

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ



Mgr. ELIŠKA ŠVECOVÁ

Působení biguanidů na metabolismus jater

Effect of biguanides on the liver metabolism

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.
Školitelé konzultanti: RNDr. Monika Cahová, PhD.,
RNDr. Zdeněk Drahota, DrSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

.....

Mgr. Eliška Švecová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli panu doc. RNDr. Martinu Kalousovi, CSc., školitelům-konzultantům RNDr. Monice Cahové, PhD., a RNDr. Zdeňkovi Drahotovi DrCs., za vedení mé práce a za čas, který mi věnovali. Velký dík patří i kolegům z laboratoře za podporu a příjemné pracovní prostředí. Chtěla bych poděkovat RNDr. Monice Cahové PhD. a Ing. Petru Stopkovi CSc. za vyšperkování mé práce high-tech metodami seahorse a EPR, dále RNDr. Věře Lánské, CSc. za pomoc při hodnocení statistiky.

Děkuji také svému dosud nenarozenému dítěti, že si vybralo tuto dobu, a tím výrazně urychlilo dopsání mé práce.

Abstrakt

Již od středověku se k léčbě některých příznaků provázejících diabetes mellitus, používal extrakt z jestřabiny lékařské (*Galega officinalis*), která obsahuje derivát guanidinu galegin. Pozitivní účinky léčby však byly často převáženy množstvím negativních vedlejších efektů, které mohly vést až k úmrtí pacienta. Guanidin byl posléze nahrazen syntetickými deriváty biguanidy se sníženou toxicitou. Do klinických studií byly zařazeny pouze tři: metformin (N,N-dimetylbiguanid), fenformin (fenyletylbiguanid) a buformin (butylbiguanid), přičemž buformin a fenformin byly postupně z klinického použití staženy kvůli závažnému riziku laktátové acidózy. Méně toxický metformin je v léčbě diabetu 2. typu široce využíván do současnosti a je označován jako lék první volby. V současnosti se pozornost opět obrací i k fenforminu, zejména v souvislosti s potenciálním využitím biguanidů jako kancerostatik i jako k vhodnému modelu pro experimentální studium účinku biguanidů.

Navzdory dlouhodobému klinickému využití není mechanismus působení biguanidů dosud plně objasněn. V současné době je obecně přijímána teorie, že hlavní příčinou hypoglykemického účinku metforminu je inhibice glukoneogeneze v játrech, známy jsou však také jeho účinky na hnědou a bílou tukovou tkáň, svaly nebo protektivní vliv na srdce. Ještě menší shoda panuje ohledně konkrétního metabolického děje/dějů, které jsou za inhibici glukoneogeneze zodpovědné. Byly navrženy teorie, v nichž klíčovou roli hraje aktivace AMPK kinázy, ale poté bylo prokázáno, že metformin ovlivňuje glukoneogenezi také u myši nesoucích dominantně negativní mutaci α podjednotky tohoto enzymu. Zcela nedávno se objevila studie identifikující jako hlavní cíl metforminu v buňce mitochondriální glycerol-3-fosfátdehydrogenázu. Nelze pominout ani práce, které dokazují vliv metforminu na neenzymatické děje, např. interakci s membránovými fosfolipidy nebo snížení citlivosti *membrane permeability transition pore* (MPTP).

Společným znakem působení biguanidů, který není v rozporu s žádnou z výše uvedených hypotéz, je jejich vliv na energetický metabolismus buněk. Hlavním cílem předložené dizertační práce je proto studium mechanismů působení biguanidů (metforminu a fenforminu) na funkci izolovaných jaterních mitochondrií *in vitro* a na energetický metabolismus v játrech *in vivo*. Podkladem pro tuto dizertační práci jsou tři články, z nichž dva už byly publikovány (Publikace A, B) a třetí je v recenzním řízení (Publikace C).

V naší práci jsme prokázali, že jaterní homogenát i izolované jaterní mitochondrie představují srovnatelné modely pro studium mechanismu účinku metforminu *in vitro* a že jaterní homogenát je vhodný alternativní model v experimentech, které vyžadují delší inkubaci s testovanou látkou.

Zjistili jsme, že metformin *in vitro* inhibuje specificky aktivitu komplexu I ($EC_{50} = 5 \text{ mM}$) a neovlivňuje další komplexy respiračního řetězce. Naopak, částečná inhibice komplexu I metforminem je kompenzována zvýšeným přísunem elektronů přes komplex II.

Naše výsledky ukazují, že mechanismus účinku metforminu a fenforminu je obdobný. Obě sloučeniny inhibují mitochondriální respiraci NADH-dependentních substrátů v závislosti na použité dávce, fenformin inhibuje komplex I s výrazně vyšší účinností ($EC_{50} = 0,25 \text{ mM}$) než metformin. Nové je naše zjištění, že ve vyšších koncentracích fenformin inhibuje i mitochondriální komplex II a IV a na rozdíl od působení metforminu nedochází k plné kompenzaci dodávky elektronů prostřednictvím komplexu II. Obě sloučeniny zvyšují odolnost MPTP k účinku vápenatých iontů. Účinky metforminu i fenforminu nejsou závislé na integritě buňky a projevují se jak v jaterním homogenátu, tak i v permeabilizovaných hepatocytech.

Předložili jsme důkazy, že po dlouhodobém podávání metforminu *in vivo* lze v izolovaných mitochondriích prokázat srovnatelné změny jako po přidání metforminu přímo k mitochondriím *in vitro* – sníženou respiraci NADH-dependentních substrátů a sníženou aktivitu některých mitochondriálních enzymů. V souladu s těmito pozorováními jsme prokázali i sníženou resyntézu ATP v játrech během reperfuze po ischemii u potkanů krměných metforminem. Naše výsledky podporují teorii, že za podmínek *in vivo* dochází dosud neobjasněným mechanismem k akumulaci metforminu v mitochondriích a dosažení účinné koncentrace.

Pozorovali jsme protektivní antioxidační účinek metforminu při ischemicko/reperfučním poškození jater, přičemž tento efekt byl výraznější ve steatózních játrech. Jednou z příčin může být přímý inhibiční vliv metforminu na tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) na komplexu I.

Naše výsledky podporují hypotézu o pleiotropním mechanismu účinku biguanidů založeném na jejich interakci s mitochondriálním respiračním řetězcem spíše než teorii jednoho unikátního molekulárního cíle. Toto komplexní působení biguanidů nabízí možnost vysvětlení jejich rozmanitých metabolických účinků.

Abstract

The extract from the plant *Galega officinalis* containing the guanidine derivative galegin has been used in the treatment of diabetes-associated complications since middle ages. Nevertheless, the positive effects of the treatment were often outweighed by the adverse side effects. Some sixty years ago guanidin was replaced by the less toxic synthetic biguanide derivatives – metformin, phenformin and buformin, the latter two being withdrawn due to the unacceptable risk of fatal lactate acidosis. Metformin is still widely used antidiabetics and belongs to the first choice drugs in the treatment of type 2 diabetes. Phenformin is now gaining renewed attention with regard to its antineoplastic properties.

Despite its long-term clinical use the mechanism of biguanides action is not fully understood yet. At present it is generally accepted that the core of its antihyperglycemic effect lays in the inhibition of hepatic gluconeogenesis. In contrast, there is less consensus regarding the particular metabolic pathway or target that are responsible for the metformin-induced attenuation of gluconeogenesis. For a long time, a hot candidate for metformin target in the cell was AMP-activated kinase (AMPK) but the metformin effect was proved also in mice carrying the dominant negative mutation of AMPK α subunit. Quite recently, a study identifying mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase as the new metformin target has been published. Numerous reports demonstrate also the metformin effect on non-enzymatic processes including membrane fluidity or mitochondrial permeability transition pore (MPTP) sensitivity to calcium.

The common feature of biguanide action that reconciles above mentioned hypothesis is their effect on the cell energy metabolism. Therefore, the main aim of the presented thesis is to study the effect of biguanides (metformin and phenformin) on the function of isolated liver mitochondria *in vitro* and on the energy metabolism in the liver *in vivo*. The submitted thesis is based on three papers, two of them has been already published (Publication A, B) and one is now under review (Publication C).

Our data showed that both liver homogenate and isolated liver mitochondria represent comparable models for the study of effect of metformin action *in vitro*. Liver homogenate is particularly suitable model in experiments that require longer incubation of the tested substance with the mitochondria.

We further found that *in vitro* metformin selectively inhibits the activity of complex I ($EC_{50} = 5 \text{ mM}$) and that it does not affect the activities of other components of mitochondrial respiratory chain. The metformin-induced partial inhibition of complex I may be compensated by the increased supply of electrons via complex II. The mechanism of action of metformin and phenformin shares a lot of common features. Both compounds inhibit mitochondrial respiration of NADH-dependent substrates in dose-dependent manner, phenformin being

more effective ($EC_{50} = 0.25 \text{ mM}$) compared with metformin. We were first to demonstrate that in high doses phenphormin inhibits also complex II and complex IV and in contrast to metformin, phenphormin-induced inhibition of respiration could not be fully compensated by electron supply via complex II. Both biguanides increase the resistance of MPTP to calcium cations. Both metformin and phenphormin action is not dependent on the cell integrity and could be demonstrated in the liver homogenate as well as in permeabilized hepatocytes.

The persistent stumbling block in the research focused on the mechanism biguanide action is the discrepancy between the effective concentration *in vitro* and real concentrations found in serum *in vivo*. We brought the evidence that long-term metformin administration *in vivo* results in comparable changes in mitochondrial metabolism as acute metformin administration *in vitro* – decreased respiration of NADH-dependent substrates and lowered activities of some mitochondrial enzymes. In accordance with these findings we observed the decreased ATP re-synthesis during reperfusion in the liver after short-term ischemia in rats administered metformin for 10 weeks. Our data support the hypothesis that *in vivo* metformin accumulates within mitochondria where it reaches sufficient effective concentration.

We demonstrated protective effect of metformin against oxidative stress after ischemia/reperfusion injury, the effect being more pronounced in fatty liver. At the same time we showed the decreased reactive oxygen species formation in submitochondrial particles *in vitro* in metformin-treated group.

Our data support the hypothesis that the metformin effect is pleiotropic and involves more partial processes rather than the one unique target theory. Such a complex biguanide action provides better platform for explanation of their multiple and diverse effects.

Obsah

1. LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	13
1.1. Biguanidy	13
1.2. Fenformin	13
1.3. Metformin	14
1.4. Interakce metforminu s respiračním řetězcem	15
1.5. Účinky metforminu nezávislé na procesech transformace energie	17
1.6. Mechanizmy podmiňující hypoglykemické účinky metforminu <i>in vivo</i>	18
1.7. Mechanizmy, kterými metformin inhibuje glukoneogenezi	19
1.7.1. Závislé na AMPK.....	19
1.7.2. Nezávislé na AMPK.....	20
2. CÍLE PRÁCE	22
3. MATERIÁL A METODY	23
3.1. Materiál	23
3.1.1. Přístroje a programy	23
3.1.2. Kity	23
3.1.3. Chemikálie.....	24
3.1.3.1. Roztoky a pufrы	24
3.1.4. Podávané diety.....	25
3.2. Zvířata	27
3.3. Metody	28
3.3.1. Příprava homogenátu a izolace mitochondrií	28
3.3.1.1. Izolace jaterních mitochondrií.....	28

3.3.1.2. Izolace srdečních mitochondrií	28
3.3.2. Stanovení mitochondriální respirace a mitochondriální enzymové aktivity	28
3.3.2.1. Stanovení mitochondriální respirace na Clarkově elektrodě.....	28
3.3.2.2. Stanovení mitochondriální respirace na XF 24 analyzáru	29
3.3.2.3. Stanovení aktivity mitochondriálních enzymů	29
3.3.3. Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu	29
3.3.4. Stanovení bobtnání mitochondrií	30
3.3.5. Biochemické analýzy	30
3.3.6. ³¹ P NMR studie	30
3.3.7. Statistická analýza	31

4. VÝSLEDKY32

4.1. PUBLIKACE A.....	32
4.1.1. Jaterní homogenát je vhodný model pro studium vlivu metforminu na mitochondriální respiraci	32
4.1.2. Metformin snižuje oxidaci substrátů závislých na komplexu I	33
4.1.3. Transport elektronů prostřednictvím komplexu II kompenzuje inhibiční vliv metforminu na komplex I	35
4.1.4. Pokles hodnoty Indexu respirační kontroly je podobný inhibiční respiračního „stavu 3“	37
4.1.5. Délka preinkubace neovlivňuje inhibiční vliv metforminu v játrech	37
4.1.6. Metformin rozdílně inhibuje mitochondriální respiraci v játrech, srdci ..	38
4.1.7. Metformin je schopen krátkodobě oddálit porušení membránového potenciálu mitochondrií	39
4.1.8. Metformin zvyšuje odolnost mitochondriálního póru přechodné permeability k vápníku	40
4.2. PUBLIKACE B.....	42

4.2.1. Srovnání vlivu fenforminu a metforminu na enzymatické komplexy mitochondriálního respiračního řetězce	42
4.2.2. Inhibiční vliv fenforminu na NADH-oxidaci	46
4.2.3. Fenformin ve vysokých koncentracích inhibuje nejen komplex I, ale také další enzymatické systémy respiračního řetězce	47
4.2.4. Fenformin zvyšuje odolnost MPTP k vápenatým kationtům	48
4.2.5. Fenformin inhibuje mitochondriální respiraci shodně na izolovaných mitochondriích a permeabilizovaných hepatocytech	49
4.3. PUBLIKACE C.....	51
4.3.1. Metabolické parametry zvířat	51
4.3.2. Metformin snižuje oxidaci NADH-dependentních substrátů v podmínkách <i>in vivo</i>	52
4.3.3. Účinek metforminu a diety snižuje aktivitu mitochondriálních enzymů	54
4.3.4. Metformin zpomaluje ATP replaci v játrech <i>in vivo</i>	55
4.3.5. Metformin snižuje tvorbu reaktivních forem kyslíku	58
5. DISKUZE	61
5.1. Vhodnost různých buněčných a sub-buněčných modelů pro studium účinků biguanidů <i>in vitro</i>	61
5.2. Účinná koncentrace metforminu <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	62
5.3. Specifita působení biguanidů	64
5.4. Působení metforminu v srdci a v játrech	65
5.5. Vliv metforminu na mitochondrial permeability transition pore	66
5.6. Metformin a tvorba volných radikálů	66
5.7. Souhrn	69
6. ZÁVĚRY	70
7. SEZNAM LITERATURY.....	72
8. PŘÍLOHY (PUBLIKACE A, B, C)	77

Seznam zkratk

AMPK	5'AMP-aktivovaná proteinová kináza	<i>5' AMP-activated protein kinase</i>
AMPKK	AMPK kináza kináz	<i>AMPK protein kinase kinase</i>
ANT	Adeninnukleotidový translokátor	<i>Adenine nucleotide translocator</i>
CaMKK β	Ca ²⁺ /kalmodulin–dep. kináza kináz	<i>Ca²⁺/Calmodulin-dep. protein kinase β</i>
cGPDH	Cytozolická glycerol-6-fosfátdehydrogenáza	
CoQ	Koenzym Q	
DCFDA	2',7'-dichlorofluorescindiacetát	
DMPO	2,2-dimetyl-3,4-dihydropyrol-1-oxid	
DNP	2,4-dinitrofenol	
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl	
EPR	Elektronová paramagnetická rezonance	
G6Páza	Glukóza-6-fosfatáza	
i.p.	Intraperitoneálně	
LKB1	Jaterní kináza B1	<i>Liver kinase B1</i>
MATE		<i>Multidrug extrusion proteins</i>
mGPDH	Mitochondriální glycerol–6–fosfátdehydrogenáza	
MMP	Mitochondriální membránový potenciál	
MPT		<i>Mitochondrial permeability transition</i>
MPTP	Mitochond. pór přechodné permeability	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
mTOR	Savčí rapamycinový cílový receptor	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NEMK	Neesterifikované mastné kyseliny	

NIDDM	Non-inzulín-dependentní diabetes mellitus	
NMR	Nukleární magnetická rezonance	
NO [•]	Nitroxylový radikál	
OCTs		<i>Organic cation transporters</i>
OH [•]	Hydroxylový radikál	
OOH [•]	Superoxidový radikál	
OR [•]	Volný organický radikál	
p.o.	Perorálně	
PEPCK	Fosfoenolpyruvátcarboxykináza	
PMAT		<i>Plasma membrane monoamine transporter</i>
PP2C _α	Proteinová fosfatáza 2C _α	
ROS	Reaktivní formy kyslíku	<i>Reactive oxygen species</i>
SEM	Střední chyba průměru	
Tg	Triacylglyceroly	
VDAC		<i>Voltage dependent anion selective channel</i>

1. LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1. Biguanidy

Již od středověku se k léčbě některých příznaků provázejících diabetes mellitus, zejména častého močení, používal extrakt z jeřábiny lékařské (*Galega officinalis*), která obsahuje derivát guanidinu galegin. Pozitivní účinky léčby však byly často převáženy množstvím negativních vedlejších efektů, které mohly vést až k úmrtí pacienta (Witters, 2001). V 50. letech minulého století byl guanidin nahrazen syntetickými deriváty biguanidy, jejichž toxicita byla ve srovnání s původní látkou výrazně menší. Z více než 300 známých derivátů biguanidů vykazovalo jen několik antidiabetické účinky a pouze tři byly zařazeny do klinických studií: metformin (N,N-dimethylbiguanid), fenformin (fenyletylbiguanid) a buformin (butylbiguanid). Buformin a fenformin byly postupně z klinického použití staženy kvůli závažnému riziku laktátové acidózy (Schäfer, 1983). Méně toxický metformin je v léčbě diabetu 2. typu široce využíván do současnosti a je označován jako lék první volby. K pozapomenutému fenforminu se opět obrací pozornost vědců s důrazem na jeho silnější metabolické účinky. Ty by mohly přispět k objasnění přesného mechanismus působení metforminu, jež zatím není plně znám.

