotenoidy, thiolové antioxidanty (glutathion, thioredoxin, lipoová 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 další a obnovovat jejich funkci.

Superoxiddizmutáza jak již bylo zmíněno výše katalyzuje dismutaci dvou superoxidů na molekulární kyslík a méně reaktivní peroxid vodíku ($2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). Existuje v několika izoformách, které se liší kovem v aktivním centru, aminokyselinovou sekvencí, počtem podjednotek, atd. U lidí se vyskytují tři izoformy – cytozolová (CuZnSOD), mitochondriální (MnSOD) a extracelulární (EC-SOD). Peroxid vodíku může být dismutován na vodu a molekulární kyslík ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) pomocí katalázy nebo glutathionperoxidázy.

Kátaláza (CAT) je peroximální enzym a je velmi efektivním katalyzátorem této reakce.

Enzymy s glutathionperoxidázovou aktivitou můžeme dělit na dvě základní skupiny. Do první patří na selenu nezávislé **glutathion-S-transferázy**. Jedná se o skupinu enzymů, které se podílejí na konjugaci elektrofilních látek s glutathionem. Mezi látky jejichž konjugaci katalyzují patří řada kancerogenů. Také se podílejí na redukci peroxidů a nenasycených aldehydů, které vznikají při lipoperoxidaci. Druhou skupin tvoří na selenu závislé **glutathionperoxidázy** (GPx). U lidí byly identifikovány 4 různé GPx, které dokáží přeměnit toxické produkty lipoperoxidace na alkoholy za současné oxidace redukováného glutathionu (GSH) (Valko et al., 2006, Roušar et al., 2005).

K velice důležitým a silným endogenním antioxidantům působících ve vodném prostředí patří **kyselina askorbová**. Je to také hlavní antioxidační partner vitamínu E a karotenoidů. Vitamín C regeneruje α -tokoferol z tokoferolového radikálu v membránách a lipoproteinech a tak se účastní ochrany membrán před oxidačním stresem. V poslední době se objevily studie naznačující, že za jistých podmínek může vitamín C naopak zvyšovat oxidační poškození. Za vysokých koncentrací kyselina askorbová redukuje železo v molekule feritinu a uvolňuje jej z vazby (Smith a Aust, 1997; Valko et al., 2006). Vitamín C může také ovlivňovat expresi některých genů (Valko et al., 2006).

Významným antioxidantem je rovněž **vitamín E**, tedy skupina izomerů tokoferolu a tokotrienolu. U lidí je z nich nejdůležitější α -tokoferol. Tyto sloučeniny jsou považovány za nejučinnější antioxidanty v ochraně proti oxidačnímu poškození lipidových membrán. Účinkem α -tokoferolu vznikají z alkylperoxylových radikálů organické hydroperoxydy, tím se ukončuje řetězová reakce lipoperoxidace, při které by byly další polynenasycené mastné kyseliny napadány těmito reaktivními sloučeninami (Valko et al., 2006).

Karotenoidy ve své struktuře obsahují systém konjugovaných dvojných vazeb, čímž je dána jejich antioxidační aktivita. Karotenoidy však mohou mít i prooxidační účinky.

Klíčovými faktory ovlivňující aktivitu karotenoidů jsou parciální tlak kyslíku (pO_2) a jejich koncentrace. Při vysokém pO_2 reagují s O_2 za vzniku karotenoid-peroxylového radikálu. Karotenoidy také ovlivňují transkripci některých genů. U zdravých buněk snižují proliferaci, stimulují diferenciaci a mají antiapoptický účinek. U některých typů nádorových buněk působí naopak apopticky (Valko et al., 2006).

Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny rostlinného původu a jsou významnou složkou stravy. Působí jako terminátoři radikálové řetězové reakce a chelatátoři přechodných kovů. Jsou účinnými inhibitory lipoperoxidace. Za jistých podmínek však mohou mít i efekt oxidační.

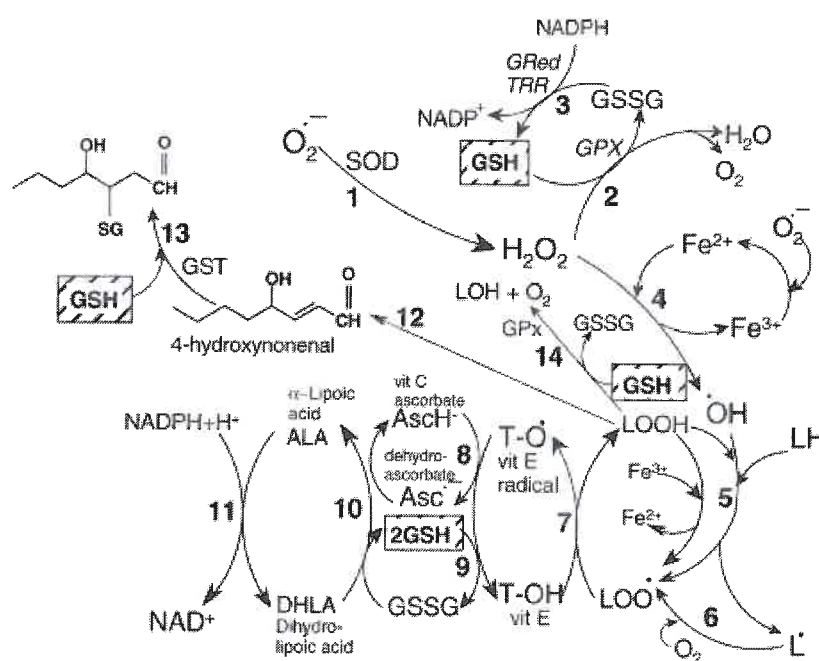
Mezi oxidanty patří rovněž **Koenzym Q** a **bilirubin**, které spolupracují s vitamínem E při ochraně membrán (Dudnik a Kharpova, 1998).

Glutathion je tripeptid γ -glutamylcysteinylglycin. γ -glutamyllová chrání glutathion před naštěpením peptidázami. Z funkčního hlediska je velmi důležitá $-SH$ skupina cysteinového zbytku. Glutathion se v buňkách vykytuje ve velmi vysokých koncentracích. Játra patří mezi orgány s nejvyšší intracelulární koncentrací glutathionu (kolem 5 mM) (Latour et al., 1999). Glutathion se vyskytuje ve dvou formách - redukované (GSH) a oxidované (GSSG). Poměr mezi těmito formami informuje o oxidačním stavu buňky. Za fyziologických podmínek se v buňce nachází více než 99% glutathionu ve formě GSH. Za různých patologických stavů se tento poměr velmi dramaticky mění ve prospěch GSSG. Játra jsou hlavním orgánem tvorby glutathionu a aktivně ho vylučují do cirkulace i do žluče. Glutathion dokáže přímo eliminovat hydroxylový radikál, má schopnost reparace DNA poškozené volnými radikály a schopnost regenerace dalších antioxidantů. Účastní se také redoxní signalizace. Udržení poměru GSH/GSSG je nutné pro zachování redukovaných sulfhydrylových skupin proteinů, cysteinu a koenzymu A, které jsou nezbytné pro funkci těchto sloučenin. GSH funguje jako zásobárna cysteinu a též jako jeho transportní systém (Valko et al., 2006; Roušar et al., 2005). Jako koenzym působí u glutathionperoxidázy a glutathiontransferázy. Zvláštní schopností glutathionu je možnost neenzymové, reverzibilní reakce s $-SH$ skupinami jiných sloučenin, tzv. S-thiolace. S-thiolace chrání tyto skupiny před ireverzibilní oxidací a zároveň vykazuje určité regulační funkce (Latour et al., 1999). K regeneraci oxidovaného glutathionu na GSH slouží glutathionreduktáza spolu s $NADPH + H^+$.

Thioredoxin je malý multifunkční redoxní protein. V redukované formě obsahuje 2 $-SH$ skupiny, které jsou oxidovány na disulfid. Zpětná redukce je katalyzována thioredoxinreduktázou s $NADPH$ jako kofaktorem. Thioredoxin je schopný v odpovědi na

oxidační stres translokace z cytozolu do jádra a podílí se na redoxní regulaci. Má kontrolu nad transkripčními faktory ovlivňující buněčnou proliferaci a smrt. Hladina thioredoxinu je 100-1000 x nižší než GSH, ale efekt thioredoxinu a GSH se překrývá a doplňuje. Bylo zjištěno, že thioredoxin může ovlivňovat aktivitu některých proteinů přímou vazbou (Valko et al., 2006).

Kyselina lipoová (LA) je příkladem antioxidantu, který je rozpustný v tucích i ve vodném prostředí. Účastní se vychytávání ROS, regeneruje vitamín C, E a glutathion, chelatuje přechodné kovy a opravuje poškozené proteiny. Redukovaná forma lipoové kyseliny (DHLA) je jedním z nejsilnějších antioxidantů v biologických systémech. LA se snadno absorbuje a využívá se např. k léčbě komplikací u diabetu mellitu (Valko et al. 2006, Bustamante et al., 1998).



Obr. 13: ROS a antioxidační ochrana (Valko et al., 2006)

3.5.3 Reparační procesy

Savčí buňky vykazují pouze omezené možnosti přímé opravy oxidačně modifikovaných proteinů, a tak jich většina podléhá selektivní proteolýze. Nejdůležitějším intracelulárním proteolytickým systémem je proteazomový systém. Proteazomy jsou komplexy proteáz, které za účasti ATP degradují molekuly bílkovin na peptidy. K rozpoznání oxidačně modifikovaných proteinů pak slouží značení pomocí ubikvitinu (Grune et al., 1997). Pokud poškození není tak závažné, může dojít k opravě těchto bílkovin pomocí proteinů

s *chaperonovou funkcí*, které jsou primárně určeny pro posttranslační prostorové uspořádání nascentních proteinů a pro jejich začlenění do buněčných organel. Oxidační stres indukuje syntézu *chaperonů* (Bose et al, 1996), které, pokud je to možné, obnovují původní terciární strukturu oxidačně modifikovaných proteinů. Pokud to možné není, urychlují jejich odstranění v proteazomech. Příkladem proteinů s *chaperonovou funkcí* jsou tzv. „*heat shock*“ proteiny.

Thioredoxinový reduktázový systém či proteinová disulfidová izomeráza jsou enzymy opravující oxidací vytvořené disulfidové můstky (Holmgren, 1989; Puig a Guilbert, 1994). Methionin sulfoxidová reduktáza je schopná redukovat oxidovaný methionin v peptidovém řetězci (Vougier et al., 2003).

V játrech jako ve všech savčích buňkách existují reparační mechanizmy DNA. Nejdůležitějšími z těchto enzymů jsou různé typy DNA-polymeráz a DNA-ligáza. Opravné systémy existují rovněž pro modifikované fosfolipidy.

3.5.4 Regenerační schopnost jater

Jaterní poškození a regenerace jsou dva současně probíhající, ale opačné děje. Blokování proliferace umožňuje rychlý postup jaterního poškození (Soni a Mehendale, 1998). Bylo prokázáno, že poškození navozené nízkými dávkami CCl_4 a CHCl_3 je eliminováno právě díky výrazné proliferační schopnosti hepatocytů (Mehendale, 1994). V průběhu embryogeneze se z hepatoblastů vyvíjejí hepatocyty, cholangiocyty a tzv. oválné buňky, považované za vlastní progenitorové (kmenové) buňky. Dalšího dělení jsou schopné všechny tři typy. To, který z typů buněk se bude podílet na obnovení jater, záleží na velikosti a typu inzultu (Fausto a Riehle, 2005; Fausto, 2004).

Pro optimální průběh jaterní regenerace je nutná interakce cytokinů, růstových faktorů a komitogenů (noradrenalin, hormony štítné žlázy, inzulin a glukagon). Dělení buněk probíhá ve dvou na sobě závislých vlnách. V první vlně je mobilizován malý počet hepatocytů, které se v játrech nacházejí v G_2 fázi buněčného cyklu. Během dělení se do okolí uvolňují prozánětlivé cytokiny (TNF- α , interleukin-6), růstové faktory (EGF, TGF- α , HGF) a dochází k expresi některých protoonkogenů (c-myc, c-jun, H-ras). Tyto děje stimulují dělení ostatních buněk. Nastává tedy druhá, mohutnější vlna dělení hepatocytů a dalších buněk přítomných v játrech (Soni a Mehendale, 1998; Mehendale, 1994; Calbresse et al., 1993). Míra proliferace je závislá na množství hepatotoxinu. Nejdříve se se zvyšující dávkou zvyšuje i proliferační aktivita, čímž je poškození eliminováno. Proliferační aktivita však roste jen do určité koncentrace aplikované látky. Po překročení této koncentrace dochází ke zpožděnému

nástupu a poklesu proliferační aktivity hepatocytů (Mangipudy et al., 1995; Soni a Mehendale, 1998). Nové buňky jsou schopny obnovit nejen jaterní strukturu, ale i funkci. Na základě mnoha studií bylo zjištěno, že nově vzniklé buňky jsou dokonce více odolné k působení chemických látek. Míru proliferace neovlivňuje jen množství toxinu, ale také jeho chemická charakteristika. Na proliferaci má také vliv věk a nutriční vlivy. Proliferační schopnost se výrazně liší u různých živočišných druhů (Soni a Mehendale, 1998; Mehendale, 1994).

3.6 Modely toxického poškození jater

Játra jsou hlavním místem detoxikačních procesů a centrálním orgánem metabolismu. Jsou proto vhodným modelovým orgánem pro studium toxicity. Modely můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin: *in vitro* a *in vivo* modely. *In vivo* znamená testování látky na živém zvířeti, zatímco *in vitro* na izolovaných perfundovaných orgánech, tkáňových řezech, buněčných suspenzích a kulturách a na subcelulárních frakcích. Modely nacházejí uplatnění v toxikologických, farmakologických a metabolických studiích (Kosina et al., 1999).

Hlavními problémy testů na zvířatech jsou jejich vysoká ekonomická náročnost, etická a legislativní omezení spojená s použitím laboratorních zvířat a v neposlední řadě také omezení vyplývající z mezidruhových rozdílů. Díky rozdílné aktivitě enzymových systémů a rozdílům ve vstřebávání nemohou být data s jistotou přenesena na člověka. V testech na zvířatech nemohou být detekována imunoalergická a autoimunní poškození jater (Ballet, 1997).

Nové technologie ve farmaceutickém průmyslu dávají vzniknout daleko většímu počtu látek, které jsou ale zároveň dostupné ve velmi malém množství. I díky této skutečnosti se pozornost v poslední době stále více soustřeďuje k testování látek v podmínkách *in vitro* (Paillard et al., 1999; Flint, 1998) U mnoha chemických látek byla prokázána tvorba stejného metabolitu v podmínkách *in vivo* i *in vitro* (Guillouzo, 1998).

In vitro modely jsou účinné a cenově dostupné nástroje k zjištění specifických mechanismů za přesně kontrolovatelných podmínek (Ulrich et al, 1995; Dvořák et al., 2003). *In vitro* testy se používají buď pro zjištění potenciální toxicity, nebo k objasnění mechanismů již dříve identifikované *in vivo* toxicity. Pokud existuje velké množství chemických analogů dostupných v malém množství, dává se při farmakologickém screeningu přednost *in vitro* testování (Flint, 1998). Objasnění mechanismu, kterým látka působí, pomáhá odhadnout rizikové faktory poškození a v neposlední řadě může být odhalena hepatoprotektivní látka (Guillouzo, 1998). Výhodou je, že lze testovat různé chemické látky v různých koncentracích

(Ballet 1997; Guillouzo, 1998). Buňky však musí být použity v čase, kdy jsou dostatečně aktivní enzymy I. a II. fáze biotransformace. Médium nesmí reagovat s testovanou látkou a jejími metabolity. Testování je limitováno časem a buňky se nemusejí nacházet ve zcela fyziologickém stavu. Mimoto dochází k akumulaci látky a jejích metabolitů v médiu. Chybí také interakce s ostatními orgány (Guillouzo, 1998).

3.6.1 *In vitro* modely

Mezi nejvíce používané *in vitro* modely patří izolované perfundované orgány, tkáňové řezy, subcelulární frakce, izolované hepatocyty a hepatocytární kultury. Kultury hepatocytů jsou dnes nejvíce rozšířeným *in vitro* modelem (Guillouzo, 1998). Každý model má své výhody a nevýhody a výběr modelu záleží na konkrétním problému, který má být řešen (Ulrich et al., 1995). Na našem pracovišti používáme izolované hepatocyty a ze subcelulárních frakcí izolované mitochondrie.

3.6.1.1 *Izolované hepatocyty*

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. Pro tyto účely se používají i lidské hepatocyty (Guillouzo, 1998).

Zdrojem hepatocytů mohou být celá játra, jaterní fragmenty, nebo biopsie. Celá lidská játra mohou být získána jen při odběru orgánů z různých důvodů pro transplantaci nevhodných. Při biopsii je vzorek odebrán ze zdravých jater během chirurgického zákroku. Všechny odběry pro získání lidských hepatocytů musí být v souladu se zákony dané země a musí být provedeny se souhlasem pacienta (Guillouzo, 1998 ; Kosina et al., 1999). Po odběru je nutno vzorky před dalším zpracováním udržovat při teplotě 0 – 4 °C. Pro delší skladování a transport je vhodné vzorky umístit do roztoků pro hypotermickou prezervaci (roztok Euro-Collins, University of Wisconsin). Nedoporučuje se hepatocyty skladovat déle než 7 hodin (Kosina et al., 1999).

Pro izolaci hepatocytů se dnes nejvíce používá dvoustupňová kolagenázová metoda. Použitím proteolytických enzymů však dochází ke změně povrchových vlastností parenchymových buněk. U bezkolagenázových technik je kolagenáza nahrazena chelatačním činidlem (EDTA). Funkční kapacita hepatocytů je sice vyšší než při použití dvoustupňové kolagenázové metody, výtěžek životaschopných hepatocytů je však nižší a výsledky jsou diskutabilní (Guillouzo, 1998).

3.6.1.1.1 Izolace hepatocytů

V roce 1967 Howard et al. izolovali potkaní hepatocyty za použití kombinované mechanicko-enzymové techniky (Mítry et al., 2002). Tato technika spočívala v rychlém promytí jater studeným Hanksovým pufrem bez přítomnosti kalcia, který obsahoval kolagenázu (0,05%) a hyaluronidázu (0,1%). Játra byla poté nakrájena na malé kousky a inkubována v enzymovém roztoku na třepačce (Guillouzo, 1998). Výsledkem byl získání intaktních hepatocytů, ovšem ve velmi nízkém výtěžku. Tato technika byla dále vylepšena Berry a Friendem (1969 – získali poměrně vysoký výtěžek) a modifikována Seglenem (1976). Seglenova dvoustupňová kolagenázová perfúze jater je nyní v různých modifikacích široce užívána pro izolaci hepatocytů různých živočišných druhů, včetně člověka (Berry a Phillipst, 2000; Guillouzo, 1998; Mítry et al., 2002). Dá se říci, že každá laboratoř používá svou vlastní modifikaci. Cílem je maximální výtěžek, minimální biochemické změny v buňkách během izolace, minimální kontaminace neparenchymovými buňkami a maximální podíl buněk schopných přichycení a přežití při případné další kultivaci a to vše za sterilních podmínek (Berry et al., 1991).

Dvoustupňová kolagenázová technika spočívá v perfúzi jater pufrem bez přítomnosti kalcia a následné recirkulační perfúzi jater médiem obsahujícím kolagenázu a Ca^{2+} ionty, které jsou pro dostatečnou aktivitu kolagenázy nezbytné. V prvním kroku dochází k porušení desmozomů a rozptýlení buněk. Vynecháme-li tuto první perfúzi médiem bez iontů vápníku, je výtěžnost hepatocytů menší. Navíc takto izolované hepatocyty vykazují snížení některých metabolických funkcí, např. sníženou tvorbu ATP a sníženou schopnost glukoneogeneze (Červinková et al., 2002; Berry et al., 1991). Ve druhém kroku dochází k rozrušení sítě kolagenních vláken (Berry a Phillipst, 2000). Pro přípravu subpopulací perivenózních nebo periportálních hepatocytů se používá selektivní destrukce periportální resp. perivenózní části mikrocirkulace digitoninem. Dílčí úpravou dvoustupňové kolagenázové metody (přídavkem inhibitoru trypsinu) lze získat spojené dvojice hepatocytů se zachovanými žlučovými kanálky (Guillouzo, 1998).

K oddělení hepatocytů od ostatních buněk (endotelové buňky, Kupfferovy buňky, lipocyty, fibroblasty atd.) se většinou používá krátká nízkorychlostní centrifugace (5 – 10 min. při max. 50 g). Většina neparenchymových buněk s výjimkou některých fibroblastů je menší a má menší hmotnost než zralé hepatocyty a zůstává v supernatantu (Berry et al., 1991).

Metodou dvoustupňové perfúze jater lze získat poměrně vysoký počet živých neporušených parenchymových buněk. Z mladých potkaních jater lze získat 40 - 60 x 10⁶

hepatocytů na gram tkáně, jejichž viabilita stanovená pomocí exkluze trypanové modře (viz. dále) se pohybuje v rozmezí 85 – 95 %. Preparáty obsahují méně než 5 % neparenchymových buněk (Guillouzo, 1998), což postačuje pro krátkodobé kultivace. Při delších inkubacích se může počet kontaminujících buněk snížit dalšími metodami, popřípadě potlačit jejich vliv (percollová centrifugace, použití různých povrchů k přichycení, použití bezsérových médií) (Berry et al, 1991). Počet a kvalita izolovaných hepatocytů v různých pokusech se liší a závisí na kvalitě tkáně, na složení promývacího roztoku a na typu a aktivitě kolagenázy (Mitry et al., 2002).

Kolagenáza je připravována z bakterií (*Clostridium histolyticum*) a skládá se ze slabě přečištěné směsi enzymů. Tato směs má různé složení a kromě kolagenázy obsahuje další proteázy. Výsledkem mohou být nechtěné enzymové reakce ovlivňující kvalitu a kvantitu živých hepatocytů. Aktivita hrubé kolagenázy se tedy liší dávkou od dávky (Mitry et al., 2002). Dodnes nebylo zjištěno, které z kontaminujících proteáz jsou nezbytné k dostatečnému natrávení tkáně. V pokusech s vysoce čištěnou kolagenázou nebylo dosaženo očekávaného stupně natrávení. Zdá se, že kombinace kolagenázy a elastázy vede k vyšším výtěžkům (Berry a Phillipst, 2000). Naproti tomu Donini a spol. (2001) porovnávali nový přípravek Liberázu (vysoce čištěnou směs izoform kolagenázy) s hrubou kolagenázou při izolaci prasečích hepatocytů a zjistili, že s Liberázou dosahují vyšší viability (Mitry et al., 2002).

Čerstvě izolované hepatocyty jsou schopny odpovídat na signály stejně jako před izolací, nicméně dochází k některým fenotypovým změnám. Během izolace nastává snížení některých funkcí, z nichž největší je rychlá ztráta celkového cyt-P450. Izolace hepatocytů vede ke změněné expresi CYP mRNA molekul. Během 1h izolace a promývání hepatocytů došlo k 27x zvýšení mRNA kódující c-jun (Padgham et al., 1993).

Po izolaci je nutné zhodnotit viabilitu získaných hepatocytů. Pro jednoduchost se používá metoda barvení buněk trypanovou modří (viz. metodiky) a stanovení metabolické aktivity izoenzymů cytochromu P-450. Životaschopnost potkaních hepatocytů bývá obvykle vyšší než u lidských. U lidských se pohybuje mezi 70 – 90 % (Kosina et al., 1999). Aktivita CYP je značně variabilní, což je způsobeno věkem, pohlavím, jaterními nemocemi, genetickým polymorfizmem, léky a podmínkami izolace a uchování vzorků (Guillouzo, 1998).

Čerstvě izolované hepatocyty si uchovávají schopnost odpovídat na signály podobně jako *in vivo*, nicméně byly pozorovány určité fenotypové a genotypové změny. Během izolace buňky mění tvar, ztrácejí polaritu, dochází k proteolytickému poškození receptorů a enzymů a je porušena transportní schopnost (Červenková et al., 2001). Dochází ke ztrátám

diferenciovaných funkcí, z nichž nejvýraznější je ztráta CYP (Padgham et al, 1993; Griffiths a Evans, 2000; Richert et al., 2002; Ulrich, 1995). Brzy po izolaci klesá aktivita CYP na 50 – 75 % původní aktivity a během kultivace se dále snižuje (Richert et al., 2002). Dostatečná aktivita nicméně zůstává zachována během prvních dnů kultivace a její kapacita může být podpořena, nebo indukována (Ulrich, 1995). Signály, které jsou odpovědné za ztrátu funkcí diferenciovaných hepatocytů, jsou pravděpodobně následkem stresu navozeného během izolace (Varley a Dickson, 1999). Během izolace vznikají ROS a dochází k aktivaci NF- κ B a k aktivaci iNOS syntázy. Zvýšená koncentrace NO koreluje se sníženou aktivitou CYP (Richert et al., 2002). NO snižuje aktivitu CYP díky ireverzibilní destrukci již nasyntetizovaného enzymu (nitrozylace hemu), zároveň snižuje transkripci DNA CYP genů (Lopéz-García, 1998). iNOS může být během izolace aktivována různými faktory, mezi něž patří ROS a také endotoxin, který je často přítomen v hrubé kolagenáze. Na druhou stranu se zdá se, že v tomto případě NO uplatňuje inhibiční efekt na proapoptotické faktory, čímž hepatocyty chrání před apoptózou (Dilworth et al., 2000). Dále jsou aktivovány SAPK (p38-kináza, JNK-1) a dochází ke zvýšené expresi některých genů (c-jun, c-fos) (Varley a Dickson, 1999; Guillouzo, 1998).

Přežití izolovaných hepatocytů je krátké a nepřesahuje několik hodin (Guillouzo, 1998; Guillouzo et al., 1997). Na počátku devadesátých let minulého století byly publikovány první zkušenosti s uchováváním zmrazených hepatocytů. Kryoprezervované hepatocyty lze uchovávat až několik let (Dvořák et al., 2000).

3.6.1.1.2 Experimentální modely používané při práci s hepatocyty

Suspenze buněk

Hepatocyty si v suspenzi udržují nativní morfologii, integritu buněčné membrány, metabolickou kapacitu a aktivitu enzymových systémů I. a II. fáze biotransformace. Tento systém umožňuje studium mnoha složek v různých koncentracích a studium mezidruhových rozdílů. Jeho nevýhodou je velmi krátká životnost (3 – 6 hodin). Buňky používané ihned po izolaci se nenacházejí ve zcela fyziologických podmínkách vlivem prodělaného stresu během izolace (viz. výše). Pro tento model se lidské hepatocyty většinou nepoužívají (Guillouzo, 1998; Kosina et al., 1999; Červenková et al., 2001).

Primární kultury hepatocytů

Pro delší přežití musí být hepatocyty kultivovány v buněčné kultuře. V konvenčních kulturách vykazují hepatocyty omezenou životnost, obvykle nepřesahující několik dní. Buňky se nedělí a brzy se u nich projevují fenotypové změny, které vedou ke snížení, nebo vymizení

paterních specifických funkcí. Během prvních dnů kultivace je hladina exprese CYP sice bazální, ale hepatocyty si stále zachovávají schopnost odpovídat na jeho induktory. Tato schopnost však s prodlužující se dobou kultivace mizí. Dále se snižuje produkce albuminu, transferinu a dalších proteinů (Guillouzo, 1998; Kosina et al., 1999; Guillouzo et al., 1997; Ulrich, 1995). Bylo zjištěno, že u lidských hepatocytů tyto změny nastávají po delší době než u potkaních a jsou více progresivní (Guillouzo, 1998). V primárních kulturách mají hepatocyty abnormální poměr povrch/objem. Buňky mají mnohem větší kontakt se sousedními buňkami než *in vivo* (Červenková et al., 2001). Po přichycení hepatocytů k médiu dochází ke komplexní reorganizaci cytoskeletonu a je vyžadována normální funkce aktinu a myozinu (Bhadriraju a Hansen, 2002).

Zachování buněčných funkcí může být prodlouženo pomocí tří faktorů: média (přídavek antibiotik, hormonů, růstových a komitogéních faktorů), mezibuněčných interakcí (kokultivace s jinými typy buněk, kultivace ve formě agregátů) a přítomnosti extracelulární matrix (kolagen, matrigel, sandwichová metoda kultivace) (Guillouzo, 1998; Mitry et al., 2002).

Mezi další experimentální modely používané při práci s izolovanými hepatocyty patří model bioreaktoru a linie imortalizovaných hepatocytů, které však na našem pracovišti nevyužíváme.

3.6.1.1.3 Subcelulární frakce

Do této skupiny modelů patří mikrozómy, cytozol, jádra, mitochondrie, proteinové receptory, enzymy atd. Jejich výhodou je relativně snadná příprava a možnost dlouhodobého uchování ve zmraženém stavu. Kultivační médium musí být doplněno koenzymy a kosubstráty. Mitochondrie se používají ke studiu efektů chemických látek na oxidační fosforylaci, syntézu ATP a β -oxidaci mastných kyselin.

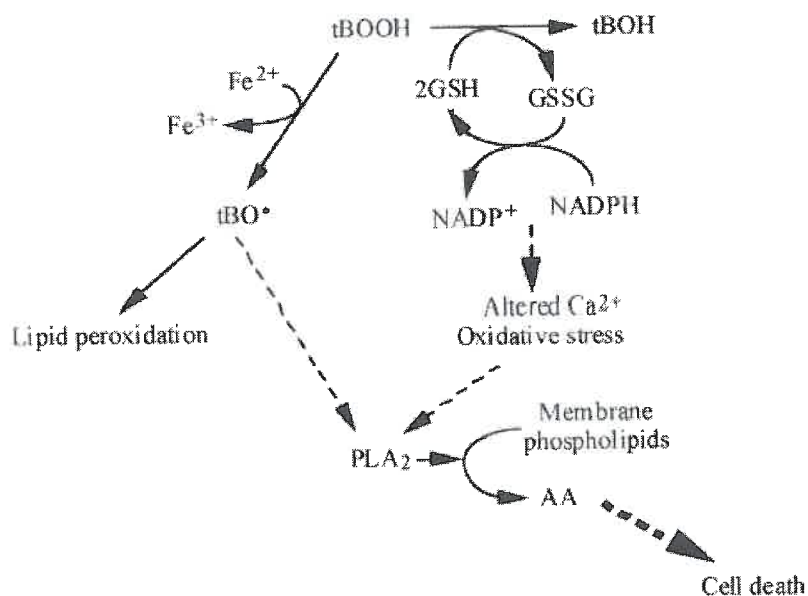
Subcelulárních frakcí se s úspěchem využívá především při objasňování stupňů jednotlivých metabolických reakcí a interakcí na molekulární úrovni (Červenková et al., 2001; Guillouzo, 1998).

Dominantní postavení při izolaci subcelulárních frakcí zaujímají metody založené na využití síly a na rozdílu ve velikosti a hustotě izolovaných částic (S-rychlostní a isopyknotická centrifugace). Pro přípravu hustotních gradientů se používá sacharóza, Ficoll, Percoll, Metrizamid a Nycodenz (Chandoga a Hampl, 1994).

Přestože velké množství informací může být získáno ze studií v podmínkách *in vitro*, je nezbytné tyto informace doplnit a porovnat s pokusy *in vivo*. Pouze pokusy na celém organismu zachytí účinek nejen na úrovni buněčné, nebo cílového orgánu, ale i zpětné vazby mezi orgány a i vedlejší účinky. Pro budoucnost je důležité standardizovat metody tak, aby byly akceptovatelné vědci i regulačními orgány.

3.7 Terciární butylhydroperoxid jako modelová látka pro studium oxidačního poškození hepatocytů

Jak již bylo řečeno, oxidační stres patří mezi nejvýznamnější mechanismy, kterými hepatotoxiny navozují jaterní poškození. Přestože je mechanismus oxidačního poškození v poslední době velmi intenzivně studován, není zcela objasněn. Terciární butylhydroperoxid (tBHP) je organický hydroperoxid s krátkým uhlovodíkovým řetězcem. Jde o analog lipidových hydroperoxidů tvořených během oxidačního stresu v buňkách. Tert-BHP není typickým hepatotoxinem, ale nespecifické oxidační činidlo, které poškozuje jakékoli buňky, se kterými přijde do kontaktu. V experimentu *in vitro* je používán jako modelová látka k navození oxidačního stresu. Tert-BHP snadno prochází biologickými membránami a v hepatocytech je metabolizován různými cestami.



Obr. 14: Biotransformační cesty tBHP v hepatocytech (tBOOH – terciární butylhydroperoxid; tBO• – terciární butoxylový radikál; tBOH – terciární butanol; PL A₂ – fosfolipasa A₂; AA – kyselina arachidonová) (Martín et al, 2001)

Za prvé jde o katalytickou přeměnu tBHP v přítomnosti GSH a glutathionperoxidázy, přičemž vznikají t-butanol a GSSG (Sies et al., 1972). GSSG regeneruje na GSH pomocí glutathionreduktázy, k čemuž je třeba dostatek NAD(P)H. Tato reakce zabraňuje toxickému působení tBHP, ovšem za cenu deplece GSH, NAD(P)H a změny redoxního stavu buněk (Ahmed-Choudhury et al., 1998). Druhou reakcí je přeměna pomocí cytochromu P450 (Davies, 1989) či za přítomnosti iontů železa (Rush a Alberts., 1986) na peroxylové a alkoxylové radikály. Snížení hladiny GSH a vznik ROS vede k poškození lipidů, proteinů a DNA, narušení homeostázy Ca^{2+} , poškození mitochondrií a snížení syntézy ATP. Výsledkem je v závislosti na dávce buď apoptóza nebo nekróza buňky (Haidara et al., 2001)

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 způsobuje rychlou oxidaci mitochondriálních pyridinových nukleotidů - NADH a NADPH (Byrne et al., 1999). Tato oxidace je pravděpodobně bifázický proces, kdy iniciální fáze je způsobena na tBHP závislou tvorbou ROS. To vede k rozvratu homeostázy kalcia s počátečním zvýšením volných Ca^{2+} iontů v mitochondriích. Tím je navozena druhá fáze zvýšené tvorby ROS mitochondriemi. Zvýšení mitochondriální koncentrace Ca^{2+} předchází zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytozolu (Lemasters et al., 1999). Druhý stupeň oxidace NAD(P)H pravděpodobně způsobuje otevření PTP, existují ale i důkazy, že následná tvorba ROS je naopak způsobena MPT (Nieminen et al., 1997). Zvýšení permeability vnitřní membrány pro ionty navodí kolaps membránového potenciálu, bobtnání mitochondrií, rozpojení oxidativní fosforylace a akcelerovanou hydrolýzu ATP mitochondriální ATPázou s následným energetickým rozvratem a smrtí buňky (Masaki et al., 1989; Gunter a Pfeiffer, 1990; Imberti et al., 1993; Nieminen et al., 1997; Lemasters et al., 1999).

Účinkem tBHP rovněž dochází k mobilizaci kyseliny arachidonové (AA) z fosfolipidů plazmatické membrány prostřednictvím fosfolipázy A_2 . Její činností se v buňkách akumulují lysofosfatidyly a kyselina arachidonová, oba typy sloučenin se podílejí významnou měrou na buněčné signalizaci (Martín et al., 2001).