1.2. Fenformin (fyzikálně chemické vlastnosti, farmakokinetika)

Fenformin, systematickým názvem 2-(N-fenetylkarbamimidoyl)-guanidin, je za fyziologických podmínek silná báze ($pK_{a1} = 11,8$; $pK_{a2} = 2,7$), kdy dvě guanidové skupiny propojené přes sekundární aminy jsou navázané na fenyletylový aromatický kruh. Díky tomuto chemickému složení je fenformin méně polární a více lipofilní než metformin. Vzhledem ke svým fyzikálně chemickým vlastnostem má fenformin vyšší afinitu k mitochondriálním membránám a vykazuje silnější inhibiční účinky na funkci mitochondriálního respiračního řetězce (Goodarzi and Bryer-Ash, 2005, Sogame *et al.*, 2013, Pernicova and Korbonits, 2014). Léčba fenforminem přinášela řadu vedlejších negativních účinků v podobě zvýšeného uvolňování laktátu ze svalů (Fasshauer *et al.*, 2004), zesíleného kardiovaskulárního rizika, popř. poklesu gastrointestinální absorpce

glukózy (Czyzyk *et al.*, 1968). Fenformin je metabolizován v játrech pomocí cytochromu P450 2D6, biologický poločas eliminace je 7-15 h, vylučován je ledvinami (Sogame *et al.*, 2013). U lidí je p-hydroxyfenformin jediný metabolit fenforminu detekovatelný v séru a moči. Hlavním odpadním metabolitem fenforminu u většiny laboratorních zvířat je o-glukuronid p-hydroxyfenformin (Alkalay *et al.*, 1979). Denní dávka pro dospělého jedince se u lidí pohybuje kolem 150 - 400 mg na den (Assan *et al.*, 1975, Pernicova and Korbonits, 2014), u potkanů 20 mg/ kg intraduodenálně (Guest *et al.*, 1979), nebo v rozmezí 50 - 150 mg / kg pro aplikaci i. p. / p. o. (Kruger *et al.*, 1970, Guest *et al.*, 1980).

Do 90. let 20. století byl fenformin zakázán ve většině zemí světa, s výjimkou Itálie, Číny a Brazílie, pro jeho spojitost se vznikem laktátové acidózy, která byla u lidí fatální z 30-50 % (Schäfer, 1983, Pernicova and Korbonits, 2014).

Ve zvířecích modelech *in vitro* a *in vivo* byla u fenforminu zaznamenána vyšší antineoplastická aktivita oproti metforminu (Segal *et al.*, 2011, Appleyard *et al.*, 2012). Pacientky léčené fenforminem měly zlepšený imunologický stav v případě rakoviny prsu (Dilman *et al.*, 1982), ačkoliv potenciál protinádorového účinku fenforminu nebyl v klinických studiích prokázán (Pernicova and Korbonits, 2014).

1.3. Metformin (fyzikálně chemické vlastnosti, farmakokinetika)

Metformin je alifatická molekula se dvěma metylovými zbytky navázanými na biguanidový řetězec. Za fyziologických podmínek je tato látka báze ($pK_{a1} = 11,5$; $pK_{a2} = 2,8$), která je snadno rozpustná ve vodné fázi a špatně solubilní v tukové vrstvě (Schäfer, 1976a, Hale *et al.*, 2002). Vzhledem k těmto fyzikálně-chemickým vlastnostem probíhá prostá difúze přes plazmatickou membránu pouze výjimečně a vstup metforminu do buňky je zajištěn především aktivním transportním systémem. Absorpce metforminu ze střeva je zprostředkována PMAT (*plasma membrane monoamine transporter*), který se nachází na straně přivrácené k lumenu střeva. Z enterocytu do intersticiální tekutiny je metformin transportován pomocí OCTs (*organic cation transporters*) OCT1 a OCT3. Metformin neprochází biotransformací v játrech a je vylučován primárně v ledvinách. Z krve do epiteliálních buněk je dopraven prostřednictvím transportérů OCT2, do moči je vylučován pomocí MATE 1 a MATE 2

(*multidrug extrusion proteins 1, 2*) (Viollet *et al.*, 2012, Pawlyk *et al.*, 2014). Biologický poločas eliminace je mezi 1,5 – 7 h v závislosti na renální funkci (Gan *et al.*, 1992, Bailey and Turner, 1996, Pawlyk *et al.*, 2014). Optimální denní dávka metforminu pro člověka je přibližně 20 mg/kg/den, což odpovídá 250 mg/kg u myši (Foretz *et al.*, 2014). Při podávání těchto dávek lze v séru prokázat řádově 10 μM koncentrace metforminu (Owen *et al.*, 2000). Oproti jiným biguanidům a guanidům je inhibiční vliv metforminu na buněčnou respiraci je slabší a je reverzibilní. Tato kombinace zřejmě hraje roli v udržení klíčové rovnováhy mezi akumulací - vyloučením látky a požadovaným terapeutickým účinkem bez laktátové acidózy (Bridges *et al.*, 2014).

Více než padesát let je metformin užíván jako antihyperglykemická látka vhodná pro léčbu cukrovky, jež nezpůsobuje váhový přírůstek (Argaud *et al.*, 1993). Tento biguanid je schopen snižovat hodnoty krevní glukózy, aniž by při tom došlo ke stimulaci inzulinové sekrece (Schatz *et al.*, 1972, Bailey, 2008). Primárním účinkem metforminu je snížení glukoneogeneze v játrech.

1.4. Interakce metforminu s respiračním řetězcem

Prvé pozorování mechanismu účinku derivátů biguanidů na oxidační fosforylaci bylo publikováno v 60. letech 20. století. Tehdy byla prokázána souvislost mezi zvýšenou glykolýzou a inhibicí buněčné respirace pod vlivem guanidů (Hollunger, 1955). Téměř o 50 let později byl nastolen konsenzus ohledně primárního cíle metforminu v buňce. Tímto místem jsou mitochondrie, ve kterých metformin přechodně inhibuje komplex I. Tato inhibice vede k energetickému stresu způsobenému poklesem oxidační fosforylace a syntézy ATP (El-Mir *et al.*, 2000, Owen *et al.*, 2000, Carvalho *et al.*, 2008, Bridges *et al.*, 2014).

NADH:ubichinonoxidoreduktáza, tj. komplex I, podmiňuje využití redukováných koenzymů NADH jako zdroje elektronů. Její inaktivace snižuje efektivitu mitochondriální respirace a oxidační fosforylace v savčích buňkách. Data získaná na hepatocytech, izolovaných mitochondriích a buněčných kulturách fibroblastů naznačují, že pro dosažení přímého účinku na komplex I a inhibici procesu oxidace NADH–dependentních substrátů je potřeba vysoká koncentrace metforminu (10 mM)

a prodloužená doba (2 – 24 h) preinkubace (Owen *et al.*, 2000). El-Mir *et al.* prokázal inhibiční vliv metforminu na komplex I pouze v neporušených buňkách, ale nikoli v izolovaných mitochondriích a na permeabilizovaných buňkách. Za těchto podmínek metformin inhiboval respirační řetězec z 25 % (1 mM metformin) a 60 % (5 mM metformin). Inhibiční vliv metforminu byl závislý jak na koncentraci biguanidu, tak na čase preinkubace (El-Mir *et al.*, 2000). V rozporu s tvrzení El-Mira *et al.* Owen prokázal, že metformin respiraci inhibuje taktéž na izolovaných mitochondriích a submitochondriálních partikulích (Owen *et al.*, 2000). Menší účinnost metforminu na izolovaných mitochondriích oproti partikulím vysvětluje Owen ztrátou akumulovaného metforminu v průběhu izolace mitochondrií. Předpokládá, že skutečná bezztrátová inhibice by byla o 10 % vyšší (Owen *et al.*, 2000). Efekt metforminu pozorovaný na submitochondriálních partikulích souvisí s faktem, že tyto částice mají matrixovou stranu orientovanou do média a umožňují tak přímý kontakt metforminu s respiračním řetězcem, bez nutnosti transportovat metformin dovnitř mitochondrie. Koncentrace metforminu v reakčním prostředí tak představuje jeho skutečnou účinnou koncentraci. V intaktních mitochondriích řídí akumulaci pozitivně nabitého metforminu v matrix membránová propustnost. Pozitivní náboj biguanidu má za následek akumulaci této látky v mitochondriích. Nárůst koncentrace může dosahovat až řádu mM. Oproti sérovým koncentracím, jejichž účinnost byla prokázána *in vitro*, jsou až tisícinásobně vyšší (Owen *et al.*, 2000, Bridges *et al.*, 2014).

Nedávná studie prezentuje vliv biguanidu na vazebné modifikace komplexu I. Komplex I může zaujímat dva reversibilní konformační stavy: aktivní a ne-aktivní (*deactive-like*). Po navázání metforminu do respiračního řetězce dojde ke konformační změně vazebného místa pro ubiquinon a k „uzamčení“ komplexu I v jeho „deactive-like“ konformaci. K vazbě dochází pravděpodobně v amfipatické oblasti na rozhraní hydrofilní a membránové domény v blízkosti matrixové kličky subjednotky ND3 (Bridges *et al.*, 2014, Matsuzaki and Humphries, 2015). Metformin zřejmě působí na dvě mezi sebou oddělená místa na komplexu I: první místo narušuje reaktivitu flavinu, druhé inhibuje katalýzu (Bridges *et al.*, 2014).

1.5. Účinky metforminu nezávislé na procesech transformace energie

Koncem 80. let 20. století byl charakterizován jev známý jako MPT (*mitochondrial permeability transition*) - ukazatel změn propustnosti vnitřní mitochondriální membrány (Hunter and Haworth, 1979). Příčinou MPT je otevření mitochondriálního póru přechodné permeability (MPTP) (Crompton *et al.*, 1998). MPTP je multiproteinový komplex nacházející se jak na vnější membráně, jejíž součástí je napětově řízený kanál VDAC (*voltage dependent anion selective channel*), tak na vnitřní mitochondriální membráně s adeninnukleotidovým translokátorem (ANT) (Crompton *et al.*, 1998). V důsledku např. zvýšené koncentrace Ca^{2+} iontů v matrix dojde k otevření MPTP, nastane vyrovnání koncentrací solutů procházejících vnitřní membránou a proteiny zadržované v matrix způsobí nárůst osmotického tlaku a mitochondriální bobtnání. Následuje narušení vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru (Halestrap *et al.*, 2002). Metformin snižuje citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům a oddaluje otevření póru (Guigas *et al.*, 2004). Předpokládá se, že čím větší je inhibice komplexu I vyvolaná metforminem, tím delší je interval opožděného otevření MPTP. Studie provedené na různých typech endoteliálních buněk naznačují, že při nízkých koncentracích *in vitro* (100 μM), je metformin schopen inhibovat otevření MPTP a tím chránit buňku před stresem, např. vyvolaným hyperglykemií (Detaille *et al.*, 2005).

Inhibiční vliv biguanidů na mitochondriální respiraci byl vysvětlován i na základě zcela odlišného mechanismu, a to vlivem biguanidů na fluiditu membrán (Schäfer, 1976b). Schäfer předpokládal, že základem pro pochopení velké rozmanitosti účinků biguanidů jsou jejich specifické interakce s membránovými fosfolipidy. Metformin se váže na fosfolipidy mitochondrií a tím dochází k modifikaci fyzikálních vlastností membrán. Jeho pozitivní náboj zodpovídá za akumulaci v matrixu, zatímco jeho nepolární uhlovodíkový řetězec podporuje vazbu na fosfolipidy mitochondriálních membrán. Příčinou inhibice elektronového toku respiračním řetězcem pak není změna vazebných interakcí s membránovými proteiny, ale modifikace fyzikálních vlastností membrán vlivem metforminu. Zpomalení elektronového toku je úměrné velikosti vazebné afinity metforminu k fosfolipidové dvojvrstvě (Schäfer and Rieger, 1974, Viollet *et al.*, 2012). Podle této hypotézy je hypoglykemický efekt spíše nahodilým výsledkem, než cíleným účinkem látky. (Schäfer, 1976b).

1.6. **Mechanismy podmiňující hypoglykemické účinky metforminu *in vivo***

Starší práce naznačovaly, že antihyperglykemický účinek metforminu je primárně zprostředkován zvýšenou citlivostí periferních tkání k inzulínu a následným vzestupem absorpce glukózy (Vigneri and Goldfine, 1987, Hother-Nielsen *et al.*, 1989). Později se ukázalo, že hypoglykemizující účinek metforminu je především důsledkem snížené endogenní produkce glukózy v játrech (DeFronzo *et al.*, 1991, Cusi *et al.*, 1996). Vysvětlení mechanismu tohoto děje však není jednotné. Studie na perfundovaných játrech a izolovaných hepatocytech ukázaly, že metformin ovlivňuje více různých dějů, jejichž výsledkem je snížená glukoneogeneze. Tento biguanid způsobuje pokles hepatické absorpce glukoneogeneze (laktátu, alaninu, glutaminu) a rovněž negativně ovlivňuje signalizační dráhu glukagonu (Wollen and Bailey, 1988, Wiernsperger and Bailey, 1999). Glukagon, jenž je hlavním sekrečním produktem α -buněk, má v organismu antagonistický účinek k inzulínu. Tento pankreatický hormon je aktivován, pokud je organismus vystaven stresu, např. při hypoglykémii. Zesiluje glukoneogenezi, glykogenolýzu, ketogenezi a snižuje glykogenezi a glykolýzu (Pernicova and Korbonits, 2014). Metformin ovlivňuje signalizaci glukagonu prostřednictvím inhibice adenylátcyklázy. Tato inhibice způsobí pokles cAMP spolu s poklesem aktivity PKA (protein kinázy A) a zamezí produkci glukózy vyvolané glukagonem (Miller *et al.*, 2013).

Překvapivým zjištěním je pravděpodobné zapojení metforminu do modulace složek inkretinové osy (Maida *et al.*, 2011). Mezi inkretiny patří GLP-1 (glukagonu podobný peptid 1). Tento antihyperglykemický hormon v organismu především podporuje funkci pankreatických β -buněk. Metformin zesiluje expresi genu GLP-1, prostřednictvím mechanismu závislého na PPAR α , a zvyšuje tak jeho koncentraci v plazmě, aniž by vzrostly sérové hodnoty jiných inkretinových hormonů. Akutní nárůst sekrece GLP-1 zapříčiněný metforminem je zřejmě spojen s potlačením jaterní tvorby a periferního hromadění glukózy (Maida *et al.*, 2011).

Nejnovější výzkumy dokazují, že centrem metabolického účinku metforminu je změna energetického metabolismu buněk, realizovaná zejména částečnou inhibicí komplexu I. V důsledku snížené efektivity mitochondriální respirace klesá NADH

oxidace, protonový gradient vnitřní mitochondriální membrány i syntéza ATP (Pernicova and Korbonits, 2014).

1.7. Mechanizmy, kterými metformin inhibuje glukoneogenezi

1.7.1. Závislé na AMPK

Enzym AMPK (AMP-aktivovaná proteinová kináza) působí jako klíčový regulátor energetického stavu buněk (Viollet *et al.*, 2009). Tento „metabolický senzor“ má hlavní slovo při přepnutí buňky z katabolického do anabolického stavu (Zheng *et al.*, 2015). Jeho protektivní funkce je klíčová během metabolického stresu vzniklého např. při hypoxii, vyčerpání zásob glukózy nebo při inhibici oxidační fosforylace. Spouštěčem dějů vedoucích k aktivaci AMPK je změna poměru AMP:ATP (Foretz *et al.*, 2010). AMPK je podřízená složka proteinových kaskád, k jejíž aktivaci dochází fosforylací ¹⁷²Thr na N-konci α -podjednotky AMPK nadřazenými AMPKK (AMP-aktivovanou proteinovou kinázou kináz). Fosforylovat katalytickou α -podjednotku lze dvěma základními způsoby: AMP-dependentní, nebo Ca²⁺-dependentní cestou (Davies *et al.*, 1995, Lage *et al.*, 2008). AMP-dependentní cesta je založena na změně hladiny AMP, která způsobí inhibici defosforylační PP2C α (proteinové fosfatázy 2C α) a stále aktivní LKB1 (jaterní kináza B1) pak může zaktivovat AMPK (Bridges *et al.*, 2014). Metforminem indukovaná akumulace AMP přímou cestou inhibuje adenylátcyklázu, tím také způsobí zablokování glukoneogeneze prostřednictvím glukagonu (Miller *et al.*, 2013). Druhá cesta aktivace AMPK je Ca²⁺-dependentní. Zvýšená koncentrace Ca²⁺ iontů v cytozolu zaktivuje CaMKK β dráhu (Ca²⁺/kalmodulin-dependentní kináza kináz), která následně fosforyluje ¹⁷²Thr AMPK (Lage *et al.*, 2008, Pernicova and Korbonits, 2014). Předpokládá se, že tato cesta je na metforminu nezávislá. Aktivace AMPK ovlivňuje řadu metabolických cest s cílem stimulovat katabolické a omezit anabolické děje, včetně inhibice glukoneogeneze (Zhou *et al.*, 2001).

1.7.2. Nezávislé na AMPK

Ačkoliv metformin aktivuje AMPK, její působení nevysvětluje všechny terapeutické účinky metforminu (Foretz *et al.*, 2014). Jemná a specifická inhibice komplexu I metforminem vede k poklesu energetického náboje a v konečném důsledku i k poklesu produkce glukózy. Ačkoliv několik dějů způsobených metforminem může aktivovat AMPK (pokles energetického náboje buňky, útlum aktivity adenylátcyklázy, potlačení hepatické genové exprese), bylo prokázáno, že tento enzym není nezbytný pro přímou inhibici jaterní glukoneogeneze metforminem (Foretz *et al.*, 2010). Tomu odpovídá zjištění, že hypoglykemický efekt metforminu byl potvrzen také u AMPK/LKB1-deficientních myší. U tohoto modelu pokles tvorby glukózy koreloval se sníženou hladinou intracelulárního ATP. Autoři studie vyslovili hypotézu, podle které metformin inhibuje glukoneogenezi prostřednictvím poklesu energetického stavu v játrech.

Alternativní mechanismus navrhl v nedávné studii Madiraju (Madiraju *et al.*, 2014). Podle této teorie je významným faktorem ovlivňujícím intenzitu glukoneogeneze redoxní stav v hepatocytech, konkrétně poměr $\text{NADH}^+:\text{NAD}^+$ v cytozolu. Redoxní stav v cytozolu a mitochondriích byl měřen jako podíly laktátu:pyruvátu a β -hydroxybutyrátu:acetoacetátu. Madiraju *et al.* prokázali, že metformin je schopen inhibovat enzym mGPDH (mitochondriální glycerol-6-fosfátdehydrogenázu) i v nízkých koncentracích (50 μM). Mitochondriální GPDH je součástí glycerol-3-fosfátového člunku, nachází se ve vnitřní straně mitochondriální membrány. Tento člunek přenáší elektronové páry z cytozolu přímo do zásob CoQ (poolu) respiračního řetězce. Jeho hlavní úlohou je především znovu oxidovat cytozolický NADH (Mráček *et al.*, 2013, Orr *et al.*, 2014, Rauchová *et al.*, 2014). Inhibice mGPDH zabraňuje využití glycerolu jako prekurzoru syntézy glukózy, protože znemožňuje nezbytný krok přeměny glycerol-3-fosfátu na dihydroxyacetonfosfát. Kromě toho inhibice mGPDH vede k akumulaci cytozolického NADH, což vytváří nepříznivé podmínky pro přeměnu laktátu na pyruvát a eliminuje tak tento významný prekursor glukoneogeneze. Tyto změny redoxního stavu se dějí bez vlivu na energetický náboj buňky (Madiraju *et al.*, 2014).

Dosud nepanuje shoda ohledně fyziologického významu glycerofosfátového člunku, resp. jeho inhibice pro glukoneogenezi v játrech (Baur a Birnbaum 2014). Proti zásadní

roli mGPDH v glukoneogenezi mluví skutečnost, že narušení malát-aspartátového člunku v játrech způsobí pokles lačné glykémie a nárůst cytozolického NADH/NAD⁺, zatímco narušením glycerofosfátového člunku se nedostaví žádná změna glykémie. Nelze vyloučit, že inhibice komplexu I zvyšuje význam glycerofosfátového přenašeče, protože malát-aspartátový člunek potřebuje k činnosti mitochondriální membránový potenciál. Ani v tomto případě však není přínos glycerofosfátového člunku pro energetickou bilanci zásadní. Pokud by byly Tg jediným substrátem mitochondriální respirace, elektrony z nich plynoucí, které by byly přeneseny glycerofosfátovým člunkem, by odpovídaly asi 0,5 % produkce ATP. Je nepravděpodobné, že ztráta těchto elektronů by byla zodpovědná za měřitelnou změnu mitochondriálního NADH/NAD⁺. Baur předkládá své vlastní vysvětlení poklesu cytozolického NADH/NAD⁺ v přítomnosti metforminu, a to působením cGPDH (cytozolická glycerol-6-fosfátdehydrogenáza). Cytozolická GPDH je druhou složkou glycerofosfátového člunku, je NADH-dependentní a ve vodném prostředí rozpustná (Mráček *et al.*, 2013). Je možné, že za podmínek, kdy metformin inhibuje mGPDH, zvýšená koncentrace cytozolického NADH neodráží inhibovaný glycerofosfátový člunek, ale ukazuje reverzní chod glycerofosfátového člunku. Tedy přeměnu NAD⁺ na NADH katalyzovanou cGPDH. Účinek metforminu by pak byl závislý na přítomnosti glycerolu a jeho přeměně na glycerol-3-fosfát (Baur and Birnbaum, 2014).

Několik desetiletí výzkumu působení metforminu nevedlo k identifikaci jednoho děje, který by byl zodpovědný za všechny metabolické účinky metforminu. Naopak, současný stav znalostí nahrává spíše předpokladu, že hlavní projev metforminu, snížená glukoneogeneze v játrech, je výsledkem více synergicky působících procesů, např. snížené dostupnosti ATP, inhibice genů glukoneogeneze nebo zvýšené aktivity AMPK (Foretz *et al.*, 2014).

2. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem předložené dizertační práce bylo studium mechanismů působení biguanidů (metforminu a fenforminu) na funkci izolovaných jaterních mitochondrií *in vitro* a na energetický metabolismus v játrech *in vivo*.

Specifické cíle

1. Optimalizace modelu pro studium mechanismu účinku metforminu *in vitro*: porovnání izolovaných jaterních mitochondrií a jaterního homogenátu.
2. Studium vlivu metforminu na aktivitu mitochondriálního respiračního řetězce a jednotlivých enzymatických komplexů *in vitro*.
3. Kvalitativní a kvantitativní porovnání mechanismu působení dvou biguanidů, metforminu a fenforminu, na modelu izolovaných jaterních mitochondrií.
4. Sledování vlivu metforminu podávaného *in vivo* na energetický metabolismus v játrech: porovnání s výsledky studií *in vitro*.
5. Hodnocení antioxidačního účinku metforminu při ischemii/reperfuzi, analýza možného mechanismu.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

3.1.1. Přístroje a programy

Dat-Lab 4, 5	Oroboros, Rakousko
Glukometr Accu-Chek	Roche, ČR
Homogenizátor Potter-Elvehjem	Sigma Aldrich, Co., USA
jMRUI 4,0	Bruker Biospin GmbH, Německo
MS Excel	Microsoft
NMR přístroj BioSpec 47/20	Bruker Biospin GmbH, Německo
Oxygraf-K2	Oroboros, Rakousko
Spektrofluorimetr PC1	ISS Inc., USA
Spektrofotometr UV-1650	Shimadzu, Japonsko
Spektrometr UV-1601	Shimadzu, Japonsko
Vinci	ISS Inc., USA
XF 24 Analyzář	Seahorse Bioscience, USA

3.1.2. Kity

BCA Protein Assay	Pierce, USA
β -hydroxybutyrát fluorometric assay kit	Cayman Chemical Company, USA
FFA half micro test	Roche Diagnostics GmbH, Německo
Laktát colorimetric/fluorometric assay kit	Biovision, USA

Triacylglycerols liquid 250 S kit	ERBA-Lachema, ČR
Cholesterol liquid 1000 kit	ERBA-Lachema, ČR

3.1.3. Chemikálie

ADP	Sigma Aldrich, Co., USA
BCA	Sigma Aldrich, Co., USA
Cytochrom c	Sigma Aldrich, Co., USA
Dexdormitor	Orion Pharma, Finsko
Digitonin	Sigma Aldrich, Co., USA
Dinitrofenol 2,4-	Sigma Aldrich, Co., USA
DMPO	Sigma Aldrich, Co., USA
DPPH	Sigma Aldrich, Co., USA
EDTA	Sigma Aldrich, Co., USA
EGTA	Sigma Aldrich, Co., USA
Fenformin	Sigma Aldrich, Co., USA
Glutamát	Sigma Aldrich, Co., USA
HEPES	Serva, Německa
KCl	Sigma Aldrich, Co., USA
KH ₂ PO ₄	Lachema, ČR
Koenzym A	Sigma Aldrich, Co., USA
Malát	Sigma Aldrich, Co., USA

Manitol	Sigma Aldrich, Co., USA
Metformin	Sigma Aldrich, Co., USA
MgCl ₂	Sigma Aldrich, Co., USA
Narketan 10 %	Vétoquinol AG, Švýcarsko
Rotenon	Sigma Aldrich, Co., USA
Safranin O	Sigma Aldrich, Co., USA
Sacharóza	Sigma Aldrich, Co., USA
Sukcinát	Sigma Aldrich, Co., USA
Tris	Sigma Aldrich, Co., USA

3.1.3.1. **Roztoky a pufry**

<i>Draselné médium:</i>	80 mM KCl, 10 mM Tris, 3 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
<i>Homogenizační pufr:</i>	220 mM manitol, 75 mM sacharóza, 1 mM HEPES, pH 7,2
<i>MAS pufr:</i>	220 mM manitol, 70 mM sacharóza, 1 mM EGTA, 10 mM KH ₂ PO ₄ , 5,5 mM MgCl ₂ , 2 mM HEPES, pH 7,4
<i>MMP médium:</i>	Draselné médium obohacené safraninem O. Na 3 l média 3 µM safraninu
<i>Swelling médium:</i>	125 mM sacharózu, 65 mM KCl, 5 mM sukcinát, 10 mM HEPES, 1 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2

3.1.4. Podávané diety

Standardní (peletovaná) dieta	Velaz, ČR
Standardní dieta + metformin	Dieta připravená na Pracovišti experimentální medicíny IKEM, viz. tabulka 1; 5,2 g metforminu/kg diety
Vysokotuková dieta	Dieta připravená na Pracovišti experimentální medicíny IKEM
Vysokotuková dieta + metformin	Dieta připravená na Pracovišti experimentální medicíny IKEM, viz. tabulka 1; 5,2 g metforminu/kg diety

Tabulka 1 Složení diet

	standardní dieta (SD)		vysokotuková (VTD)	
	<i>g/kg</i>	<i>kJ/kg</i>	<i>g/kg</i>	<i>kJ/kg</i>
<i>kasein</i>	100	1627	85,2	1342
<i>sunar</i>	60	1237	60	1237
<i>vojtěška</i>	411	3699	22	198
<i>droždí</i>	60	256	60	256
<i>rostlinný olej</i>	6	222	6	222
<i>sádlo</i>			200	7200
<i>škrob</i>	376	5109	100	1360
<i>agar</i>			8,5	109
<i>vitamíny</i>	10		10	
<i>minerály</i>	10		10	
		12150		11713

3.2. Zvířata

Pokusy byly prováděny na dospělých potkanech, samcích kmene Wistar ve stáří 4 – 6 měsíců. Zvířata byla chována za standardních podmínek v řízeném světelném režimu 12 : 12 a teplotě 23 °C. Potkani byli ustájeni v klecích po šesti a měli volný přístup k vodě a potravě. V průběhu experimentu byli po dobu deseti týdnů krmeni standardní a vysokotukovou dietou. Polovina zvířat v obou dietních skupinách byla krmena dietou obohacenou o metformin (5,2 g metforminu /1 kg diety). Při výpočtu přibližné denní dávky metforminu (300 mg/kg t.hm /den) jsme vycházeli z experimentálně zjištěné průměrné spotřeby diety na den pro potkana tohoto věku (20 g).

U poloviny zvířat v každé skupině byla těsně před koncem experimentu navozena krátkodobá částečná teplá ischemie jater. Po uspání byla otevřena břišní dutina a na 20 min byla zaškrvena *vena portae*. Po obnovení krevního oběhu byla břišní dutina uzavřena a zvířata byla ponechána naživu dalších 48 hodin. Následně byla zvířata usmrcena exsanguinací v celkové anestézii a sérum, popř. játra byla využita k dalším analýzám.

Anestezie: 10 % narketan : dexdormitor v poměru 1:4 a dávce 0,065 ml směsi/ 100 g těl. váhy

Při měření rychlosti replece ATP metodou ³¹P NMR byla uspaná zvířata s otevřenou břišní dutinou fixována na podložce a ³¹P/¹H cívka byla umístěna přímo na povrch jater. Tato skupina zvířat byla usmrcena okamžitě po 120 min reperfuzi a jejich tkáň nebyly využity k dalším experimentům.

Všechny experimenty byly vypracovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 359/2012 Sb.) a schváleny etickou komisí pro ochranu zvířat Institutu klinické a experimentální medicíny.