Díky rozvratu kalciové homeostázy dochází rovněž k aktivaci Ca^{2+} dependentních proteinkináz C, což vede k poškození cytoskeletu a těsných spojení hepatocytů (Pérez et al., 2006). Jak v pokusech na perfundovaných játrech, tak i v izolovaných hepatocytech byl prokázán cholestatický účinek tBHP (Ahmed-Choudhury et al., 1998). Efekt tBHP na biliární kapiláry při použití nižších koncentrací je pravděpodobně dán právě porušením integrity těsných spojení (Ahmed-Choudhury et al., 1998).

Dalším účinkem tBHP je inhibice proteosyntézy (Latour et al., 1999). Zdá se, že inhibice proteosyntézy je spíše adaptivní mechanismus buňky na stres, než časný marker cytotoxicity. Buňka tak zřejmě šetří energii pro zachování důležitých funkcí. Stupeň inhibice závisí na dostupnosti zdrojů energie a redoxním stavu buňky, zvýšená S-thiolace proteinů má pak pravděpodobně ochranný účinek (Latour et al., 1999). tBHP rovněž vede k oxidačnímu poškození DNA s tvorbou DNA adduktů a zlomů (Latour et al., 1995).

Rovněž byl popsán toxický účinek tBHP na endoteliální buňky jaterních sinusoidů (Cogger et al., 2004).

3.8 S-adenosylmethionin jako látka s potenciálně hepatoprotektivním účinkem

S-adenosylmethionin (S-AMe) je biologicky aktivní sloučenina obsahující síru, která se nachází prakticky ve všech žijících organizmech (Friedel et al., 1989). S-AMe je po ATP druhým nejčastěji využívaným substrátem enzymových reakcí (Fontecave et al., 2004; Grillo a Colombatto, 2005) a účastní se transmetylací, transsulfurací a syntéz polyaminů (Stramentinoli, 1987). Přestože je jeho tvorby schopna většina lidských buněk, centrální úlohu v metabolismu S-AMe plní játra.

Endogenně je S-AMe syntetizován v cytoplazmě buněk z ATP a z methioninu za katalytického působení methioninadenosyltransferázy (MAT). U savců existují 3 izoformy MAT. Izoformy I a III (MAT I a III) jsou exprimovány jako homotetramer respektive homodimer α -podjednotky výlučně v hepatocytech a vykazují vysokou aktivitu. Izoforma II (MAT II) je heterotetramer dvou α a dvou β podjednotek a byla izolována z většiny tkání těla (Kotb et al, 1997). V játrech dospělých jedinců potkana i člověka se MAT II nachází ve velmi nízkých koncentracích. Naproti tomu ve fetálních játrech jde o hlavní izoformu tohoto enzymu (Horikawa et al, 1993).

Játra se na metabolismu methioninu podílejí asi z 50 %. Aktivně ho vychytávají z oběhu a preferenčně ho inkorporují do molekuly S-AMe, což je jediná katabolická cesta methioninu u savců (Cooper, 1989). Pacienti s cirhózou jater mají sníženou aktivitu MAT. Snížená aktivita MAT byla zaznamenána i u experimentálních modelů toxického poškození CCl_4 a alkoholem (Avila et al., 2002; Mato et al., 1997). Jaterní MAT je enzym velmi citlivý ke změnám redoxního stavu buňky a k čídnlům reagujícím se sulfhydrylovými skupinami (Avila et al., 1997). Při depleci GSH dochází ke snížení její aktivity, což následně vede k dalšímu poklesu tvorby SH ze S-AMe a tím i k další inhibici její aktivity (Mato et al., 1997).

Oxidační poškození nevede jen ke snížení aktivity MAT I/III, ale také ke snížení exprese genu *MAT1A* (Avila et al., 2002). Tyto změny vedou ke snížení endogenní syntézy SAME.

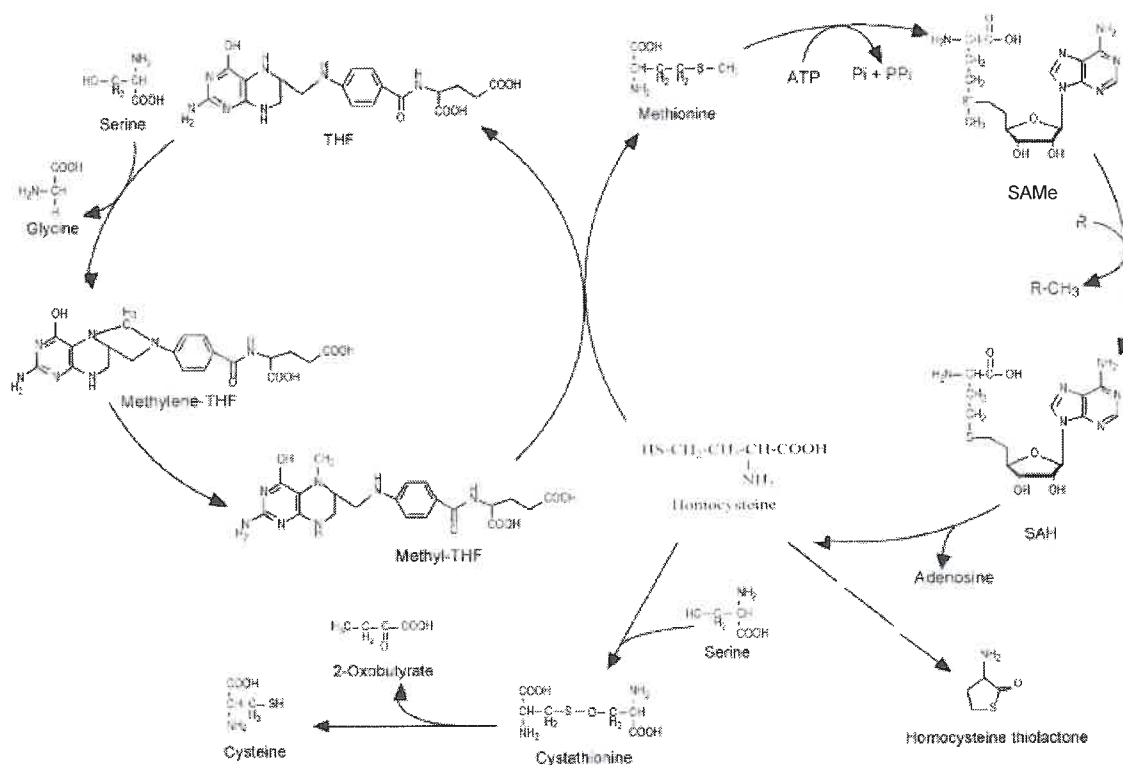
SAME v organismu slouží jako hlavní donor methylových skupin při transmethylačních reakcích. Asi 85 % všech methylací probíhá v játrech (Mudd a Poole, 1975). Anabolické i katabolické reakce proteinů, fosfolipidů, nukleových kyselin, některých hormonů, neurotransmiterů a dalších látek závisí na inkorporaci methylové skupiny do jejich molekul (Friedel et al., 1989). Právě methylace membránových fosfolipidů je pravděpodobně jedním z hepatoprotektivních mechanismů. Methylace fosfolipidů zajišťuje udržování optimální fluidity a bioelektrických vlastností membrán, podílí se na uchování aktivit některých enzymů (Stramentinoli, 1987). Reverzibilní methylace membránových proteinů se může účastnit přenosu signálu (Chiang et al., 1996). Methylací DNA se SAME podílí na regulaci genové exprese (Fentecave et al., 2004).

Uvolnění methylové skupiny z molekuly SAME vede k tvorbě S-adenosylhomocysteinu (SAHo), který je účinkem SAHohydrolázy hydrolyzován na adenosin a homocystein. Homocystein je cystathionin- β -syntázou kondenzován se serinem a vstupuje tak do transsulfuračních reakcí, při kterých se tvoří homocystein, cystein, sulfáty, taurin, koenzym A a též hlavní intracelulární antioxidant – glutathion. Limitujícím faktorem syntézy glutathionu a sirných sloučenin je právě dostupnost cysteinu (Finkelstein et al., 1975). Pro správný průběh transmethylačních reakcí je důležitý nejen dostatek SAME, ale i vhodný poměr SAME ku SAHo, neboť SAHo je velice účinný kompetitivní inhibitor transmethylací (Mato et al., 1997). Homocystein může být také remethylován zpět na methionin.

Za normálních okolností se jen malé procento SAME využije pro syntézu polyaminů. Za stavů, které vyžadují zvýšenou tvorbu těchto biogenních sloučenin, jako je tomu např. při regeneraci jater, je přeměna SAME na polyaminy podstatně vyšší (Mudd et al., 1980).

U řady chronických onemocnění jater (např. při jaterní cirhóze) dochází k poruše metabolismu methioninu. To se projevuje jeho sníženou *clearance*. Porucha je pravděpodobně na úrovni snížené aktivity MAT (Cabrero et al., 1988). Současné snížení aktivity fosfolipidové N-methyltransferázy, která katalyzuje sekvenční methylace fosfatidylethanolaminu na fosfatidylcholin, vede k poklesu obsahu tohoto nejhojnějšího fosfolipidu membrán hepatocytů v játrech (Duce et al., 1988). Tento stav dále může vést k nedostatečné tvorbě organických sloučenin síry. Některé hepatotoxiny (ethanol, tetrachlormethan, galaktosamin a acetaminofen) vyvolávají rychlý pokles redukovaného glutathionu s následnou inaktivací jaterní MAT (Pajares et al., 1992).

Perorální či parenterální aplikace stabilních solí SAME pomáhá obnově normálních jaterních funkcí u řady chronických onemocnění jater (alkoholická i nealkoholická cirhóza, různé formy intrahepatální cholestázy). Podkladem jeho anticholestatického účinku se zdá být zvýšení aktivity některých enzymů a rovněž ovlivnění fluidity membrán, zmiňován bývá i podíl fosfolipidů na transportu žlučových solí (Fernandez et al., 1995). Exogenní SAME vykazuje hepatoprotektivní účinek u řady experimentálních modelů toxického poškození (Mato et al., 1997; Mesa et al., 1996; Wu et al., 1996). Hepatoprotektivních mechanismů účinku SAME může být celá řada, díky obrovskému množství reakcí, kterých se účastní. V poslední době je SAME připisován i regulační účinek na některé jaterní funkce (Mato et al., 2002). Rovněž změna redoxních poměrů v játrech a přítomnost ROS je důležitým signálním mechanismem (Lander, 1997), který můžeme ovlivňovat exogenním podáním SAME.



Obr. 15: Metabolické cesty s-adenosylmethioninu (SAME) (Medina et al., 2001) THF – Tetrahydrofolát, SAH – s-adenosylhomocystein.

4 CÍLE PRÁCE

- a) Zavedení metody měření spotřeby kyslíku na modelu izolovaných hepatocytů, izolovaných mitochondrií a jaterního homogenátu 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 potencionálního hepatoprotektivního účinku s-adenosylmethioninu (SAME)

5 METODIKY

5.1 Materiál

Základní chemikálie jako NaCl, KCl, MgSO₄.xH₂O, Na₂HPO₄.12H₂O, KH₂PO₄, NaHCO₃, MgCl₂, KOH byly získány od firmy Lachema, Česká Republika. Ostatní chemikálie pokud není uvedeno jinak od firmy Sigma-Aldrich, USA.

5.2 Pokusná zvířata

Pokusy byly provedeny na dospělých potkanech, samcích kmene Wistar o hmotnosti 180 až 240 g. Potkani byli chováni za standardních podmínek při konstantní teplotě 23 ± 1 °C, relativní vlhkosti vzduchu 55 ± 10 %, výměně vzduchu 12 – 14x za hodinu a při 12hodinovém světelném režimu (6,00 – 18,00 hod.). Potkani byli ustájeni v klecích po 6 – 10 potkanech. Po celou dobu měli volný přístup k vodě a potravě. 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.

5.3 Izolace hepatocytů

K izolaci hepatocytů jsme využili dvoustupňovou kolagenázovou perfúzi jater. Tuto metodu zavedli Berry a Friend v roce 1969 (Berry a Friend, 1969). Jimi použité roztoky neobsahovaly vápenaté ionty. Tato metoda byla později modifikována Seglenem (Seglen, 1976), který játra nejprve promýval puřem bez obsahu Ca²⁺ a následně byla játra recirkulačně perfundována roztokem s obsahem kolagenázy a vápenatých iontů.

5.3.1 princip dvoustupňové perfúze jater

- 1) Otevřená perfúze (perfúze bez recirkulace) jater puřem bez kalcia, což je nezbytnou podmínkou pro disociaci desmozómů.
- 2) Recirkulační perfúze jater médiem obsahujícím kolagenázu a Ca²⁺ ionty. V tomto kroku dochází k rozrušení sítě kolagenních vláken.
- 3) V další fázi se mechanicky naruší adhezní síly mezi buňkami a hepatocyty se od ostatních buněk jaterní tkáně oddělí pomocí nízkorychlostní centrifugace.

5.3.2 postup izolace hepatocytů

Izolaci jsme provedli v éterové narkóze potkana. Břišní část jsme potřeli dezinfekčním roztokem, nástřihem kůže a svaloviny do tvaru písmene V jsme otevřeli dutinu břišní. Střeva

jsme odsunuli k levé straně, čímž jsme uvolnili přístup k *v. cava inferior*. Do *v. cava inf.* jsme aplikovali heparin v dávce 0,3 ml o koncentraci 833,33 m. j./ml (heparin Léčiva, 10 ml o koncentraci 5000 m. j./ml, ředěný fyziologickým roztokem). Tupou preparací a za stálého vlhčení terénu fyziologickým roztokem jsme uvolnili přístup k *v. portae* a založili pod ní ligaturu. Podloženou *v. portae* jsme nastříhli a dovnitř zavedli kovovou kanylu. Kanylu jsme upevnili ligaturou. Připojili jsme kanylu k aparatuře (hadicí, která přivádí roztok ze sběrné baňky) a játra propláchli *in situ* roztokem A (roztok bez kalcia). O úspěšnosti perfúze svědčí odbarvení jater v důsledku vymytí krve izolačním roztokem a mírné zvětšení objemu jater. Poté, co došlo k zvětšení objemu jater, jsme prostříhli aortu a dolní dutou žílu, aby nenastalo mechanické porušení buněk zvýšeným tlakem. Zastavili jsme průplach a co nejrychleji játra z dutiny břišní vystříhli. Další kroky izolace probíhaly v podmínkách *in vitro*. Opět jsme zahájili otevřenou perfúzi roztokem A a játra opláchli ponořením do fyziologického roztoku. Játra jsme umístili do speciálního stojánku a stojánek ponořili do roztoku A. Po třech minutách jsme zastavili přítok roztoku do sběrné baňky a zbylý roztok nechali samospádem protéct játry. Svorkou jsme uzavřeli hadici, kterou přitékal roztok do jater a játra ve stojánku přemístili do kádinky s roztokem B (roztok s kolagenázou). Sběrnou baňku jsme naplnili roztokem B a uvolnili hadici vedoucí k játrům. Zahájili jsme 15 min. trvající recirkulační perfúzi roztokem B. Hladinu v baňce jsme udržovali ve stejné výšce pro zajištění konstantního perfúzního tlaku. Po ukončení recirkulační perfúze jsme játra ponořili do Krebs-Henseleitova média s bovinním sérovým albuminem (roztok C, tab. 1) a jaterní tkáň jemně mechanicky rozvolnili pomocí pinzet. Přítomnost albuminu je nezbytná pro zachování koloidně-osmotických podmínek. Suspenze buněk jsme přefiltrovali přes sterilní 4x složenou gázu do centrifugační zkumavky a centrifugovali po dobu 5 minut (28 g, 15 °C; *Rotina 35R*, Hettich). Odsáli jsme supernatant a buňky několikrát propláchli Krebs-Henseleitovým médiem a opět centrifugovali. Centrifugaci jsme opakovali celkem třikrát. Optimální rychlost průtoku játry roztokem A i roztokem B byla stanovena na 40 – 50 ml/min (Lotková, 2000).



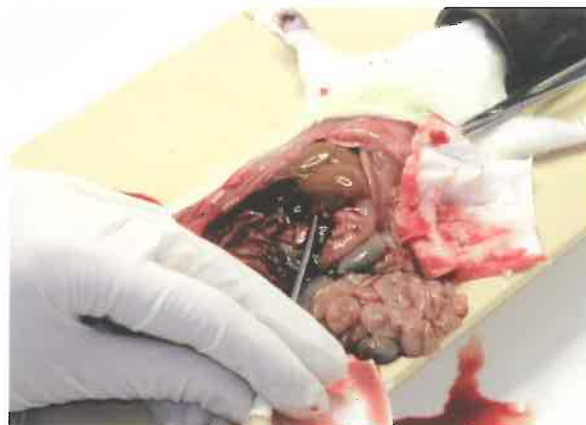
Obr. 16: Aparatura pro izolaci hepatocytů: Vodní lázeň zahřátá na 37 °C, ve které jsou umístěny kádinky s izolačními roztoky. Zásobník izolačních roztoků, který je umístěn asi 40 cm nad kádinky s izolačními roztoky, kvůli zajištění přiměřeného perfuzního tlaku. Peristaltická pumpa, napojená mezi kádinky s roztoky a zásobníkem roztoků, tlaková nádoba obsahující karbogen, která je hadicí (silikon, Ø 5 mm) spojena se zásobníkem izolačních roztoků. Probubláváním karbogenem je zajištěno dostatečné množství kyslíku v médiu. Hadice (silikon, Ø 5 mm) přivádějící roztoky z baňky do kanyly umístěné ve v. *portae*. Přepadová hadice (silikon, Ø 5 mm), která odvádí roztoky ze sběrné baňky do kádinek ve vodní lázni.

Roztok A (pro izolaci je třeba 250 ml)	8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,0977 g MgSO ₄ .xH ₂ O; 0,1206 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O; 0,06 g KH ₂ PO ₄ ; 2,188 g NaHCO ₃ ; 0,19 g EGTA, do 1000 ml doplněno destilovanou vodou, 7 min. syceno karbogenem (95 % O ₂ + 5 % CO ₂), aby výsledné pH bylo 7,3 – 7,4.
Roztok B (pro izolaci je třeba 200 ml)	4,8 g NaCl; 0,24 g KCl; 0,05862 g MgSO ₄ .xH ₂ O; 0,07236 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O; 0,036 g KH ₂ PO ₄ ; 0,3528 g CaCl ₂ .2H ₂ O, 1,314 g NaHCO ₃ ; doplněno do 600 ml destilovanou vodou, 7 min. syceno karbogenem (95 % O ₂ + 5 % CO ₂), aby výsledné bylo pH 7,3 – 7,40; obvykle používáme 0,055 g surové kolagenázy (SEVAC) do 200 ml recirkulačního roztoku. Pozn.: Množství použité kolagenázy se liší u každé šarže, neboť její aktivita není stejná, proto je nutno pro novou šarži kolagenázy vždy vytitrovat optimální dávku.
Roztok C (Krebs – Henseleitovo médium)	6,9 g NaCl; 0,36 g KCl; 0,1441 g MgSO ₄ .xH ₂ O; 0,13 g KH ₂ PO ₄ ; 0,374 g CaCl ₂ .2H ₂ O; 2g NaHCO ₃ ; 0,9 g glukózy, doplněný do 1000 ml destilovanou vodou pro infúze. 1,333 g albuminu do 100 ml C roztoku pro práci s izolovanými buňkami.

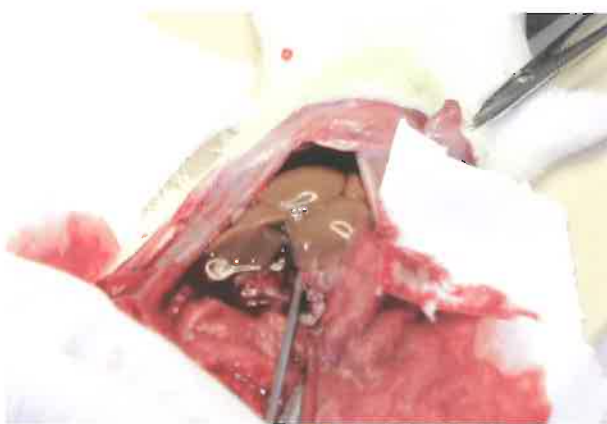
Tab 1: Složení izolačních roztoků



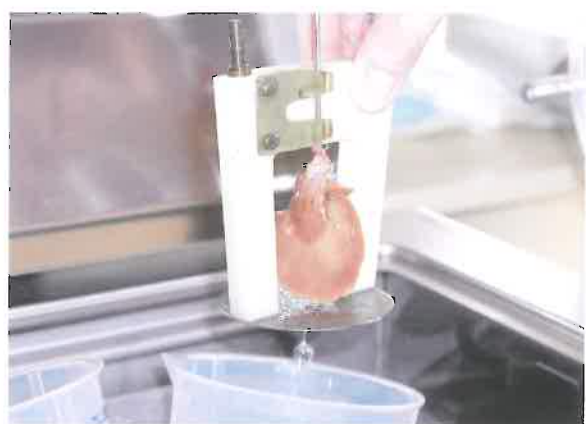
Obr. 17A



Obr. 17B



Obr. 17C



Obr. 17D

Obr. 17: Izolace potkaních hepatocytů pomocí dvoustupňové perfúze jater (A) Příprava ligatury *v. portae* (B) Zavedení kanily do *v. portae* (C) Játra se při průplachu odbarvují (D) Játra ve speciálním stojánku

Bezprostředně po izolaci jsme stanovili viabilitu hepatocytů pomocí exkluze trypanové modře.

5.4 Stanovení viability hepatocytů pomocí exkluze trypanové modře

5.4.1 Princip

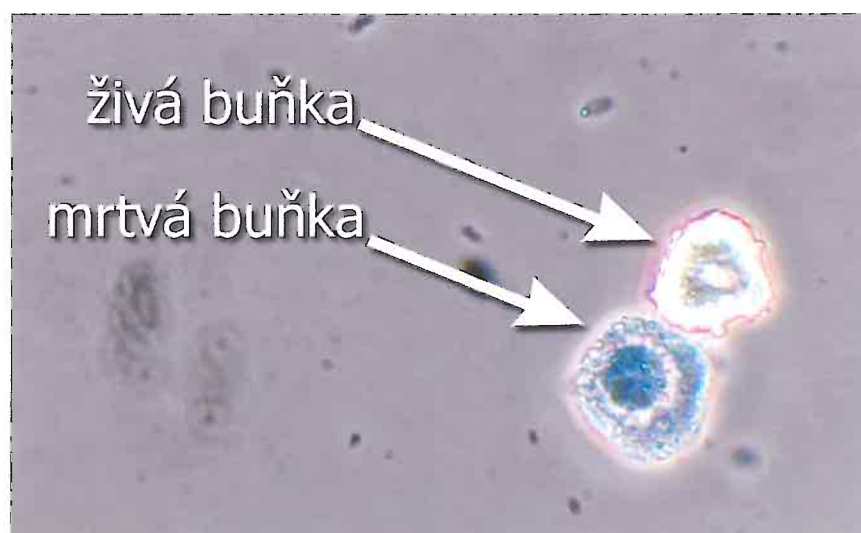
Trypanová modř (sodná sůl toluidin-díazo-diamino-naftol-disulfonové kyseliny) prochází plazmatickou membránou do buňky. Buňky s neporušenou plazmatickou membránou ji vypuzují, zatímco v buňkách, které ztratily vlivem poškození membránový potenciál dochází k její akumulaci.

5.4.2 Provedení

Hepatocyty jsme naředili přibližně na 10^6 buněk/ml. 10 μ l připravené suspenze jsme na podložním sklíčku smíchali s 10 μ l 0,4 %-ní trypanové modře, přikryli krycím sklíčkem a pod mikroskopem při 200 (10 x 20) násobném zvětšení v 10 polích počítali živé (neobarvené)

a mrtvé (modré) buňky. Výsledek uvádíme a vyjadřujeme v procentech jako poměr počtu živých buněk k celkovému počtu hodnocených buněk.

Metoda je rychlá a jednoduchá, má však malou citlivost. Trypanová modř má sama cytotoxické účinky, proto se viabilita hodnotí nejdéle do 10 s po přidání barvy. Trypanová modř patří mezi potenciální karcinogeny.



Obr. 18: Stanovení viability pomocí exkluze trypanové modři

5.5 Počítání buněk

Ze suspenze buněk získané po závěrečné centrifugaci a promytí jsme odpipetovali 10 μ l do 990 μ l K-H médiem (100x ředění) a buňky počítali v Bürkerově komůrce obdobně jako krevní elementy. Podle zjištěného počtu buněk se dále suspenze ředí Williamsovým médiem E, nebo Krebs-Henseleiteovým roztokem pro potřeby kultivace. Hepatocyty určené pro měření respirace pomocí vysokoúčinné oxygrafie a pro stanovení MMP pomocí akumulace TPP^+ ředíme až v komůrkách oxygrafu resp. ionselektivní elektrody (viz. dále)

5.6 Kultivace hepatocytů *in vitro*

5.6.1 Suspenze hepatocytů *in vitro*

Pro některé studie postačuje krátkodobá inkubace. Pro ty je možné využití suspenzí hepatocytů, které vydrží funkční a viabilní pouze po dobu několika hodin. Suspenze o denzitě 1 milión buněk v 1 ml média se kultivují v kultivačních lahvičkách (*Tissue Culture Flasks 50 ml*, Becton–Dickinson) o objemu 50 ml v CO_2 inkubátoru (Sanyo, MCO-17AIC) v atmosféře s 5% CO_2 při 37 °C. Jako kultivační médium je použit Krebs-Henseleitův roztok.

Suspenze hepatocytů mohou být v těchto kultivačních médiích kultivovány jak s hepatotoxiny, tak i s hepatoprotektivními látkami. Po uplynutí inkubační doby se médium odebere na biochemická stanovení.

5.6.2 Primární kultury hepatocytů potkana

Pro toxikologické a farmakologické studie a výzkum kancerogeneze a genové exprese je potřeba přežívání hepatocytů po delší dobu. Pro zachování jejich specifických funkcí a viability jsou pro izolované hepatocyty nutné kontakty s různými substráty a rovněž se sousedními buňkami (Berry et al, 1991). Proto jsou hepatocyty kultivovány v primárních kulturách.

Zpočátku se buňky v médiu s přídavkem séra kultivovaly v plastových nádobách. Hepatocyty mají k plastu slabou afinitu a přídavek séra poskytuje fibronectin pro lepší přichycení. Pro delší kultivace je dnes běžnější použít nádoby potažené jednotlivými matrixovými proteiny, nebo jejich směsí. Hepatocyty se nejčastěji kultivují na kolagenovaných Petriho miskách (PM). Pro přichycení a rozprostření buněk do jedné vrstvy (monolayeru) je potřeba poměrně malého množství kolagenu. Přichycení buněk závisí na teplotě a je maximální v přítomnosti Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů. Inzulín zvyšuje přichycení ke kolagenu typu I z 50 – 60 % na 80% (Berry et al., 1991).

Kultivace na relativně jednoduchých substrátech a v médiích vede k poměrně časně změně genové exprese (Padgham et al, 1993). V posledních letech se zkouší různé modifikace jednoduchých kultivačních systémů. Jednou z cest je použití komplexnějších médií. Nevýhodou však je, že různé složky média mohou mít pozitivní vliv na jednu funkci, mohou však negativně ovlivňovat funkci jinou. Navíc mezi sebou mohou interagovat, což může vést ke změně funkce. I přes tyto problémy se používají některé látky k suplementaci média, které mají obecně dobrý vliv na prodloužení životnosti buněk v kultuře. Určitý poměr mezi inzulínem, glukagonem a dexametazonem v médiu prodlužuje přežívání hepatocytů v kultuře (Berry et al., 1991).

Buněčná hustota v kultuře má rovněž nezanedbatelný vliv na zachování specifických funkcí a na přichycení hepatocytů. Pokud jsou buňky kultivovány ve větších hustotách, dochází k oddálení ztráty některých funkcí. Hlavní faktor, který podmiňuje vliv hustoty buněk na zachování specifických funkcí je kontakt mezi buňkami. Pokud jsou hepatocyty kultivovány v dostatečné hustotě, seskupují se po třech až šesti a obnovují těsná spojení (*tight junctions*) a desmozómy. V kulturách potkaních hepatocytů dochází k vymizení kontaktů mezi buňkami během 1 – 3 dnů (Berry, 1991). Buňky kultivované v hustotě 1,3 – 1,5 .

$10^5/\text{cm}^2$ na kolagenu typu I vytvoří poměrně kompaktní monolayer (jednovrstvu). Buňky v hustotě okolo $2 \cdot 10^5/\text{cm}^2$ vytvoří během 1 – 2 denní kultivace hustší monolayer, ale některé buňky nejdříve zaujmou místo ve druhé vrstvě. S dalším zvyšováním denzity buněk klesá schopnost jejich přichycení (Berry et al., 1991).

Provedení:

V naší laboratoři používáme sterilní polystyrenové PM o průměru 60 mm pro buněčné kultury (*Tissue Culture Dish 60 mm*, Iwaki) potažené kolagenem typu I. Kolagen typu I (Collagen Type I from Rat Tail) je díky své špatné rozpustnosti ve vodě nutné rozpouštět v 20 mM kyselině octové. 1 ml roztoku kolagenu necháme v kontaktu s povrchem PM po dobu 10 minut, po této době kolagen odstraníme. Vzhledem k použití kyseliny octové jako rozpouštědla musíme přichycený kolagen zneutralizovat promytím 2 ml Krebs-Henseleitova roztoku.

Před nasazením buněk na PM jsou hepatocyty naředěny na denzitu 1 milion buněk v 1 ml kompletního Williamsově E média (WE). Na kolagenované PM nanášíme 2 ml suspenze hepatocytů, tedy 2 milióny hepatocytů na jednu PM. Hepatocyty jsou poté ponechány 2 hodiny v CO_2 inkubátoru (5% CO_2) při 37 °C. To je dostatečná doba pro přichycení živých buněk ke kolagenu a vytvoření jedné vrstvy buněk – „*monolayeru*“ Následuje odsátí média a nepřichycených buněk.

Poté lze již primokultury využít pro experimenty. Do PM s kontrolními skupinami dáváme kompletní Williamsovo médium, do ostatních pak stejné médium, které navíc obsahuje modelovou toxickou látku (terciární butylhydroperoxid, Fluka) v příslušné koncentraci anebo hepatoprotektivum (S-Ademetionin, hydrogenobutandisulfonas, Transmetil, Abbott). Misky jsou inkubovány při 37 °C v atmosféře s 5 % CO_2 po stanovenou dobu. Po jejím uplynutí se odebere médium na biochemická stanovení (aktivita laktátdehydrogenázy, koncentrace malondialdehydu). Buňky se pak buď dále kultivují nebo se použijí pro různá měření (obsah intracelulárního GSH, měření MMP). Veškeré manipulace, jak s roztoky tak i s buňkami, jsou prováděny v laminárním boxu za sterilních podmínek.

Kyselina octová 20 mM	0,12 g p.a. doplnit do 100 ml vody pro inj
Kolagen	2 mg kolagenu rozpustit v 6,66 ml 20 mM kys. octové
Kompletní Williamsovo médium E	Williamsovo médium E (WE): (Biotech GmbH, cat. no. P04-29510), bez L-glutaminu a fenolčerveně, doplněné fetálním boviním sérem (10%), L-glutaminem (2mM), penicilinem (200 IU/ml, Novo Nordisk), streptomycinem (0,2 mg, NovoNordisk), inzulinem (0,08 IU/ml, NovoNordisk), prednizolonem (0,5 µg/ml, Merc) a glukagonem (0,008 µg/ml, NovoNordisk)
Krebs – Henseleitovo médium	6,9 g NaCl; 0,36 g KCl; 0,1441 g MgSO ₄ .xH ₂ O; 0,13 g KH ₂ PO ₄ ; 0,374 g CaCl ₂ .2H ₂ O; 2g NaHCO ₃ ; 0,9 g glukózy, doplněný do 1000 ml destilovanou vodou pro infúze. 1,333 g albuminu do 100 ml C roztoku pro práci s izolovanými buňkami.

Tab. 2: Roztoky pro kultivaci hepatocytů

5.6.3 Morfologické znaky čerstvě izolovaných a kultivovaných hepatocytů

K posouzení kvality izolovaných hepatocytů lze rovněž použít světelný mikroskop. Vzhledem k tomu, že hodnotíme živé neobarvené buňky, je vhodnější zvolit fázový kontrast (Červinková et al, 2002; Berry et al., 1991). V podmínkách *in vivo* mají hepatocyty typický polygonální tvar. Během izolace však v důsledku mechanického zatížení při perfúzi a také vlivem použitého média dochází ke změně tvaru (Červinková et al, 2002). Čerstvě izolované hepatocyty jsou kulaté nebo oválné, jak je patrné z obr. 19A. Většina buněk se nachází samostatně, někdy může zůstat pár buněk u sebe a vytvořit dublety, vzácně i triplety (Berry et al., 1991).

Neporušené buňky vykazují vysoký kontrast mezi buňkou a okolním médiem, mají jasně zřetelnou jadernou membránu, nízký stupeň granulace cytoplazmy a ostře viditelné jádro s jadérky (Červinková et al., 2002).

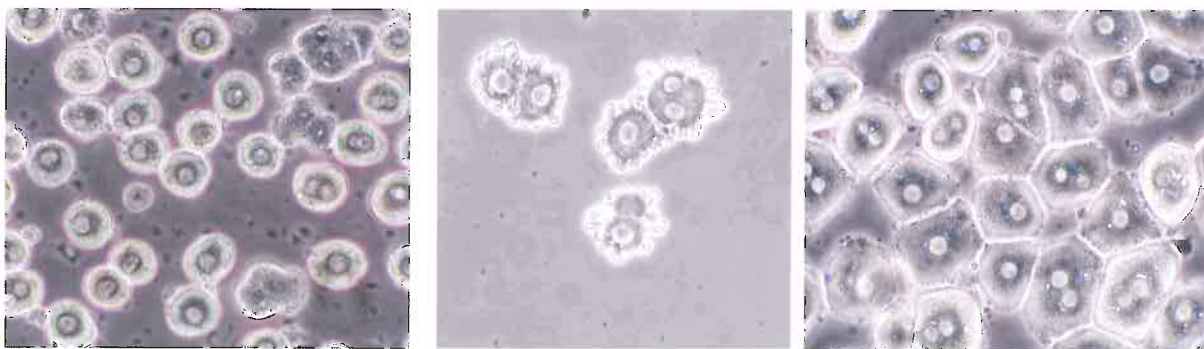
Na čerstvě izolovaných hepatocytech lze často pozorovat výskyt měchýřku na povrchu cytoplazmatické membrány (blebs) (obr. 19B). Tyto průsvitné bleby neobsahují organely (Berry et al., 1991). Vznikají působením hypoxie, popřípadě mechanickým poškozením či vlivem kolagenázy a jsou známkou částečného poškození buněk (Červinková et al., 2002). Formování puchýřku cytoplazmatické membrány je částečně reverzibilní proces a po inkubaci buněk za vhodných podmínek dojde během krátké doby k jejich odstranění a ke stabilizaci cytoplazmatické membrány (Berry et al., 1991; Červinková et al., 2002). Pokud

ovšem nejsou zajištěny optimální podmínky, prohlubuje se narušení membrány, dochází ke granulaci cytoplazmy a buňka odumírá (Herman et al., 1988).