3.3. Metody

3.3.1. Příprava homogenátu a izolace mitochondrií

3.3.1.1. *Izolace jaterních mitochondrií*

Jaterní homogenát byl připraven homogenizací na nožovém homogenizátoru Ultraturax v homogenizačním pufru. Mitochondrie byly připraveny metodou opakované diferenciační centrifugace podle Bustamanteho (Bustamante *et al.*, 1977) s několika modifikacemi. Supernatant byl centrifugován na 8000 g 10 min. Peletované mitochondrie byly resuspendovány v homogenizačním pufru a dvakrát přečištěny centrifugací na 8000 g 10 min. Finální mitochondriální peleta byla resuspendována v homogenizačním pufru na koncentraci 20 – 30 mg proteinu/ml. Koncentrace proteinů byla stanovena metodou Bradford (Bradford, 1976) užitím BSA jako standardu.

3.3.1.2. *Izolace srdečních mitochondrií*

Srdeční mitochondrie byly připraveny metodou opakované diferenciační centrifugace podle Kavazise (Kavazis *et al.*, 2008). Stanovení proteinů je obdobné jako u izolace v játrech.

3.3.2. Stanovení mitochondriální respirace a mitochondriální enzymové aktivity

3.3.2.1. *Stanovení mitochondriální respirace na Clarkově elektrodě*

Spotřeba kyslíku v izolovaných mitochondriích nebo v jaterním homogenátu byla měřena Clarkovou elektrodou (Oxygraf-K2) při teplotě 30 °C (Gnaiger, 2001, Hütter *et al.*, 2006). Rychlost spotřeby kyslíku byla vypočítána pomocí programu DatLab-4, 5 (Oroboros, Rakousko).

3.3.2.2. **Stanovení mitochondriální respirace na XF 24 analyzáru Seahorse**

Respirace mitochondrií byla měřena i na XF 24 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience, USA). Čerstvě izolované jaterní mitochondrie (10 µg/jamku; MAS pufr) byly na ledu napipetovány v objemu 50 µl /jamku do XF 24 desek a stočeny 20 000 g po dobu 10 min při 4°C. Poté byl přidán MAS pufr (450 µl) a první dvě měření byla provedena bez přidání substrátů. Před následujícími měřeními byly postupně přidávány tyto složky (uvedené koncentrace jsou finální): 10 mM glutamát + 5 mM malát, 4 mM ADP, 2 µM rotenon, 10 mM sukcinát. Každé měření bylo provedeno dvakrát. Rychlost spotřeby kyslíku byla vyjádřena v pmol O₂/min/mg proteinu.

3.3.2.3. **Stanovení aktivity mitochondriálních enzymů**

Aktivita citrát-syntázy byla měřena dle Rustina et al. (Rustin *et al.*, 1994). Principem stanovení je konverze acetyl-CoA a oxalacetátu na citrát a SH-CoA, která je spojena s ireverzibilní redukcí chromogenního substrátu TNB absorbujícího při 412 nm.

Aktivita rotenon-senzitivní (mitochondriální) NADH:cytochrom c oxidoreduktázy byla stanovena rovněž spektrofotometricky podle redukce cytochromu c v přítomnosti NADH jako rozdíl v absorbanci (550 nm) před a po přidání rotenonu.

3.3.3. **Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu**

Měření membránového potenciálu v jaterním homogenátu bylo provedeno fluorimetricky v přítomnosti safraninu O, excitační/ emisní spektrum 495/586 nm, na spektrofluorimetru PC1 (ISS Inc., USA) (Akerman and Wikström, 1976). K výpočtu byl využit program Vinci (ISS Inc., USA).

3.3.4. Stanovení bobtnání mitochondrií

Bobtnání mitochondrií jsme měřili turbidimetricky dle Drahoty (Drahota *et al.*, 2012) jako pokles absorbance suspenze mitochondrií po přidání 100 μM CaCl_2 v čase. Absorbance byla měřena při 520 nm opakovaně každých 6 s po dobu 5 min na spektrometru UV-1601 (Shimadzu, Japonsko). Intenzita bobtnání byla vypočítána jako rozdíl optické hustoty na začátku a na konci každé periody měření. Základní křivku jsme získali po vynesení hodnoty absorbance (osa y) proti času (osa x). Maximální rychlost bobtnání byla vypočítána na základě derivace základní křivky a vyjádřena jako změna absorbance za 6 s (0,1 min). Z této derivace byl odvozen i třetí parametr charakterizující bobtnání mitochondrií, a to časový interval mezi přidáním vápníku a dosažením maximální rychlosti bobtnání.

3.3.5. Biochemické analýzy

Obsah triacylglycerolů, cholesterolu, NEMK, β -hydroxybutyrátu a laktátu v séru byly stanoveny pomocí komerčních kitů (viz seznam reagensí). Obsah glykogenu a triacylglycerolů v játrech byl měřen dříve popsanou metodou (Cahova *et al.*, 2004). Glykémie byla měřena Accu-Check glukometrem (Roche, ČR).

3.3.6. ^{31}P NMR studie

Měření byla prováděna na uspaných zvířatech při otevřené břišní dutině. $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ cívka byla volně položena na povrch jater do blízkosti *porta hepatica*. Spektra byla získána na přístroji Bruker Biospec 47/20 (4,7 T). Snímání spekter probíhalo v pětiminutových intervalech za tří odlišných situací: 1) bazální (klidový) stav, interval 0 - 20. min; 2) ischemie (zaškrcení *vena portae*), interval 21. – 40. min; 3) reperfuze (obnovení průtoku krve), 41. – 120. min. Obsah ATP byl stanoven na základě intenzity signálu β -fosfátového ATP píku programem jMRUI 4,0 (Bruker Biospin GmbH, Německo) a vyjádřen jako poměr konkrétní hodnoty v daném čase a bazální hodnoty.

3.3.7. **Statistická analýza**

Všechny hodnoty jsou uváděny jako aritmetický průměr \pm SEM. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při hladině $P \leq 0,05$. Statistická analýza byla provedena pomocí Studentova t-testu ($n = 3-5$) u dvou skupin a pomocí one-way ANOVA u tří a více skupin. K vytvoření grafů jsme použili MS Excel (Microsoft).

4. VÝSLEDKY

4.1. Publikace A

INHIBITORY EFFECT OF METFORMIN ON OXIDATION OF NADH-DEPENDENT SUBSTRATES IN RAT LIVER HOMOGENATE (Páleníčková, E., M. Cahová, Z. Drahota, L. Kazdová, and M. Kalous, 2011)

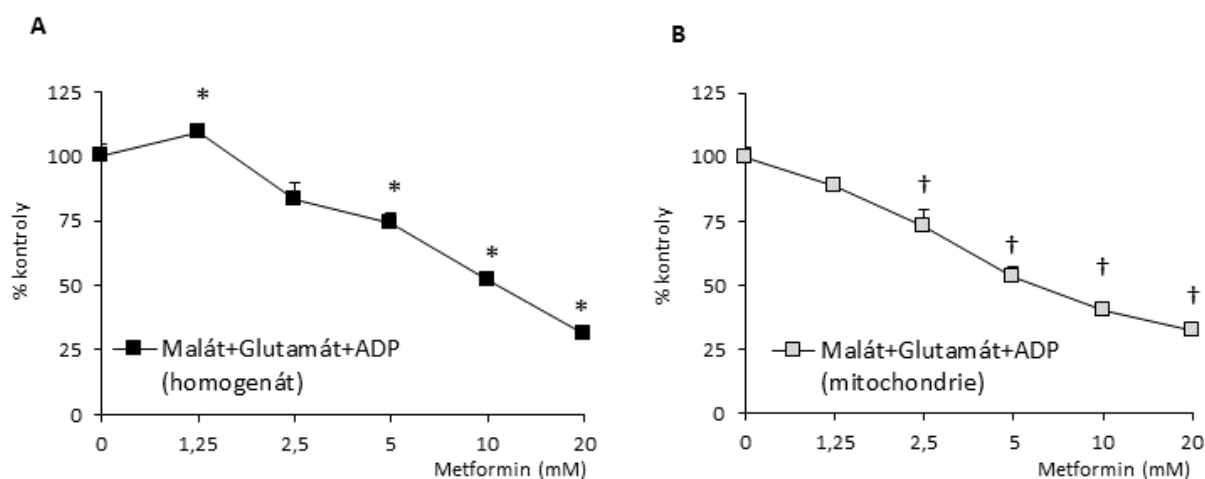
Výsledky předchozích experimentálních studií naznačují, že metformin ovlivňuje respirační řetězec především na úrovni komplexu I, přesto však v této otázce panuje řada nejasností. V této části studie jsme se zaměřili na následující otázky:

- 1) porovnání vhodnosti modelu izolovaných jaterních mitochondrií a jaterního homogenátu pro studium vlivu metforminu na mitochondriální respiraci
- 2) stanovení vlivu metforminu přidávaného *in vitro* na respiraci NADH-dependentních a NADH-independentních substrátů v játrech
- 3) vliv délky preinkubace s metforminem na oxidační kapacitu jaterních mitochondrií *in vitro*
- 4) vliv metforminu na respirační kontrolu jaterních mitochondrií/homogenátu
- 5) porovnání působení metforminu na mitochondriální respiraci v játrech a v srdci

4.1.1. Jaterní homogenát je vhodný model pro studium vlivu metforminu na mitochondriální respiraci

Literární data týkající se mechanismu účinku metforminu byla získána buď na izolovaných mitochondriích, nebo na buněčných kulturách. V našich pokusech spotřeba kyslíku izolovaných jaterních mitochondrií při oxidaci substrátů malátu a glutamátu +ADP za absence metforminu činila 1100 ± 46 pmol/s/mg proteinu. Při použití 10 % jaterního homogenátu byla spotřeba kyslíku za obdobných podmínek (substráty, teplota, absence metforminu) o 45 % nižší (609 ± 31 pmol/s/mg proteinu). Jaterní homogenát a izolované mitochondrie reagovaly na *in vitro* přidávaný metformin obdobně, ale lišily se v citlivosti. V respiračním „stavu 3“, tedy při maximální rychlosti

respirace, jsme statisticky významnou inhibici respirace na izolovaných mitochondriích prokázali již v přítomnosti 2,5 mM metforminu, zatímco v jaterním homogenátu při 2,5 – 5 mM metforminu (obr. 1). Analogicky, EC_{50} metforminu pro homogenát byla 10 mM, pro mitochondrie 5 mM. Naše výsledky ukázaly, že izolované jaterní mitochondrie a 10 % jaterní homogenát mají pro měření buněčné respirace obdobnou vypovídací hodnotu. Nevýhodou homogenátu je nižší citlivost. Na druhou stranu, příprava izolovaných mitochondrií je časově náročnější, zvyšuje riziko poškození mitochondrií a limituje dobu experimentu. Vzhledem k požadavku na delší preinkubaci mitochondrií jsme v některých experimentech používali jaterní homogenát.



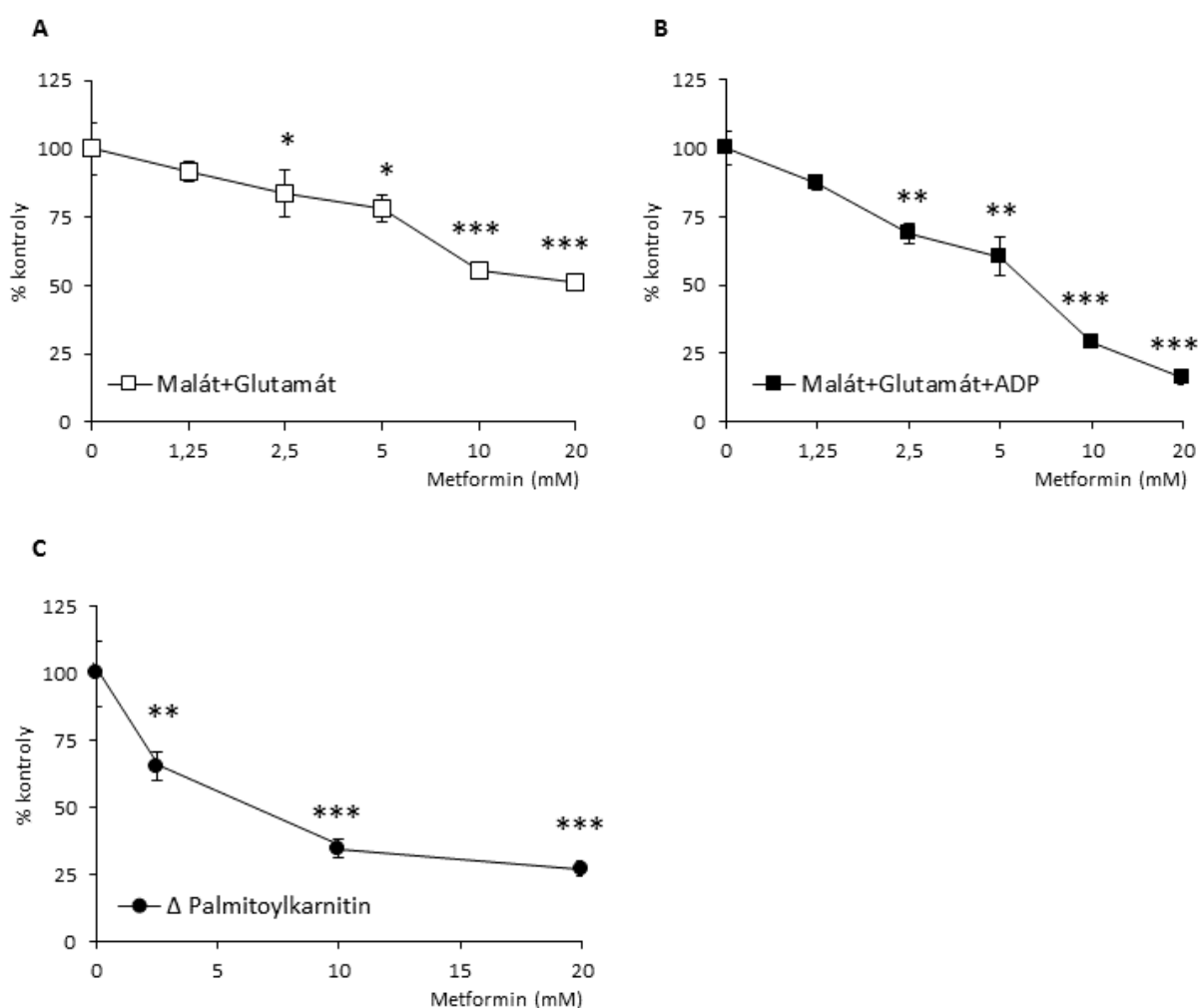
Obr. 1 Závislost maximální intenzity oxidace glutamátu a malátu na koncentraci metforminu přidávaného *in vitro* v jaterním homogenátu a mitochondriích.

Respirace glutamátu a malátu v jaterním homogenátu (A) a v izolovaných jaterních mitochondriích (B) byla měřena po 5 min preinkubaci s 0; 1,25; 2,5; 5; 10 a 20 mM metforminem. * $P < 0,05$ vs. kontrola (homogenát). † $P < 0,05$ vs. kontrola (mitochondrie). Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku bez metforminu a představují průměr ze čtyř nezávislých experimentů \pm SEM. Absolutní hodnota spotřeby kyslíku: jaterní homogenát 609 ± 31 pmol/s/mg proteinu, mitochondrie 1100 ± 46 pmol/s/mg proteinu.

4.1.2. Metformin snižuje oxidaci substrátů závislých na komplexu I

Malát a glutamát mohou dodávat elektrony do respiračního řetězce výlučně prostřednictvím komplexu I formou redukováného NADH. Beta-oxidací palmitoylkarnitinu vzniká acetyl-CoA, z něhož jsou po průchodu Krebsovým cyklem vytvořeny 3 molekuly NADH a jedna molekula $FADH_2$. Palmitoylkarnitin je tedy rovněž substrát z větší části závislý na komplexu I. Spotřeba kyslíku pro oxidaci těchto

substrátů v přítomnosti zvyšující se koncentrace metforminu je znázorněna na obr. 2. Měření byla prováděna v 10 % jaterním homogenátu, výsledky jsou vyjádřeny v procentech spotřeby kyslíku kontrolního vzorku, tj. v nepřítomnosti metforminu. Ve všech testovaných kombinacích jsme prokázali vztah mezi inhibičním účinkem metforminu a jeho koncentrací. Při použití malátu a glutamátu jsme statisticky významný inhibiční vliv metforminu na respiraci prokázali při koncentraci 2,5 mM, 50 % inhibice bylo dosaženo v přítomnosti 20 mM metforminu. Respirace samotného palmitoylkarnitinu (Δ palmitoylkarnitin) byla vypočítána jako rozdíl ve spotřebě kyslíku



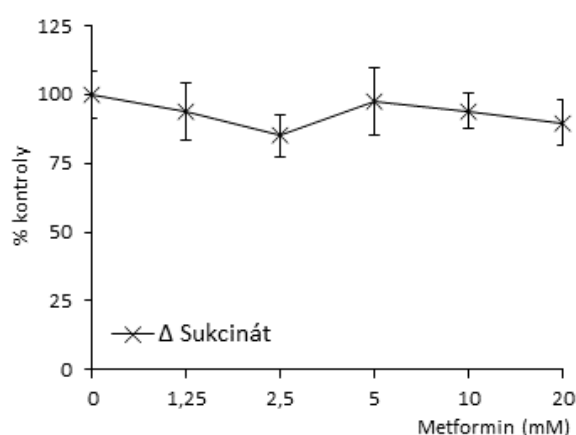
Obr. 2 Účinek metforminu na oxidaci NADH-dependentních substrátů v jaterním homogenátu.

A: malát + glutamát; B: malát+glutamát+ADP; C: Δ palmitoylkarnitin. Jaterní homogenát byl 5 min před měřením preinkubován bez metforminu nebo s 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM; 10 mM nebo 20 mM metforminem. Respirace samotného palmitoylkarnitinu (Δ palmitoylkarnitin) byla vypočítána jako rozdíl ve spotřebě kyslíku za přítomnosti malátu + ADP po a před přidáním palmitoylkarnitinu. Absolutní hodnota spotřeby kyslíku: malát + glutamát 82 ± 8 pmol/s/mg proteinu, Δ palmitoylkarnitin 288 ± 35 pmol/s/mg proteinu. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku bez metforminu a představují průměr ze čtyř nezávislých experimentů \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. kontrola, ** $P < 0,01$ vs. kontrola, *** $P < 0,001$ vs. kontrola.

za přítomnosti malátu + ADP po a před přidáním palmitoylkarnitinu. V přítomnosti 20 mM metforminu je respirace inhibována ze sedmdesáti procent.

4.1.3. Transport elektronů prostřednictvím komplexu II kompenzuje inhibiční vliv metforminu na komplex I

Sukcinát je meziprodukt citrátového řetězce, který dodává elektrony do dýchacího řetězce výlučně prostřednictvím FADH₂ a komplexu II. Prokázali jsme, že respirace za přítomnosti FADH₂-dependentního substrátu není ovlivněna rostoucí koncentrací metforminu (obr. 3).

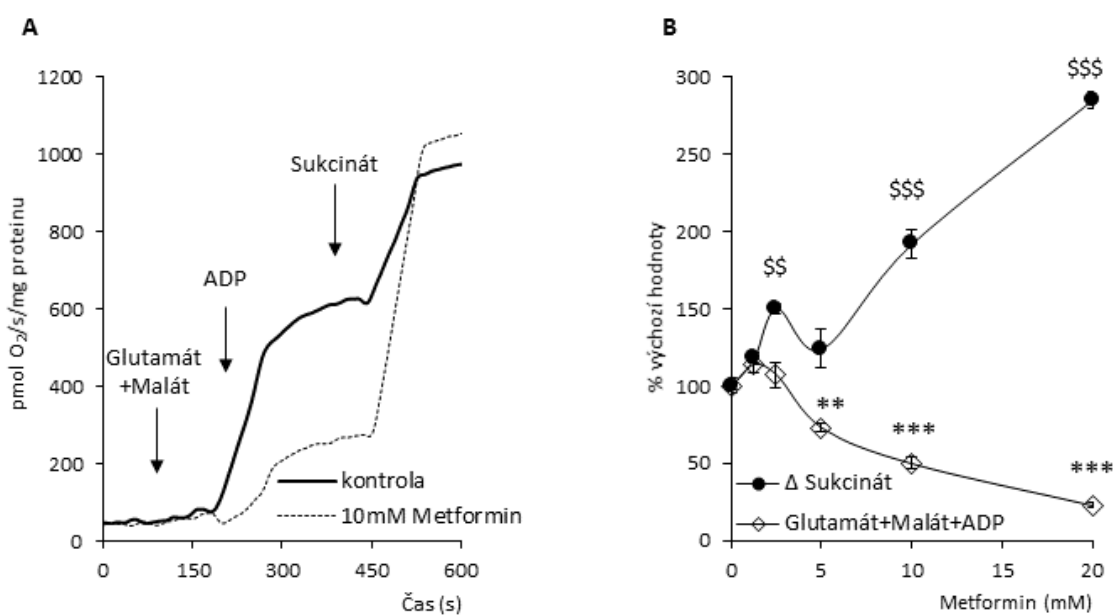


Obr. 3 Oxidace sukcinátu v jaterním homogenátu.

Respirace samotného sukcinátu (Δ sukcinát) byla vypočítána jako rozdíl ve spotřebě kyslíku za přítomnosti malátu + ADP po a před přidáním sukcinátu. Absolutní spotřeba kyslíku kontroly na oxidaci samotného sukcinátu 1473 ± 125 pmol/s/mg proteinu. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku bez metforminu a představují průměr ze čtyř nezávislých experimentů \pm SEM.

Obr. 4A ukazuje časový průběh respirace NADH- a FADH₂-dependentních substrátů v přítomnosti a nepřítomnosti metforminu. Křivka spotřeby kyslíku u kontrolního vzorku, tj. za absence metforminu, představuje standardní průběh oxidace substrátů. Po přidání malátu a glutamátu se spotřeba kyslíku zvýšila jen nepatrně, dodáním ADP nastal výrazný nárůst dýchání. Přídavek sukcinátu vedl k dalšímu skokovému navýšení spotřeby kyslíku, při kterém bylo dosaženo maximální rychlosti respirace. V přítomnosti 10 mM metforminu se po přidání ADP spotřeba kyslíku navýšila pouze o třetinu v porovnání s kontrolním vzorkem. Buněčná respirace inhibovaná metforminem byla obnovena po přidání elektronů, tj. v důsledku vstupu elektronů přicházejících do řetězce prostřednictvím komplexu II (přidáním sukcinátu). Dodání

elektronů zprostředkované sukcinátem způsobilo strmý nárůst inhibované křivky a následné vyrovnání spotřeby kyslíku v obou vzorcích. Z tohoto pozorování usuzujeme, že metformin neovlivňuje vnitřní mitochondriální membránu jako rozpojovač (uncoupler). Procentuální příspěvek substrátů komplexu I na mitochondriální respiraci se snižuje v závislosti na rostoucí koncentraci metforminu. Naopak, se snižujícím se příspěvkem komplexu I roste procentuální zastoupení elektronů dodávaných do elektronového transportního řetězce prostřednictvím komplexu II (obr. 4B).

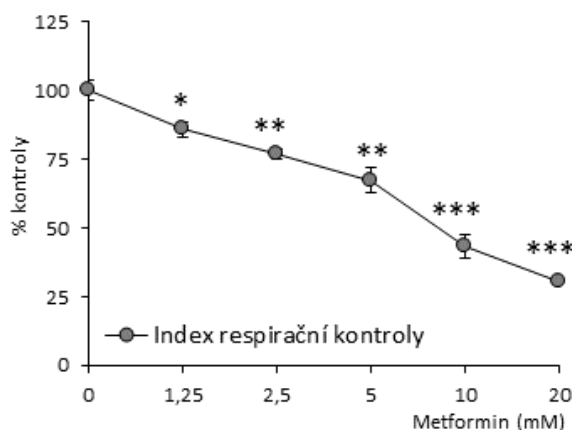


Obr. 4 Respirační křivka glutamátu+malátu+ADP+sukcinátu v homogenátu jater a jejich relativní příspěvek k respiraci při vzrůstající koncentraci metforminu.

Spotřeba kyslíku v jaterní homogenátu (0,6 mg proteinu/ml) v čase měřená za přítomnosti 10 mM metforminu (A); procentuální příspěvek sukcinátu a NADH-dependentních substrátů při různých koncentracích metforminu (B). Respirace samotného sukcinátu (Δ sukcinát) byla vypočítána jako rozdíl ve spotřebě kyslíku za přítomnosti malátu + ADP po a před přidáním sukcinátu. Draselné médium obsahovalo 0,5 mg/ml sérový albumin bez mastných kyselin a 20 μ M cytochrom c. Koncentrace přidaných substrátů: glutamát 10 mM; malát 2,5 mM; ADP 1,5 mM; sukcinátu 10 mM. Data v grafu B jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku ve vzorku bez metforminu a představují průměr ze čtyř nezávislých experimentů \pm SEM. ** $P < 0,01$ NADH-závislé substráty + metformin vs. kontrola, *** $P < 0,001$ NADH-závislé substráty + metformin vs. kontrola, ss $P < 0,01$ FADH₂-závislý substrát + metformin vs. kontrola, sss $P < 0,001$ FADH₂-závislý substrát + metformin vs. kontrola.

4.1.4. Pokles hodnoty Indexu respirační kontroly je podobný inhibici respiračního „stavu 3“

Metformin způsobuje pokles Indexu respirační kontroly, tj. poměr spotřeby kyslíku při maximální ADP-stimulující respiraci a respiraci za absence ADP, je obvykle považován za ukazatel spřažení aktivity elektronového transportního řetězce a oxidační fosforylace. V našich pokusech jsme prokázali zřetelnou negativní závislost indexu respirační kontroly na stoupající koncentraci metforminu (obr. 5). Výsledky uvedené v předchozím odstavci však odpráhují roli metforminu vylučují, protože respirace malátu a glutamátu byla v přítomnosti metforminu snižena, a to nezávisle na ADP. Získaná data interpretujeme jako útlum intenzity respirace NADH-dependentních substrátů v přítomnosti metforminu a z toho plynoucí snížení číselných hodnot indexu respirační kontroly.



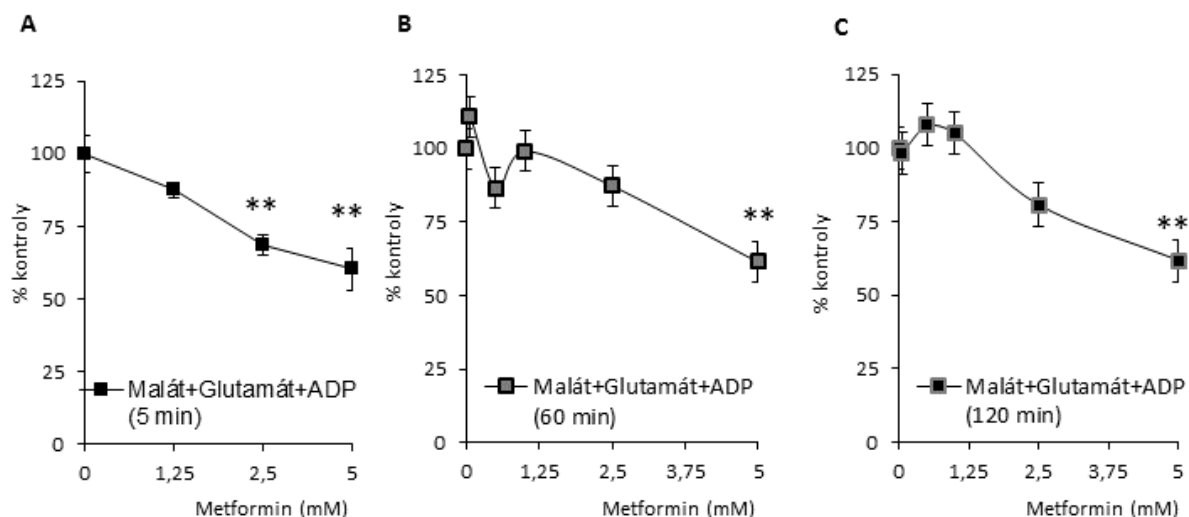
Obr. 5 Vliv koncentrace metforminu na index respirační kontroly v jaterním homogenátu.

Index respirační kontroly byl vypočítán jako poměr spotřeby kyslíku pro oxidaci glutamátu + malátu v přítomnosti a nepřítomnosti ADP po 5 min preinkubaci bez metforminu nebo s 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM; 10 mM nebo 20 mM metforminem. Absolutní spotřeba kyslíku kontrolního vzorku respirační kontroly činila $7,7 \pm 0,65$. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku bez metforminu a představují průměr ze čtyř nezávislých experimentů \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. kontrola; ** $P < 0,01$ vs. kontrola; *** $P < 0,001$ vs. kontrola.

4.1.5. Délka preinkubace neovlivňuje inhibiční vliv metforminu v játrech

Pokusy na tkáňových kulturách naznačují, že prodloužená inkubace buněk s metforminem zvyšuje jeho inhibiční vliv na respirační řetězec (El-Mir *et al.*, 2000). Cílem následujícího pokusu bylo ověřit tato pozorování na homogenátu. Testované

vzorky jaterního homogenátu jsme před měřením spotřeby kyslíku inkubovali s metforminem v rozmezí koncentrací 0,125 – 5 mM po dobu 5 min, 60 min a 120 min (obr. 6). V rozporu s očekáváním jsme neprokázali zásadní rozdíly ve spotřebě kyslíku v závislosti na době preinkubace s metforminem. Naše výsledky nepotvrdily předpoklad, že stoupající doba preinkubace jaterního homogenátu s metforminem *in vitro* povede ke zvýšenému inhibičnímu účinku, který byl prokázán na primární kultuře hepatocytů.



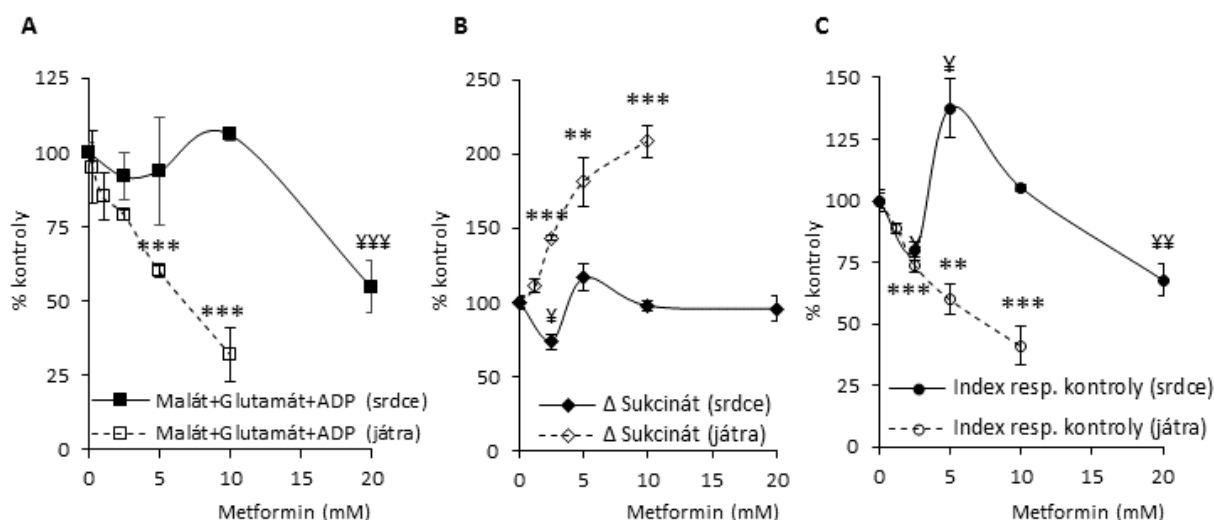
Obr. 6 Vliv délky preinkubace jaterního homogenátu s metforminem na stupeň inhibice respiračního „stavu 3“.