Ireverzibilně poškozené buňky mají vysoce granulovanou cytoplazmu, špatně viditelné jádro a jadérko, neostře a nepravidelné rozhraní mezi cytoplazmatickou membránou a okolním médiem a mezi jádrem a cytoplazmou.

Nepoškozené hepatocyty kultivované na Petriho miskách potažených kolagenem a za použití vhodného média mají polygonální tvar podobný situaci *in vivo*. Buňky dokonce vytvářejí vzájemné kontakty a formují se v útvary, které připomínají jaterní aciny (obr. 19C). Nepoškozené hepatocyty jsou přichyceny ke kolagenu a mají neporušenou integritu plazmatické membrány. Naproti tomu poškozené hepatocyty se stávají oválnými, odtrhávají se od kolagenu a vznášejí se v médiu. Vykazují stejné vlastnosti jako poškozené hepatocyty v suspenzi (neostře rozhraní mezi cytoplazmatickou membránou a médiem atd.). Z kultury je odstraníme při výměně média (Červinková et al., 2002).

Pro posouzení morfologických znaků hepatocytů jsme použili invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem Olympus CK 40 (200x zvětšeno) a záznam jsme provedli pomocí digitálního fotoaparátu Olympus, Camedia 4040.



Obr. 19A

Obr. 19B

Obr. 19C

Obr. 19: Izolované a akultivované hepatocyty. (A) Hepatocyty bezprostředně po izolaci (B) blebující hepatocyty (C) Hepatocyty inkubované na kolagenu typu I po 2 h přichycení

5.7 Izolace mitochondrií

K izolaci mitochondrií jsme použili metody několikanásobné centrifugace v sacharózovém médiu s postupně se zvyšujícím počtem otáček (Schneider a Hogeboom, 1951).

Provedení:

Játra jsme odebírali v éterové narkóze potkana. Břišní část jsme potřeli dezinfekčním roztokem, nástřihem kůže a svaloviny do tvaru písmene V jsme otevřeli dutinu břišní. Viscerální orgány jsme odsunuli k levé straně. Prostřihli jsme *v. cava inferior* a krev pomocí tampónů odsávali. Játra jsme vystřihli z dutiny břišní a opláchli v ledovém fyziologickém roztoku. Z jater jsme odebrali 3 g tkáně a opláchli je v ledovém izolačním H roztoku. Asi v 1 ml H roztoku jsme játra nastříhali na malé kousky a přemístili směs do homogenizační zkumavky. Směs jsme homogenizovali v homogenizátoru s teflonovým pístem. Poté jsme homogenát naředili ledovým H médiem na celkový objem 30 ml. Pokud bylo třeba, odebrali jsme část homogenátu pro měření respirace a stanovení proteinů. Zbylou část jsme přelili do centrifugační zkumavky a centrifugovali (*Rottina 35R*, Hettich) po dobu 4 min při 830 g (2825 RPM) při 4°C. Supernatant jsme opatrně přelili do další zkumavky přes vrstvu gázy a centrifugovali 15 min při 5190 g (7065 RPM) při 4°C. Poté jsme supernatant odlili a sediment resuspendovali v 30 ml ledového H média. Suspenzi jsme centrifugovali 10 minut při 11200 g (10378 RPM) ve 4°C. Opět jsme odlili supernatant, sediment resuspendovali v 15 ml ledového H média a centrifugovali 10 min při 14400 g (11768 RPM) ve 4°C. Poté jsme odlili supernatant a sediment resuspendovali ve 4 ml ledového H média. Suspenzi mitochondrií jsme následně pro další analýzu rozpíjeli do mikrozkušavek. Před použitím suspenze jsme stanovili obsah proteinů Lowryho metodou (1951). Všechny roztoky byly chlazeny v ledové lázni.

Izolační H médium: 40,08 g D-mannitolu, 23,96 g sacharózy, 0,477 g HEPES, 0,5 g BSA rozpustit v 1 l destilované vody, pH 7,2

5.8 Biochemické testy

5.8.1 Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy v supernatantu

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytoplazmatický enzym, který katalyzuje přeměnu kyseliny pyrohroznové v mléčnou oběma směry. V klinické diagnostice se jedná o poměrně málo citlivý ukazatel jaterního poškození, neboť se vyskytuje téměř ve všech tkáních. LDH je tvořena čtyřmi podjednotkami dvou typů, M (muscle) a H (heart). Podle zastoupení jednotlivých podjednotek rozlišujeme pět izoenzymů. V srdci, ledvinách, mozku a erytrocytech mají nejvyšší zastoupení izoenzymy LD₁ a LD₂, zatímco v játrech a kosterním svalstvu převládá izoenzym LD₅.

Pokud stanovujeme aktivitu enzymu v kulturách hepatocytů, jedná se o citlivý ukazatel, neboť laktátdehydrogenáza je uvolněna výhradně z poškozených hepatocytů. Oproti barvení trypanovou modří má tato metoda některé výhody. Odpadá například statistický problém, který je důsledkem hodnocení malého počtu buněk a vzorky pro stanovení LDH lze uchovávat delší dobu (při barvení trypanovou modří by stanovení mělo být ukončeno do 30 min po skončení izolace.) (Berry et al., 1991). Nevýhodou je, že cílové místo poškození mnoha cytotoxických látek je uvnitř buňky a může se stát, že buňka je ireverzibilně poškozena, zatímco plazmatická membrána je stále intaktní (Wyllie et al., 1998). Měření aktivity laktátdehydrogenázy nelze použít jako vstupní údaj o kvalitě čerstvě izolovaných hepatocytů, s úspěchem se však využívá pro hodnocení poškození buněk po delší inkubaci (Berry et al., 1991).

LD

Princip stanovení: $\text{laktát} + \text{NAD}^+ \xrightleftharpoons{\text{LD}} \text{pyruvát} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Rychlost přeměny NAD^+ na NADH se monitoruje fotometricky při 340 nm jako vzrůst absorbance NADH (NADH při 340 nm absorbuje, zatímco NAD^+ nikoliv)

Provedení:

Ke stanovení jsme použili diagnostický kit LD-L (Sigma, proc. No. 228-UV). Reakční činidlo (laktát - 50 mmol/l, NAD - 7 mmol/l, pufr pH 8,9, azid sodný - 5%), jsme dle návodu doplnili deseti ml deionizované vody, přelili do zkumavek, zkumavky jsme umístili do termobloku vyhřátého na 37 °C a krátce inkubovali. Do křemenné kyvety jsme pipetovali 1 ml připraveného činidla a 50 µl média (supernatantu) odebraného po stanovené době inkubace z buněčné kultury, směs jsme promíchali otočením kyvety a měřili absorbanci po 30 s od promíchání (čas t_0) a po 90 s od promíchání (čas t_1). Měření jsme prováděli na UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV - 1601 při vlnové délce $\lambda = 340$ nm proti deionizované vodě (blank).

Na základě **vztahu:**

$$LD(U/L) = \frac{\Delta A \times TV \times 1000}{6.22 \times SV \times l}$$

kde: $\Delta A = A_{t1} - A_{t0}$; TV = celkový reakční objem (1,05); SV = objem vzorku (0,05 ml); l = délka kyvety (1 cm), 6,22 = absorbance 1 mM NADH při 340 nm; 1000 = přepočítání na litr

j jsme vypočetli aktivitu LDH v supernatantu. Aktivitu LDH jsme přepočítali na jednotky SI kat/l (1 U \approx 16,67 nkat)

5.8.2 Stanovení koncentrace malondialdehydu

Kvantifikovat primární produkty lipoperoxidace - hydroperoxydy (viz. obecná část) je obtížné, zejména díky jejich vysoké reaktivitě a nestabilitě. Proto je stanovení míry lipoperoxidace zaměřeno na sekundární oxidační produkty, jako je malondialdehyd (MDA) (Fenaille et al., 2001).

Malondialdehyd je poměrně jednoduchá tříuhlíková sloučenina, která vzniká peroxidací polyneenasycených mastných kyselin (PUFA), především kyseliny arachidonové.

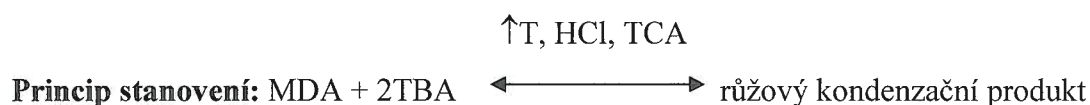


MDA může reagovat s aminoskupinami proteinů a nukleových kyselin a vykazovat tak cytotoxické a mutagenní účinky (Suttnar et al., 1997).

Běžná metoda ke stanovení MDA je založena na spektrofotometrickém měření kondenzačního produktu MDA se dvěma molekulami 2-thiobarbiturové kyseliny (TBA) (Fenaille et al., 2001). Reakce probíhá za vysoké teploty a nízkého pH (Lefevre et al., 1998). Do reakční směsi se může přidat trichloroctová kyselina (TCA), kvůli snížení interference proteinů a neutrálních lipidů (Hong et al., 2000). Reakce je velmi citlivá a provedení jednoduché, ale její specifita i přes vylepšení pre-analytického (extrakce na pevné fázi) a analytického (HPLC se spektrofotometrickou, fluorimetrickou detekcí, GC-MS) je stále předmětem mnoha diskuzí (Lefevre et al., 1998; Suttnar et al., 1997; Liu et al., 1997; Hong et al., 2000).

TBA reaguje s různými složkami buněk včetně kyseliny sialové, prostaglandinů, deoxyribózy a aldehydů a tyto produkty pak interferují se spektrofotometrickým stanovením. Během stanovení může docházet k autooxidaci lipidů. MDA může vznikat i oxidací jiných látek než lipidů a může být metabolizován mitochondriemi neporušených buněk (Hong et al., 2000; Berry, 1991).

I přes problémy se specifitou se díky své relativní nenáročnosti na laboratorní vybavení a citlivosti stále využívá spektrofotometrického stanovení MDA jako ukazatele lipoperoxidace.



Provedení:

Do zkumavky jsme napipetovali 1 ml média odebraného po stanovené době inkubace z buněčné kultury a 1 ml reakčního činidla (vodný roztok kyselin - 15 % TCA; 0,37 % TBA; 0,25 % HCl). Směs ve zkumavkách jsme promíchali na třepačce a na 15 min jsme zkumavky umístili do termobloku vyhřátého na 100 °C. Poté jsme nechali reakční směs vychladnout přibližně na laboratorní teplotu a centrifugovali po dobu 20 minut při 3 000 RPM (1590 g). Na UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV – 1601 jsme změřili absorbanci oproti slepému roztoku (1ml destilované vody + 1 ml reakčního činidla, připravený za stejných podmínek jako vzorky) a na základě kalibrace zjistili koncentrace malondialdehydu ve vzorcích.

5.8.3 Stanovení obsahu GSH a GSSG v hepatocytech a kultivačním médiu

Stanovení obsahu redukovaného a oxidovaného glutathionu uvnitř buněk je jedním ze základních parametrů, který vypovídá o redoxním stavu buňky. V našich podmínkách používáme HPLC analýzu s fluorimetrickou detekcí vycházející z metodiky Hissina a Hilfa (1976).

Provedení:**a) Příprava vzorků**

Z primokultur hepatocytů jsme odebrali kultivační médium. Kultury v PM jsme poté ihned vložili do hlubokomrazicího boxu (-80 °C), kde jsme je ponechali po dobu 15 minut k rozrušení membrán hepatocytů mrazem. Po vyjmutí okamžitě do každé PM napipetujeme 1 ml chladného (4 °C) Krebs-Henseleitova roztoku. Škrabátkem oddělíme mrazem poškozené hepatocyty od kolagenu a výslednou suspenzi napipetujeme do mikrozkuvek a protřepeme ji. 200 µl této suspenze napipetujeme do mikrozkuvky s 400 µl chladné (4°C) 10 % kyseliny metafosforečné (MPA, Sigma-Aldrich) a protřepeme. Necháme inkubovat při 4 °C po dobu 10 min., opět protřepeme a centrifugujeme (13500 g, 4 °C, 10 min.). Z každého vzorku napipetujeme 50 resp. 200 µl supernatantu do mikrozkuvek pro stanovení intracelulárního GSH resp. GSSG a uložíme do -80 °C pro pozdější analýzu.

Příprava vzorků pro měření extracelulárního GSH a GSSH je obdobná, liší se pouze použitím 200 µl kultivačního média namísto 200 µl suspenze zmražených, seškrabaných buněk. Po opakovaném zjištění, že naprostá většina extracelulárního glutathionu je v oxidované formě, stanovujeme v médiu pouze GSSG.

Před vlastní HPLC detekcí redukovaného glutathionu do mikrozkuvek s 50 µl vzorku přidáme 1000 µl fosfátového pufru (1,4g Na₂HPO₄ + 0,2g EDTA v 100 ml

deionizované vody, výsledné pH 8,0) a řádně promícháme. Z této směsi odebereme 20 µl do další mikroskopické kumavky a přidáme 300 µl fosfátového pufru a 20 µl 0,1% o-ftalaldehydu k derivatizaci (OPA, rozpouštěno v methanolu). Následuje promíchání a inkubace po dobu 15 min. při pokojové teplotě ve tmě. Pak je vzorek skladován ve tmě při teplotě 4 °C až do nástřiku na kolonu.

Před detekcí oxidovaného glutathionu do mikroskopické kumavky s 200 µl vzorku přidáme 100 µl 40 mM N-ethylmaleimidu (NEM, Sigma-Aldrich, rozpouštěno v deionizované vodě), řádně promícháme a inkubujeme po dobu 25 min. ve tmě při laboratorní teplotě. Přidání NEM je nutné k zablokování thiolových skupin GSH. Poté ke směsi připipetujeme 750 µl 0,1 M NaOH a opět promícháme. Z této směsi odebereme 20 µl do další mikroskopické kumavky a přidáme 300 µl NaOH a 20 µl 0,1% OPA k derivatizaci. Přítomnost NaOH je nutná pro reakci GSSG s OPA. Další postup je shodný s přípravou pro detekci GSH.

b) Příprava standardů kalibrační křivky

Pro kalibrační křivku GSH připravíme z dodávaného standardu glutathionu (Sigma-Aldrich) roztoky o výsledných koncentracích 0; 5; 10; 25; 50; 100; 250 a 500 µM a pro GSSG 0; 0,5; 1; 5; 10; 50 a 100 µM. Další postup je shodný s přípravou vzorků.

c) Vlastní HPLC analýza na obrácené fázi s fluorimetrickou detekcí a izokratickou separací

Pro přípravu mobilní fáze rozpustíme 3,02 g Na₂HPO₄ v 850 ml deionizované vody a následně přidáme 150 ml methanolu, řádně promícháme a upravíme pH na 6,0. Vzniklý roztok přefiltrujeme přes nylonový filtr (0,20 µm) a odvzdušíme v ultrazvukové vaně (2 x 15min.). K separaci použijeme kolonu Discovery C18 (Supelco, 15 cm x 4 mm, 5 µm) a předkolonu Discovery C18 (Supelco, 2,5 cm x 4 mm, 5 µm). Vlastní měření provádíme na HPLC přístroji Shimadzu (pumpa LC-10ADvp, autosampler SIL-10ADvp, termostat kolon CTO-10ADvp, fluorescenční detektor RF-10Ax1, řídicí jednotka SLC-10ADvp). Průtok stacionární fáze je 0,5 ml/min. při teplotě 37 °C. Používáme fluorescenční detekce o excitační vlnové délce 350 nm a emisní vlnové délce 420 nm. Ke zpracování dat slouží program CSW32 System (DataApex).

5.8.4 Měření mitochondriálního membránového potenciálu

MMP ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) je elektrochemický potenciál, který vzniká na vnitřní mitochondriální membráně v důsledku distribuce H⁺ iontů při neporušené funkci mitochondrií.

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = -2,3RT\Delta pH + F\Delta\psi_m$$

R - univerzální plynová konstanta, T - absolutní teplota, ΔpH - rozdíl pH v matrix a vně mitochondrií, F – Faradayova konstanta, $\Delta\psi_m$ - elektrická složka membránového potenciálu

MMP se neuplatňuje jen při syntéze ATP, ale řídí řadu dalších procesů. Jeho hodnota se pohybuje v rozmezí -120 až -180 mV. Za různých patologických stavů, kdy je narušena funkce mitochondrií, dochází ke ztrátě MMP a depolarizaci mitochondriální membrány. Změny $\Delta\psi_m$ mohou být monitorovány řadou metod. Nejčastěji se využívají lipofilní kationty. Mezi ně patří fluorescenční sondy (Rhodamin 123, jeho tetramethyl ester TMRM, JC-1), radioaktivně značené sondy ($[^{14}C]$ tetrafenylfosfonium) a neznačené sondy (tetrafenylfosfonium (TPP^+), dibenzylidimethylamonium (DDA^+)). Tyto sondy pronikají přes buněčné membrány a rozdělují se mezi buňky/organely a jejich okolí podle Nernstovy rovnice:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{out}}{a_{in}}$$

R - univerzální plynová konstanta, T - absolutní teplota, z - valence, F – Faradayova konstanta, a_{out} – aktivita sondy v médiu, a_{in} – aktivita sondy uvnitř buňky/organely.

5.8.4.1 Hodnocení MMP pomocí akumulace Rhodaminu 123

Rhodamin 123 (Rho 123) je fluorescenční kationová barva, která je v závislosti na MMP akumulována v mitochondriích (Nuydens et al, 1999). Změny v akumulaci rhodaminu 123 odrážejí změny v MMP (Emaus et al, 1986). Nevýhodou Rho 123 je vazba na některé komponenty vnitřní mitochondriální membrány bez závislosti na MMP, což snižuje citlivost stanovení. Navíc hepatocyty v průběhu kultivace zvyšují expresi glykoproteinu P, který aktivně transportuje rhodamin 123 z buněk ven (Hirsch-Ernst et al, 2001). Díky tomu lze tuto metodu použít pouze pro stanovení MMP v suspenzi mitochondrií a hepatocytů nebo v krátkodobých primárních kulturách.

Provedení:

K hepatocytům přichyceným na kolagenované PM přidáme 3 ml 60 nM Rho 123 rozpuštěného v Krebs-Henseleitově médiu bez albuminu a necháme inkubovat (15 min., 37 °C). Poté odsajeme médium do zkumavek a zcentrifugujeme (5 min., 28 g). Pro vytvoření kalibrační křivky byly použity tyto koncentrace Rho123 – 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 nM. V supernatantu měříme fluorescenci na spektrofluorimetru Perkin-Elmer LS50B při excitační vlnové délce 498 nm a emisní vlnové délce 525 nm. Koncentraci Rho 123 v supernatantu

vzorků odečteme z kalibrační křivky. Výsledky pro lepší srovnávání uvádíme v procentech akumulace Rho 123 hepatocyty, přičemž akumulace kontrolními hepatocyty považujeme za 100 %.

5.8.4.2 Hodnocení MMP pomocí akumulace JC-1

Pro vizualizaci MMP jsme použili JC-1 (5,59,6,69-tetramethylbenzimidazol karbokyanin iodide; Molecular Probes). Jedná se o lipofilní kationtovou fluorescenční sondu, která přestupuje plazmatickou membránu buněk a v závislosti na MMP se akumuluje v mitochondriích. JC-1 se vyskytuje ve dvou formách, jednak jako zeleně fluoreskující monomer ($E_{m_{max}} = 595 \text{ nm}$) při nízkém MMP ($< 120 \text{ mV}$) a jednak jako červeně fluoreskující agregát (tzv. „*J-aggregate*“, $E_{m_{max}} = 525 \text{ nm}$) ve vyšších koncentracích při MMP $> 180 \text{ mV}$ (Cossarizza et al., 1993).

Provedení:

Hepatocyty jsou ve tmě inkubovány 15 min. s JC-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) při 37 °C, poté následuje opakované vymytí fluorescenční barvy čerstvým médiem a buňky jsou 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).

5.8.4.3 Hodnocení MMP pomocí akumulace TPP^+

TPP^+ není značená sonda a její koncentrace (inotová aktivita) v médiu může být stanovena s využitím iontově selektivní elektrody. Výhodou je, že změny koncentrace sondy v médiu monitorujeme kontinuálně. Pokud se pracuje s izolovanými organelami můžeme získat hodnoty MMP v mV.

Aparatura pro měření TPP^+

Aparatura byla sestrojena v laboratoři Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK Mgr. Annou Lábajovu. Aparatura se skládá z otevřené měrné komůrky (5 ml) s magnetickým míchadlem, z referenční Ag/AgCl elektrody, z měrné TPP^+ selektivní elektrody a PC s měřicí kartou PCI-6036E (Nat. Inst., USA) s vysokým odporem. Systém je umístěn ve Faradayově kleci kvůli odstínění elektromagnetického pole. Data byla zpracována softwarem MATLAB/Simulink (The MathWorks, Inc., USA). Měření je potenciometrické, za nulové hodnoty proudu.

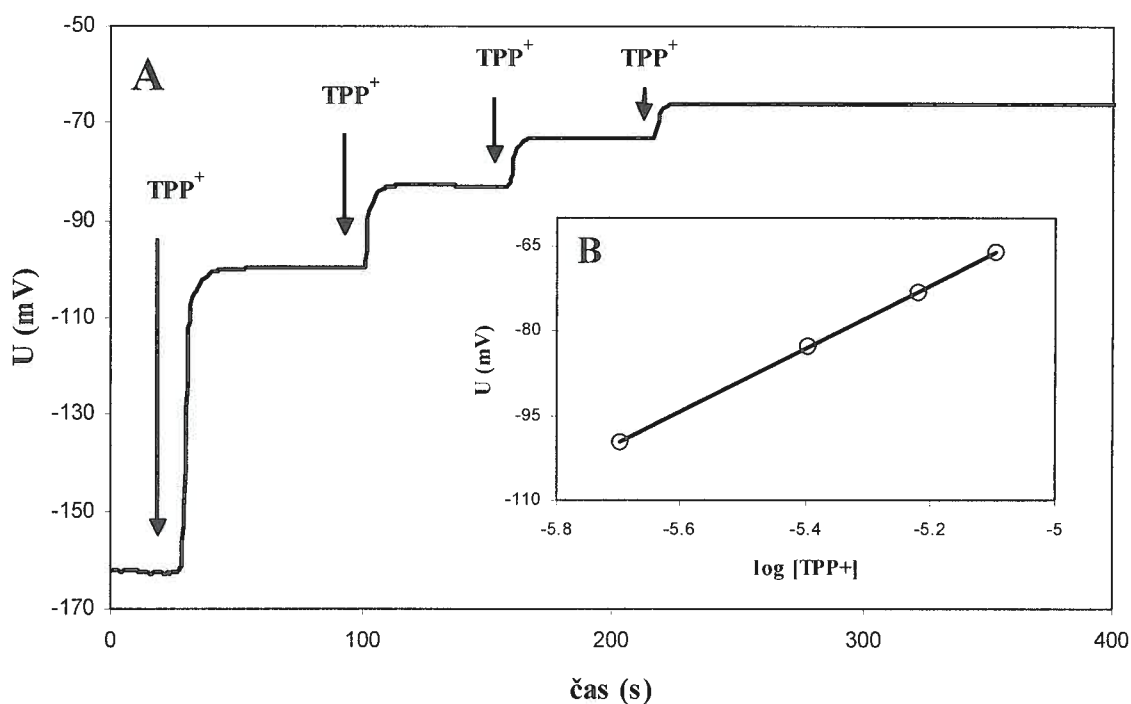
TPP⁺ selektivní elektroda

Ag/AgCl drát v 10 mM TPPCl. Membrána byla připravena dle Kamo et al., 1979 s modifikací dle Shinbo et al., 1978. Membrána obsahuje PVC (Neralit 702, Spolana Neratovice), tetrahydrofuran, dioktylfthalát, precipitát tetrafenylfosfonia a tetrafenylboronu. Její příprava je detailně posána v Lábajová et al., 2006.

Kalibrace

Ke kvantifikaci množství TPP⁺ akumulovaného v mitochondriích je třeba provést kalibraci. Měření jsme prováděli v K-médiu (100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 4 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,4). Toto médium obsahuje K⁺ a svým složením se více blíží intracelulárnímu prostředí, což je důležité, neboť při měření používáme permeabilizované buňky (viz. dále).

Do komůrky jsme napipetovali 2 ml K-média a postupně přidávali 4 μl 1 mM TPP⁺Cl⁻ (4x). Ke kalibraci jsme tedy použili koncentrace TPP⁺ 2, 4, 6 a 8 μmol/l. Hodnoty naměřeného napětí jsme vynášeli proti dekadickému logaritmu koncentrace TPP⁺. Kalibraci je třeba provést před každým měřením.



Graf 1: Kalibrace TPP⁺ elektrody (A) Postupné přidávání TPP⁺ do média do finální koncentrace 2, 4, 6 a 8 μmol/l a odezva TPP⁺ selektivní elektrody, šipky značí přidávek 4 μl 1 mM TPP⁺Cl⁻. **(B)** Odezva elektrody jako funkce logaritmu koncentrace TPP⁺

Vlastní měření MMP izolovaných hepatocytů

Po posledním přidavku TPP^+ (koncentrace $8 \mu\text{M}$ TPP^+) jsme do komůrky napipetovali hepatocyty do finální koncentrace $1,85 \cdot 10^6/\text{ml}$. TPP^+ a respirační substráty procházejí přes plazmatickou membránu poměrně pomalu. Akumulace TPP^+ při práci s celými buňkami navíc kromě MMP závisí také na potenciálu plazmatické membrány. Proto jsme se rozhodli hepatocyty permeabilizovat digitoninem. Digitonin reaguje s membránovým cholesterolem. Plazmatická membrána má největší obsah cholesterolu a při použití vhodné koncentrace digitoninu ji lze permeabilizovat selektivně, bez poškození mitochondriálních membrán. Optimální koncentrace digitoninu se liší v závislosti na typu buňky. Vhodnou koncentraci digitoninu jsme stanovili pomocí oxygrafie a pro hepatocyty v našich podmínkách se pohybuje okolo 20 mg/l (Drahota et al., 2005). Digitonin jsme do měrné komůrky pipetovali ihned po hepatocytech. Dále jsme přidávali respirační substráty [pyruvát (10 mM), malát ($2,5 \text{ mM}$), sukcinát (10 mM)], inhibitory [rotenon ($1 \mu\text{M}$)], terciární butylhydroperoxid (tBHP) event. cyklosporin A, CSA ($2 \mu\text{M}$). Na závěr jsme přidali FCCP ($1 \mu\text{M}$), látku rozpřahující respiraci a fosforylaci a získali jsme minimální hodnotu MMP. Na základě kalibrace jsme hodnoty napětí přepočítali na aktivitu TPP^+ . Změny MMP jsou tedy prezentovány jako změny koncentrace TPP^+ v inkubačním médiu.

5.8.5 Měření bobtnání mitochondrií

Řada vlivů, jako oxidační stres, porušení Ca^{2+} homeostázy atd. může vyvolat zvýšení propustnosti vnitřní mitochondriální membrány pro látky do $1,5 \text{ kDa}$. Zvýšená permeabilita je způsobena otevřením PTP. Následkem delšího otevření póru je depolarizace mitochondrií, rozpřažení respirace a fosforylace a narušení osmotické rovnováhy. Díky zvýšené permeabilitě se osmotická rovnováha stává závislou na vysokomolekulárních látkách, kterých je více v matrix mitochondrií. Mitochondrie nasávají vodu a bobtnají. Jelikož má vnější mitochondriální membrána daleko menší povrch než vnitřní, může dojít k prasknutí mitochondrií a uvolnění různých látek do cytozolu. Výsledkem je buněčná smrt. Složení PTP je stále předmětem debat. Předpokládá se, že součástí póru je ANT vnitřní membrány a VDAC vnější membrány. Řada dalších proteinů může být buď součástí komplexu, nebo ovlivňovat jeho funkci a propustnost. Z těchto proteinů jmenujme cyklofilin D. V řadě případů lze totiž otevření póru zablokovat cyklosporinem A (CSA), který se na cyklofilin D váže. Jednou z metod jak lze otevření PTP póru hodnotit je sledování poklesu absorbance suspenze mitochondrií v důsledku změn jejich objemu (bobtnání) (Nicholls a Ferguson, 2001).

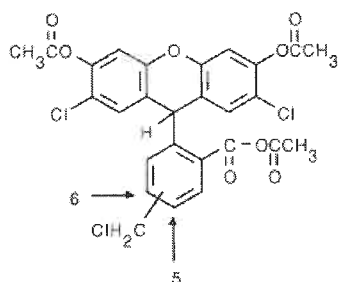
Postup:

Do kyvety spektrofotometru (Shimadzu UV – 1601) jsme napipetovali 1 ml swelling média a nastavili nulovou hodnotu absorbance při 520 nm. Do kyvety jsme poté přidávali po 5 μ l suspenzi mitochondrií, až absorbance dosáhla hodnoty přibližně 1,8. Výsledný objem suspenze mitochondrií jsme pak používali k vlastnímu měření. Do kyvety jsme podle potřeby přidávali sukcinát (10 mM), CaCl_2 (400 μ M), tBHP (3 mM) (Fluka, SUI), CSA (2 μ M).

Swelling médium: 42,79 g sacharózy, 4,585 g KCl, 2,38 g HEPES do 1 l destilované vody, pH 7,2

5.8.6 Měření mitochondriální produkce ROS

Hepatotoxiny ať už primárně nebo sekundárně velmi často vyvolávají oxidační stres. Při oxidačním stresu dochází ke zvýšení hladin ROS a RNS, což má za následek poškození buněk. Mitochondrie jsou považovány za jednoho z nejvýznamnějších producentů ROS v buňce. Pro měření produkce ROS jsou nyní nejčastěji využívány dva přístupy. První z nich je detekce pomocí elektronspinové rezonanční spektroskopie (ESR), což je jediná přímá metoda průkazu ROS. Druhou alternativou je průkaz volných radikálů pomocí specifických fluorescenčních sond (Negre-Salvayre et al., 2002; Setsukinai et al., 2003). Na našem pracovišti jsme zavedli metodu měření ROS pomocí sondy 5-(a 6-)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetátu (CM- H_2 DCFDA). Tato molekula snadno prochází přes biologické membrány do buněk a do organel, kde je intracelulárními esterázami z molekuly odštěpen diacetátový zbytek za vzniku 5-(a 6) chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceinu (CM- H_2 DCF). Chloromethylová skupina reaguje s buněčnými thiolů. Díky tomu sonda zůstává uvnitř buněk resp. organel a nedifunduje ven. CM- H_2 DCF je různými ROS a RNS oxidován na 5-(a 6-)chloromethyl-2',7'-dichlorofluorescein (CM-DCF). CM-DCF je narozdíl od předchozích derivátů fluorescenční látka a intezita její fluorescence je úměrná produkci ROS a RNS. CM- H_2 DCF je přímo oxidován NO , OH a ONOO^- (LeBel et al., 1992, Kooy et al., 1997). H_2O_2 a O^{2-} nereagují s CM- H_2 DCF přímo, ale prostřednictvím peroxy- produktů a peroxylového radikálu, jejichž vznik po reakci s buněčnými složkami katalyzují (Kooy et al., 1997). Jelikož CM- H_2 DCF nereaguje specificky s konkrétním ROS resp. RNS je využíván k hodnocení celkové produkce ROS a RNS.



Obr. 20: 5-(a 6-) chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (CM-H₂DCFDA)

Provedení:

Vzorek izolovaných potkaních jaterních mitochondrií jsme naředili K-médiem (100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 4 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,4) na koncentraci 1,5 mg proteinu/ml. Do jamek mikrotitrační destičky (24NUNC) jsme pipetovali 100 µl mitochondrií (150 µg proteinu/ ml) + 500 µl K- média s nebo bez tBHP (Fluka) a SAME (Abbott) v příslušných koncentracích + 400 µl CM-H₂DCFDA (Molecular Probes) v koncentraci 1 µmol/l DMSO. Slepý vzorek (blank) obsahoval všechny komponenty kromě mitochondrií. Destičku jsme umístili do Spektrofluorimetru (Tecan, Infinite M200) a po dobu 1 hodiny každých 5 minut měřili intenzitu fluorescence ($\lambda(\text{em})/\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm} / 535 \text{ nm}$).