Jaterní homogenát byl před měřením inkubován s metforminem po dobu 5 min (A), 60 min (B) a 120 min (C) na ledu. Koncentrace přidávaných substrátů: glutamát 10 mM; malát 2,5 mM; ADP 1,5 mM. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku bez metforminu a představují průměr ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. kontrola, ** $P < 0,01$ vs. kontrola.

4.1.6. Metformin rozdílně inhibuje mitochondriální respiraci v játrech a v srdci

Některé studie ukazují, že metformin ovlivňuje srdeční funkci a odolnost k ischemii (Roberts and Ryan, 2007, Bhamra *et al.*, 2008, Yin *et al.*, 2011). Při použití malátu + glutamátu + ADP jako substrátů oxidace vykazovaly srdeční mitochondrie u kontrolního vzorku ve srovnání s jaterními mitochondriemi o 50 % vyšší respirační kapacitu (1659 ± 53 vs. 1100 ± 25 pmol O_2 /s/mg proteinu). Citlivost srdečních mitochondrií vůči rostoucí koncentraci metforminu byla ve srovnání s jaterními mitochondriemi výrazně nižší, $EC_{50, \text{metformin, srdce}}$ pro malát+ glutamát při maximální rychlosti respirace bylo dosaženo až při 20 mM (obr. 7A). Respirace sukcinátu nebyla

metforminem ovlivněna s výjimkou izolovaného poklesu při koncentraci 2,5 mM, pro který zatím nemáme vysvětlení. U srdečních mitochondrií jsme nepozorovali zvyšující se podíl elektronů dodávaných přes komplex II v důsledku stoupající koncentrace metforminu, jenž je charakteristický pro jaterní mitochondrie (obr. 7B). Odlišný průběh měly také křivky závislosti indexu respirační kontroly na koncentraci metforminu v srdci a v játrech (obr. 7C).



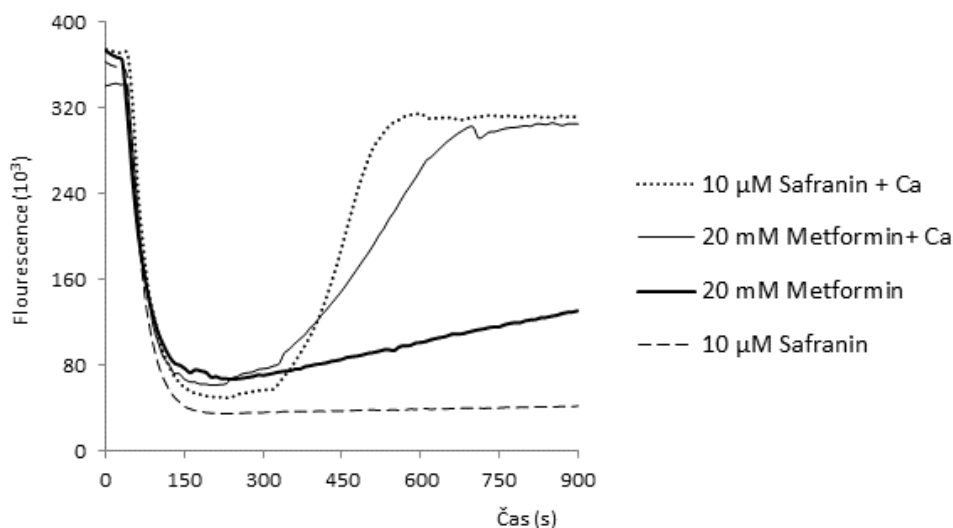
Obr. 7 Vliv metforminu na oxidaci malátu + glutamátu + ADP (A), Δ sukcinátu (B) a na index respirační kontroly (C) v srdečních a jaterních mitochondriích.

Index respirační kontroly byl vypočítán jako poměr spotřeby kyslíku pro oxidaci glutamátu + malátu v přítomnosti a nepřítomnosti ADP. Respirace samotného sukcinátu (Δ sukcinát) byla vypočítána jako rozdíl ve spotřebě kyslíku za přítomnosti malátu + ADP po a před přidáním sukcinátu. Koncentrace přidávaných substrátů: glutamát 10 mM; malát 2,5 mM; ADP 1,5 mM. Absolutní hodnota spotřeby kyslíku v srdečních mitochondriích: malát + glutamát + ADP 1659 ± 90 pmol/s/mg proteinu, Δ sukcinát 4336 ± 208 pmol/s/mg proteinu, index respirační kontroly $4,1 \pm 0,2$ pmol/s/mg proteinu. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku bez metforminu a představují průměr ze čtyř nezávislých experimentů \pm SEM. ** $P < 0,01$ vs. kontrola (játra), *** $P < 0,001$ vs. kontrola (játra), * $P < 0,05$ vs. kontrola (srdce), ** $P < 0,01$ vs. kontrola (srdce), *** $P < 0,01$ vs. kontrola (srdce).

4.1.7. Metformin je schopen krátkodobě oddálit porušení membránového potenciálu mitochondrií

Mitochondriální membránový potenciál slouží jako ukazatel charakterizující neporušenost mitochondriálního systému oxidační fosforylace. K jeho kvantifikaci jsme využili fluorescenční sondu safranin O, která je aktivně zadržována v mitochondriích s vysokým membránovým potenciálem (nízká fluorescence) a uvolňuje se do média

při poklesu membránového potenciálu (vysoká fluorescence). Přidáním homogenátu do média koncentrace safraninu O klesala, což indikovalo vysoký membránový potenciál (obr. 8). V přítomnosti 20 mM metforminu došlo k významnému snížení membránového potenciálu, a tedy k postupnému vyplavování sondy. Tento pokles potenciálu plynule rostoucí v čase byl pravděpodobně způsoben částečnou inhibicí respiračního řetězce metforminem. Přidání Ca^{2+} iontů vedlo k rychlému otevření MPTP a úplnému poklesu membránového potenciálu. Metformin (20 mM) sice nezabránil disipaci membránového potenciálu vyvolané přidáním Ca^{2+} , ale nástup tohoto děje výrazně zpomalil. Tuto skutečnost si vysvětlujeme sníženou citlivostí MPTP k Ca^{2+} v přítomnosti metforminu.



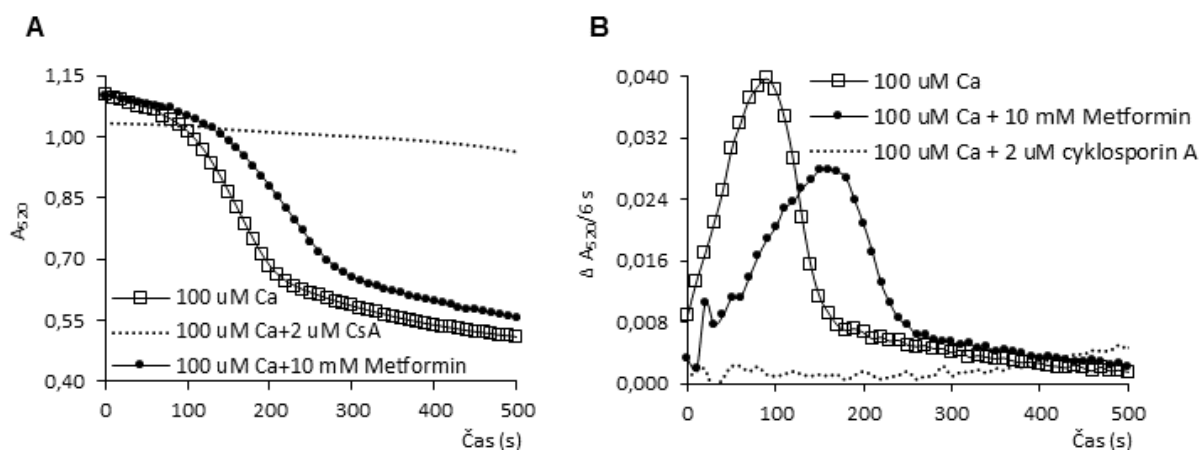
Obr. 8 Vliv délky preinkubace 20 mM metforminu na změnu mitochondriálního membránového potenciálu a přítomnosti Ca^{2+} iontů.

Jaterní homogenát (0,15 mg proteinu/ml) byl přidán do média obsahujícího 10 μM safranin O (přerušovaná čára), 10 μM safranin O + 100 μM Ca^{2+} (tečkovaná čára), 10 μM safranin O + 20 mM metformin (silná plná čára), nebo 10 μM safranin O + 20 mM metformin + 100 μM Ca^{2+} . Křivka představuje typický výsledek dvou nezávislých experimentů.

4.1.8. Metformin zvyšuje odolnost mitochondriálního póru přechodné permeability k vápníku

Mitochondriální pór přechodné permeability je známější pod svým anglickým označením „mitochondrial permeability transition pore” (MPTP). Tato struktura se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně. Za určitých okolností („otevřením póru“) dochází k depolarizaci mitochondriální membrány, narušení homeostázy, bobtnání mitochondrií a případně k apoptóze. MPTP citlivě reaguje na vápenaté kationty, tuto

citlivost mohou biguanidy ovlivňovat (Guigas *et al.*, 2004). Testovali jsme účinek 10 mM metforminu na bobtnání mitochondrií vyvolané vápenatými ionty v izolovaných mitochondriích. Cyklosporin A představuje v našem uspořádání pozitivní kontrolu, neboť v jeho přítomnosti je MPTP k vápníku necitlivý. Intenzita bobtnání měřená jako absorbance při 520 nm ($A_{520} = 0,56$ vs. $A_{520} = 0,61$) nebyla metforminem ovlivněna (obr. 9A). Derivací těchto primárních dat podle času jsme vypočítali rychlost bobtnání vyjádřenou jako $\Delta A_{520} / 0,1$ min a sledovali časový interval od přidání vápníku do bodu maximální rychlosti bobtnání. V přítomnosti metforminu došlo ke zpomalení rychlosti bobtnání o 70 % (0,0278 vs. 0,0398) a k prodloužení doby maximální rychlosti bobtnání z 90 s na 150 s (obr. 9B). Naše výsledky tak potvrzují teorii, že metformin zvyšuje odolnost MPTP k působení vápníku.



Obr. 9 Účinek metforminu na intenzitu (A) a rychlost (B) vápníkem indukovaného bobtnání izolovaných mitochondrií.

Intenzita bobtnání byla vypočítána jako rozdíl optické hustoty na začátku a na konci každé periody měření. Maximální rychlost bobtnání byla vypočítána na základě derivace základní křivky a vyjádřena jako změna absorbance za 0,1 min. 2 μ M cyklosporin A (CsA) byl použit jako pozitivní kontrola. Uvedené výsledky představují typický výsledek ze tří nezávislých měření.

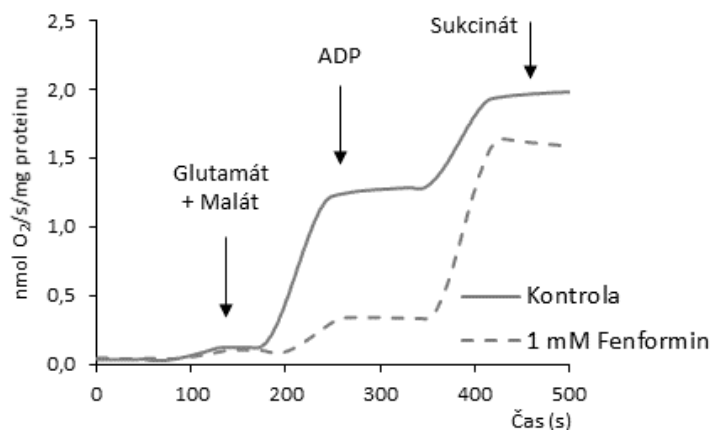
V rámci této publikace jsem provedla všechna měření a vyhodnocování výsledků.

4.2. Publikace B

BIGUANIDES INHIBIT COMPLEX I, II AND IV OF RAT LIVER MITOCHONDRIA AND MODIFY THEIR FUNCTIONAL PROPERTIES (Drahota, Z., E. Palenickova, R. Endlicher, M. Milerova, J. Brejchova, M. Vosahlikova, P. Svoboda, L. Kazdova, M. Kalous, Z. Cervinkova, and M. Cahova, 2014)

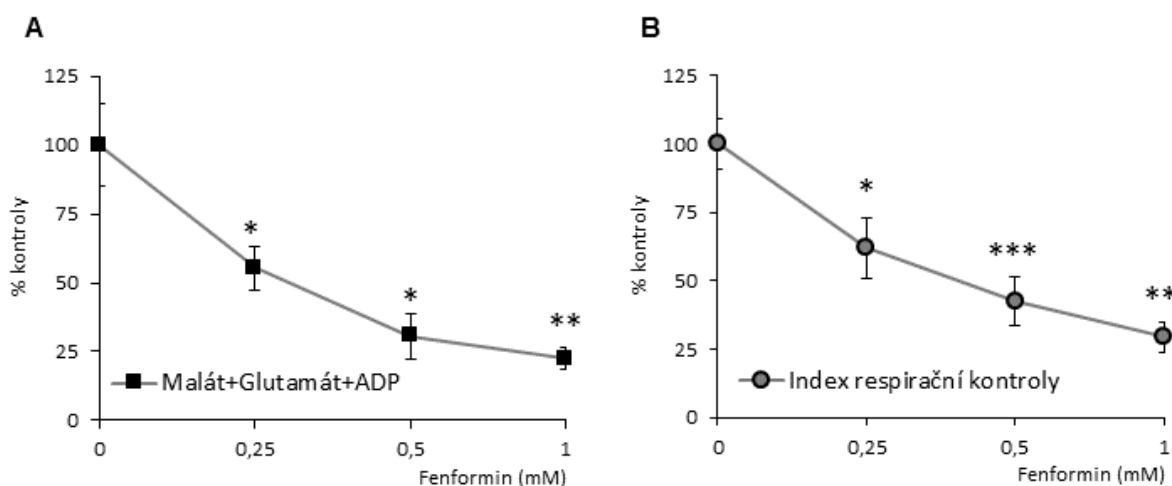
4.2.1. Srovnání vlivu fenforminu a metforminu na enzymatické komplexy mitochondriálního respiračního řetězce

Metformin i fenformin patří do rodiny biguanidů inhibujících mitochondriální respiraci. Aromatický fenformin je však na rozdíl od metforminu výrazně účinnější (cca 10 x), proto se zdá být vhodnějším nástrojem pro studium mechanismu účinků biguanidů, než jakým je klinicky používaný metformin. Podmínkou přenositelnosti výsledků získaných při studiu fenforminu je kvalitativně obdobné působení obou biguanidů. Abychom získali detailní informace o efektu fenforminu na jednotlivé komponenty mitochondriálního respiračního řetězce, stanovili jsme u izolovaných jaterních mitochondrií spotřebu kyslíku po přidání různých substrátů, které specificky dodávají elektrony jednotlivým enzymatickým komplexům. Obr. 10 ukazuje typickou křivku spotřeby kyslíku jaterních mitochondrií kontrolního vzorku a vzorku po pětiminutové preinkubaci s 1 mM fenforminem. Respirační rychlost po přidání malátu a glutamátu byla v obou vzorcích nízká a nezávisela na přítomnosti fenforminu. Přidáním ADP došlo k navození maximální respirační rychlosti mitochondrií – respiračního „stavu 3“. Zde se již projevil silný inhibiční vliv fenforminu, kdy respirace byla o 70 % nižší než u kontrolního vzorku. V přítomnosti účinné koncentrace fenforminu i metforminu jsme pozorovali nejen snížení maximální respirace jaterních mitochondrií, ale současně také pomalejší vzestup spotřeby kyslíku v čase (tj. odlišný sklon křivky). Dodáním sukcinátu se sice navýšila buněčná respirace obou vzorků, přesto maximální respirace mitochondrií ovlivněných fenforminem dosáhla pouze 80 % kontroly.



Obr. 10 Účinek fenforminu na respiraci izolovaných mitochondrií.

Mitochondrie (0,2 mg proteinu/ ml) byly před měřením inkubovány 5 min na ledu buď pouze v draselném médiu (plná čára), nebo s 1 mM fenforminem (přerušovaná čára). Koncentrace přidaných substrátů: glutamát 10 mM; malát 2,5 mM; ADP 1,5 mM a sukcinát 10 mM. Graf představuje originální záznam z oxygrafu, typický výsledek tří nezávislých experimentů.



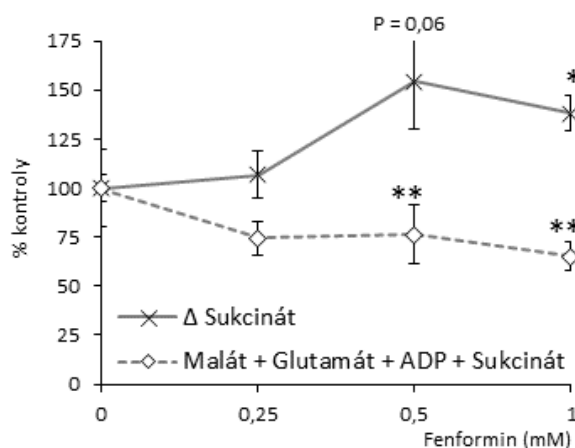
Obr. 11 Vliv fenforminu na oxidaci NADH-dependentních substrátů (A) a index respirační kontroly (B) v izolovaných mitochondriích.

Jaterní homogenát byl 5 min preinkubován bez fenforminu nebo s 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM fenforminem. Index respirační kontroly byl vypočítán jako poměr spotřeby kyslíku pro oxidaci glutamátu + malátu za přítomnosti a nepřítomnosti ADP bez fenforminu nebo s 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM fenforminem. Absolutní hodnota spotřeby kyslíku: malát + glutamát + ADP 1964 ± 301 pmol/s/mg proteinu, respirační kontrola $9,3 \pm 0,72$. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku bez fenforminu (A), nebo jako procento hodnoty respirační kontroly v kontrolním vzorku (B) a představují průměr ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. kontrola, ** $P < 0,01$ vs. kontrola, *** $P < 0,001$ vs. kontrola.

Jak jsme již ukázali v předchozí části, inhibice buněčného dýchání v podmínkách *in vitro* je závislá na dávce biguanidu. Efekt metforminu na respiraci glutamátu + malátu + ADP vykazoval koncentrační závislost, 70 % inhibice bylo dosaženo při koncentraci

10 mM, $EC_{50, \text{metformin}}$ odpovídala 5 mM (obr. 2). Když jsme za stejných podmínek kvantifikovali inhibiční efekt fenforminu, dosáhli jsme 70 % inhibice při koncentraci 1 mM a $EC_{50, \text{fenformin}}$ odpovídala 0,25 mM (obr. 11A). Fenformin snižoval index respirační kontroly u spřažených mitochondrií přímo úměrně se vzrůstající koncentrací. Zjištěná závislost odpovídala korelaci mezi dávkou fenforminu a inhibičním efektem na respiraci glutamátu + malátu + ADP (obr. 11B). Na základě těchto výsledků vyvozujeme, že mechanismus působení obou biguanidů na utilizaci NADH-dependentních substrátů a na respirační kontrolu je obdobný.

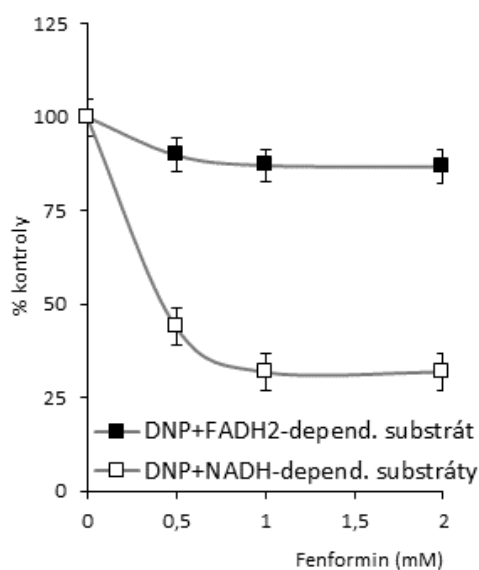
Inhibice respirace NADH-dependentních substrátů metforminem byla v plném rozsahu kompenzována sukcinátem, a to i při nejvyšší použité koncentraci metforminu 20 mM (obr. 3). Naproti tomu tento $FADH_2$ -dependentní substrát byl schopen vyrovnat vliv fenforminu na respiraci pouze dokud koncentrace fenforminu nepřesáhla 0,5 mM. V přítomnosti vyšší koncentrace fenforminu respirace při oxidaci sukcinátu dále nevzrůstala ani v přítomnosti malátu + glutamátu a sukcinátu (obr. 12). To ukazuje na celkový útlum respirační kapacity a možný přímý inhibiční vliv fenforminu na komplex I a komplex II (obr. 11, 12).



Obr. 12 Vliv fenforminu na oxidaci sukcinátu v izolovaných jaterních mitochondriích.

Respirace samotného sukcinátu (Δ sukcinát) byla vypočítána jako rozdíl ve spotřebě kyslíku za přítomnosti malátu + ADP po a před přidáním sukcinátu. Absolutní spotřeba kyslíku kontroly: Δ sukcinátu 1370 ± 69 pmol/s/mg proteinu; malát + glutamát + ADP + sukcinát 3334 ± 369 pmol/s/mg proteinu. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku bez fenforminu a představují průměr ze čtyř nezávislých experimentů \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. kontrola, ** $P < 0,01$ vs. kontrola.

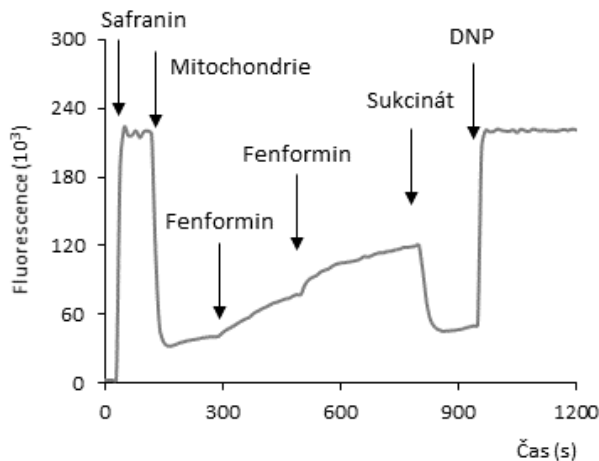
Předchozí výsledky ukazují, že na spřažených mitochondriích (tj. v přítomnosti ADP) fenformin inhibuje aktivitu komplexu I a částečně i komplexu II. Zajímalo nás, zda lze podobný efekt prokázat také při odpřažení elektronového transportního řetězce od oxidační fosforylace. Sledovali jsme proto vliv fenforminu na izolované jaterní mitochondrie v přítomnosti chemického rozpojovače 2,4-dinitrofenolu (DNP). Výsledky získané na tomto modelu jsou obdobné jako na modelu spřažených mitochondrií (obr. 13).



Obr. 13 Vliv fenforminu na respiraci substrátů v odpřažených jaterních mitochondriích.

Oxidace malátu a glutamátu (prázdné symboly) a sukcinátu (plné symboly) bez fenforminu, nebo s 0,5 mM; 1 mM; 2 mM fenforminem byla měřena v médiu obsahující 0,15 mM 2,4-dinitrofenol (DNP), který odpřahuje elektronový transport od oxidační fosforylace. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku kontrolního vzorku bez fenforminu a představují průměr dvou nezávislých experimentů.

Prokázali jsme inhibici 70 % komplexu I a 13 % inhibici komplexu II v přítomnosti 1 mM fenforminu. Tato zjištění podporují naši teorii, že fenformin ovlivňuje přímo aktivitu jednotlivých enzymatických komplexů a nepůsobí jako rozpojovač. Tuto hypotézu jsme dále ověřovali pomocí měření změn mitochondriálního membránového potenciálu (obr. 14). Safranin O užitý jako fluorescenční sonda posloužil jako indikátor změn mitochondriálního membránového potenciálu. V médiu obsahujícím glutamát a malát 0,75 mM fenformin způsobil snížení hodnoty membránového potenciálu ve srovnání s membránovým potenciálem samotných mitochondrií. Následný přidavek sukcinátu měl za následek obnovení potenciálu (opětovnou akumulaci sondy). Přidání rozpojovače DNP vedlo k výraznému porušení membránového potenciálu.



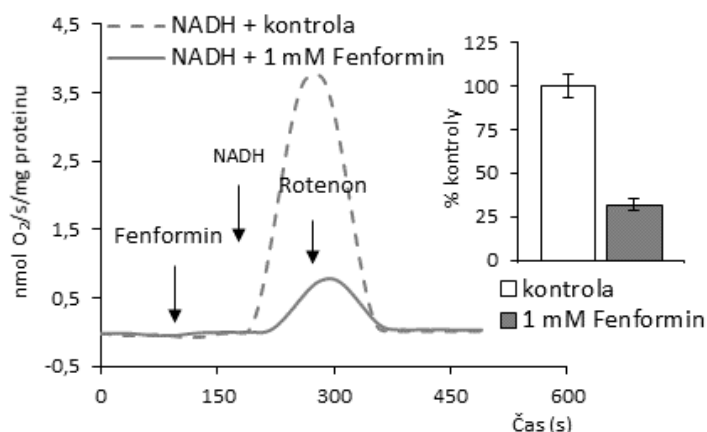
Obr. 14 Vliv fenforminu na mitochondriální membránový potenciál izolovaných mitochondrií.

Safranin O (10 μM) byl přidán do draselného média obsahujícího 10 mM glutamát a 2,5 mM malát. Jednotlivé komponenty byly přidávány postupně v následujícím pořadí: izolované jaterní mitochondrie (0,12 mg proteinu/ ml); fenformin (0,25 mM a 0,5 mM), sukcinát (10 mM) a 2,4-dinitrofenol (0,05 mM). Křivka představuje typický výsledek tří nezávislých experimentů.

Všechny uvedené výsledky podporují hypotézu, že fenformin nemá odpřahující efekt. Pozorovaný pokles respirační rychlosti glutamátu + malátu + ADP a tomu odpovídající snížení indexu respirační kontroly, podobně jako fenforminem indukovaný pokles mitochondriálního membránového potenciálu, jsou důsledkem inhibice respiračního komplexu I fenforminem.

4.2.2. Inhibiční vliv fenforminu na NADH-oxidaci

Inhibice oxidace NADH-dependentních substrátů fenforminem může být vysvětlena jak inhibicí dehydrogenáz produkujících NADH, tak utlumením komplexu I (NADH:ubichinon oxidoreduktázy), tj. omezením dodávky elektronů z komplexu I do respiračního řetězce. Abychom zjistili, která z těchto dvou možností platí, změřili jsme vliv fenforminu na přímou oxidaci NADH na zamražených mitochondriích s porušenou vnitřní membránou. Tento model umožňuje NADH přímý přístup ke komplexu I a nezbytnost NADH dehydrogenáz je eliminována. Obr. 15 ukazuje, že v přítomnosti 1 mM fenforminu je oxidace rotenon-senzitivní, tedy mitochondriální NADH snížena stejnou měrou, jako oxidace glutamátu + malátu + ADP v intaktních mitochondriích. V obou uspořádáních $EC_{50, \text{fenformin}}$ odpovídala 0,25 mM. Na základě těchto výsledků usuzujeme, že hlavním místem působení fenforminu je komplex I.

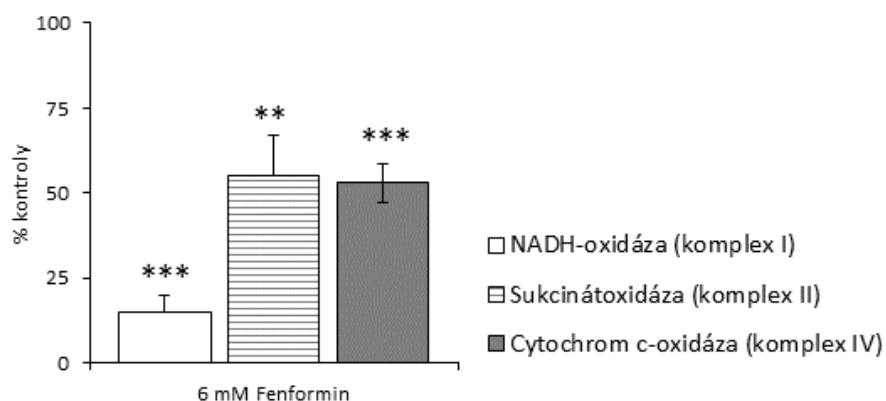


Obr. 15 Vliv fenforminu na rotenon-senzitivní NADH oxidaci v jaterních mitochondriích.

Izolované jaterní mitochondrie byly dezintegrovány opakovaným zamražením a rozmražením a inkubovány za přítomnosti 1 mM fenforminu, 100 μ M NADH a 2 μ M rotenonu. Graf reprezentuje typický výsledek tří nezávislých experimentů.

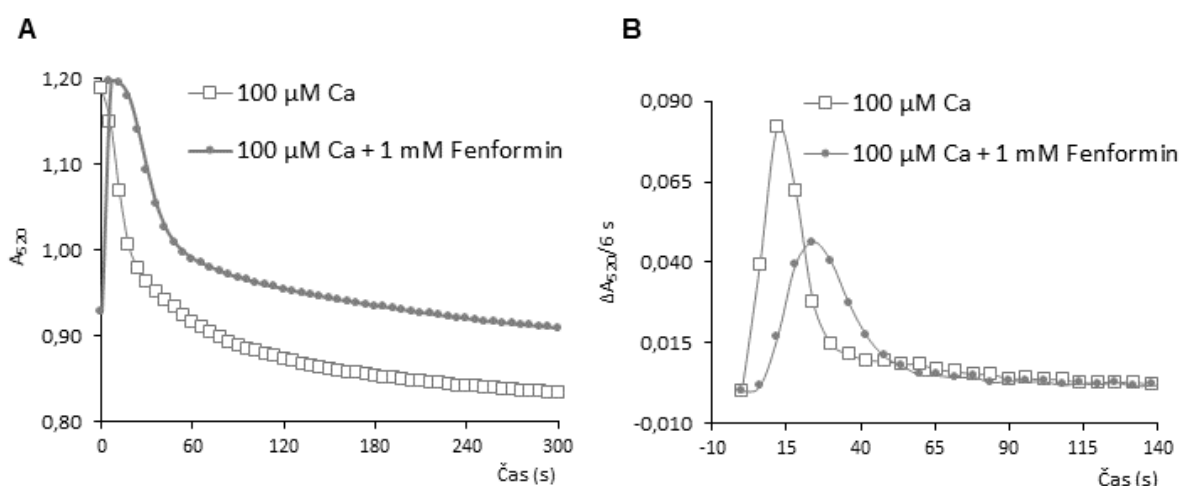
4.2.3. Fenformin ve vysokých koncentracích inhibuje nejen komplex I, ale také další enzymatické systémy respiračního řetězce

Jak bylo zmíněno dříve, metformin ani ve vysokých koncentracích neinhibuje komplex II (obr. 3), oproti tomu fenformin vykazuje částečný inhibiční efekt vůči komplexu II již při 1 mM koncentraci (obr. 12). Zajímalo nás, zda při zvýšení koncentrace fenforminu na 6 mM jsme schopni prokázat inhibiční efekt fenforminu na další enzymatické systémy respiračního řetězce, tj. sukcinát- a cytochrom c – oxidázu. Zjistili jsme, že při této koncentraci fenformin inhibuje nejenom komplex I, ale vykazuje signifikantní inhibiční vliv rovněž na komplex II a komplex IV (obr. 16). Z toho vyplývá, že biguanidy nevykazují striktní specifitu pouze ke komplexu I, ale v závislosti na chemickém složení a dávce mohou interagovat také s dalšími enzymatickými systémy elektronového transportního řetězce.