5.8.7 Měření spotřeby kyslíku pomocí vysokoúčinné respirometrie

Aktivitu enzymových komplexů dýchacího řetězce jsme hodnotili pomocí respirometrie. Principem této metody je měření úbytku kyslíku v uzavřené komůrce v důsledku konzumpce O₂ biologickým materiálem. Vhodným kombinováním různých substrátů, rozpřahovačů a specifických inhibitorů můžeme hodnotit jednotlivé respirační komplexy i funkce (index respirační kontroly, intenzitu tvorby ATP, integritu vnější a vnitřní mitochondriální membrány) (Červinková et al., 2002; Barrientos, 2002). Koncentrace kyslíku je měřena Clarkovou kyslíkovou elektrodou. Potřeba práce s malými kvanty buněk či tkáňových fragmentů, analýza patologických stavů vycházejících ze snížené respirace a měření při nízkém intracelulárním parciálním tlaku kyslíku vedla k vývoji nové generace oxygrafů, mezi něž patří i Oxygraph OROBOROS-2k, Austria. Tento oxygraf představuje instrumentální základ pro vysokoúčinnou respiometrii. Oxygraf OROBOROS-2k se vyznačuje vysokou citlivostí a stabilitou. Díky těmto vlastnostem lze měřit i velmi malé změny koncentrace O₂. Vysoké stability a citlivosti je dosaženo kombinací různých konstrukčních prvků (vhodný materiál, optimální tloušťka membrány, udržování konstantní teploty a konstantní rychlost míchání, umístění POS atd.) (Gnaiger 2001; Gnaiger a Kuznetsov, 2002; Hutter et al., 2006). Dříve se k hodnocení respirace využívala závislost

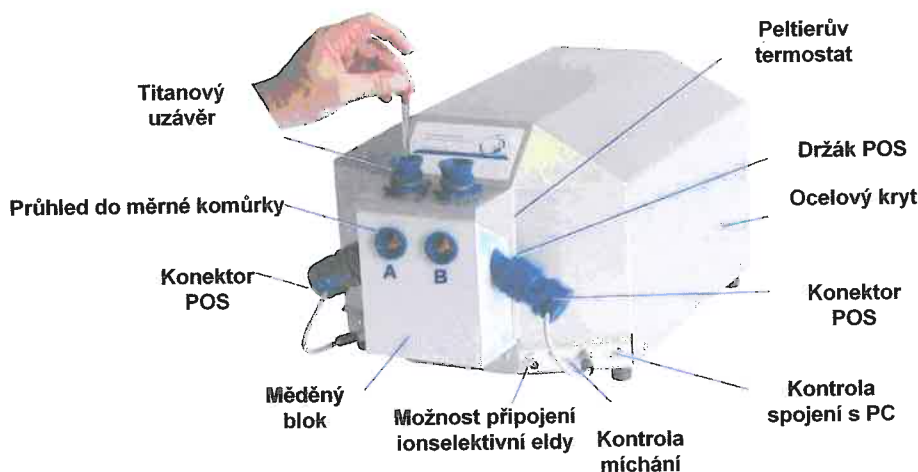
koncentrace kyslíku na čase (oxygrafie). OROBOROS-2k je vybaven softwarem (Datlab), který umožňuje on-line přepočítání koncentrace kyslíku na spotřebu kyslíku v čase, neboli flux (první negativní časová derivace koncentrace kyslíku) (graf 1). Ideálně je snížení koncentrace kyslíku v uzavřené respirační komůrce způsobeno jen díky spotřebě kyslíku biologickým materiálem. Toho je velmi těžké dosáhnout, neboť nikdy nemáme ideálně uzavřený systém a kyslík z okolí vždy bude difundovat do média. To je problém zejména při měření za nízké koncentrace kyslíku, kdy difúze O_2 z okolí roste (Hutter et al., 2006). Reakce na elektrodě přispívají rovněž ke konzumaci kyslíku. Design a použité materiály minimalizují u Oroborosu-2k zpětnou difúzi a spotřebu kyslíku elektrodou. Software rovněž umožňuje on-line korekci na toto pozadí. OROBOROS-2k je dvoukomorový titračně-injekční respirometr. Dvě měrné skleněné komůrky o objemu 2ml jsou umístěny v termostatovaném měděném bloku. Komůrky se uzavírají speciálně konstruovaným titanovým uzávěrem s injekční kapilárou. Uzavření komůrky brání volné difúzi kyslíku z okolního vzduchu a injekční kapilára umožňuje dávkování biol. materiálu, substrátů a inhibitorů. Vzorky se dávkuje Hamiltonovou pipetou. V komůrce je umístěn polarografický senzor (POS) a elektromagnetické míchadlo, které zajišťuje konstantní difúzi O_2 k polarografickému senzoru. POS je v podstatě Clarkova kyslíková sonda. Platinová měrná katoda ve formě disku a referenční argentschloridová anoda ve formě prstence jsou odděleny od analyzovaného roztoku semipermeabilní membránou, jež zabraňuje přístupu zejména adsorptivních látek na elektrody a propouští O_2 . Mezi membránou a elektrodami je tenká vrstva elektrolytu (1 M KCl). Mezi anodu a katodu je vložen konstantní malý potenciál (0,6 V). Na katodě dochází k redukci kyslíku na vodu a na anodě k oxidaci stříbra na AgCl. Vzniklý proud je kontinuálně monitorován a je přímo úměrný koncentraci O_2 v měrné komůrce. Komůrka je osvětlena a přidávek vzorků můžeme kontrolovat přes průhled.

Kalibrace:

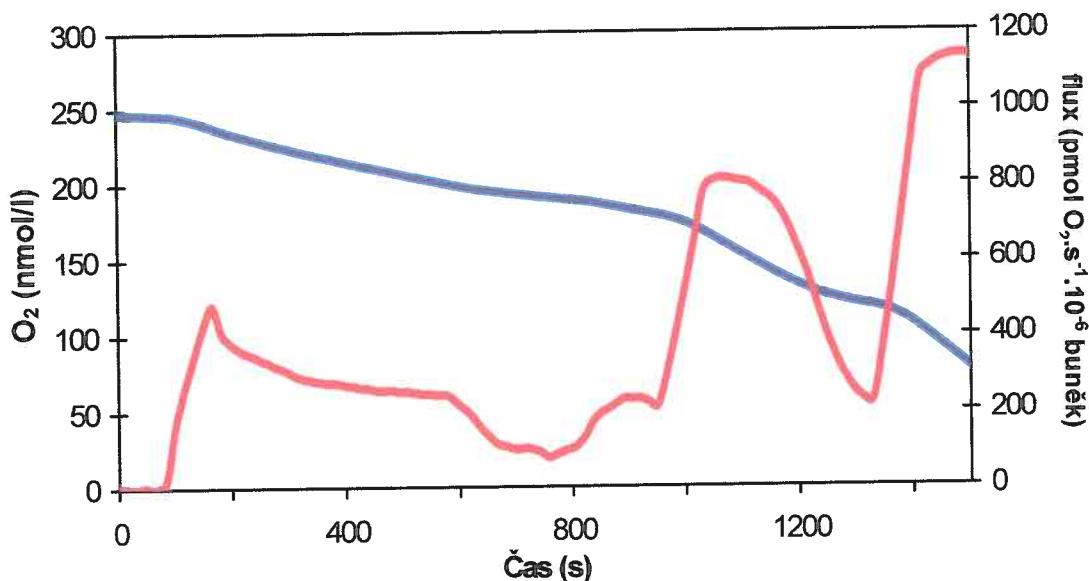
Před vlastním experimentem je třeba provést dvoubodovou kalibraci POS. K tomu potřebujeme znát signál POS pro 100% saturaci média kyslíkem (tzn. při saturaci vzdušným kyslíkem) a pro nulovou koncentraci kyslíku v komůrce, teplotu, barometrický tlak, nastavenou citlivost signálu, rychlost míchání a rozpustnost kyslíku v daném médiu. Do komůrky napipetujeme čisté médium, které za konstantního míchání necháme v kontaktu se vzdušnou fází. Nulovou koncentraci obvykle zjistíme, pokud necháme buňky event. mitochondrie v uzavřené komůrce vydýchat veškerý kyslík. Kalibraci provádíme pomocí softwaru, který zároveň automaticky odečítá teplotu a tlak.

Provedení:

Při vlastním experimentu jsme do komůrky napipetovali 2,1 ml K-média a provedli kalibraci pro 100% saturaci. Komůrku jsme uzavřeli titanovým uzávěrem. Poté jsme nechali ustálit signál a pomocí Hamiltonovy pipety přes kapiláru uzávěru přidali hepatocyty ($0,25 \cdot 10^6$ buněk/ml) event. izolované mitochondrie (0,05 mg prot./ml) či jaterní homogenát (1 mg prot./ml). Izolované hepatocyty jsme permeabilizovali přidavkem digitoninu (20 $\mu\text{g/ml}$) do komůrky. Dále jsme pipetovali respirační substráty a inhibitory. Přidáním substrátů oxidovaných NADH-dependentními dehydrogenázami [malát (2,5 mM), glutamát (10 mM)] můžeme testovat funkci komplexu I a po přidání ADP (1 mM) hodnotit index respirační kontroly. Aktivitu komplexu I můžeme inhibovat specifickým inhibitorem (1 μM rotenon). Po inhibici komplexu I lze přidat flavoproteinové substráty (10 mM sukcinát) a měřit rychlost jejich oxidace po aktivaci ADP. Aktivace respirace NADH- a flavoprotein-dependentních substrátů přidáním ADP je přímým indikátorem funkce ATP-syntázy. Přidavkem cytochrómu c (20 μM) lze hodnotit integritu mitochondriálních membrán. Data jsou zpracována pomocí softwaru Datlab 3 a Datlab 4. Hodnoty jsou prezentovány jako 1. negativní derivace koncentrace kyslíku v čase na množství biologického materiálu ($\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot 10^{-6}$ buněk resp. $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinu).



Obr. 21: Oxygraf OROBOROS-2k



Graf 2: Výstup z oxygrafu OROBOROS-2k. Modrá čára značí koncentraci kyslíku, červená je flux – první negativní časová derivace koncentrace kyslíku v tomto případě přepočtena na množství biologického materiálu.

5.9 Statistické zpracování výsledků

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 (GraphPad Software) a k vytvoření grafů byl použit MS Excel (Microsoft). Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se směrodatnými odchylkami. Hladina statistické významnosti $\alpha = 0,05$.

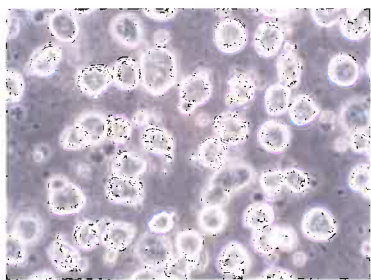
6 VÝSLEDKY

6.1 Efekt terciálního butylhydroperoxidu na izolované potkaní hepatocyty

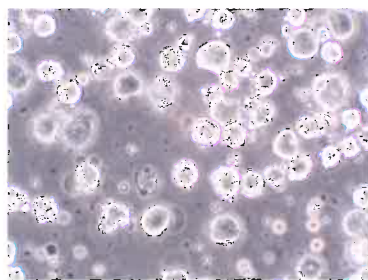
Oxidační stres je jedním z nejvýznamnějších mechanismů účinku hepatotoxinů. Ačkoliv je oxidační poškození dnes velmi intenzivně studováno, přesný mechanismus ještě není zcela objasněn. Terciální butylhydroperoxid není specifický hepatotoxin. Používá se k navození oxidačního stresu u různých typů buněk včetně hepatocytů. Narozdíl od peroxidu vodíku tBHP není degradován katalázou. Práce navazuje na výsledky studie naší skupiny, ve které jsme model poškození hepatocytů *in vitro* zaváděli (Kučera, 2005). Cílem práce bylo soustředit se na studium energetického metabolismu a porovnání účinku tBHP na hepatocyty v suspenzi, v buněčné kultuře, izolované jaterní mitochondrie eventuálně jaterní homogenát. V další části jsme využili tento model pro studium potenciálního hepatoprotektivního účinku s-adenosylmethioninu.

6.1.1 Morfologické změny hepatocytů po působení tBHP

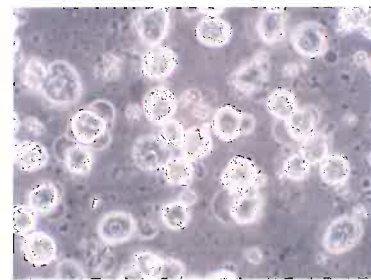
Vzhledem k poměrně rychlému působení tBHP je možné studovat jeho účinek i na suspenzi hepatocytů, jejíž životnost je omezena na dobu několika hodin. Hepatocyty v suspenzi mají kulatý nebo oválný tvar (obr. 22). Neporušené hepatocyty vykazují vysoký kontrast mezi buňkou a okolním médiem, mají jasně zřetelnou jadernou membránu, nízký stupeň granulace cytoplazmy a ostře viditelné jádro s jadérky (Berry et al, 1991). Hepatocyty v suspenzi nevytvářejí buněčné kontakty, které jsou pro tyto buňky velmi důležité. Během izolace prodělávají „stres“ a dochází k částečnému poškození. Na obrázku 22A jsou hepatocyty bezprostředně po izolaci naředěné v Krebs-Henseleitově médiu na 1.10^6 buněk/ml. V této suspenzi vidíme jednak hepatocyty neporušené, tak i menší množství hepatocytů s granulovanou cytoplazmou a s porušenou integritou cytoplazmatické membrány (vytváření blebů). Obdobně je tomu i u hepatocytů inkubovaných v K-H médiu při 37°C (5%CO₂) po dobu 30 minut (Obr. 22B). Stejně byly inkubovány i hepatocyty na obr. 22C, médium však navíc obsahovalo 1,5 mM tBHP. Vlivem tBHP došlo ke zvýšení počtu poškozených hepatocytů. Hepatocyty jsou výrazně granulované, vytvářejí bleby, nemají jasně ohraničené jádro a nejsou vidět jadérka.



Obr. 22A



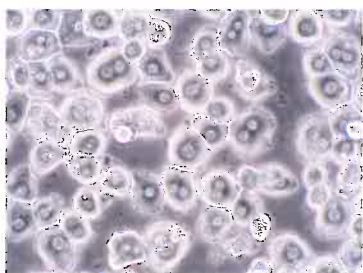
Obr. 22B



Obr. 22C

Obr. 22: Mikrofotografie izolovaných potkaních hepatocytů v suspenzi. Obrázky byly pořízeny fázovým kontrastem (zvětšení 200x). (A) je kontrolní suspenze hepatocytů v čase 0 minut (B) kontrolní suspenze hepatocytů v čase 30 minut (C) suspenze hepatocytů inkubovaná s 1,5 mM tBHP po dobu 30 minut.

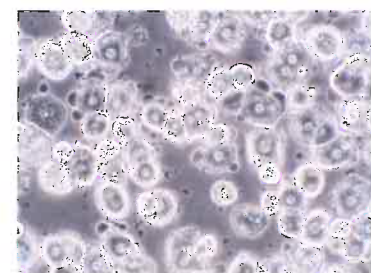
Pro zachování specifických funkcí a viability jsou pro izolované hepatocyty nutné kontakty s různými substráty a rovněž se sousedními buňkami (Berry et al, 1991). V primokulturách dochází během několika hodin k obnovení polygonálního tvaru hepatocytů. Neporušené hepatocyty se ke kolagenu přichycují rychleji než částečně poškozené buňky. Narozdíl od suspenzí zde můžeme snadněji eliminovat hepatocyty poškozené během izolačního procesu. Na obr. 23A jsou hepatocyty po výměně média, která následovala po 2 hodinové inkubaci (37°C, 5% CO₂) nutné pro přichycení ke kolagenu. Buňky mají polygonální tvar, neporušenou plazmatickou membránu, nízce granulovanou cytoplazmu, ostře ohraničené jádro s několika jádřky a vytvářejí mezibuněčné kontakty. Častá je i přítomnost polyploidních buněk. Na obrázku 23B jsou hepatocyty inkubované po výměně média po dobu 30 minut při 37°C, 5 %CO₂. Buňky zde vypadají obdobně jako na obrázku 23A. K hepatocytům na obr. 23C byl navíc přidán 1,5 mM tBHP (30 min, 37°C, 5 %CO₂). Tyto buňky mají porušenou integritu cytoplazmatické membrány, zvyšuje se u nich stupeň granulace cytoplazmy, jádro kondenzuje, přestávají být viditelná jádřka, hepatocyty se zakulacují a odlučují od podkladu.



Obr. 23A



Obr. 23B



Obr. 23C

Obr. 23: Mikrofotografie izolovaných potkaních hepatocytů inkubovaných v primokulturách na kolagenu typu I. (A) jsou hepatocyty ihned po výměně média po přichycení (B) kontrolní hepatocyty po 30 minutách (C) hepatocyty inkubované 30 min s 1,5 mM tBHP

Vzhledem ke skutečnosti, že v suspenzi nedochází k tvorbě mezibuněčných kontaktů a k vytváření polarity hepatocytů na biliární a krevní pól, chovají se odlišně od hepatocytů v primokultuře. Jak již bylo zmíněno výše, u primárních kultur lze snadněji eliminovat buňky částečně poškozené vlivem izolačního procesu. Snadnější je rovněž výměna média. V naší předchozí studii jsme zjistili, že u kontrolních hepatocytů (rozuměj hepatocytů neovlivněných toxickou látkou) inkubovaných v suspenzi, byla v médiu aktivita LDH asi pětkrát vyšší než u hepatocytů inkubovaných za stejných podmínek v primokultuře (Kučera, 2005). To svědčí o přítomnosti vyššího počtu poškozených buněk. Pro hodnocení efektu tBHP jsme proto zvolili primokultury hepatocytů.

I přes jisté nevýhody jsou suspenze hepatocytů častým a nenahraditelným modelovým systémem pro studium některých dějů, např. měření respirace pomocí oxygrafie nebo hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu s využitím TPP⁺.

Pro hodnocení energetického metabolismu se kromě suspenze buněk často využívají izolované mitochondrie a tkáňové homogenáty. Efekt tBHP na respiraci jsme proto hodnotili a porovnávali u všech třech zmíněných modelů.

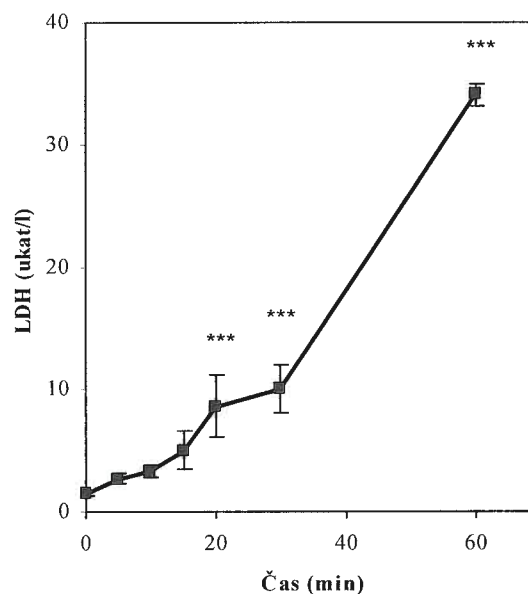
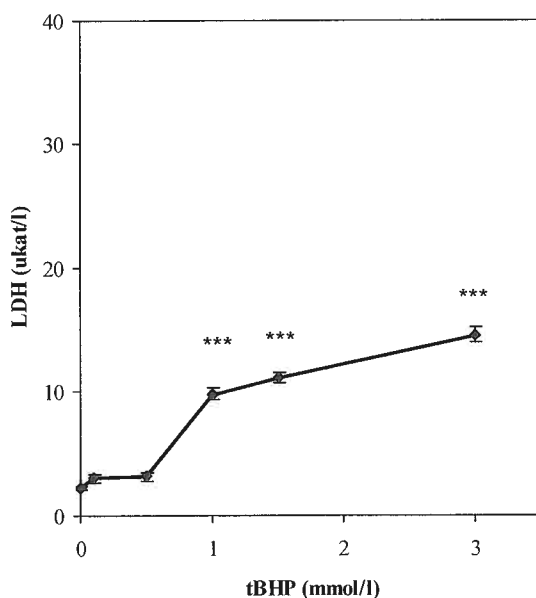
6.1.2 Vliv tBHP na aktivitu LDH v médiu primární kultury hepatocytů

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytoplazmatický enzym, který je při poškození plazmatické membrány uvolňován z buněk. Využívá se tedy jako poměrně citlivý ukazatel míry poškození plazmatické membrány.

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 (37°C, 5 % CO₂). Poté bylo médium odebráno a použito jednak k měření aktivity LDH a také k měření koncentrace MDA (viz. dále). Jak je vidět na grafu 3A při použití 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 (p<0,001). Nejdramatičtější nárůst aktivity LDH v médiu tedy 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 (graf 3B). Během prvních 15 minut inkubace s 1,5 mM tBHP nedošlo k signifikantnímu nárůstu aktivity LDH v médiu. Signifikantní nárůst (p< 0,001) 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 (37°C, 5% CO₂) a délka inkubace neměla statisticky významný vliv na únik LDH do média.



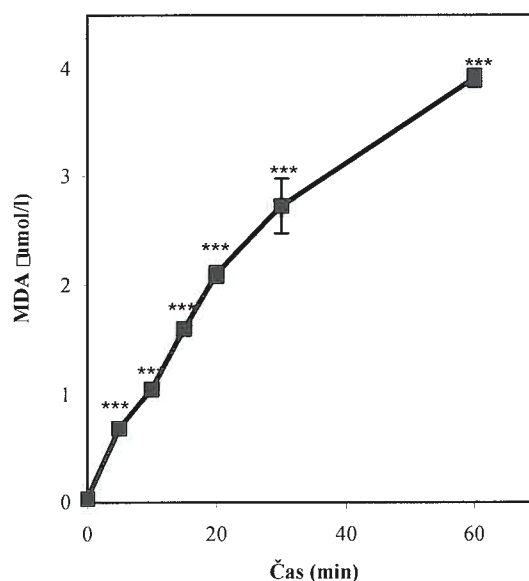
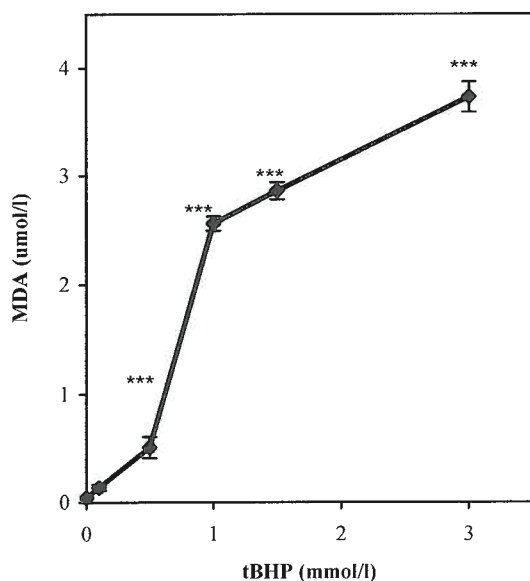
Graf 3A

Graf 3B

Graf 3: Vliv tBHP na aktivitu LDH v médiu hepatocytů. (A) koncentrační závislost (tBHP 0,1 – 3 mM, 30 min) (B) časová závislost (tBHP 1,5 mM, 5 – 60 min) (n = 6, ***p < 0,001 vs kontroly).

6.1.3 Vliv tBHP na lipoperoxidace v primární kultuře hepatocytů

Malondialdehyd vzniká peroxidací polynenasycených mastných kyselin. Změny koncentrace MDA slouží jako ukazatel lipoperoxidace. Stejně jako při měření aktivity LDH jsme hodnotili 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 (37°C, 5 % CO₂) (graf 4A). K signifikantnímu nárůstu lipoperoxidace (p < 0,001) 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 (p < 0,001) zvýšení lipoperoxidace, kdy koncentrace MDA mezi 0 – 30 minutami rostla téměř lineárně (R²=0,9856). V intervalu mezi 30 a 60 minutami se nárůst koncentrace MDA zmírnil (graf 4B).



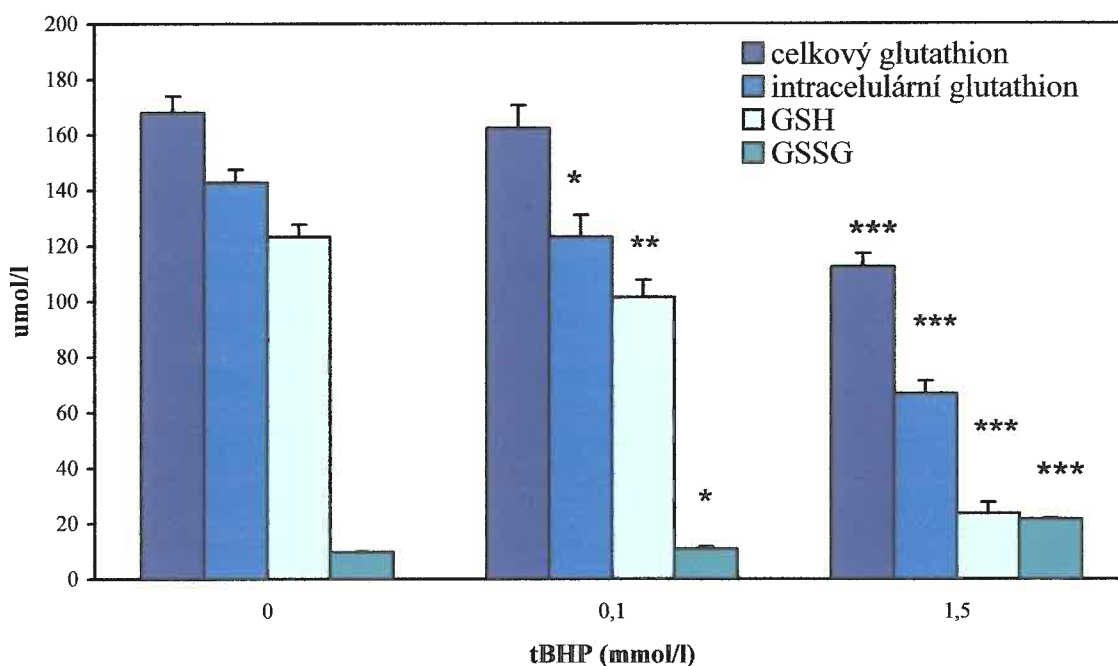
Graf 4A

Graf 4B

Graf 4: Vliv tBHP na koncentraci MDA v médiu hepatocytů (A) koncentrační závislost (tBHP 0,1 – 3 mM, 30 min) (B) časová závislost (tBHP 1,5 mM, 5 – 60 min) (n = 6, *p < 0,001 vs kontroly).**

6.1.4 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. Za fyziologických podmínek se v buňce nachází více než 99 % glutathionu ve formě GSH. Za různých patologických stavů se tento poměr velmi dramaticky mění ve prospěch GSSG. Při 30minutové inkubaci hepatocytů s tBHP (graf 5) došlo již při použití velmi nízké koncentrace tBHP (0,1 mM) k poklesu GSH asi na 80 % původních hodnot ($p < 0,01$). Při inkubaci s 1,5 mM tBHP byl pokles ještě výraznější (20 %, $p < 0,001$). Intracelulární koncentrace GSSG v obou případech vzrostla. Inkubace hepatocytů s tBHP měla v obou případech za následek signifikantní snížení intracelulárního obsahu celkového glutathionu [$p < 0,05$ (tBHP 0,1 mM), $p < 0,001$ (tBHP 1,5 mM)]. 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).



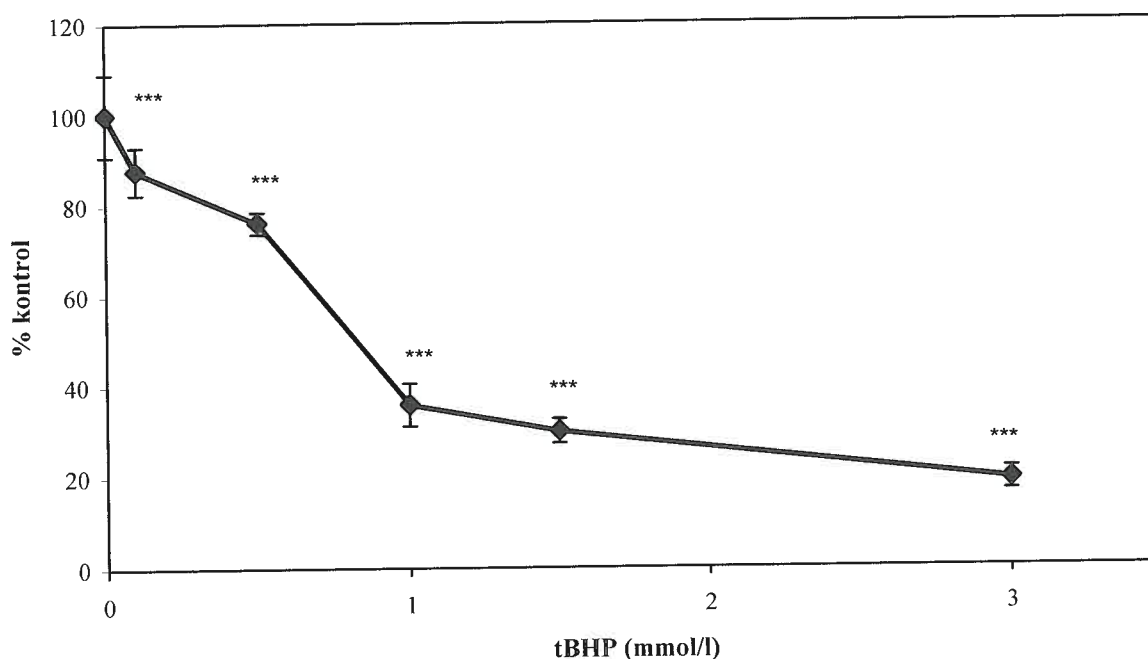
Graf 5: Vliv tBHP na obsah celkového (extracelulárního + intracelulárního), celkového intracelulárního glutathionu a intracelulárního GSH a GSSG hepatocytů v primokultuře. Byly testovány koncentrace tBHP 0,1 a 1,5 mmol/l po dobu 30 min. (n = 3, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs kontroly).

6.1.5 Vliv tBHP na akumulaci Rho 123 hepatocytů v primární kultuře

Častým cílem poškození oxidačním stresem jsou membrány, včetně membrán mitochondrií. To může mít za následek kolaps membránového potenciálu. Zachování mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\mu\text{H}^+$) je pro hepatocyty velmi důležité. $\Delta\mu\text{H}^+$ Je využíván pro syntézu ATP, řídí mitochondriální transport, ovlivňuje homeostázu Ca^{2+} , produkci ROS a buněčnou smrt. Pro stanovení $\Delta\mu\text{H}^+$ se nejčastěji využívají kationtové lipofilní fluorescenční sondy. Rhodamin 123 byl jednou z prvních fluorescenčních sond, které byly použity pro měření $\Delta\mu\text{H}^+$ (Johnson et al., 1980). Změny v akumulaci rhodaminu 123 odrážejí změny v $\Delta\mu\text{H}^+$. Nevýhodou Rho 123 je vazba na některé komponenty vnitřní mitochondriální membrány bez závislosti na $\Delta\mu\text{H}^+$, což poněkud snižuje citlivost stanovení. Nespecifickou vazbu je třeba odečíst.

Hodnotili jsme vliv tBHP (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; a 3 mM; 30 min) na schopnost akumulace Rho 123 hepatocytů v primokultuře (graf 6). 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 ($p < 0,001$) $\Delta\mu\text{H}^+$. 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. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech, přičemž za 100 % je považováno množství Rho 123 akumulovaného kontrolními hepatocyty.

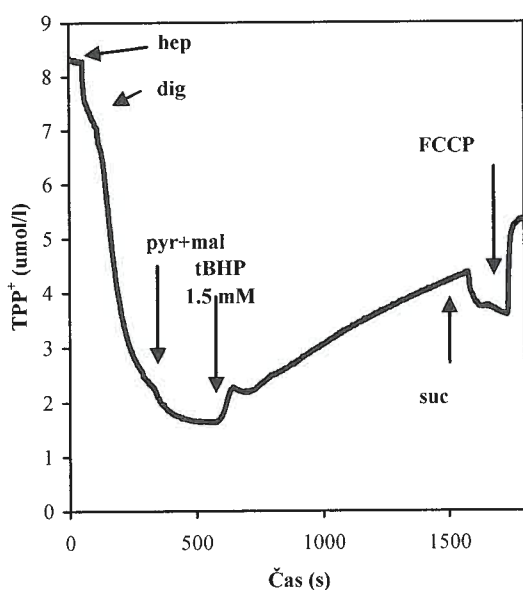


Graf 6: Vliv koncentrace tBHP na akumulaci Rho 123 hepatocyty v primární kultuře při 30 minutové inkubaci (n = 6, ***p < 0,001 vs kontroly).

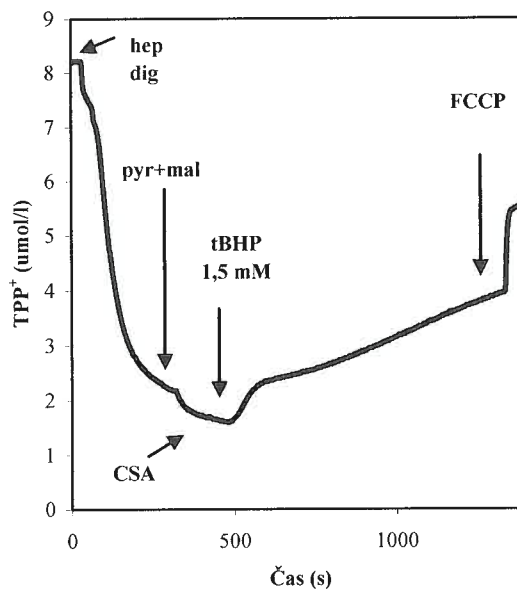
6.1.6 Vliv tBHP na akumulaci TPP⁺ hepatocyty v suspenzi permeabilizovaných digitoninem

K detailnějšímu posouzení mitochondriálního membránového potenciálu jsme využili akumulaci TPP⁺. TPP⁺ je rovněž lipofilní kationt, který se podobně jako Rho 123 v závislosti na $\Delta\mu\text{H}^+$ hromadí v mitochondriích. TPP⁺ není fluorescenční sonda a jeho koncentraci v médiu jsme měřili pomocí iontově selektivní elektrody. Výhodou této metody je, že změny $\Delta\mu\text{H}^+$ můžeme sledovat kontinuálně. Z důvodů pomalého průchodu TPP⁺ a respiračních substrátů přes plazmatickou membránu jsme buňky permeabilizovali pomocí detergentu digitoninu. Digitonin reaguje s cholesterolem v membránách. Při použití vhodné koncentrace digitoninu, můžeme buňky selektivně permeabilizovat, neboť množství cholesterolu v membránách klesá v pořadí: plazmatická membrána > vnější mitochondriální membrána > vnitřní mitochondriální membrána (Ronning et al., 1982). Koncentrace digitoninu pro permeabilizaci plazmatické membrány se liší v závislosti na typu buňky. Při použití optimální

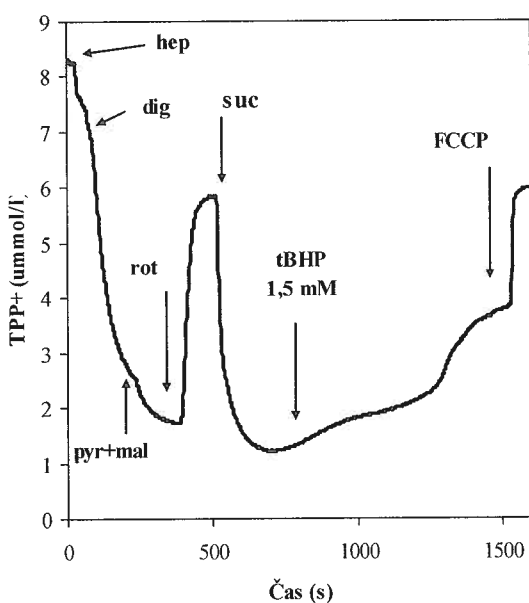
koncentrace zůstávají mitochondriální membrány intaktní. Optimální koncentraci digitoninu v našem experimentálním systému jsme stanovili pomocí oxygrafie (viz. dále) a pohybovala se okolo 20 $\mu\text{g/ml}$ média. Z důvodů permeabilizace jsme měření prováděli v K médium (viz. metodiky) s obsahem K^+ , které se svým složením více blíží intracelulárnímu prostředí. Jak lze vidět v první části křivky na grafu 7A, koncentrace TPP^+ v médiu se snížila po permeabilizaci digitoninem díky akumulaci v mitochondriích. Přídavkem pyruvátu a malátu (substrátů respiračního komplexu I) dochází k další energizaci mitochondrií. Tert-butylhydroperoxid způsobil uvolnění TPP^+ z mitochondrií do média a tedy pokles $\Delta\mu\text{H}^+$ ($\Delta\mu\text{H}^+$ se stal méně negativní). Přídavek sukcinátu (substrátu komplexu II) ještě nepatrně koncentraci TPP^+ v médiu snížil. Po přidání látky rozpřahující oxidační fosforylaci, FCCP jsme získali minimální hodnotu $\Delta\mu\text{H}^+$. Přídavek Cyklosporinu A (CSA), inhibitoru nescifického póru ve vnitřní mitochondriální membráně, neovlivnil pokles $\Delta\mu\text{H}^+$ vyvolaný tBHP (graf 7B). Když jsme po pyruvátu a malátu přidali do inkubační komůrky rotenon (specifický inhibitor komplexu I) došlo k prudkému poklesu $\Delta\mu\text{H}^+$ a k úniku TPP^+ do média (graf 7C). Přídavek Sukcinátu znovu akumulaci TPP^+ v mitochondriích zvýšil. Po přidavku tBHP (1,5 mM) došlo opět ke snížení $\Delta\mu\text{H}^+$. 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) (graf 7D).



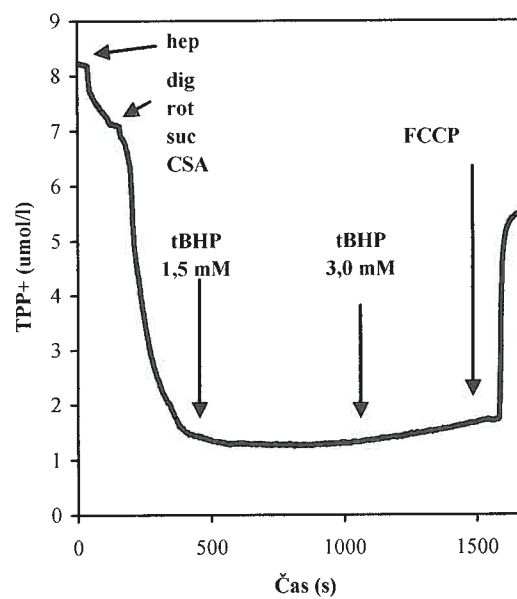
Graf 7A



Graf 7B



Graf 7C

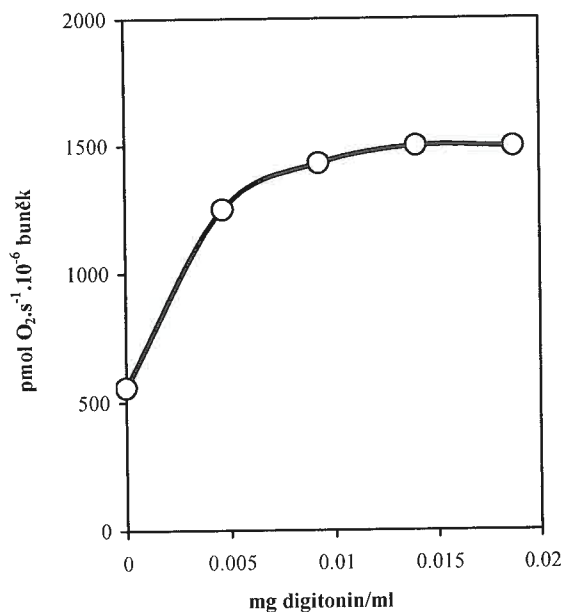
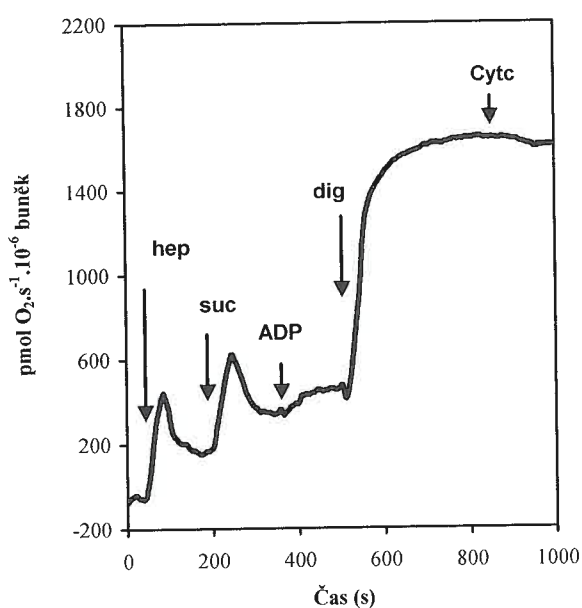


Graf 7D

Graf 7: Změny akumulace TPP⁺ permeabilizovanými hepatocyty vlivem t-BHP. Šipky značí aplikace komponent systému: (A) 1,85 ml/ml hepatocytů (hep), 20 μg/ml digitonin (dig), 10 mM pyruvát (pyr), 2,5 mM malát (mal), 1,5 mM t-BHP, 1 μM FCCP; (B) 1,85 ml/ml hepatocytů (hep), 20 μg/ml digitonin (dig), 10 mM pyruvát (pyr), 2,5 mM malát (mal), 2 μM cyklosporin (CSA), 1,5 mM t-BHP, 1 μM FCCP; (C) 1,85 ml/ml hepatocytů, 20 μg/ml digitonin, 10 mM pyruvát, 2,5 mM malát, 1 μM rotenon, 10 mM sukcinát (suc), 1,5 mM t-BHP, 1 μM FCCP; (D) 1,85 ml/ml hepatocytů, 1 μM rotenon, 20 μg/ml digitonin, 10 mM sukcinát, 2 μM cyklosporin (CSA), 1,5 mM t-BHP, 3 mM t-BHP, 2 μM FCCP.

6.1.7 Vliv tBHP na respiraci hepatocytů v suspenzi permeabilizovaných digitoninem

Mitochondriální membránový potenciál je tvořen v důsledku průchodu elektronů respiračním řetězcem. Energií, která se během tohoto procesu uvolňuje, využívají respirační komplexy I, III a IV k přenosu H^+ přes vnitřní mitochondriální membránu. Protože vnitřní mitochondriální membrána je za normálních okolností pro protony velmi málo propustná, vzniká $\Delta\mu H^+$. Elektrony uvolněné během oxidace živin vstupují do respiračního řetězce přes respirační komplex I a II a některé další dehydrogenázy (glycerofosfát dehydrogenáza, ETF). Všechny tyto enzymové komplexy předávají elektrony na koenzym Q. Elektrony pak dále procházejí dýchacím řetězcem a nakonec reagují s kyslíkem za vzniku vody. Protože je známo, že oxidační stres ovlivňuje funkci mitochondrií a ničí $\Delta\mu H^+$, zajímal nás vliv tBHP na respiraci. Jak již bylo řečeno výše, z důvodů pomalé prostupnosti respiračních substrátů přes plazmatickou membránu byly hepatocyty permeabilizovány digitoninem. Digitonin reaguje s membránovým cholesterolem. Aby byla plazmatická membrána dostatečně permeabilizovaná a zároveň nedošlo k poškození mitochondriálních membrán, je třeba stanovit optimální koncentraci digitoninu. Postup testování optimální koncentrace digitoninu je znázorněn na grafu 8A. Měření jsme prováděli v K médiu. Po přidavku hepatocytů do komůrky oxygrafu roste spotřeba kyslíku následkem endogenní respirace hepatocytů. Po přidavku sukcinátu a ADP respirace vzrostla jen nepatrně, díky pomalé propustnosti substrátů přes plazmatickou membránu. Přídavek digitoninu (20 $\mu\text{g/ml}$) výrazně zvýšil spotřebu kyslíku hepatocyty. Neporušenost mitochondriálních membrán jsme ověřovali pomocí přidavku cytochrómu c. Cytochróm c se nachází v mezimembránovém prostoru a je asociován s kardiolipinem a dalšími lipidy vnitřní mitochondriální membrány. Za normálních okolností je vnější mitochondriální membrána pro cytochróm c nepropustná. Pokud by došlo k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, nastalo by uvolnění cytochrómu c do média a pokles respirace. Přídavek exogenního cytochrómu c by pak respiraci aktivoval, což se v našem případě nestalo. Tato metoda se využívá i ke kontrole kvality mitochondrií po izolaci. Testovali jsme digitonin v koncentracích 5, 10, 15 a 20 $\mu\text{g/ml}$. Při použití koncentrace digitoninu nižší než 10 $\mu\text{g/ml}$ nedošlo k maximální aktivaci respirace. Maximální aktivace respirace nastala v koncentračním rozmezí 10 – 20 $\mu\text{g/ml}$ (graf 8B). Integrita vnější mitochondriální membrány zůstala zachována u všech testovaných koncentrací, což bylo potvrzeno přidavkem cytochrómu c (graf 8A).



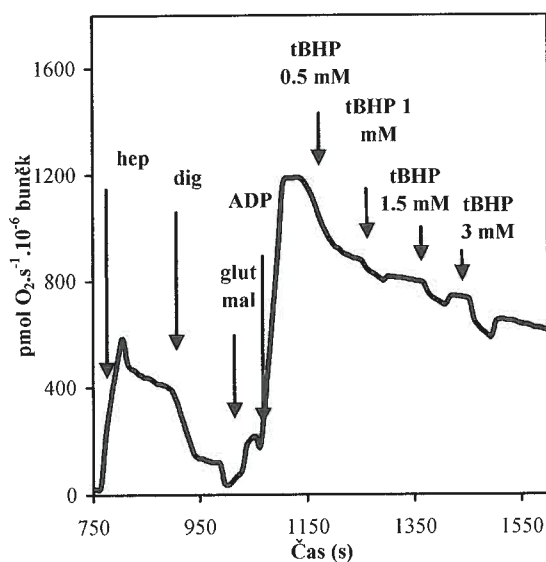
Graf 8A

Graf 8B

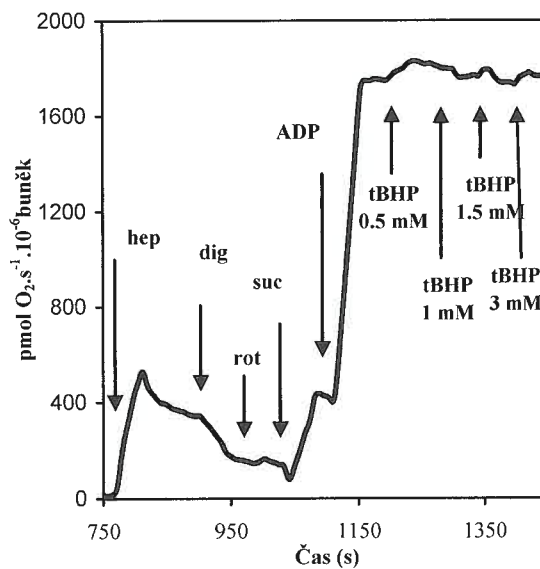
Graf 8: Stanovení optimální koncentrace digitoninu pro permeabilizaci plazmatické membrány hepatocytů. (A) Do komůrky oxygrafu byly napipetovány 2 ml K média, šipky značí přidavky komponent systému do celkové koncentrace: $0,25 \cdot 10^6$ hepatocytů /ml (hep), 10 mM sukcinát (suc), 1 mM ADP, 20 μ g/ml digitonin (dig), 20 μ M cytochróm c (Cyt c) (B) Závislost koncentrace digitoninu (5, 10, 15 a 20 μ mol/l) na respiraci hepatocytů aktivované sukcinátem a ADP

Po stanovení optimální koncentrace digitoninu jsme testovali vliv tBHP na aktivitu respiračního komplexu I a komplexu II (grafy 9-11). Graf 9A znázorňuje krátkodobý efekt tBHP na aktivitu respiračního komplexu I. Po přidavku hepatocytů vzrostla spotřeba kyslíku. Hepatocyty jsme permeabilizovali digitoninem, což mělo za následek vyplavení endogenních substrátů do média a pokles respirace. Přídavek glutamátu a malátu (substrátů komplexu I) spotřebu kyslíku zvýšil jen nepatrně. Poté jsme přidali ADP. ADP aktivuje ATP syntázu a následně respiraci. Spotřeba kyslíku vzrostla asi 6x (index respirační kontroly = 6). To svědčí o dobrém spřažení respirace a fosforylace. Do komůrky oxygrafu jsme postupně aplikovali tBHP do celkové koncentrace 0,5; 1,0; 1,5 a 3 mmol/l. Již nejnižší použitá koncentrace tBHP měla za následek výrazné snížení spotřeby kyslíku hepatocyty. S rostoucí koncentrací tBHP se respirace dále snižovala. Stejně jsme postupovali při zkoumání vlivu tBHP na respirační komplex II (graf 9B). Místo glutamátu a malátu jsme přidali substrát pro komplex II – sukcinát. Komplex I jsme předtím inhibovali rotenonem, abychom zabránili zpětnému toku elektronů z komplexu II na komplex I. Spotřeba kyslíku aktivovaná přídavkem sukcinátu a ADP byla asi o 1/3 vyšší než spotřeba kyslíku aktivovaná substráty komplexu I, neboť pro

hepatocyty je typická velmi vysoká aktivita sukcinátdehydrogenázy. Postupné přidávání tBHP (0,5-3,0 mmol/l) nemělo na aktivitu komplexu II vliv.



Graf 9A

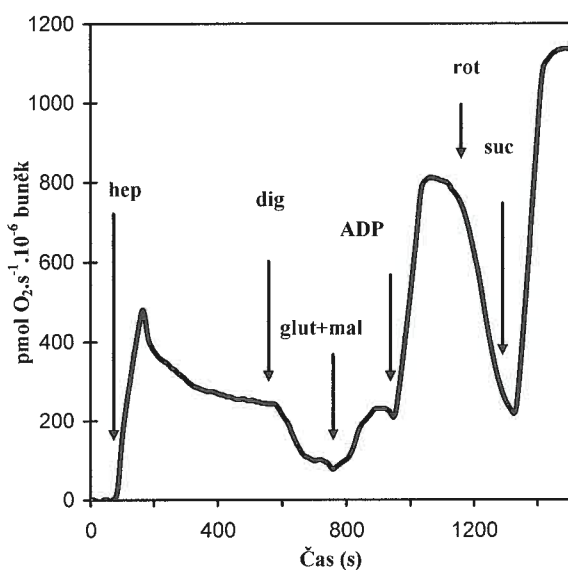


Graf 9B

Graf 9: (A) Efekt tBHP na oxidaci glutamátu+malátu. Hepatocyty ($0,25 \cdot 10^6/\text{ml}$) byly inkubovány v K médiu. Buňky byly permeabilizovány digitoninem ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$), dále byl přidán glutamát (10 mM) + malát ($2,5 \text{ mM}$). Respirace byla aktivována ADP (1 mM). Poté jsme přidávali tBHP do výsledné koncentrace 0,5; 1,0; 1,5 a $3 \text{ mmol}/\text{l}$. (B) Efekt tBHP na oxidaci sukcinátu. Hepatocyty byly permeabilizovány digitoninem ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$), dále byl přidán sukcinát (10 mM), ADP (1 mM) a poté tBHP do výsledné koncentrace 0,5; 1,0; 1,5 a $3 \text{ mmol}/\text{l}$.

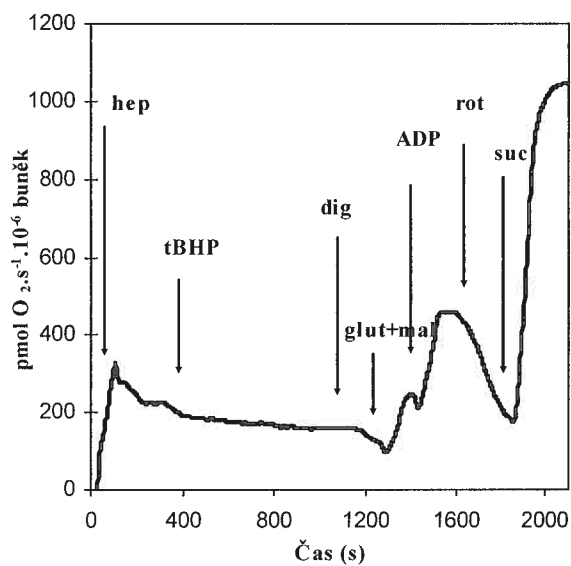
Dále nás zajímal koncentrační a časový vliv tBHP na aktivitu respiračního komplexu I a komplexu II. Schéma experimentu je vidět na grafu 10. Aktivitu obou komplexů jsme stanovovali během jednoho měření. Do komůrky jsme postupně přidávali hepatocyty, digitonin, glutamát, malát, ADP a hodnotili aktivitu komplexu I. Poté jsme komplex I zainhibovali rotenonem, přidali sukcinát a měřili aktivitu respiračního komplexu II (graf 10A). Hepatocyty jsme s tBHP inkubovali přímo v komůrce oxygrafu. tBHP byl přidán ihned po hepatocytech (graf 10B). Při testování koncentrační závislosti jsme hepatocyty inkubovali s tBHP 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 a $3 \text{ mmol}/\text{l}$ po dobu 30 minut. Výsledky jsou shrnuty v grafu 11A. Všechny testované koncentrace vyvolaly signifikantní pokles aktivit obou komplexů ($p < 0,001$). Komplex I je však daleko citlivější k oxidačnímu poškození tert-butylhydroperoxidem. Nejvýraznější pokles aktivity komplexu I nastal v koncentračním rozmezí tBHP 0,1 - $0,5 \text{ mmol}/\text{l}$, kdy respirace klesla asi na 30 % kontrolních hodnot (hepatocyty inkubované 30 min v komůrce oxygrafu bez tBHP). 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 (graf 11B). Aktivita komplexu I klesala rychleji a výrazněji než aktivita komplexu II. Již po 5 minutách inkubace s 1,5 mM tBHP nastal významný ($p < 0,01$) pokles aktivity komplexu I. Aktivita komplexu II signifikantně klesla ($p < 0,05$) až po 20 minutách inkubace s tBHP.

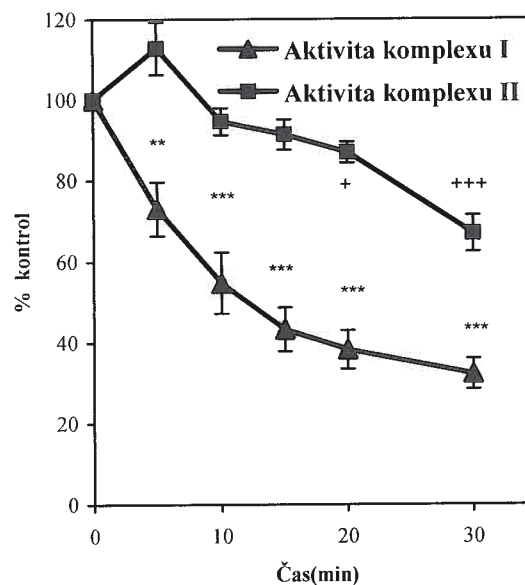
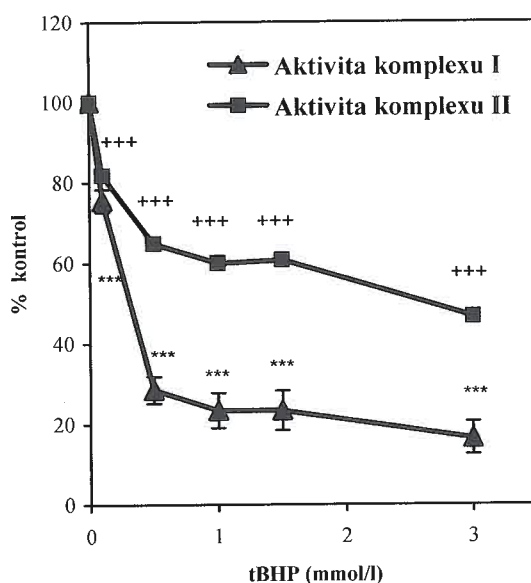


Graf 10A

Graf 10: (A) Kontrolní hepatocyty ($0,25 \cdot 10^6/\text{ml}$) byly inkubovány v K-médiu. Hepatocyty jsme permeabilizovali digitoninem ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$), přidali jsme glutamát (10 mM) + malát (2.5 mM), ADP (1mM), komplex I byl inibován rotenonem ($10 \mu\text{M}$), na závěr jsme přidali sukcinát (10 mM) (B) Hepatocyty ($0,25 \cdot 10^6/\text{ml}$) byly po dobu 15 minut inkubovány v K-médiu s tBHP (1,5 mM). Další postup byl stejný jako v případě grafu 8A.



Graf 10B



Graf 11A

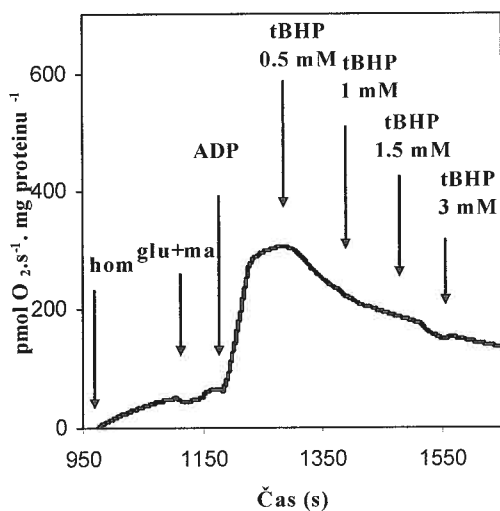
Graf 11B

Graf 11: Koncentrační a časová závislost vlivu tBHP na respiraci izolovaných hepatocytů permeabilizovaných digitoninem (A) Koncentrační závislost efektu tBHP na aktivitu komplexu I a komplexu II. **(B)** Časová závislost efektu tBHP na aktivitu respiračního komplexu I a II. Postup byl stejný jako u grafu 8, měnili jsme jen koncentrace tBHP resp. dobu inkubace ($n = 6$, $^+p < 0.05$, $^{+++}p < 0.001$ aktivita komplexu II vs. kontroly, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ aktivita komplexu I vs. kontroly). Za 100% pro komplex I je považována respirace po přidávku glut+mal+ADP kontrolních hepatocytů bez přidávku tBHP a pro komplex II respirace po přidávku sukcinátu.

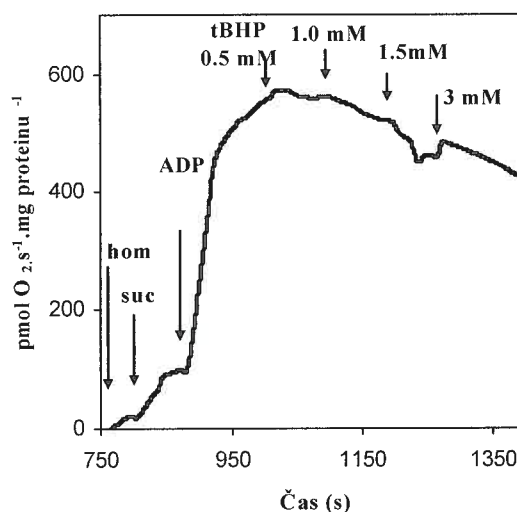
6.1.8 Vliv tBHP na respiraci izolovaných mitochondrií a jaterního homogenátu

Při studiu energetického metabolismu se velmi často využívají izolované mitochondrie. Izolované mitochondrie nejsou jako v případě intaktních nebo permeabilizovaných buněk v kontaktu s ostatními organelami a při izolaci může dojít k částečnému poškození mitochondriálních membrán. Mitochondrie jsou však při studiu některých dějů (např. bobtnání mitochondrií) nezastupitelným modelovým systémem. 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. Oxygrafické měření konzumpce kyslíku bylo provedeno stejně jako v případě hepatocytů. Koncentrace proteinu v měrné komůrce se při měření s mitochondriemi pohybovala mezi 0,05 – 0,1 mg/ml a při měření v homogenátu mezi 0,5 – 1,0 mg/ml. Postup byl obdobný jako u grafu 9A a 9B, jen nebylo třeba permeabilizovat plazmatickou membránu digitoninem. K jaternímu homogenátu a k izolovaným jaterním mitochondriím jsme přidávali glutamát + malát respektive sukcinát, ADP a tBHP v koncentracích 0,5; 1,0; 1,5 a 3 mmol/l. Jak u jaterního homogenátu (graf 12), tak u izolovaných mitochondrií (graf 13) se index

respirační kontroly pohyboval okolo 6, podobně jako u permeabilizovaných buněk. 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.

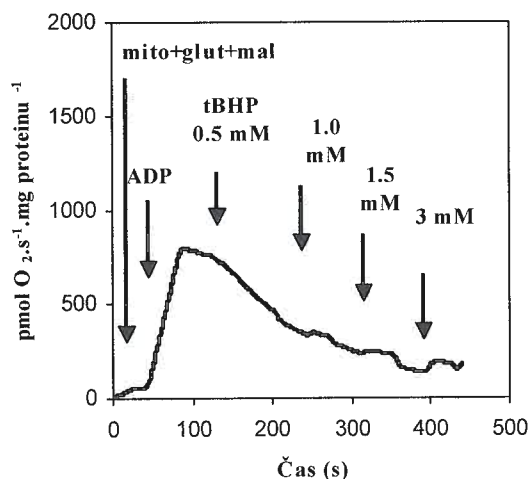


Graf 12A

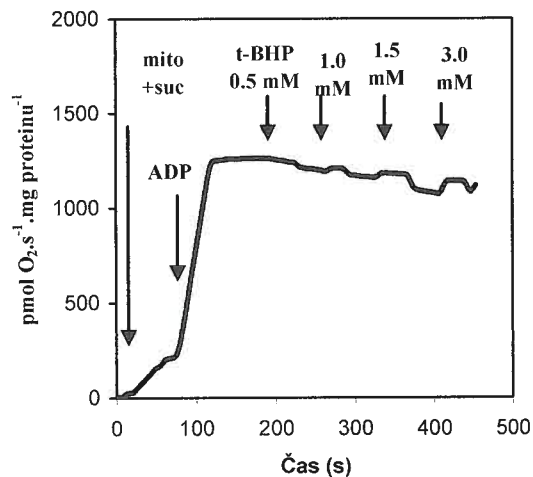


Graf 12B

Graf 12 (A) Efekt tBHP na oxidaci glutamátu+malátu. Jaterní homogenát (hom) (1 mg proteinu/ml) byl inkubován v K médiu. Dále byl přidán glutamát (10 mM) + malát (2.5 mM), ADP (1 mM) a tBHP do výsledné koncentrace 0,5; 1,0; 1,5 a 3 mmol/l. **(B) Efekt tBHP na oxidaci sukcinátu.** K homogenátu byl přidán sukcinát (10 mM), ADP (1 mM) a poté tBHP do výsledné koncentrace 0,5; 1,0; 1,5 a 3 mmol/l.



Graf 13A

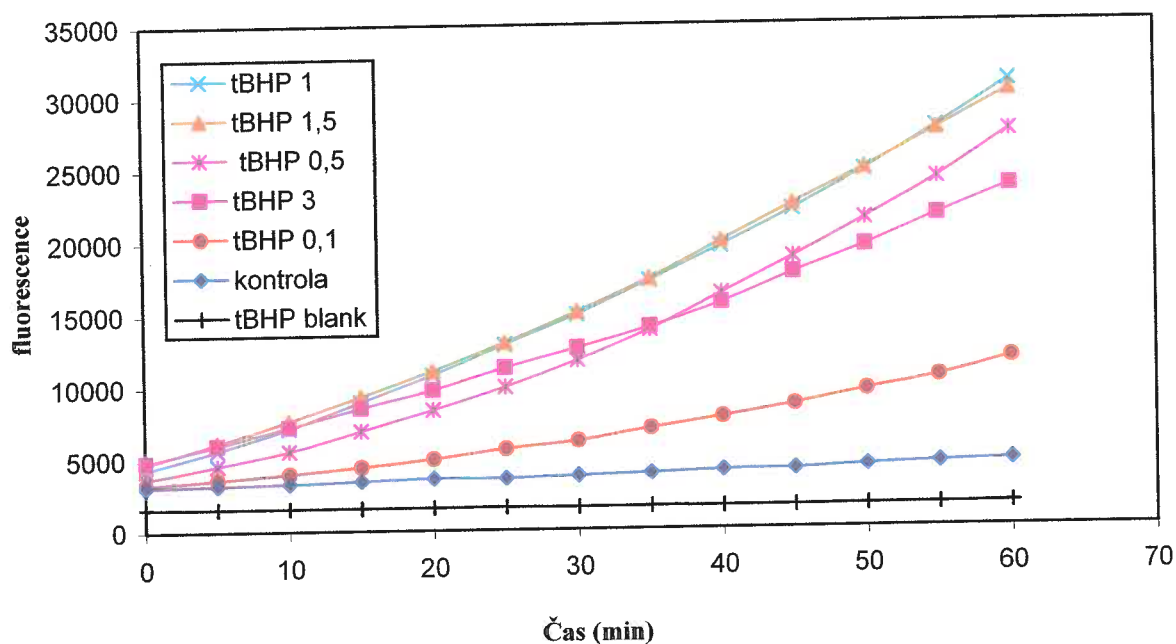


Graf 13B

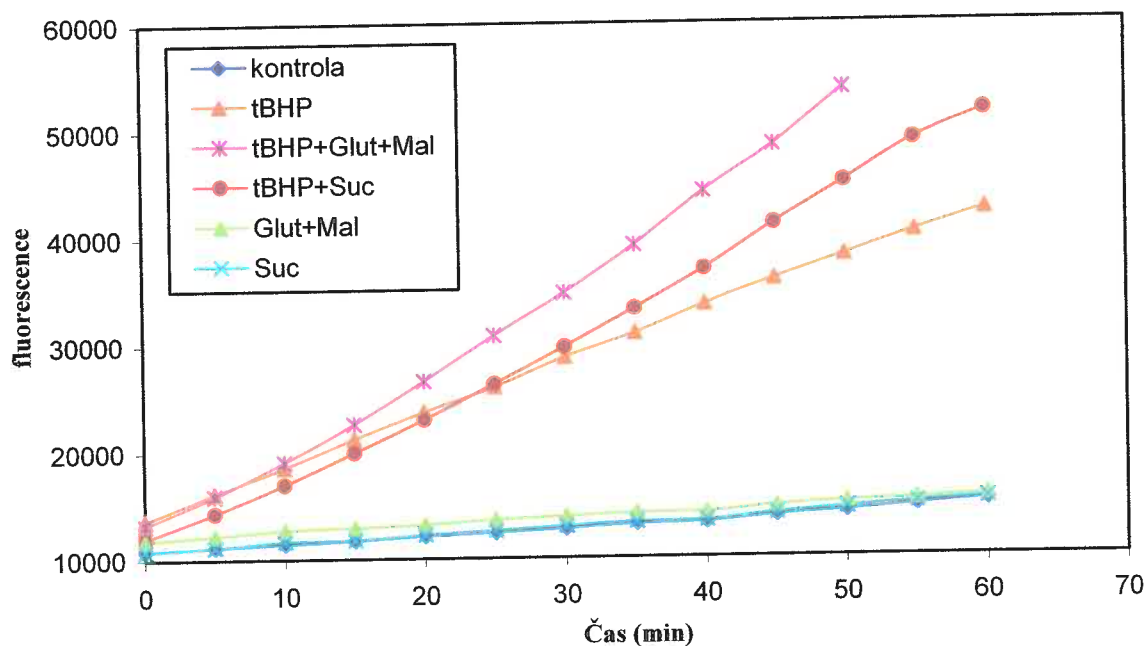
Graf 13 (A) Efekt tBHP na oxidaci glutamátu+malátu. Izolované mitochondrie (0.05 mg proteinu/ml) byly inkubovány v K médiu. Dále byl přidán glutamát (10 mM) + malát (2.5 mM), ADP (1 mM) a tBHP do výsledné koncentrace 0,5; 1,0; 1,5 a 3 mmol/l. **(B) Efekt tBHP na oxidaci sukcinátu.** K mitochondriím byl přidán sukcinát (10 mM), ADP (1 mM) a poté tBHP do výsledné koncentrace 0,5; 1,0; 1,5 a 3 mmol/l.

6.1.9 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. Mitochondrie nejsou jen zdrojem ROS, ale taky cílem jejich toxického účinku. Vliv tBHP na mitochondriální produkci ROS jsme hodnotili u izolovaných mitochondrií s využitím sondy CM-H₂DCFDA (viz metodiky). 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. Ověřili jsme si, že tBHP neinterferuje s vlastním stanovením (graf 14, blank tBHP). 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 (graf 15). Pokud byly k respirační substráty (glutamát + malát, sukcinát) přidány ke kontrolním mitochondriím, nedošlo k ovlivnění produkce ROS. Přídavek glutamátu+malátu i sukcinátu (bez rotenonu) k mitochondriím poškozeným 1,5 mM tBHP zvýšil fluorescenci DCF. Se substráty pro komplex I bylo zvýšení produkce ROS navozené vlivem 1,5 mM tBHP výraznější než se sukcinátem.



Graf 14: Vliv tBHP na mitochondriální produkci ROS. Mitochondrie (150 µg/ml) byly inkubovány v K médiu s CM-H2DCFDA (0,4 µM) a s příslušnou koncentrací tBHP (0-3 mM)

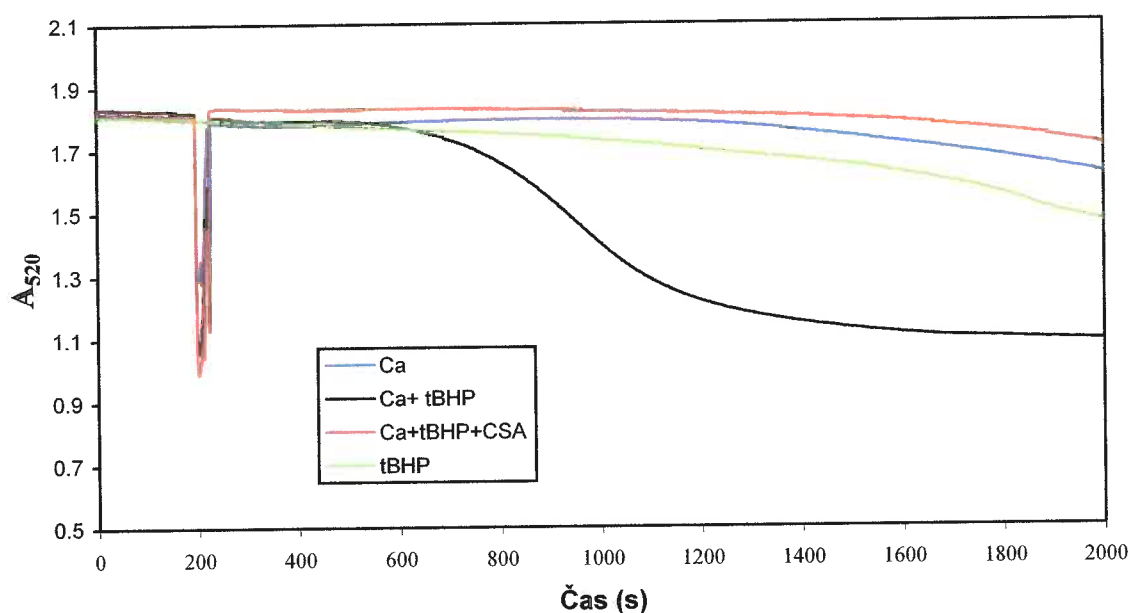


Graf 15: Vliv tBHP a respiračních substrátů na mitochondriální produkci ROS. Mitochondrie (150 µg/ml) byly inkubovány v K médiu s CM-H2DCFDA (0,4 µM) event. s 1,5 mM tBHP, s glutamátem (10 mM), malátem (2,5 mM), sukcinátem (10 mM)

6.1.10 Vliv tBHP na bobtnání mitochondrií

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. Zvýšená permeabilita je způsobena otevřením PTP. Následkem delšího otevření póru je depolarizaci mitochondrií, rozprážení respirace a fosforylace, narušení osmotické rovnováhy a bobtnání mitochondrií. Z mitochondrií je uvolněn cytochrom c a další látky a dochází k buněčné smrti. Jednou z metod hodnocení otevření PTP je sledování poklesu absorbance suspenze mitochondrií v důsledku změn jejich objemu (bobtnání). Sledovali jsme vliv tBHP na otevření PTP. Měření bylo provedeno ve swelling médiu (viz metodiky). 3 mM tBHP vyvolal pokles absorbance. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} (400 μM) vedla rovněž k bobtnání mitochondrií. Pokud jsme kombinovali vliv tBHP a Ca^{2+} došlo ke znásobení efektu a k daleko masivnějšímu snížení absorbance. Přídavkem Cyklosporinu A (CSA), inhibitoru PTP před tBHP a Ca^{2+} jsme bobtnání mitochondrií téměř úplně zablokovali. Bobtnání mitochondrií navozené vlivem tBHP a Ca^{2+} bylo tedy z velké části vyvolané otevření CSA senzitivního PTP (graf 16).



Graf 16: Vliv tBHP a Ca^{2+} na bobtnání mitochondrií. Izolované mitochondrie (do $A_{520} \cong 1,8$) byly inkubovány ve swelling médiu s 10 mM Sukcinátem a 1 μM Rotenonem. Poté k nim byl přidán Ca^{2+} (400 μM), tBHP (3 mM) event. cyklosporin A – CSA (2 μM).

6.2 Efekt SAME na potkaní hepatocyty poškozené tBHP

Model toxického poškození hepatocytů tBHP jsme se rozhodli využít pro testování látky s potenciálně hepatoprotektivním účinkem. Zvolili jsme s-adenosylmethionin (SAME). SAME je látka, která se přirozeně vyskytuje v organismu. SAME se účastní transmetylačních, transulfuračních reakcí a syntézy polyaminů a játra hrají v metabolismu SAME velmi

významnou roli. Bylo prokázáno, že SAME v experimentálních modelech působí proti poškození vyvolanému některými hepatotoxiny jako tetrachlormetan (Gasso et al., 1996), galaktosamin (Stramentionoli et al., 1978) ethanol (Lieber, 2002). Naším cílem bylo popsat efekt SAME na oxidační poškození hepatocytů navozené tBHP. Zajímalo nás, jak SAME ovlivňuje energetický metabolismus. Na základě výsledků získaných při zavádění modelu toxického poškození hepatocytů tBHP v našich podmínkách, jsme pro testování hepatoprotektivního účinku SAME zvolili 30 minutovou inkubaci buněk s 1,5 mM tBHP. Díky dřívějším experimentům (Kučera, 2005) jsme zjistili, že pokud byly hepatocyty koinkubovány s tBHP a SAME, nebyl protektivní účinek SAME prokázán. Hepatocyty po přichycení (viz. metodiky) jsme proto 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. Schéma pokusu, skupiny hepatocytů a použitá média jsou znázorněna v tabulce 3.

Doba inkubace	30 minut	30 minut
Kontroly intaktní	WE	WE
Kontroly s SAME	WE+SAME (5, 25 a 50 mg/l)	WE
Hepatocyty s tBHP	WE	WE+1,5 mM tBHP
Hepatocyty s SAME a s tBHP	WE+SAME (5, 25 a 50 mg/l)	WE+1,5 mM tBHP

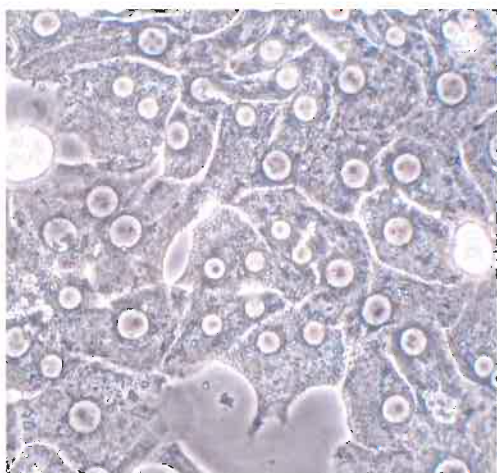
Tab. 3: Schéma pokusu. Po 2h přichycení (37°, 5% CO₂) bylo hepatocytům v primokultuře vyměněno médium za kompletní Williamsovo médium E (WE) s event. bez SAME v příslušné koncentraci. Po 30 minutách (37°, 5% CO₂) bylo médium opět vyměněno za nové WE s event. bez 1,5 mM tBHP a hepatocyty byly inkubovány dalších 30 minut (37°, 5% CO₂). Každá skupina obsahovala 6 Petriho misek. Po závěrečné inkubaci jsme hepatocyty pozorovali pod mikroskopem a v médiu stanovovali aktivitu LDH a koncentraci TBARS. Hodnotili jsme rovněž MMP pomocí Rho123 event. JC-1 a stanovili intracelulární koncentraci glutathionu.

Pro hodnocení vlivu SAME na respiraci jsme použili suspenzi permeabilizovaných hepatocytů a pro hodnocení produkce ROS izolované mitochondrie. Permeabilizované hepatocyty i mitochondrie byly inkubovány v K-médiu.

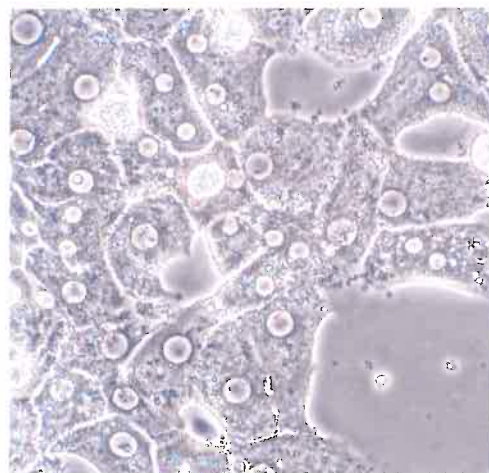
6.2.1 Efekt SAME na morfologii hepatocytů poškozených tBHP

Na obrázku 24A jsou znázorněny kontrolní intaktní hepatocyty. Hepatocyty mají polygonální tvar, jsou jasně ohraničeny, mají dobře viditelné jádro s jadérky. Hepatocyty na obrázku 24B byly po dobu 30 minut inkubovány v kompletním WE médiu obsahujícím 50

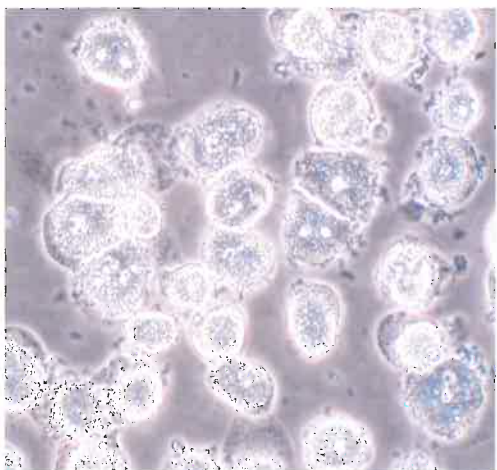
mg/ml SAME. Inkubace se SAME nijak neovlivňovala morfologii a hepatocyty vypadají podobně, jako hepatocyty kontrolní. Hepatocyty inkubované po dobu 30 minut s 1,5 mM tBHP (obr. 24C) vykazují četná poškození plazmatické membrány a dochází k úniku cytozolu z buněk. Cytoplazma je vysoce granulovaná, jádra 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 (obr. 24D) vedla k redukci morfologických změn navozených tBHP.



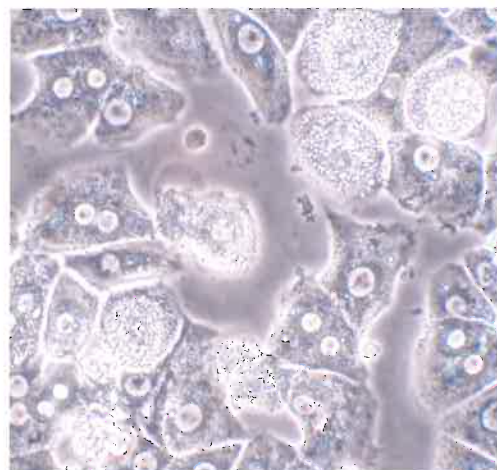
Obr. 24A



Obr. 24B



Obr. 24C

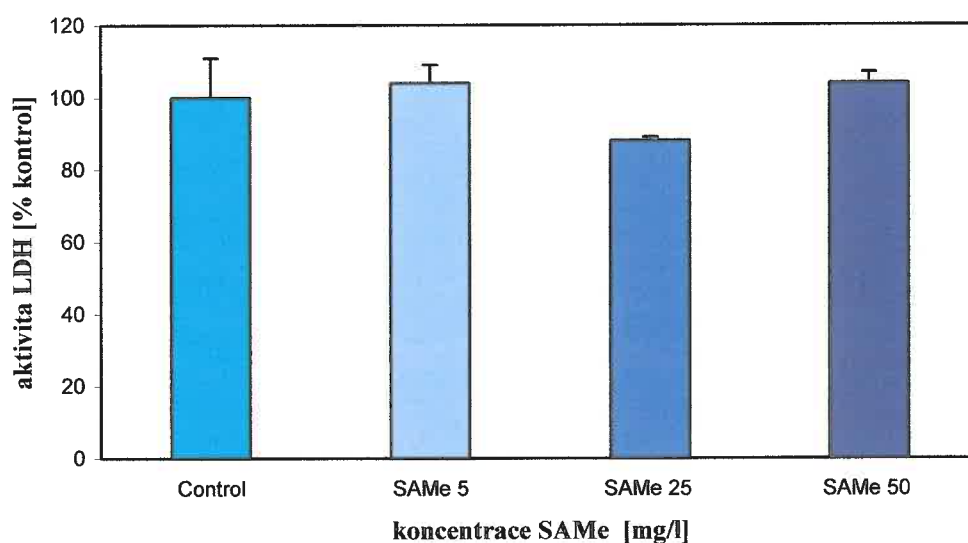


Obr. 24D

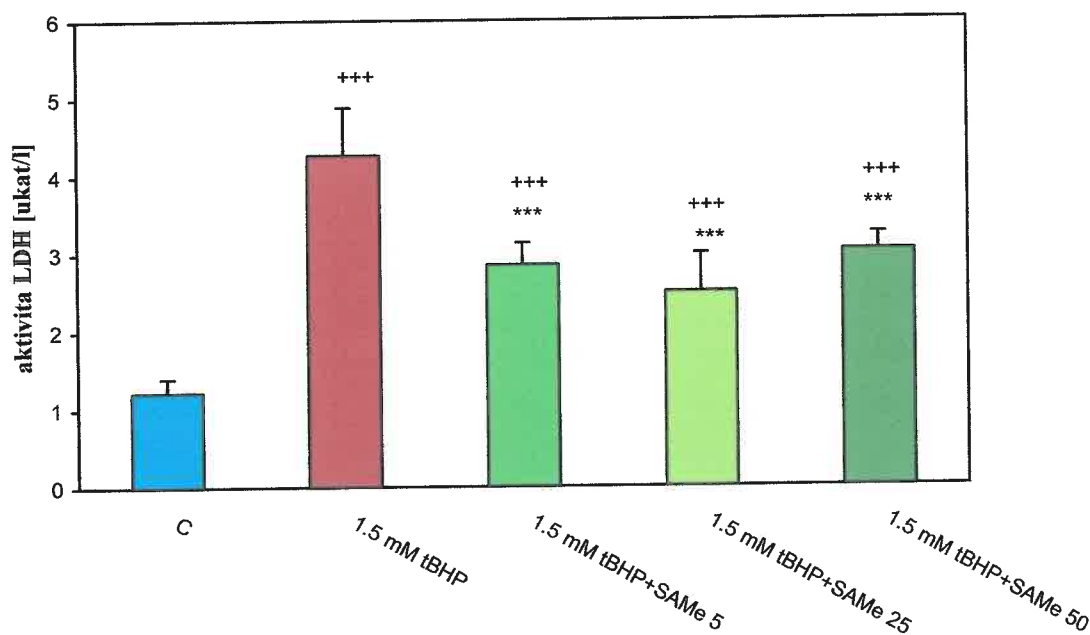
Obr. 24: Mikrofotografie izolovaných potkaních hepatocytů inkubovaných v primokulturách na kolagenu typu I. (A) jsou kontrolní hepatocyty (B) hepatocyty inkubované po dobu 30 min s 50 mg/l SAME (C) hepatocyty inkubované 30 min s 1,5 mM tBHP (D) hepatocyty preinkubované 30 min se SAME (50 mg/l) a poté 30 min inkubované s 1,5 mM tBHP.

6.2.2 Efekt SAME na na aktivitu LDH v médiu hepatocytů poškozených tBHP

Cytotoxicita byla hodnocena pomocí měření aktivity LDH v médiu. Nejprve jsme hodnotili vliv samotného SAME (graf 17A) na intaktní hepatocyty v primokulturách. Zjistili jsme, že inkubace hepatocytů se 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 (graf 17B). Preinkubace se SAME vedla u všech použitých koncentrací k signifikantnímu snížení cytotoxicity ($p < 0,001$).



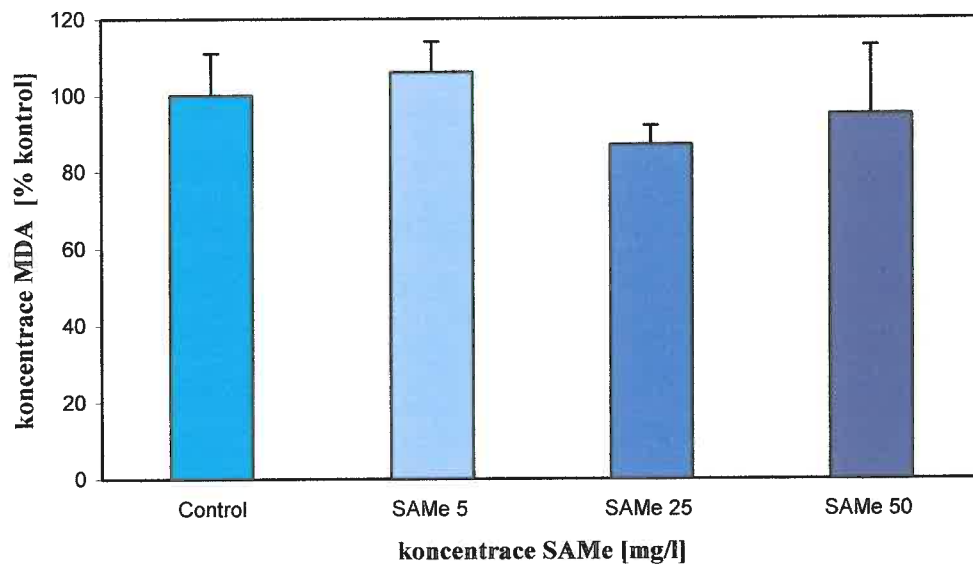
Graf 17A: Vliv SAME (5; 25 a 50 mg/l) na uvolnění LDH do média intaktních hepatocytů kultivovaných v primokulturách (n=6).



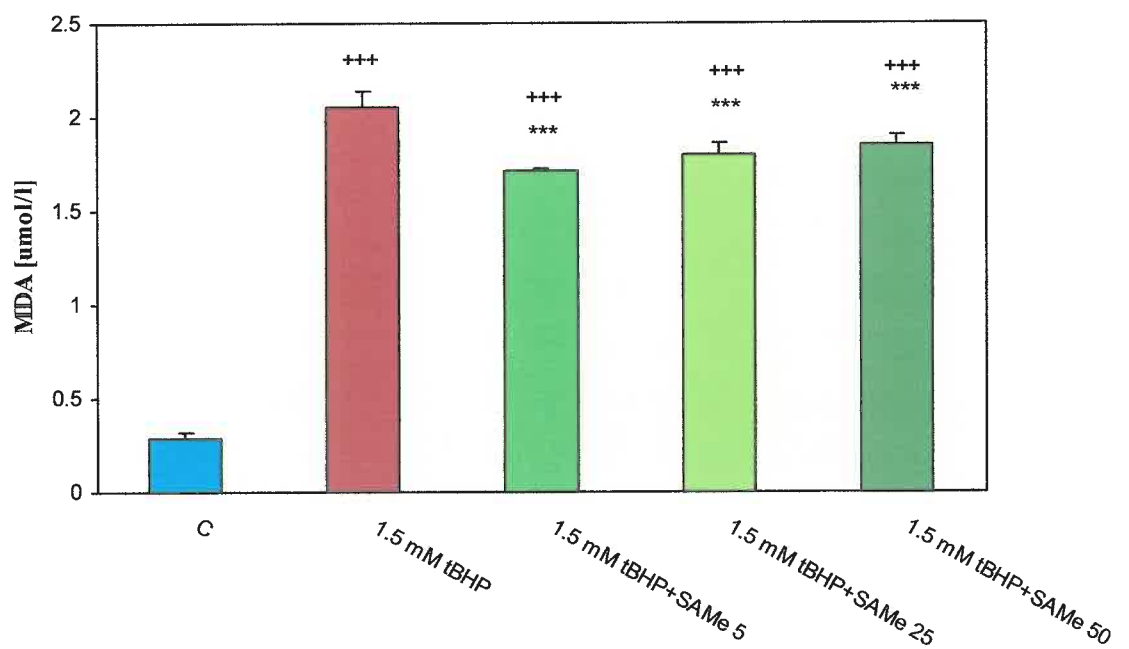
Graf 17B: Vliv SAMe v koncentracích 5, 25, a 50 mg/l na únik LDH z hepatocytů poškozených 1,5 mM tBHP (n = 6, +++ p < 0,001 vs K; *** p < 0,001 vs tBHP 1,5 mM).

6.2.3 Efekt SAMe na lipoperoxidaci hepatocytů poškozených tBHP

Stejně jako v případě měření aktivity LDH, jsme nejprve testovali vliv SAMe (5; 25 a 50 mg/l) na produkci MDA hepatocyty v primokultuře (graf 18A). Zjistili jsme, že SAMe neovlivňuje signifikantně koncentraci TBARS v médiu hepatocytů. Tert-butylhydroperoxid (1,5 mM, 30 min) indukuje výrazné zvýšení koncentrace TBARS. Všechny testované koncentrace SAMe signifikantně (p < 0,001) snížily stupeň lipoperoxidace navozené tBHP, koncentrace TBARS však oproti kontrolám zůstala výrazně (asi 6x) zvýšená (graf 18B).



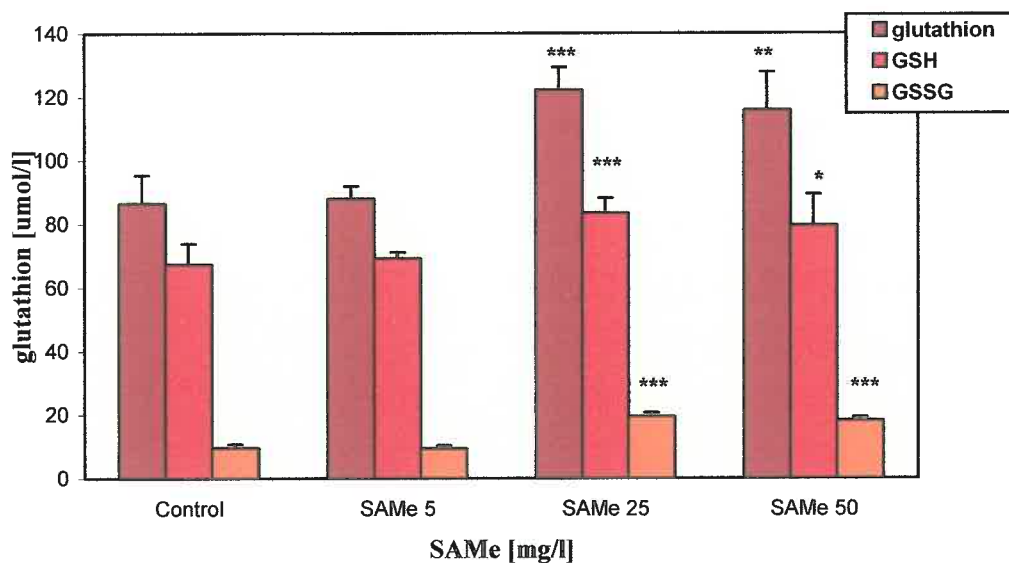
Graf 18A: Vliv SAME (5; 25 a 50 mg/l) na uvolnění MDA do média ntaktních hepatocytů kultivovaných v primokulturách (n=6).



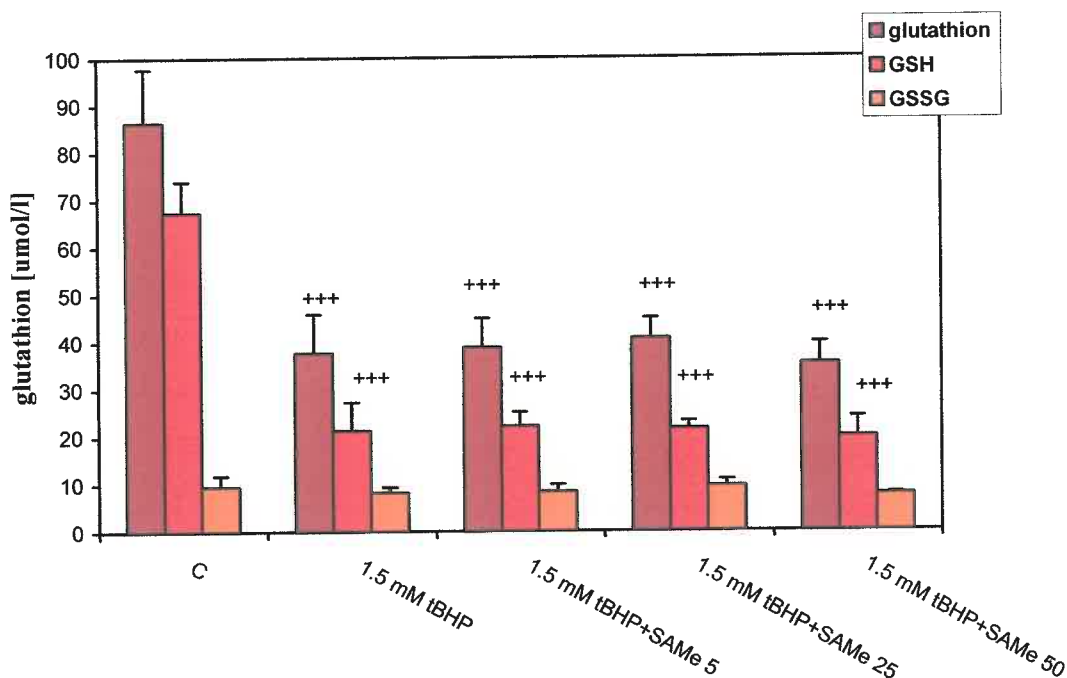
Graf 18B: Vliv SAME v koncentracích 5, 25 a 50 mg/l na tvorbu TBARS v hepatocytech poškozených 1,5 mM tBHP (n = 6, ⁺⁺⁺ p < 0,001 vs K; ^{***} p < 0,001 vs tBHP 1,5 mM).

6.2.4 Efekt SAmE na na hladinu glutathionu v hepatocytech poškozených tBHP

SAmE je prekurzorem esenciálních organických sloučenin obsahujících ve své molekule síru, včetně významného antioxidantu glutathionu. Hladina GSH se při oxidačním poškození velmi výrazně snižuje. Proto nás zajímal vliv SAmE na koncentraci intracelulárního glutathionu u hepatocytů 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 (graf 19A). SAmE v koncentracích 25 a 50 mg/l za 30 minut významně zvýšil obsah intracelulárního glutathionu ($p < 0,001$ resp. $p < 0,01$). Na nárůstu se podílel jak GSH ($p < 0,001$ resp. $p < 0,05$) tak GSSG ($p < 0,001$). 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 neovlivnilo snížení hladiny glutathionu navozené 1,5 mM tBHP (graf 19B).



Graf 19A: Vliv SAmE (5; 25 a 50 mg/l) na intracelulární obsah celkového glutathionu, GSH a GSSG hepatocytů kultivovaných v primokulturách ($n=6$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs tBHP 1,5 mM).

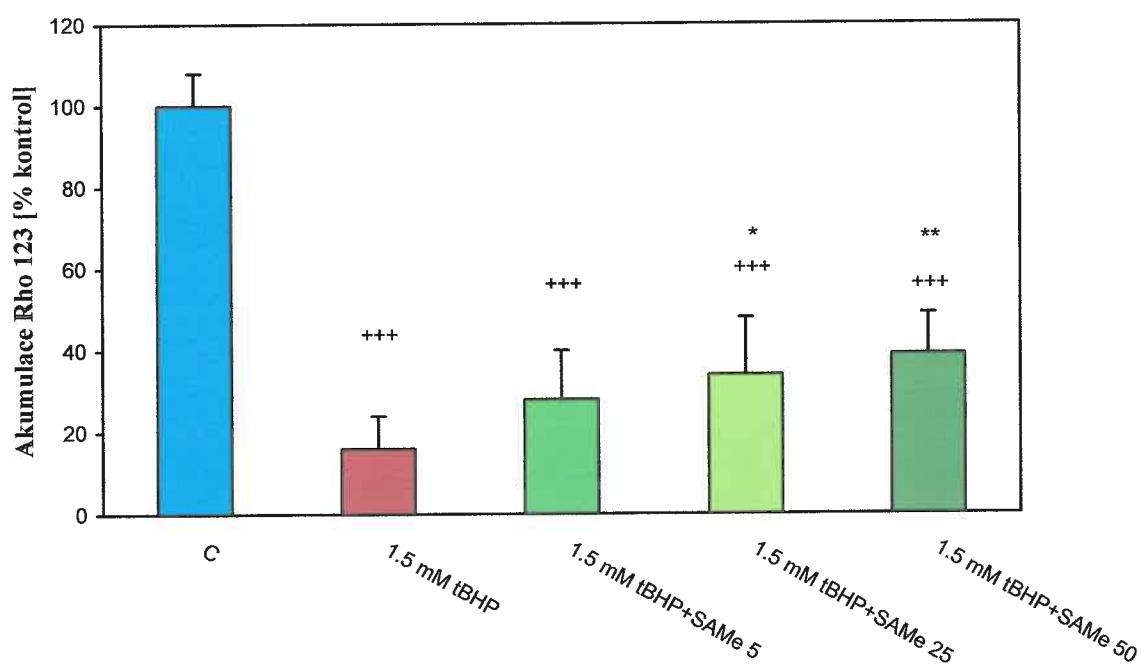


Graf 19B: Vliv SAMe v koncentracích 5, 25 a 50 mg/l na intracelulární obsah GSH a GSSG v hepatocytech poškozených 1,5 mM tBHP (n = 6, +++ p < 0,001 vs C).

6.2.5 Efekt SAMe na pokles MMP induvaný tBHP

6.2.5.1 Vliv SAMe na akumulaci Rho 123

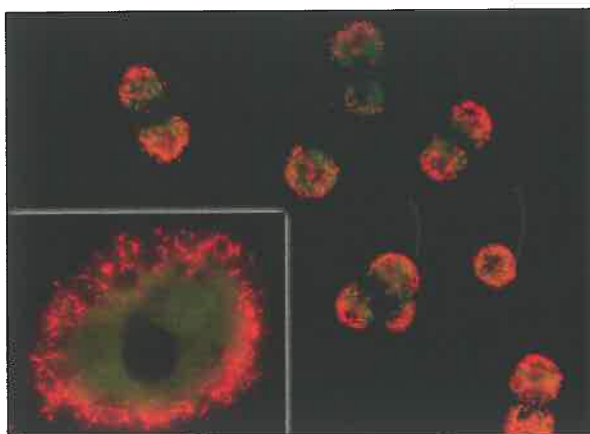
Akumulace Rho 123 závisí na mitochondriálním membránovém potenciálu. Třicetiminutová inkubace s 1,5 mM tBHP snížila schopnost akumulace Rho 123 hepatocyty v primokulturách asi na 20 % původních hodnot (akumulace intaktními hepatocyty) (graf 20). Samotná inkubace s SAMe MMP neovlivňovalo. Preinkubace s 25 a 50 mg/l SAMe po dobu 30 minut významně zvyšovala MMP (p<0,05 resp. p<0,01). Nižší koncentrace SAMe neměla na snížení potenciálu vlivem tBHP efekt.



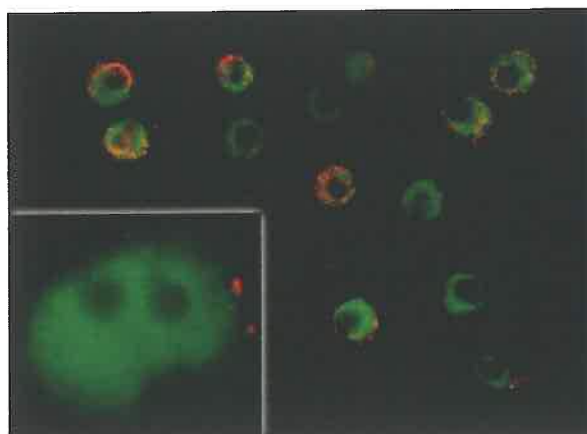
Graf 20: Vliv SAME v koncentracích 5, 25 a 50 mg/l na akumulaci rhodaminu 123 v hepatocytech poškozených 1,5 mM tBHP (n = 6, *** p < 0,001 vs C; * p < 0,05 ** p < 0,01 vs tBHP 1,5 mM).

6.2.5.2 Vliv SAME na akumulaci JC-1

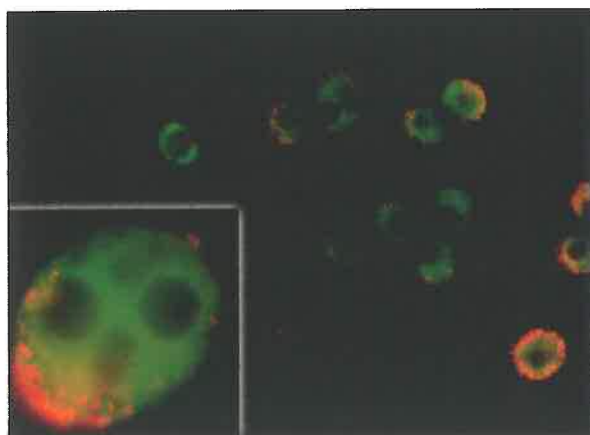
Pro vizualizaci MMP jsme použili akumulaci JC-1, která v závislosti na koncentraci a tedy na MMP emituje světla dvou vlnových délek. Při vysokém MMP dochází k tvorbě tzv. J-agregátů a k emisi oranžového světla. Při nižší koncentraci JC-1 netvoří agregáty. Sonda pak emituje zelené světlo. Na obrázku 25A je vidět výrazná oranžová fluorescence značící vysoký MMP, zejména v blízkosti plazmatické membrány kontrolních intaktních hepatocytů. Po 30 minutové inkubace s 1,5 mM tBHP došlo téměř k vymizení oranžové fluorescence (obr. 25B). Preinkubace s SAME v koncentraci 50 mg/l nepatrně podíl oranžové fluorescence zvýšila (obr. 25C). Pro zvýraznění efektu SAME jsme hepatocyty preinkubovali i s velmi vysokou koncentrací SAME 1000 mg/l (obr. 25D). Tato preinkubace výrazně omezila efekt tBHP na MMP a oranžová fluorescence je téměř na úrovni kontrolních hodnot. Samotný SAME neměl na MMP vliv a hepatocyty inkubované po dobu 30 minut s 50 mg/l SAME vypadaly obdobně jako kontrolní hepatocyty.



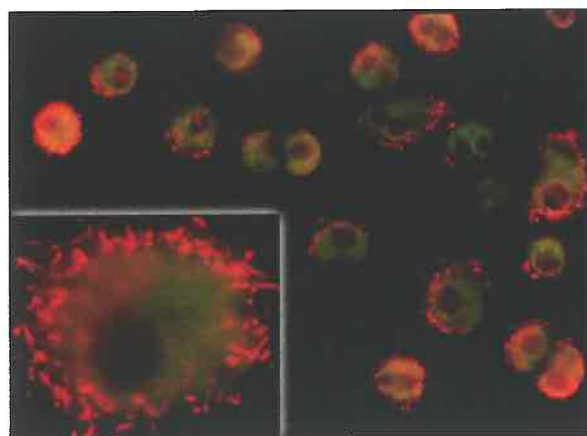
Obr. 25A



Obr. 25B



Obr. 25C



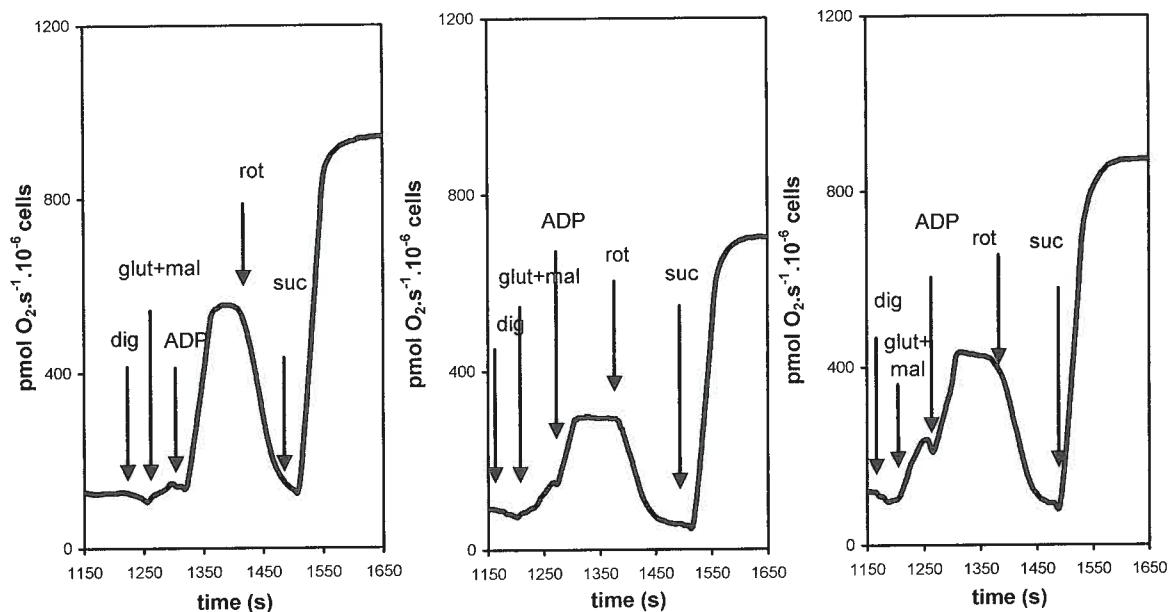
Obr. 25D

Obr. 25: Hodnocení MMP pomocí fluorescenční sondy JC-1 (A) u intaktních hepatocytů (B) hepatocytů poškozených 1,5 mM tBHP (C) u hepatocytů preinkubovaných se SAME v koncentraci 50 mg/l a následně vystavených 30 min účinku 1,5 mM tBHP resp. (D) u hepatocytů preinkubovaných se SAME v koncentraci 1000 mg/l a následně vystavených 30 min účinku 1,5 mM tBHP (fluorescenční mikroskopie, zvětšení 100x resp. 400x).

6.2.6 Efekt SAME na respiraci permeabilizovaných hepatocytů poškozených tBHP

Pro hodnocení aktivit enzymových komplexů dýchacího řetězce jsme využili permeabilizované hepatocyty. Hepatocyty jsme v komůrce oxygrafu inkubovali po dobu 30 minut v K-médiu se SAME v koncentracích 5; 25 a 50 mg/l SAME, poté jsme přidali tBHP do celkové koncentrace 1,5 mM a inkubovali dalších 30 minut. Následně jsme přidali digitonin a respirační substráty, jak je znázorněno na grafech 10 a 21. Aktivitu respiračního komplexu I jsme hodnotili po přidavku glutamátu, malátu a ADP a aktivitu komplexu II po inhibici komplexu I rotenonem a přidavku sukcinátu. 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.



Graf 21A

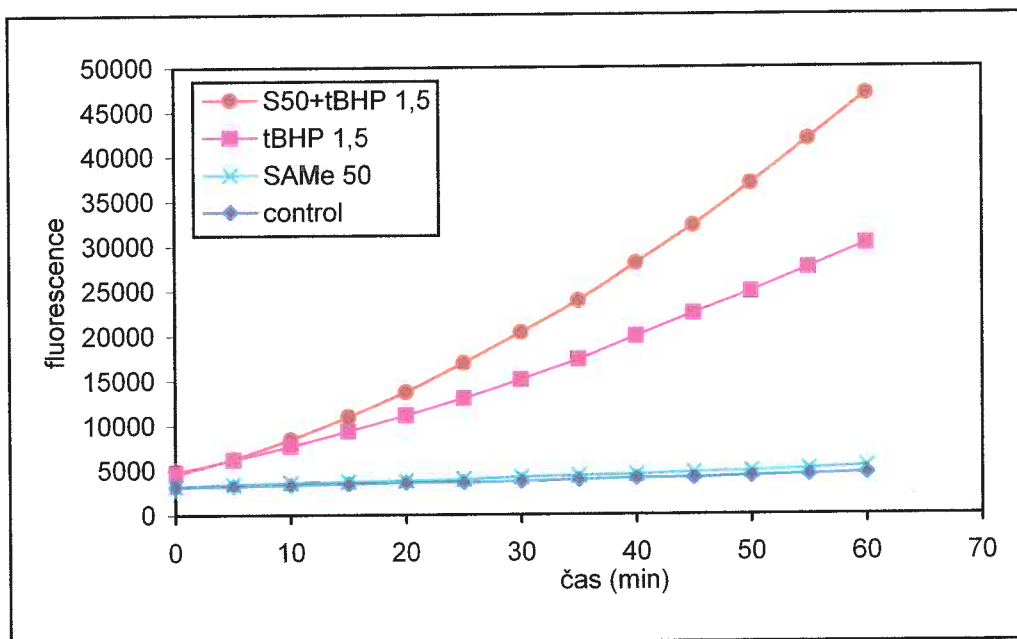
Graf 21B

Graf 21C

Graf 21: Efekt SAME na respiraci hepatocytů poškozených 1,5 mM tBHP (A) Kontrolní hepatocyty ($0,25 \cdot 10^6/\text{ml}$) byly inkubovány v K-médiu. Hepatocyty jsme permeabilizovali digitoninem ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$), přidali jsme glutamát (10 mM) + malát ($2,5 \text{ mM}$), ADP (1 mM), komplex I byl inhibován rotenonem ($10 \mu\text{M}$), na závěr jsme přidali sukcinát (10 mM) **(B)** Hepatocyty ($0,25 \cdot 10^6/\text{ml}$) byly po dobu 30 minut inkubovány v K-médiu s tBHP ($1,5 \text{ mM}$). **(C)** Hepatocyty byly inkubovány 30 minut se SAME ($50 \text{ mg}/\text{l}$) a dále 30 minut s tBHP ($1,5 \text{ mM}$).

6.2.7 Efekt SAME na mitochondriální produkci ROS navozenou vlivem tBHP

Testovali jsme efekt SAME na produkci ROS u izolovaných potkaních mitochondrií (graf 22). K tomuto účelu jsme opět použili sondu CM-H₂DCFDA. Pokud jsme k hepatocytům přidali samotný SAME v koncentraci $50 \text{ mg}/\text{l}$, nedošlo po dobu 1 hodiny k ovlivnění produkce ROS. $1,5 \text{ mM}$ 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.



Graf 22: Vliv SAmE (50 mg/l) na mitochondriální produkci ROS Mitochondrie (150 µg/ml) byly inkubovány v K médiu s CM-H₂DCFDA (0,4 µM) event. s příslušnou koncentrací 1,5 mM tBHP a s 50 mg/l SAmE

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 není narozdíl od peroxidu vodíku degradován katalázou (Chance et al., 1979) a lze ho použít ke zkoumání závislosti oxidačního poškození na dávce oxidantu.

Cílem této práce bylo popsat efekt t-butylhydroperoxidu na izolované potkaní hepatocyty, jaterní mitochondrie event. homogenát jaterní tkáně. Zaměřili jsme se zejména na vliv oxidačního poškození na mitochondrie a energetický metabolismus. V další části jsme zavedený model oxidačního poškození využili pro testování látky s potenciálně hepatoprotektivním účinkem s-adenosylmethioninu (SAMe).

7.1 Model toxického poškození hepatocytů tert-butylhydroperoxidem

Tert-BHP snadno proniká přes membrány do buňky, kde je metabolizován pomocí různých cest. Hlavním systémem zodpovědným za přeměnu tBHP na relativně inertní terciární butylalkohol je glutathionperoxidáza, která jako substrát využívá redukovaný glutathion (Rush et al, 1985). To má za následek depleci intracelulárního GSH a hromadění GSSG. Tert-BHP je také pomocí cytochromu P450 (Davies, 1989) či za přítomnosti iontů železa (Rush a Alberts, 1986) přeměňován na peroxylové a alkoxylové radikály, což prohlubuje pokles GSH (Haidara et al., 2001).

7.1.1 Efekt tBHP na hladinu glutathionu u potkaních hepatocytů

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 enzymu glutathionreduktázy s NADPH jako kofaktorem. Následkem oxidačního stresu roste podíl GSSG, dochází k depleci NAD(P)H, mění se redoxní stav buňky a je porušena kalciová homeostáza. Řada proteinů včetně enzymů, receptorů, proteinkináz a transkripčních faktorů má redox-senzitivní thiolové skupiny a při změně redoxního stavu buňky se tvoří smíšené disulfidy (Ghezzi, 2005). Tento proces je reverzibilní. Tvorba smíšených disulfidů vede ke změně genové exprese. V závislosti na intenzitě a trvání insultu může dojít buď k aktivaci obranných mechanismů, k proliferaci nebo k buněčné smrti.

U kontrolních potkaních hepatocytů kultivovaných v primokulturách se 93% glutathionu nacházelo ve formě GSH. Důvodem nižšího zastoupení GSH může být to, že

hepatocyty v kultuře nejsou kultivovány za zcela fyziologických podmínek a zejména za fyziologické koncentrace kyslíku. Ve vzduchu je pO_2 asi 21 kPa, ve smíšené venózní krvi se pohybuje kolem 5,6 kPa a v buňce okolo 0,4 kPa. V médiu saturovaném vzdušným kyslíkem je koncentrace kyslíku asi 10x vyšší než v kapilární krvi (Gnaiger a Kuznetsov, 2002). Po 30minutové inkubaci s tBHP došlo již při použití 0,1 mM tBHP k poklesu GSH asi na 80 % kontrolních hodnot (graf 5). 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 sulfhydrylovými skupinami proteinů (Lu, 1999). Zvýšený export potvrdil nárůst GSSG v inkubačním médiu. Hepatocyty mají poměrně aktivní mechanismus transportu GSH do extracelulárního prostředí (Smith et al., 1995). Koncentrace GSH v médiu byla pod úrovní detekce. Export GSH se během oxidačního stresu snižuje a aktivita γ -glutamyltransferázy roste (Meister, 1988; Karp et al., 2001). Enzym γ -glutamyltransferáza je ukotven na vnější straně plazmatické membrány a jako jediný dokáže odštěpit γ -glutamylový zbytek z glutathionu. Měřitelné hodnoty GSH v médiu nebyly zaznamenány ani u kontrol, to může být podpořeno oxidací GSH a nepřítomností redukčního systému v 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 právě zvýšená aktivita γ -glutamyltransferázy a vazba GSSG na proteiny. Tento výsledek je ve shodě s Lapshina et al. 2005, kde tBHP u kultivovaných křeččích B14 buněk rovněž vyvolal snížení GSH, spojené s redukcí celkového obsahu glutathionu.

7.1.2 Efekt tBHP na mitochondrie

Glutathion je z velké části syntetizován v cytozolu a do mitochondrií je transportován. V mitochondriích však dosahuje o něco vyšších koncentrací (10-12 mM) než v cytozolu (1-8 mM) (Liu a Kehrer, 1996). V mitochondriích se nevyskytuje kataláza a H_2O_2 je rozkládán jen pomocí glutathionperoxidázy. 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 (Lemasters, 1999; Liu and Kehrer, 1995; Brambilla et al., 1998). Deplece glutathionu je díky glutathionreduktáze úzce spjata s deplecí NAD(P)H.

Glutathionperoxidáza nemůže používat NADH. Ačkoliv je redoxní potenciál NAD^+/NADH a $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ skoro stejný, v mitochondriální matrix je poměr $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ daleko vyšší než NADH/NAD^+ . K udržování tohoto poměru přispívají transhydrogenázy, které přenášejí vodík z NADH na NADP^+ (Nicholls and Ferguson, 2002). Během různých stresů je hladina NADPH stabilnější, než hladina NADH (Liu and Kehrer, 1995).

7.1.2.1 *Efekt tBHP na respiraci*

Ve vnitřní mitochondriální membráně jsou lokalizované enzymové komplexy dýchacího řetězce a oxidační fosforylace. Respirační komplex I přijímá vodíky od NADH-dependentních dehydrogenáz a předává je na koenzym Q. Redukovaný koenzym Q přenáší vodíky na komplex III. Komplex III předává elektrony cytochrómu c a ten je přenáší na komplex IV (COX). COX reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku vody. Koenzym Q přebírá vodíky i od mitochondriálních dehydrogenáz flavoproteinového typu, mezi něž patří komplex II (sukcinát-koenzym Q-oxidoreduktáza) a glycerofosfátdehydrogenáza (Drahota et al., 2002). U izolovaných digitoninem permeabilizovaných hepatocytů jsme měřili vliv tBHP na respiraci aktivovanou substráty pro komplex I (glutamát+malát) a pro komplex II (sukcinát) (graf 9-11). Permeabilizace dovoluje stanovit maximální aktivity mitochondriálních enzymů, protože umožňuje volný přístup substrátů a kofaktorů k mitochondriím. Interakce s cytoskeletem a s ostatními organelami zůstávají zachovány (Červinková et al., 2002). Potvrdili jsme, že v játrech je v porovnání s komplexem I velmi vysoká aktivita sukcinát dehydrogenázy (Briere et al., 2005). 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. Respirační komplex II byl inhibován pomaleji, než komplex I a také s menší intenzitou. Respirace aktivovaná glutamátem a malátem byla snížena již po 5 minutách inkubace hepatocytů s 1,5 mM tBHP, zatímco k významnému snížení aktivity komplexu II došlo až po 20 minutách. Po 30 min inkubaci s 3 mM tBHP klesla aktivita komplexu I asi na 20 % původních hodnot, zatímco aktivita komplexu II se pohybovala okolo 50 % (graf 11). 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). Oxidační stres se také uplatňuje v mechanismu poškození jater virem hepatitidy C (HCV) (Wang a Weinman, 2006). V souladu s našimi výsledky není překvapením, že respirace aktivovaná substráty komplexu I a aktivita komplexu I byla snížena u mitochondrií izolovaných z transgenních

myší exprimujících korový protein (HCV), zatímco respirace aktivovaná sukcinátem narušena nebyla (Korenaga et al., 2005).

Částečným vysvětlením větší citlovosti 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. Otevření PTP je indukováno zvýšenou koncentrací Ca^{2+} v matrix, oxidačním stresem, závisí na $\Delta\mu\text{H}^+$, na pH, P_i a řadě dalších faktorů. Respirace v přítomnosti substrátů komplexu I zvyšuje pravděpodobnost otevření póru. Tento jev nezávisí na oxidaci pyridinnukleotidů, $\Delta\mu\text{H}^+$ a produkci ROS, ale na toku elektronů přes komplex I (Fontaine et al., 1998). Chinony jsou účinné inhibitory PTP. Zvýšený tok e^- komplexem I snižuje vazbu chinonů ke komplexu, což má za následek zpřístupnění vazebných míst pro Ca^{2+} (Bernardi et al., 2006). PTP indukuje specifické konformační změny komplexu I a inhibuje fyziologický tok elektronů (Batandier et al., 2004). Je možné, že komplex I je součástí PTP (Bernardi et al., 2006, Fontaine et al., 1998). Struktura savčího komplexu I je velmi komplikovaná. Komplex I je složen nejméně ze 46 podjednotek, zatímco komplex II má jen 4 podjednotky. 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; Korenaga et al., 2005). Aktivita komplexu I je v porovnání s ostatními komplexy nižší a komplex I může mít regulační roli (Paradies et al., 2003). U srdečních mitochondrií izolovaných z myší 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. Ischemie a následná reperfúze vede k narušení kalciové homeostázy a k oxidačnímu stresu (Valko et al., 2006; Kolar et al., 2006). 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 nenasycených mastných kyselin je náchylný k oxidačnímu poškození. Přídavek exogenního kardiolipinu k mitochondriím vedl k obnovení aktivity komplexu I (Paradies et al., 2003). Podobný efekt ischemie a reperfúze a vliv kardiolipinu byl pozorován u srdečních mitochondrií na aktivitu komplexu III a komplexu IV (Paradies et al., 1999; Petrosillo et al., 2003). Kardiolipin má tedy 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, Haines end Dencher, 2002, Gohil

et al., 2004). Za fyziologických podmínek je většina komplexu I asociována s komplexem III. Formování superokomplexu 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 klastrů, 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. Dimethylbiguanid (DG) je antihyperglykemický lék používaný při léčbě diabetu typu II. DG u hepatocytů obdobně jako tBHP inhibuje respirační komplex I a neovlivňuje aktivitu komplexu II, III a IV. Efekt DG se však projeví jen u intaktních hepatocytů, ale ne u izolovaných mitochondrií (El-Mir et al., 2000). Tert-butylhydroperoxid tedy narozdíl od DG pro svůj toxický efekt nevyžaduje metabolickou přeměnu v cytoplazmě, popřípadě v dalších organelách.

7.1.2.2 *Efekt tBHP na mitochondriální membránový potenciál*

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 $\Delta\mu H^+$. Tento potenciál pak využívá ATP-syntáza pro tvorbu ATP. $\Delta\mu H^+$ netvoří jen hnací sílu pro syntézu ATP, ale také řídí transport iontů, substrátu a proteinů. Hodnotili jsme vliv tBHP na schopnost akumulace Rho 123 hepatocyty v primokultuře. Rhodamin 123 je fluorescenční lipofilní kationtová barva, která se v závislosti na $\Delta\mu H^+$ akumuluje v mitochondriích. Tert-BHP velmi významně snižuje schopnost hepatocytů akumulovat Rho 123 (graf 6). Tento pokles závisí na dávce tBHP. Signifikantní snížení akumulace Rho 123 bylo pozorováno již při použití velmi nízké koncentrace tBHP (0,1 mM), což značí vysokou senzitivitu $\Delta\mu H^+$ k oxidačnímu působení tBHP. Nejprudší pokles byl zaznamenán v koncentračním rozmezí tBHP 0,5 – 1,0 mM. Po 30 minutové inkubaci s 1,5 mM tBHP dosáhl $\Delta\mu H^+$ asi 30 % původních hodnot, což je ve shodě s nálezy Kmoníčkové et al. (2001). Pro vizualizaci $\Delta\mu H^+$ jsme použili akumulaci JC-1, která v závislosti na koncentraci a tedy na $\Delta\mu H^+$ emituje světla dvou vlnových délek. Při vysokém MMP dochází k tvorbě tzv. J-agregátů a k emisi oranžového světla. Při nižší koncentraci JC-1

netvoří agregáty. Sonda pak emituje zelené světlo. 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). Hepatocyty mají velmi vysokou denzitu mitochondrií a jsou v buňce rovnoměrněji distribuovány než u ostatních typů buněk, pro které je typická větší hustota mitochondrií v perinukleární oblasti (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. Jak jsme prokázali, jedním z mechanismů může být inhibice respirace. Dále může docházet ke změnám redox-senzitivních molekul dýchacího řetězce, k poškození mitochondriálních membrán lipoperoxidací a k indukci MPT. K objasnění tohoto problému jsme využili akumulaci TPP^+ . 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). Koncentraci TPP^+ v médiu jsme měřili pomocí iontově selektivní elektrody. Pro snadný přístup substrátů a TPP^+ do mitochondrií jsme hepatocyty permeabilizovali digitoninem. Zjistili jsem, že mechanismus účinku tBHP na $\Delta\mu\text{H}^+$ závisí na použitém substrátu. Pokud jsme mitochondrie energizovali substráty pro komplex I (glutamátem a malátem), 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 energizovány sukcinátem (substrátem komplexu II). V tomto případě však CSA plně inhiboval snížení $\Delta\mu\text{H}^+$ vyvolané tBHP (graf 7). 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 přidávkem Ca^{2+} a Pi. 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. Tert-butylhydroperoxid vyvolává bifázickou redukci NAD(P)H. První fáze je rychlá a je během ní oxidováno asi 85% pyridinnukleotidů (Lemeshko, 2002). Druhá fáze je pomalejší a je spojena s mitochondriální produkcí ROS a otevřením PTP (Lemeshko, 2002; Nieminen et al., 1997). Naše výsledky tedy naznačují, že pokles aktivity komplexu I vlivem tBHP není jen důsledkem otevření PTP, ale otevření PTP předchází. Další možností, proč CSA neinhibuje pokles $\Delta\mu\text{H}^+$ v přítomnosti pyruvátu a

malátu může být otevření jiného typu kanálu ve vnitřní membráně necitlivého na CSA (Kusnareva a Sokolove, 2000). 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).

7.1.2.3 *Efekt tBHP na mitochondriální produkci ROS*

Mitochondrie jsou považovány za jednoho z největších zdrojů ROS v buňce. Uvádí se, že 1-2 % O_2 konzumovaného mitochondriemi podléhá jednoelektronové redukci za vzniku superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), prekursoru ostatních ROS (Boveris a Chance, 1973). Všechny enzymové komplexy dýchacího řetězce kromě terminální COX jsou termodynamicky schopné produkovat $O_2^{\cdot-}$ (Turrens, 2003; Drahotka et al., 2002). Relativní příspěvek jednotlivých komplexů k celkové produkci $O_2^{\cdot-}$ se v různých orgánech liší. Produkce ROS je komplexně regulovaná elektrochemickým membránovým potenciálem a závisí na aktivitě respirace. (Starkov a Fiskum, 2003; Nohl et al., 2005). Za nejvýznamnější producenty jsou považovány komplex I a komplex III. V mitochondriální matrix jsou pravděpodobně také další oxidoreduktázy schopné produkce ROS v závislosti na NAD(P)H/NAD(P⁺) (Grivennikova a Vinogradov, 2006). Tert-butilhydroperoxid způsobuje oxidaci pyridinnukleotidů, zvýšení koncentrace Ca^{2+} v matrix a zvýšení mitochondriální produkci ROS (Lemasters, 1999, Nieminen et al., 1997). Vliv tBHP na mitochondriální produkci ROS jsme hodnotili u izolovaných mitochondrií s využitím sondy CM-H₂DCFDA. Tato sonda proniká přes membrány do buněk a do mitochondrií, kde je hydrolyzována a po reakci s ROS vzniká fluorescenční produkt. Jelikož CM-H₂DCF nereaguje specificky s konkrétním ROS je využíván k hodnocení celkové produkce reaktivních forem kyslíku. Zjistili jsme, že tBHP v závislosti na době inkubace zvyšuje mitochondriální produkci ROS (graf 14). Nejvyšší hladina ROS však nebyla naměřena u nejvyšší použité koncentrace tBHP (3 mM). Maximální nárůst koncentrace ROS nastal při inkubaci mitochondrií s 1,0 tBHP. Důvodem může být otevření PTP. Batandier et al. (2004) zjistili, že otevření PTP inhibuje mitochondriální produkci ROS v případě, kdy jsou mitochondrie energizovány substráty pro komplex I nebo pro komplex II. Pokud je však k mitochondriím přidán NADH, otevření PTP indukovalo u mitochondrií energizovaných substráty komplexu I zvýšení produkce ROS. Jak již bylo řečeno dříve, tBHP vyvolává masivní oxidaci pyridinnukleotidů. Otevření PTP ještě depleci PN podporuje, což může být důvodem snížené produkce ROS. Tyto výsledky se shodují i s měřením produkce malondialdehydu, produktu lipoperoxidace. Největší nárůst MDA byl

pozorován v koncentračním rozmezí tBHP 0,5 – 1,0 mM. My jsme také měřili 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 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). Ti pozorovali u mitochondrií izolovaných z mozku potkana a holuba vyšší produkci ROS bez přítomnosti rotenonu s glutamátem a malátem, než se sukcinátem. Důvodem může být to, že sukcinát dependentní tvorba ROS je velmi citlivá k poklesu $\Delta\mu H^+$ (Starkov a Fiskum, 2003; Grivennikova a Vinogradov, 2006). Zpětný tok e^- vyžaduje vysoký membránový potenciál a je inhibován rozpráhovači a procesy snižujícími membránový potenciál (Lenaz et al., 2006). Prokázali jsme, že tBHP snižuje $\Delta\mu H^+$ již ve velmi nízkých koncentracích (0,1 mM). Tet-butylhydroperoxid má rozpráhovací efekt na respiraci aktivovanou sukcinátem (Drahota et al., 2005).

7.1.2.4 *Efekt tBHP na bobtnání mitochondrií*

Jak již bylo řečeno dříve vysoká intramitochondriální koncentrace Ca^{2+} , Pi, ROS a dalších látek má za následek nescifické zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány pro ionty a substráty do 1,5 kDa (Lemasters, 1999, Orrenius, 2004). Zvýšená permeabilita je způsobena otevřením nescifického póru - PTP. Primárně se zřejmě jedná o pór vnitřní membrány, vyvolává však sekundární změny vnější membrány (Bernardi et al., 2006). Předpokládá se účast ANT, VDAC a řada dalších proteinů, například cyklofilin D, hexokináza, Bax, Bid a kreatinkináza, mohou být buď součástí komplexu, nebo ovlivňovat jeho funkci a propustnost (Lemasters a Nieminen, 2001, Zoratti et al., 2005). Roli zde zřejmě hraje i respirační komplex I a kardiolipin (Bernardi et al., 2006). Výsledkem otevření póru je depolarizace mitochondrií, deplece pyridinnukleotidů, hydrolýza ATP F_1F_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, 1999, Skulachev, 1999). Sledovali jsme vliv tBHP na otevření PTP pomocí měření poklesu absorbance suspenze mitochondrií při 520 nm v důsledku změn jejich objemu (graf 16). Přidavek 3 mM tBHP způsobil bobtnání mitochondrií, obdobně jako zvýšení koncentrace Ca^{2+} (400 μM). Pokud jsme kombinovali vliv tBHP a Ca^{2+} došlo ke znásobení efektu a k daleko masivnějšímu bobtnání. To značí spolupráci mezi zvýšenou hladinou Ca^{2+} a ROS při otevírání PTP. Pokud byly mitochondrie

nejdříve inkubovány s CSA, snížení absorbance v důsledku bobtnání nebylo zaznamenáno. Bobtnání mitochondrií navozené vlivem tBHP a Ca^{2+} bylo tedy vyvolané otevřením CSA senzitivního PTP. K indukci otevření PTP a bobtnání mitochondrií jsme použili poměrně vysokou koncentraci tBHP a také vysokou koncentraci kalcia (v médiu nebyl fosfát). V buňkách jsou mitochondrie obklopeny cytoplazmatickými proteiny. Tento onkotický tlak může ovlivnit bobtnání mitochondrií (Batandier et al., 2004). Bylo prokázáno, že tBHP indukuje otevření PTP i v intaktních buňkách (Lemasters, 1998; Nieminen et al., 1997; Collins et al., 2002). Indukci PTP předchází zvýšení Ca^{2+} v mitochondriální matrix a zvýšená produkce ROS (Kmoníčková et al., 2000; Lemasters, 1999). Tert-BHP zvyšuje koncentraci Ca^{2+} zejména vyplavením z intracelulárních zásob (Martínez-Burgos et al., 2006). Bylo zjištěno, že tBHP oxiduje –SH skupiny ryanodinového receptoru endoplazmatického retikula (Huang et al., 2005). Je třeba zdůraznit, že ne všechny mitochondrie v buňce jsou stejně náchylné k otevření PTP a otevření PTP nemusí být synchronní proces (Batandier et al., 2004; Collins et al., 2002). Následkem delšího otevření PTP je buněčná smrt. O způsobu buněčné smrti rozhoduje stav buňky a množství a stupeň poškozených mitochondrií (Tatsumi et al., 2003, Kirveliēne et al., 2003).

7.1.3 Efekt tBHP na lipoperoxidaci

Tert-BHP je známý induktor lipoperoxidací buněčných membrán (Jewell et al., 1986). Za iniciaci a propagaci LPO jsou zodpovědné terciární butoxylový a butylperoxylový radikál, které vznikají při metabolismu tBHP pomocí cytochromu P450 (Cadenas et Sies, 1982). 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. Superoxidový radikál vznikající na matrixové straně vnitřní mitochondriální membrány neproniká membránou a zůstává v matrix. O_2^- produkovaný na vnější straně se může do cytozolu dostat přes VDAC (Han et al., 2003). O_2^- je následně konvertován na H_2O_2 . Peroxid vodíku již může procházet membránami. Diethylmaleát a methansulfonát u hepatocytů navozují rychlý pokles GSH. Tirmenstein et al. (2000) prokázali, že za lipoperoxidaci indukovanou těmito látkami jsou zodpovědné ROS vznikající v mitochondriích. Snížení GSH a zvýšená produkce ROS vede k uvolnění přechodných kovů z jejich vazby a k indukci lipoperoxidaci (Staubli a Boelsteri, 1998; Tirmenstein et al., 2000). Stupeň lipoperoxidace jsme hodnotili pomocí koncentrace malondialdehydu (resp. TBARS) v inkubačním médiu hepatocytů kultivovaných v primokulturách. Malondialdehyd je sekundární produkt lipoperoxidace, který vykazuje

cytotoxické a mutagenní účinky (Arguelles et al., 2004). Tert-butyhydroperoxid zvyšuje lipoperoxidace v závislosti na dávce a době inkubace (graf 4). Signifikantní nárůst MDA vyvolala použitá koncentrace tBHP 0,5 mmol/l. Nejvýraznější nárůst byl zaznamenán po 30 min v rozmezí 0,5 – 1,0 mM tBHP. To koresponduje s naměřenou mitochondriální produkcí ROS. Některé zdroje uvádějí, že koncentrace GSH musí klesnout pod určitou hladinu, aby byla navozena lipoperoxidace (Tiermenstein et al., 2000). Při použití 0,1 mM tBHP došlo k poklesu intracelulárního GSH na 80 % původních hodnot a tato koncentrace tBHP vedla ke zvýšené produkci ROS v mitochondriích, nevedla však ještě k signifikantnímu nárůstu lipoperoxidace. Jak již bylo řečeno, k lipoperoxidaci v případě tBHP přispívají terciální butoxylový a butylperoxylový radikál. Koncentrace MDA byla zvýšená již po 5 minutové inkubaci hepatocytů s 1,5 mM tBHP a dále rostla po celý sledovaný interval (60 minut). Rashba-Step et al. (1997) zjistili, že peroxidace membránových fosfolipidů usnadňuje aktivaci fosfolipázy A₂ a mobilizaci kyseliny arachidonové. Tento efekt je spíše vyvolán zvýšenou hladinou ROS a Ca²⁺ a lipoperoxidace je přidružený jev (Martín et al., 2001). Důsledkem lipoperoxidace je změna biofyzikálních vlastností membrány (fluidita, elektrická rezistence), mění se počet SH skupin proteinů. Vznikem křížové vazby mezi zbytkem aminokyselin a proteinů a aldehydových produktů lipoperoxidace je snižovaná mobilita plazmatických proteinů. Následkem zvýšené propustnosti mohou i relativně velké molekuly intracelulárních enzymů vytékat z buňky (Jakus a Lopuchová, 1999).

7.1.4 Efekt tBHP na aktivitu LDH v médiu

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytoplazmatický enzym, který je uvolňován z buněk při poškození plazmatické membrány. Využívá se jako poměrně citlivý ukazatel míry integrity plazmatické membrány. Hodnotili jsme časový i koncentrační efekt tBHP na aktivitu LDH uvolněné z hepatocytů v primokultuře do média (graf 3). 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 nekrózou. 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.

7.1.5 Efekt tBHP na morfologii hepatocytů

Tert-butyhydroperoxid vyvolává sled reakcí, které vedou k poškození hepatocytů. Poškození je doprovázeno morfologickými změnami. Neporušené hepatocyty vykazují

vysoký kontrast mezi buňkou a okolním médiem, mají jasně zřetelnou jadernou membránu, nízký stupeň granule cytoplazmy a ostře viditelné jádro s jadérky (Berry et al, 1991). Hepatocyty v suspenzi nevytvářejí buněčné kontakty, které jsou pro tyto buňky velmi důležité. Během izolace prodělávají stres a dochází k částečnému poškození. Vlivem tBHP došlo k výrazné granulaci cytoplazmy a vytváření blebů. Poškozené buňky neměly jasně ohraničené jádro a nejsou vidět jadérka.

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. Buňky po inkubaci s 1,5 mM tBHP mají porušenou integritu cytoplazmatické membrány, což bylo potvrzeno zvýšením aktivity LDH v médiu, zvyšuje se u nich stupeň granule cytoplazmy, jádro kondenzuje, přestávají být viditelná jadérka, hepatocyty se zakulacují a odlučují od podkladu.

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 nekróza (Haidara et al., 2001).

7.2 Hepatoprotektivní účinek SAME na oxidační poškození potkaních hepatocytů

S-adenosylmethionin (SAME) se nachází téměř ve všech savčích buňkách (Friedel et al, 1989). Játra zaujímají centrální úlohu v metabolismu SAME. Bylo zjištěno, že aktivita S-adenosyl-L-methioninsyntázy, 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; Gasso et al., 1996; Lieber, 2002; Lotková et al., 2005). Řada klinických studií u člověka rovněž popisuje jeho pozitivní účinek při léčbě některých jaterních onemocnění (Friedel et al., 1989; Ponsoda et al., 1991; 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 (Ponsoda et al. 1991; Wu et al., 1996), tím může působit protektivně proti oxidačnímu poškození.

Testovali jsme tedy potenciální efekt SAME na oxidační poškození hepatocytů vyvolané tBHP. Na základě předešlých experimentů jsme pro testování hepatoprotektivního účinku SAME zvolili 30 minutovou inkubaci buněk s 1,5 mM tBHP. Tato koncentrace vyvolává nekrózu hepatocytů, což je mimo jiné dokumentováno zvýšenou aktivitou LDH v médiu. Díky dřívějším experimentům (Kučera, 2005) jsme zjistili, že pokud byly hepatocyty koinkubovány s tBHP a SAME, nebyl protektivní účinek SAME prokázán. Hepatocyty jsme proto nejprve po dobu 30 minut inkubovali se SAME až poté jsme je vystavili účinku 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 neměla na hladinu glutathionu vliv. Tato dávka je zřejmě příliš malá, aby SAME mohlo penetrovat do hepatocytů (Bontemps a van den Berghe, 1997). V plazmatické membráně savčích buněk, neexistuje specifický transportní systém pro SAME (Murphy a Spence, 1972). Sulfoniový iont v molekule SAME stěžuje jeho přechod přes membrány. Transportní systém v savčích buňkách je pouze pro jeho přenos do mitochondrií (Horne et al, 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, což jsme bohužel neměřili. 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 (Graf 21). 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. Zajímalo 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 signifikantně 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 vystavené tBHP vypadaly podobně jako kontrolní a došlo k obnovení 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 Bontemps a van den Bergheho (1997) se koncentrace dostatečná pro vstup do buněk pohybuje okolo 200 μM (\approx 80 mg/l). SAME pak může přispívat nejen k novotvorbě GSH, ale i k transmethylacím uvnitř buňky či k syntéze polyaminů, která je za některých stavů snižena. Udává se, že 30 % SAME v intaktních hepatocytech je lokalizováno v mitochondriích. Jak bylo zmíněno, SAME vstupuje do mitochondrií pomocí specifického transportního systému. V mitochondriích pak může být využito k methylaci DNA, RNA a proteinů a rovněž k biosyntéze ubiquinonu.

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- β -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. Inkubace se samotným SAME nijak neovlivňuje produkci MDA. Tert-butylhydroperoxid (1,5 mM, 30 min) indukuje výrazné zvýšení koncentrace TBARS. Všechny testované koncentrace SAME signifikantně snížily stupeň lipoperoxidace navozené tBHP, koncentrace TBARS však oproti kontrolám zůstala zvýšena asi 6x. Cytotoxicita byla hodnocena pomocí měření aktivity LDH v médiu. Inkubace hepatocytů se samotným SAME stejně jako v případě MDA neovlivňovala aktivitu LDH v médiu. SAME však poměrně výrazně snižoval aktivitu LDH po inkubaci hepatocytů s tBHP. Tento efekt byl pozorován i u nejnižší použité koncentrace 10 mg/l. 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 transmetylacím membránových fosfolipidů lokalizovaných na vnější straně plazmatické membrány, kde byla detekována methyltransferázová aktivita (Schanche et al, 1981). To potvrzují i výsledky Bontempse a van den Bergheho (1997). Za hlavní methylační reakci byla označena přeměna fosfatidylethanolaminu na fosfatidylcholinu, jejichž optimální poměr je důležitý pro udržení struktury a funkce membrány (Boelsterli et al, 1983).

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.

8 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 nescifického 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 transsulfuračním
- 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 organely, musíme být opatrní při interpretaci výsledků, neboť organely 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.

Závěrem lze říci, že jsme na naše pracoviště zavedli metody hodnocení energetického metabolismu, které jsme využili ke zkoumání mechanismu oxidačního poškození izolovaných hepatocytů a následně ke zkoumání mechanismu účinku látky s potenciálním hepatoprotektivním efektem.

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.

Tato práce byla podpořena granty: GAČR 303/03/H065, GAUK 126/04/C a MSM 0021620820

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Ahmed-Choudhury J, Orsler DJ, Coleman R. *Hepatobiliary effects of tertiary-butylhydroperoxide (tBOOH) in isolated rat hepatocyte couplets*. Toxicol Appl Pharmacol **1998**;152:270-5.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robert K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd. Ed., New York:Garland, **1994**.
3. Anders MW. *Bioactivation mechanisms and hepatocellular damage*. ch. 22, *The Liver: Biology and Pathobiology*. 2nd. Ed., Raven Press, Ltd., New York, **1988**.
4. Andreyev A, Fiskum G. *Calcium induced release of mitochondrial cytochrome c by different mechanisms selective for brain versus liver*. Cell Death Differ **1999**;6(9):825-32.
5. Arguelles S, Garcia S, Maldonado M, Machado A, Ayala A. *Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status?* Biochim Biophys Acta. **2004**;1674(3):251-9.
6. Avila MA, Garcia-Trevijano ER, Martinez-Chantar ML, Latasa MU, Perez-Mato I, Martinez-Cruz LA, del Pino MM, Corrales FJ, Mato JM. *S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function*. Alcohol **2002**;27(3):163-7.
7. Avila MA, Mingorance J, Martinez-Chantar ML, Casado M, Martin-Sanz P, Bosca L, Mato JM. *Regulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase during septic shock: role of nitric oxide*. Hepatology **1997**;25:391-6.
8. Ballet F. *Hepatotoxicity in drug development: detection, significance and solutions*. J Hepatol **1997**;26(Supp2):26-36.
9. Ballard JW, Whitlock MC. *The incomplete natural history of mitochondria*. Mol Ecol **2004**;13(4):729-44.
10. Barbouti A, Doulias PT, Nouis L, Tenopoulou M, Galaris D. *DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂*. Free Radic Biol Med **2002**;33(5):691-702.
11. 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.
12. Barrientos A. *In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities*. Methods **2002**;26(4):307-16.
13. 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):197-204.
14. Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. *Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver*. Biochem Biophys Res Commun **1995**;213(3):896-900.
15. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, Forte MA. *The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target*. FEBS J **2006**;273(10):2077-99.
16. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. *Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues*. Eur J Biochem **1999**;264(3):687-701.
17. Berry MN, Friend DS. *High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study*. J Cell Biol **1969**;43:506-20.
18. 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.
19. Berry MN, Phillipst JW. *The isolated hepatocyte preparation: 30 years on*. Biochem Soc Trans **2000**;28:131-5.
20. Bhadriraju K, Hansen LK. *Extracellular matrix- and cytoskeleton-dependent changes in cell shape and stiffness*. Exp Cell Res **2002**;278:92-100.

21. Birraux J, Genin B, Matthey-Doret D, Mage R, Morel P, Lecoultre C. *Hepatocyte cryopreservation in three-dimensional structure*. *Transplant Proc* **2002**;34:764-7.
22. Boelsterli UA, Rakhit G, Balazs T. *Modulation by S-adenosyl-L-methionine of hepatic Na⁺,K⁺-ATPase, membrane fluidity, and bile flow in rats with ethinyl estradiol-induced cholestasis*. *Hepatology* **1983**;3:12-7.
23. Bombardieri G, Pappalardo G, Bernardi L, Barra D, Di Palma A, Castrini G. *Intestinal absorption of S-adenosyl-L-methionine in humans*. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **1983**;21:186-8.
24. 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.
25. Bose S, Weikl T, Bugl H, Buchner J. *Chaperone function of Hsp90-associated proteins*. *Science* **1996**;274:1715-7.
26. Boveris A, Chance B. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. *Biochem J* **1973**;134(3):707-16.
27. 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.
28. Brent JA, Rumack BH. *Role of free radicals in toxic hepatic injury I. Free radical biochemistry*. *J Toxicol Clin Toxicol*. **1993**;31(1):139-71.
29. Briere JJ, Favier J, El Ghouzzi V, Djouadi F, Benit P, Gimenez AP, Rustin P. *Succinate dehydrogenase deficiency in human*. *Cell Mol Life Sci* **2005**;62(19-20):2317-24.
30. Brodanová M, Kordač V. *Klinická Hepatologie*, Grada Avicenum, **1993**.
31. Brookes PS. *Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple*. *Free Radic Biol Med* **2005**;38(1):12-23.
32. 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.
33. Brookes PS, Levonen AL, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM. *Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species*. *Free Radic Biol Med* **2002**;33(6):755-64.
34. Brown GC. *Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase*. *FEBS Lett* **1995**;369(2-3):136-9.
35. Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihn BH. *Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease*. *Free Radic Biol Me*. **1998 Apr**;24(6):1023-39.
36. Byrne AM, Lemasters JJ, Nieminen AL. *Contribution of increased mitochondrial free Ca²⁺ to the mitochondrial permeability transition induced by tert-butylhydroperoxide in rat hepatocytes*. *Hepatology* **1999**;29:1523-31.
37. Cabrero C, Duce AM, Ortiz P, Alemany S, Mato JM. *Specific loss of the high-molecular-weight form of S-adenosyl-L-methionine synthetase in human liver cirrhosis*. *Hepatology* **1988**;8:1530-4.
38. Cadenas E, Sies H. *Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide. Relation to microsomal hemoproteins, oxygen dependence, and lipid peroxidation*. *Eur J Biochem* **1982**;124:349-56.
39. Calbresse EJ, Baldwin LA, Mehenale HM. *Contemporary issues in toxicology. G₂ subpopulation in rat liver induced into mitosis by low level exposure to cyrbon tetrachloride: an adaptive response*. *Tox and appl Pharm* **1993**;121:1-7.
40. Cogger VC, Muller M, Fraser R, McLean AJ, Khan J, Le Couteur DG. *The effects of oxidative stress on the liver sieve*. *J Hepatol* **2004**;41:370-6.
41. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. *Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells*. *EMBO J* **2002**;21(7):1616-27.

42. Cooper AJ. *Methionine transamination in vivo*. *Biochem J* **1989**;262:689-91.
43. 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.
44. Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. *A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)*. *Biochem Biophys Res Commun* **1993**;197(1):40-5.
45. Červenková K, Belejová M, Veselý J, Chmela Z, Rypka M, Ulrichová J, Modrianský M, Maurel P. *Cell suspensions, cell cultures and tissue slices: important metabolic in vitro system*. *Biomed Papers* **2001**;145:57-60.
46. Červinka M. *Pokroky molekulární biologie v roce 1997*. *Lékařské zprávy LF UK v HK* **1998**;43:5-6
47. Červinková Z. *Toxické poškození jater*. *Postgrad Med* **1999**;2: 20-23
48. Červinková Z, Kučera O, Lotková H, Drahota Z, Houštěk J. *Hodnocení energetického metabolismu izolovaných hepatocytů pomocí oxygrafie*. *Acta Med (Hradec Králové)* **2002**;45 (Supp2):65-76.
49. Davies MJ. *Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions*. *Biochem J* **1989**;257:603-6.
50. Davies MJ. *The oxidative environment and protein damage*. *Biochim Biophys Acta* **2005**;1703:93-109.
51. de Silva D, Guo JH, Aust SD. *Relationship between iron and phosphate in mammalian ferritins*. *Arch Biochem Biophys* **1993**;303:451-5.
52. Diehl A, Yang SQ, Cote P, Wand GS. *Chronic ethanol consumption disturbs G-protein expression and inhibits cyclic AMP-dependent signaling in regenerating rat liver*. *Hepatology* **1992**;16:1212-19.
53. Dilworth C, Hamilton GA, George E, Timbrell JA. *The use of liver spheroids as an in vitro model for studying induction of the stress response as a marker of chemical toxicity*. *Tox In Vitro* **2000**;14:67-73.
54. Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F et al.. *Genetic basis of mitochondrial function and morphology in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **2002**;13(3):847-53.
55. Donini A, Baccarani U, Lavaroni S, Djaliti U, Adami V, Risaliti A, Cautero N, Degrassi A, Brejadola F. *Liberase HI enzyme versus collagenase typ P for porcine hepatocyte isolation*. *Transplant Proc* **2001**;33:1972-3.
56. Drahota Z, Chowdhury SK, Floryk D, Mracek T, Wilhelm J, Rauchova H, Lenaz G, Houstek J. *Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide*. *J Bioenerg Biomembr* **2002**;34(2):105-13.
57. Drahota 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**;54:67-72.
58. Duce AM, Ortiz P, Cabrero C, Mato JM. *S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis*. *Hepatology* **1988**;8:65-8.
59. Dudnik LB, Khrapova NG. *Characterization of bilirubin inhibitory properties in free radical oxidation reactions*. *Membr Cell Biol* **1998**;12:233-40.
60. Dvorak Z, Kosina P, Walterova D, Simanek V, Bachleda P, Ulrichova J. *Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from Silybum marianum*. *Toxicol Lett* **2003**;137(3):201-12.
61. Dvořák Z, Adler J, Ulrichová J. *Lidský hepatocyt II. – Kryopresevace*. *Česká a Slovenská Farmacie* **2000**;49:21-5.
62. Egner A, Jakobs S, Hell SW. *Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**;99(6):3370-5.

63. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. *Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I*. Biol Chem **2000**;275(1):223-8.
64. 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**;850:436-48.
65. Fausto N. *Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells*. Hepatology **2004**;39:1477-87.
66. Fausto N, Riehle KJ. *Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications*. J Hepatobiliary Pancreat Surg **2005**;12:181-9.
67. Fenaille F, Mottier P, Turesky RJ, Ali S, Guy PA. *Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders*. J Chromatogr A **2001**;921:237-45.
68. Fernandez E, Galan AI, Moran D, Gonzalez-Buitrago JM, Munoz ME, Jimenez R. *Reversal of cyclosporine A-induced alterations in biliary secretion by S-adenosyl-L-methionine in rats*. J Pharmacol Exp Ther **1995**;275:442-9.
69. 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.
70. Finkelstein JD, Kyle WE, Martin JL, Pick AM. *Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine*. Biochem Biophys Res Commun **1975**;66:81-7.
71. Flint OP. *Predict in vivo toxicity*. Toxicol. in vitro **1998**;12:591-5.
72. 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.
73. Fontecave M, Atta M, Mulliez E. *S-adenosylmethionine: nothing goes to waste*. Trends Biochem Sci **2004**;29(5):243-9.
74. Frank V, Kadenbach B. *Regulation of the H⁺/e⁻ stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios*. FEBS Lett **1996**;382(1-2):121-4.
75. Franklin MR. *Inhibition of mixed-function oxidations by substrates forming reduced cytochrome P-450 metabolic-intermediate complexes*. Pharmacol Ther. **1977**;2:227-245.
76. Frey TG, Mannella CA. *The internal structure of mitochondria*. Trends Biochem Sci **2000**;25(7):319-24.
77. 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.
78. Gallagher EP, Gardner JL, Barber DS. *Several glutathione S-transferase isozymes that protect against oxidative injury are expressed in human liver mitochondria*. Biochem Pharmacol **2006**;71(11):1619-28.
79. Gasso M, Rubio M, Varela G et al. *Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis*. J Hepatol **1996**;25:200-5.
80. Ghezzi P. *Regulation of protein function by glutathionylation*. Free Radic Res **2005**;39(6):573-80.
81. Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA. *The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation*. FEBS Lett **2003**;546(2-3):355-8.
82. Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. *Production of nitric oxide by mitochondria*. J Biol Chem **1998**;273(18):11038-43.
83. Gnaiger E. *Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply*. Respir Physiol **2001**;128(3):277-97.
84. Gnaiger E, Kuznetsov AV. *Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c*. Biochem Soc Trans **2002**;30(2):252-8.

85. Gohil VM, Hayes P, Matsuyama S, Schagger H, Schlame M, Greenberg ML. *Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent*. J Biol Chem **2004**;279(41):42612-8.
86. Gordeeva AV, Zvyagilskaya RA, Labas YA. *Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells*. Biochemistry (Mosc) **2003**;68(10):1077-80.
87. 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.
88. Grattagliano I, Porticasa P, Palmieri VO, Palasciano G. *Overview on the mechanisms of drug-induced liver cell death*. Annals of hepatology **2002**;1:162-8.
89. Griffiths BJN, Evans PJ. *Early membrane depressions in hepatocytes cultured on primary supports*. Cell Biol Int **2001**;25:489-94.
90. Grillo MA, Colombatto S. *S-adenosylmethionine and protein methylation*. Amino Acids **2005**;28(4):357-62.
91. Grivennikova VG, Vinogradov AD. *Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I*. Biochim Biophys Acta **2006**;1757(5-6):553-61.
92. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. *Degradation of oxidized proteins in mammalian cells*. FASEB J **1997**;11:526-34.
93. Guillouzo A. *Liver cell models in in vitro toxicology*. Environment. Health Persp **1998**;106(Supp2):511-31.
94. Guillouzo A, Morel F, Langouet S, Meheo K, Rissel M. *Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds*. J Hepatol **1997**;26(Supp2):73-80.
95. Gunter TE, Pfeiffer DR. *Mechanisms by which mitochondria transport calcium*. Am J Physiol **1990**;258:C755-86.
96. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 9th edn. Philadelphia: WB Saunders. **1996**.
97. Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. *Calcium and mitochondria*. FEBS Lett **2004**;567(1):96-102.
98. Haidara K, Morel I, Abalea 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.
99. Haines TH, Dencher NA. *Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation*. FEBS Lett **2002**;528(1-3):35-9.
100. Hajnoczky G, Davies E, Madesh M. *Calcium signaling and apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun **2003**;304(3):445-54.
101. Halpert J, Naslund B, Betner I. *Suicide inactivation of rat liver cytochrome P-450 by chloramphenicol in vivo and in vitro*. Mol Pharmacol **1983**;23:445-52.
102. 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.
103. Herman B, Nieminen AL, Gores GJ, Lemasters JJ. *Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated by an abrupt increase in plasma membrane permeability*. FASEB J **1988**;2:146-51.
104. Hirsch-Ernst KI, Ziemann C, Rustenbeck I, Kahl GF. *Inhibitors of mdr1-dependent transport activity delay accumulation of the mdr1 substrate rhodamine 123 in primary rat hepatocyte cultures*. Toxicology **2001**;167(1):47-57.
105. Hissin PJ, Hilf R. *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. Anal Biochem **1976**;74:214-26.
106. Holmgren A. *Thioredoxin and glutaredoxin systems*. J Biol Chem **1989**;264:13963-6

107. 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.
108. Hong Y-L, Yeh S-L, Chang C-Y, Hu M-L. *Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and improved high-performance liquid chromatography-based method.* *Clin Biochem* **2000**;33:619-25.
109. Horák J. *Poléková jaterní selhání.* *Postgrad Med* **2000**;4:444-447.
110. Horikawa S, Ozasa H, Ota K, Tsukada K. *Immunohistochemical analysis of rat S-adenosylmethionine synthetase isozymes in developmental liver.* *FEBS Lett* **1993**;330:307-11.
111. Horne DW, Holloway RS, Wagner C. *Transport of S-adenosylmethionine in isolated rat liver mitochondria.* *Arch Biochem Biophys* **1997**;343:201-6.
112. Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie.* 1. vydání, Praha: Triton, **1998**.
113. Huang HM, Chen HL, Xu H, Gibson GE. *Modification of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores by select oxidants produces changes reminiscent of those in cells from patients with Alzheimer disease.* *Free Radic Biol Med* **2005**;39(8):979-89.
114. Hutter E, Unterluggauer H, Garedew A, Jansen-Durr P, Gnaiger E. *High-resolution respirometry-a modern tool in aging research.* *Exp Gerontol.* **2006**;41(1):103-9.
115. Chance B, Sies H, Boveris A. *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.* *Physiol Rev* **1979**;59:527-605.
116. Chandoga J, Hampl L. *Izolácia subcelulárnych štruktúr pečene bez použitia ultracentifúgy.* *Čes Slov Gastroent* **1994**;48:67-73.
117. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. *S-Adenosylmethionine and methylation.* *FASEB J.* **1996**;10(4):471-80.
118. 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**;265:392-400.
119. Iverson SL, Orrenius S. *The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis.* *Arch Biochem Biophys* **2004**;423(1):37-46.
120. Jakoby W. B. *Detoxication: Conjugation and Hydrolysis. The Liver: Biology and Pathobiology.* 2nd edit., Raven Press, Ltd., New York **1998**, 375-385.
121. Jakus V, Lopuchová M. *Role of free radicals, oxidative stress and antioxidant system in liver diseases.* *Bratisl. Lek Listy* **1999**;100:548-59.
122. Jezek P. *Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins--UCPn.* *Int J Biochem Cell Biol* **2002**;34(10):1190-206.
123. Johnson LV, Walsh ML, Chen LB. *Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**;77(2):990-4.
124. Jones BE, Czaja MJ. *Mechanisms of hepatic toxicity III. Intracellular signaling in response to toxic liver injury.* *AJP-Gastrointestinal and Liver Physiol* **1998**;275:G874-8.
125. Jouaville LS, Ichas F, Mazat JP. *Modulation of cell calcium signals by mitochondria.* *Mol Cell Biochem* **1998**;184(1-2):371-6.
126. Kadenbach B. *Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation.* *Biochim Biophys Acta* **2003**;1604(2):77-94.
127. Kahl R. *Toxic liver injury.* *Oxford Textbook of Clinical Hepatology.* Oxford Medica Publications. **1992**
128. 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.

129. Kanno T, Sato EE, Muranaka S et al.. *Oxidative stress underlies the mechanism for Ca(2+)-induced permeability transition of mitochondria*. Free Radic Res **2004**;38(1):27-35.
130. Kanzler RS., Galle PR. *Apoptosis and the liver*. Sem Can Biol **2000**;10:173-84.
131. Kaplowitz N. *Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury*. Semin Liver Dis **2002**;22:137-44.
132. Karp DR, Shimooku K, Lipsky PE. *Expression of gamma-glutamyl transpeptidase protects ramos B cells from oxidation-induced cell death*. J Biol Chem **2001**;276(6):3798-804.
133. Kim A, Murphy MP, Oberley TD. *Mitochondrial redox state regulates transcription of the nuclear-encoded mitochondrial protein manganese superoxide dismutase: a proposed adaptive response to mitochondrial redox imbalance*. Free Radic Biol Med **2005**;38(5):644-54.
134. 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.
135. Kirveliėne V, Sadauskaite A, Kadziauskas J, Sasnauskiene S, Juodka B. *Correlation of death modes of photosensitized cells with intracellular ATP concentration*. FEBS Lett **2003**;553(1-2):167-72.
136. 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.
137. Kmonickova E, Kamenikova L, Hynie S, Farghali H. *Cyclosporin A modifies cytoplasmic calcium levels in isolated hepatocytes exposed to oxidative stress due to tert-butyl hydroperoxide*. Physiol Res **2000**;49(4):471-4.
138. Kolar F, Jezkova J, Balkova P et al. *Role of oxidative stress in PKC- δ up-regulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol **2006**(v tisku).
139. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H. *Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite*. Free Radic Res **1997**;27(3):245-54.
140. Korenaga M, Wang T, Li Y, Showalter LA, Chan T, Sun J, Weinman SA. *Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production*. J Biol Chem **2005**;280(45):37481-8.
141. Kosina P, Dvořák Z, Waltrová D. *Lidský hepatocyt I: Model pro studium metabolismu a toxicity xenobiotik*. Čs a Slo Farm **1999**;48:65-71.
142. Kotb M, Mudd SH, Mato JM, Geller AM, Kredich NM, Chou JY, Cantoni GL. *Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products*. Trends Genet **1997**;13:51-2.
143. Kowaltowski AJ. *Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production*. Braz J Med Biol Res **2000**;33(2):241-50.
144. Křiváková P, Červinková Z, Lotková H, Kučera O, Roušar T. *Mitochondrie a jejich úloha v buněčném metabolismu*. Acta Medica **2005**;48(2Spl):57-67.
145. Kučera O. *Studium poškození a reparace hepatocytů po působení xenobiotiky v podmínkách in vivo a in vitro*. Disertační práce, UK, LFHK, Fyziologie a patologická fyziologie **2005**.
146. Kushnareva YE, Sokolove PM. *Prooxidants open both the mitochondrial permeability transition pore and a low-conductance channel in the inner mitochondrial membrane*. Arch Biochem Biophys **2000**;376(2):377-88.
147. 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.
148. Lander HM. *An essential role for free radicals and derived species in signal transduction*. FASEB J **1997**;11:118-24.
149. Larrey D, Pageaux G P. *Genetic predisposition to drug-induced hepatotoxicity*. J Hepatol **1997**;26(Suppl.2):12-21.

150. Latour I, Demoulin JB, Buc-Calderon P. *Oxidative DNA damage by t-butylhydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated hepatocytes.* FEBS Letters **1995**;373:299-302.
151. Latour I, De Ros E, Deneff JF, Buc Calderon P. *Protein S-thiolation can mediate the inhibition of protein synthesis induced by tert-butyl hydroperoxide in isolated rat hepatocytes.* Toxicol Appl Pharmacol **1999**;160:1-9.
152. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. *Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.* Chem Res Toxicol **1992**;5(2):227-31.
153. Lee HC, Wei YH. *Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress.* Int J Biochem Cell Biol **2005**;37(4):822-34.
154. Lefevre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Therond P, Torreilles J. *Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances.* Ann Biol Clin (Paris) **1998**;56:305-19.
155. Lemasters JJ. *Mechanisms of hepatic toxicity V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **1999**; 276: 1 - 6.
156. Lemasters JJ, Nieminen AL. *Mitochondria in pathogenesis.* New York: Kluwer Academic **2001**.
157. 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.
158. Lemeshko VV. *Biphasic oxidation of mitochondrial NAD(P)H.* Biochem Biophys Res Commun **2002**;291(1):170-5.
159. 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.
160. Letelier ME, Lepe AM, Faundez M, Salazar J, Marin R, Aracena P, Speisky H. *Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity.* Chem Biol Interact **2005**;151(2):71-82.
161. Lieber CS. *S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders.* Am J Clin Nutr **2002**;76(5):1183S-7S.
162. Liu H, Kehrer JP. *The reduction of glutathione disulfide produced by t-butyl hydroperoxide in respiring mitochondria.* Free Radic Biol Med **1996**;20(3):433-42.
163. Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. *Assay of aldehydes from lipid peroxidation: Gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid.* Anal Biochem **1997**;245:161-6.
164. López-García AMP. *Endogenous nitric oxide is responsible for the early loss of P450 in cultured rat hepatocytes.* FEBS Lett **1998**;38:145-9.
165. Lotková H. *Vliv MCT na regeneraci jater.* Disertační práce, UK, LFHK, Fyziologie a patologická fyziologie **2000**
166. 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.
167. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem **1951**;193(1):265-75.
168. Lu SC. *Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies.* FASEB J **1999**;13(10):1169-83.
169. 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.

170. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. *Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?* Hepatology **2006**;43(2 Suppl 1):S31-44.
171. Mangipudy RS, Chanda S, Mehendale HM. *Tissue regeneration as function of dose in thioacetamide hepatotoxicity.* Environ Health Perspect **1998**;103: 260-7.
172. Martin C, Martinez R, Navarro R, Ruiz-Sanz JI, Lacort M, Ruiz-Larrea MB. *tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals.* Biochem Pharmacol **2001**;62:705-12.
173. Martinez-Burgos MA, Granados MP, Gonzalez A, Rosado JA, Yago MD, Salido GM, Martinez-Victoria E, Manas 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.
174. 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.
175. 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**;270:672-80.
176. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. *S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications.* Pharmacol Ther **1997**;73:265-80.
177. Mato JM, Corrales FJ, Lu SC, Avila MA. *S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function.* FASEB J **2002**;16:15-26.
178. Medina M, Urdiales JL, Amores-Sanchez MI. *Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions.* Eur J Biochem. **2001**;268(14):3871-82.
179. Mehendale HM. *Amplified interactive toxicity of chemicals at nontoxic levels: mechanistic considerations and implications for public health.* Environ Health Perspect **1994**;102(Suppl9):139-49.
180. Meister A. *Glutathione metabolism and its selective modification.* J Biol Chem **1988**;263(33):17205-8.
181. Mesa ML, Carrizosa R, Martinez-Honduvilla C, Benito M, Fabregat I. *Changes in rat liver gene expression induced by thioacetamide: protective role of S-adenosyl-L-methionine by a glutathione-dependent mechanism.* Hepatology **1996**;23:600-6.
182. Mikhaylova VT, Thiry M, Stephanova E, Goessens G, Markov DV. *Localization of nucleic acids in hepatocyte nucleoli of rats upno D-galactosamin-induced block of transcription.* Experiment Cell Res **1996**;225:389-398
183. Mitchell P. *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.* Nature **1961**;191:144-8.
184. Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A. *Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation.* Semin Cell Dev Biol **2002**;13(6):463-7.
185. Montero M, Alonso MT, Albillos A, Garcia-Sancho J, Alvarez J. *Mitochondrial Ca(2+)-induced Ca(2+) release mediated by the Ca(2+) uniporter.* Mol Biol Cell **2001**;12(1):63-71.
186. Mudd SH, Poole JR. *Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens.* Metabolism **1975**;24:721-35.
187. Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. *Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine.* Metabolism **1980**;29:707-20.
188. Murphy JT, Spence KD. *Transport of S-adenosylmethionine in Saccharomyces cerevisiae.* J Bacteriol **1972**;109:499-504.
189. Negre-Salvayre A, Auge N, Duval C et al.. *Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes.* Methods Enzymol **2002**;352:62-71.
190. Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics*3. Academic Press, **2001**.

191. 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:C1286-94.
192. Nohl H, Gille L, Staniek K. *Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria*. Biochem Pharmacol **2005**;69(5):719-23
193. Nulton-Persson AC, Szweda LI. *Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide*. J Biol Chem. **2001**;276(26):23357-61.
194. 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**;92:153-9.
195. Orrenius S. *Mitochondrial regulation of apoptotic cell death*. Toxicol Let **2004**;149(1-3):19-23.
196. Oster G, Wang H. *Rotary protein motors*. Trends Cell Biol **2003**;13(3):114-21.
197. Paillard F, Finot F, Mouche I, Prenez A, Vericat JA. *Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new chemical entities*. Toxicol. in vitro **1999**;13: 693-700.
198. Padgham CRW, Boyle CC, Wang X-J, Raleigh SM, Wright MC, Paine AJ. *Alteration of transcription factor mRNAs during the isolation and culture of rat hepatocytes suggests the activation of a proliferative mode underlies their the-differentiation*. Biochem Biophys Res Comm **1993**;197:599-605.
199. Pajares MA, Duran C, Corrales F, Pliego MM, Mato JM. *Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione*. J Biol Chem **1992**;267: 17598-605.
200. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. *Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin*. Circ Res **2004**;94(1):53-9.
201. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Serena D, Ruggiero FM. *Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion*. Free Radic Biol Med **1999**;27(1-2):42-50.
202. Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G. *The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach*. J Comp Physiol [B] **1998**;168(3):149-58.
203. Perkins GA, Frey TG. *Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy*. Micron **2000**;31(1):97-111.
204. Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, Paradies G. *Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin*. FASEB J **2003**;17(6):714-6.
205. Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G. *Ca²⁺-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin*. J Biol Chem **2004**;279(51):53103-8.
206. 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.
207. Puig A, Gilbert HF. *Protein disulfide isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme*. J Biol Chem. **1994**;269:7764-71.
208. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. *Peroxonitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. Arch Biochem Biophys **1991**;288(2):481-7.
209. Raha S, Robinson BH. *Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis*. Am J Med Genet **2001**;106(1):62-70.

210. Rashba-Step J, Tatoyan A, Duncan R, Ann D, Pushpa-Rehka TR, Sevanian A. *Phospholipid peroxidation induces cytosolic phospholipase A2 activity: membrane effects versus enzyme phosphorylation*. Arch Biochem Biophys **1997**;343(1):44-54.
211. Richert L, Binda D, Hamilton G et al. *Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured hepatocytes*. Tox in vitro **2002**;16:89-99.
212. Rizzuto R, Bernardi P, Pozzan T. *Mitochondria as all-round players of the calcium game*. J Physiol **2000**;529 (Pt 1):37-47.
213. Ronning SA, Heatley GA, Martin TF. *Thyrotropin-releasing hormone mobilizes Ca²⁺ from endoplasmic reticulum and mitochondria of GH3 pituitary cells: characterization of cellular Ca²⁺ pools by a method based on digitonin permeabilization*. Proc Natl Acad Sci U S A **1982**;79(20):6294-8.
214. 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.
215. Rube DA, van der Bliek AM. *Mitochondrial morphology is dynamic and varied*. Mol Cell Biochem **2004**;256-257(1-2):331-9.
216. Rush GF, Alberts D. *tert.-Butyl hydroperoxide metabolism and stimulation of the pentose phosphate pathway in isolated rat hepatocytes*. Toxicol Appl Pharmacol **1986**;85:324-31.
217. Rutkauskas S, Gedrimas V, Pundzius J, Barauskas G, Basevicius A. *Clinical and anatomical basis for the classification of the structural parts of liver*. Medicina (Kaunas) **2006**;42(2):98-106.
218. Seglen PO. *Preparation of isolated rat liver cells*. Methods Cell Biol **1976**;13:29-83.
219. Senior AE, Nadanaciva S, Weber J. *The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase*. Biochim Biophys Acta **2002**;1553(3):188-211.
220. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. *Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species*. J Biol Chem **2003**;278(5):3170-5.
221. Shinbo T, Kamo N, Kurihara K, Kobatake Y. *A PVC-based electrode sensitive to DDA⁺ as a device for monitoring the membrane potential in biological systems*. Arch Biochem Biophys **1978**;187(2):414-22.
222. Schagger H. *Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria*. Biochim Biophys Acta **2002**;1555(1-3):154-9.
223. Schagger H, Pfeiffer K. *Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria*. EMBO J **2000**;19(8):1777-83.
224. 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.
225. Scheffler IE. *Mitochondria make a come back*. Adv Drug Deliv Rev **2001**;49(1-2):3-26.
226. Scheffler IE., *Mitochondria*. John Wiley and Sons, Inc. **1999**.
227. Schmiedeberg GP, Biempic A, Czaja MJ. *Timing of protooncogene expression varies in toxin-induced liver regeneration*. J Cell Physiol **1993**;154:294-300.
228. Schneider WC, Hogeboom GH. *Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation*: Cancer Res **1951**;11(1):1-22.
229. Sies H, Gerstenecker C, Menzel H, Flohe L. *Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides*. FEBS Lett **1972**;27:171-175.
230. 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.
231. Skulachev VP. *Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms*. Mol Aspects Med **1999**;20(3):139-84.

232. Skulachev VP. *Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables*. Trends Biochem Sci **2001**;26(1):23-9.
233. Skulachev VP. *NAD(P)(+) decomposition and antioxidant defense of the cell*. FEBS Lett **2001**;492(1-2):1-3.
234. Skulachev VP, Bakeeva LE, Chernyak BV et al. *Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis*. Mol Cell Biochem **2004**;256-257(1-2):341-58.
235. Smith KR, Aust AE. *Mobilization of iron from urban particulates leads to generation of reactive oxygen species in vitro and induction of ferritin synthesis in human lung epithelial cells*. Chem Res Toxicol **1997** Jul;10(7):828-34.
236. Smith TK, Ikeda Y, Fujii J, Taniguchi N, Meister A. *Different sites of acivicin binding and inactivation of gamma-glutamyl transpeptidases*. Proc Natl Acad Sci U S A **1995**;92(6):2360-4.
237. Soni MG, Mangipudy RS, Mumtaz MM., Mehendale HM. *Tissue regeneration as a function of dose in trichloroethylene toxicity*. Toxicol Sci **1998**;42:158-62.
238. Soni MG, Mehendale HM. *Role of tissue repair in toxicologic interactions among Hepatotoxic Organics*. Environment Health Perspect **1998**;106(Suppl6):1307-17.
239. 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.
240. Staubli A, Boelsterli UA. *The labile iron pool in hepatocytes: prooxidant-induced increase in free iron precedes oxidative cell injury*. Am J Physiol **1998**;274(6 Pt 1):G1031-7.
241. Stiborová M. *Studim enzymů biotransformující xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace*. Chem Listy **2002**; 96:784.
242. 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.
243. Stramentinoli G. *Pharmacologic aspects of S-adenosylmethionine. Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Am J Med **1987**;83:35-42.
244. 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.
245. Suttar J, Čermák J, Dyr JE. *Solid-Phase extraction in malondialdehyde analysis*, Anal Biochem **1997**;249:20-3.
246. Sweeney BP, Bromilow J. *Liver enzyme induction and inhibition: implications for anaesthesia*. Anaesthesia **2006**;61(2):159-77.
247. Szibor M, Holtz J. *Mitochondrial ageing*. Basic Res Cardiol **2003**;98(4):210-8.
248. Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N et al. *Intracellular ATP is required for mitochondrial apoptotic pathways in isolated hypoxic rat cardiac myocytes*. Cardiovasc Res **2003**;59(2):428-40.
249. Thannickal VJ, Fanburg BL. *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **2000**;279(6):L1005-28.
250. Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemski FA, Zhang JG, Fariss MW. *Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions*. Chem Biol Interact **2000**;127(3):201-17.
251. Turrens JF. *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol **2003**;552(Pt 2):335-44.
252. 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.
253. Ulrich GR, Bacon JA, Cramer CT, Peng GW, Petrella DK, Stryd RP., Sun EL. *Cultured hepatocytes as investigational models for hepatic toxicity: practical applications in drug discovery and development*. Toxicol Lett **1995**;82/83: 107-15.

254. 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
255. Varley CL, Dickson AJ. *Hepatocyte isolation stimulates formation of interferon stimulatory response element DNA-protein complexes*. Res Comm **1999**;263:627-31.
256. 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.
257. Vouquier S, Mary J, Friguet B. *Subcellular localization of methionine sulphoxide reductase A (MsrA): evidence for mitochondrial and cytosolic isoforms in rat liver cells*. Biochem J **2003**;373:531-7.
258. Wallace KB, Eells JT, Madeira VM, Cortopassi G, Jones DP. *Mitochondria-mediated cell injury. Symposium overview*. Fundam Appl Toxicol **1997**;38(1):23-37.
259. Wallace DC. *Mitochondrial diseases in man and mouse*. Science **1999**;283(5407):1482-8.
260. Wang YF, Hu ML. *Use of rat liver slices for the study of oxidative DNA damage in comparison with isolated rat liver nuclei and HepG2 human hepatoma cells*. Food Chem Toxicol **2000**;38:451-8.
261. Wang T, Weinman SA. *Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C*. J Gastroenterol Hepatol **2006**;21 Suppl 3:S34-7.
262. Weber J, Senior AE. *ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase*. FEBS Lett **2003**;545(1):61-70.
263. Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD. *Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules*. Free Radic Biol Med. **2002**;32:577-83.
264. 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.
265. Wright PB, Moore L. *Potentiation of the toxicity of model hepatotoxicants by acetaminophen*. Tox Appl Pharm **1991**;109:327-35.
266. 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.
267. Wyllie A, Donahue V, Fischer B, Hill D, Keesey J, Manzow S. *Apoptosis and cell proliferation*. 2nd edit., Boehringer Menheim GmbH, Biochemica, **1998**.
268. Zelding G, Yang SQ, Yin M, Lin H, Rai R, Diehl AM. *Alcohol and cytokine-inducible transcription factors*. Alcohol Clin Exp Res **1996**; 20:1639-1645
269. Zhang BH, Horsfield BP, Farrell GC. *Chronic ethanol administration to rat decreases receptor-operated mobilization of intracellular ionic calcium in cultured hepatocytes and inhibits 1,4,5,-inositol triphosphate production: relevance to impaired liver regeneration*. J Clin Invest **1996**;98:1237-1244
270. Zoratti M, Szabo I, De Marchi U. *Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house?* Biochim Biophys Acta **2005**;1706(1-2):40-52.
271. 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.