Obr. 16 Vliv fenforminu na oxidaci substrátů komplexu I, komplexu II a komplexu IV v izolovaných odpražených mitochondriích.

Účinek 6 mM fenforminu byl změřen v médiu obsahující 0,15 mM 2,4-dinitrofenol (DNP) a 0,02 mM cytochrom c. Data jsou vyjádřena jako průměr pěti nezávislých experimentů \pm SEM. ** $P < 0,01$ vs. kontrola, *** $P < 0,001$ vs. kontrola.



Obr. 17 Účinek fenforminu na intenzitu (A) a rychlost (B) vápníkem indukovaného bobtnání izolovaných mitochondrií.

Intenzita bobtnání byla vypočítána jako rozdíl optické hustoty na začátku a na konci každé periody měření. Maximální rychlost bobtnání byla vypočítána na základě derivace základní křivky a vyjádřena jako změna absorbance za 0,1 min. 2 μM cyklosporin A (CsA) byl použit jako pozitivní kontrola. Uvedené výsledky představují typický výsledek ze tří nezávislých měření.

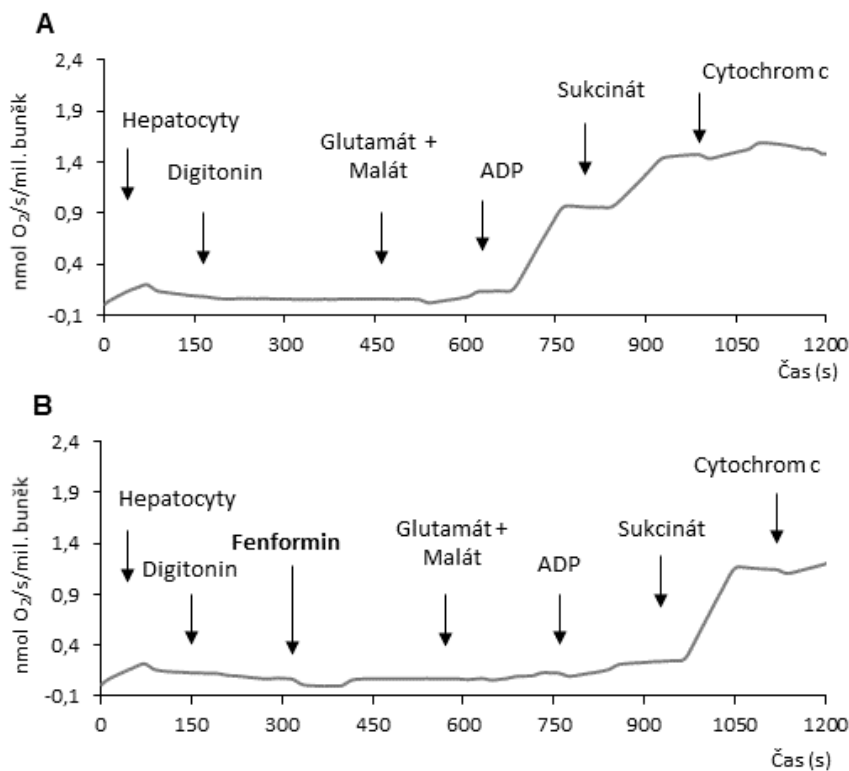
4.2.4. Fenformin zvyšuje odolnost MPTP k vápenatým kationtům

Jak jsme ukázali v předchozí části studie, 10 mM metformin efektivně snižuje citlivost MPTP k vápenatým iontům (obr. 9). Srovnatelné výsledky jsme zjistili i pro 1 mM fenformin. Obr. 17 ukazuje, že 1 mM fenformin snižuje rychlost bobtnání o 44 % (d $A_{520} / 6$ s z 0,0819 na 0,0462) a prodlužuje časový interval od přidání vápníku

do dosažení maximální rychlosti bobtnání o 100 % (z 12 s na 24 s). Na rozdíl od metforminu fenformin snižuje také intenzitu bobtnání vyjádřenou v procentech o 20 % (A_{520} z 0,36 na 0,29). Vliv fenforminu na MPTP je přímo úměrný použité koncentraci. Zjištěná data potvrzují, že kvalitativní vliv fenforminu a metforminu na MPTP je obdobný, ale fenformin je účinnější.

4.2.5. Fenformin inhibuje mitochondriální respiraci shodně na izolovaných mitochondriích a permeabilizovaných hepatocytech

V literatuře existují důkazy indikující, že funkce mitochondrií může být modifikována samotným procesem izolace, v důsledku destrukce mitochondriální sítě a narušení propojení mezi mitochondriemi a ostatními buněčnými strukturami (Kondrashova *et al.*, 2001, Kondrashova *et al.*, 2009). Rovněž panují různé názory ohledně působení biguanidů na intaktní buňky a izolované mitochondrie (El-Mir *et al.*, 2000). V naší studii jsme srovnávali působení fenforminu na izolované mitochondrie a permeabilizované hepatocyty. V tomto modelu zůstává mitochondriální síť neporušená a mitochondrie jsou v kontaktu s ostatními buněčnými organelami. Vliv fenforminu na křivku spotřeby kyslíku po přidání různých substrátů byl shodný u permeabilizovaných hepatocytů (obr. 18) a izolovaných mitochondrií. Fenformin o koncentraci 1 mM významně omezil oxidaci malátu + glutamátu + ADP. Inhibice elektronového respiračního řetězce byla částečně, nikoli úplně, obnovena až po přidání sukcinátu, tj. přes komplex II. Nepozorovali jsme statisticky významné zvýšení respirace po přidání cytochromu c, což potvrdilo, že hepatocytární mitochondrie nebyly poškozeny digitoninem. Naše výsledky prokazují, že za stejných experimentálních podmínek může být detekován inhibiční vliv fenforminu v jaterních hepatocytech, v homogenátu i na izolovaných mitochondriích.



Obr. 18 *Respirace hepatocytů permeabilizovaných digitoninem a inkubovaných bez fenforminu (A) a s 1 mM fenforminem (B).*

Hepatocyty ($2,5 \times 10^5$ buněk /ml) byly inkubovány v draselném médiu za přítomnosti digitoninu 0,03 mg/ml; glutamátu 10 mM; malátu 2,5 mM; ADP 1,5 mM; sukcinátu 10 mM a cytochromu c 0,02 mM. Grafy reprezentují typický výsledek tří nezávislých experimentů.

V této publikaci jsem se podílela na přípravě a experimentálních měřeních na oxygrafu, MMP a na vyhodnocování výsledků.

4.3. Publikace C

METFORMIN PREVENTS ISCHEMIA REPERFUSION-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN THE FATTY LIVER BY ATTENUATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES FORMATION (Cahova, M., E. Palenickova, H. Dankova, E. Sticova, M. Burian, Z. Drahota, Z. Cervinkova, O. Kucera, Ch. Gladkova, P. Stopka, J. Krizova, Z. Papackova, O. Oliyarnyk and L. Kazdova, 2015)

V předchozích studiích jsme prokázali, že metformin přidávaný k izolovaným mitochondriím *in vitro* efektivně inhibuje komplex I a snižuje mitochondriální respiraci. Účinná koncentrace metforminu *in vitro* se pohybovala v řádu mM, zatímco v séru jsme naměřili koncentraci 1000 x nižší. Zajímalo nás proto, zda se projevuje inhibiční vliv metforminu na aktivitu mitochondrií také po dlouhodobém podávání *in vivo* a zda jeho účinek závisí na druhu diety. Z tohoto důvodu jsme stanovili spotřebu kyslíku vzhledem k různým substrátům v jaterním homogenátu a v izolovaných mitochondriích zvířat krměných standardní nebo vysokotukovou dietou, kterým byl metformin podáván pouze *in vivo*. Dále jsme se zabývali antioxidačními účinky metforminu.

4.3.1. Metabolické parametry zvířat

Tabulka 2 a tabulka 3 ukazují vliv vysokotukové diety a podávání metforminu na vybrané metabolické parametry. V souladu s očekáváním podávání vysokotukové diety vedlo ke zvýšení sérových koncentrací neesterifikovaných mastných kyselin a obsahu β -hydroxybutyrátu. V játrech mělo za následek zvýšení obsahu Tg a snížení obsahu glykogenu. Metformin významně neovlivnil žádný z těchto parametrů, signifikantně však snížil váhový přírůstek potkanů krměných vysokotukovou dietou. Průměrná sérová koncentrace metforminu na standardní dietě dosahovala $6,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$, jeho sérová koncentrace na vysokotukové dietě byla $4,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$.

Tabulka 2 Sérové parametry potkanů Wistar

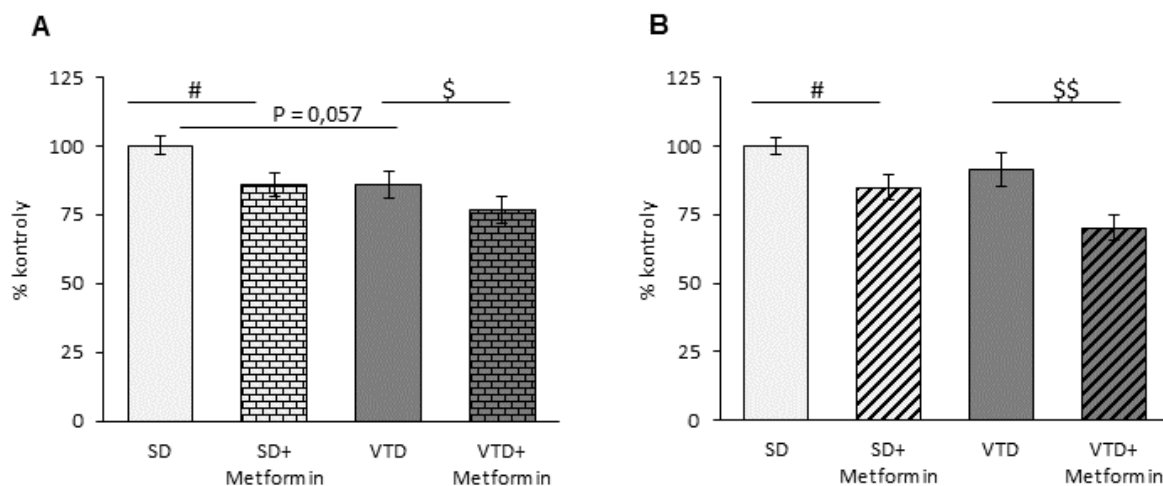
	SD	SD+ metformin	Statistická významnost	VTD	VTD+ metformin	Statistická významnost	St. význ. VTD vs. SD
Glykémie (mmol/l)	6,4 ± 0,10	6,2 ± 0,21	N. S.	6,1 ± 0,13	6,3 ± 0,11	N. S.	N. S.
Tg (mmol/l)	1,8 ± 0,09	1,8 ± 0,20	N. S.	1,4 ± 0,12	1,5 ± 0,21	N. S.	0,05
Cholesterol (mmol/l)	1,6 ± 0,11	1,4 ± 0,13	N. S.	1,5 ± 0,17	1,6 ± 0,10	N. S.	N. S.
NEMK (mmol/l)	0,8 ± 0,05	0,8 ± 0,04	N. S.	1,0 ± 0,05	0,9 ± 0,1	N. S.	0,01
β-OH butyrát (mmol/l)	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,01	N. S.	0,9 ± 0,02	1,0 ± 0,03	N. S.	0,001
Laktát (mmol/l)	3,5 ± 0,21	4,7 ± 0,31	0,05	5,9 ± 0,5	6,7 ± 0,30	N. S.	0,01

Tabulka 3 Hmotnost a obsah Tg a glykogenu v játrech potkanů Wistar

	SD	SD+ metformin	Statistická významnost	VTD	VTD+ metformin	Statistická významnost	St. význ. VTD vs. SD
Tělesná hmotnost (g)	482 ± 9	466 ± 12	N. S.	490 ± 7	437 ± 10	0,05	N. S.
Tg v játrech (μmol/g)	12 ± 1,3	9,1 ± 1,1	0,05	61 ± 11	54 ± 9	N. S.	0,001
Glykogen v játrech (μmol Glc/g)	280 ± 13	277 ± 20	N. S.	219 ± 28	185 ± 14	N. S.	0,01

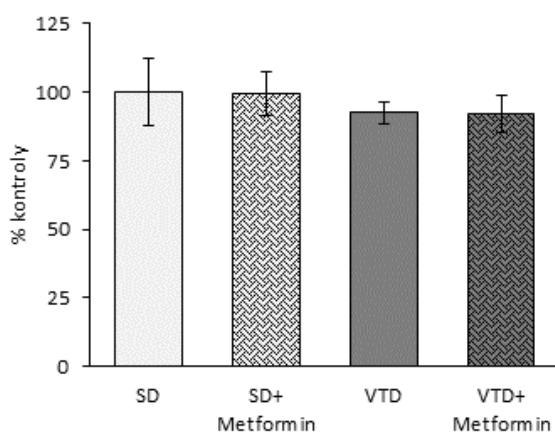
4.3.2. Metformin snižuje oxidaci NADH-dependentních substrátů v podmínkách *in vivo*

Naše měření prokázala, že jak vysokotuková dieta, tak metformin *in vivo*, snižují intenzitu maximální mitochondriální respirace plně (glutamát + malát) nebo částečně (Δ palmitoylkarnitin) NADH-dependentních substrátů v jaterním homogenátu (obr. 19 A, B). Dále jsme zjistili, že účinek metforminu a diety je aditivní. V souladu s výsledky získanými po přidání metforminu *in vitro* jsme nezjistili vliv metforminu na respiraci sukcinátu (obr. 20).



Obr. 19 Vliv dlouhodobě podávaného metforminu na oxidaci NADH-dependentních substrátů v jaterním homogenátu.

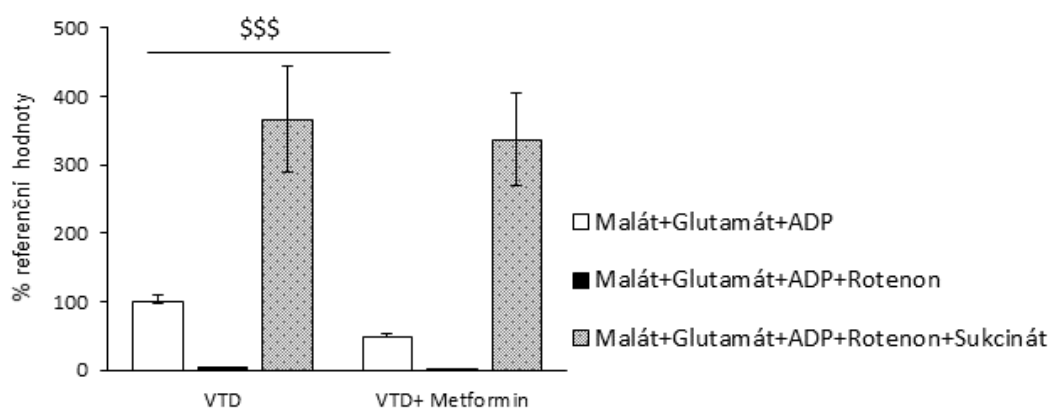
A: malát + glutamát + ADP; B: Δ palmitoylkarnitin. Respirace samotného palmitoylkarnitinu (Δ palmitoylkarnitin) byla vypočítána jako rozdíl ve spotřebě kyslíku za přítomnosti malátu + ADP po a před přidáním palmitoylkarnitinu. Absolutní hodnota kontroly SD: malát + glutamát + ADP 445 ± 15 pmol/s/mg proteinu, Δ palmitoylkarnitin 332 ± 11 pmol/s/mg proteinu. Měření byla prováděna na přístroji OROBOROS. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku (na SD bez metforminu) a představují průměr triplikátu ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. SD standardní dieta, VTD vysokotuková dieta. # $P > 0,05$ SD + metformin vs. kontrola (SD), § $P > 0,05$ VTD + metformin vs. VTD, §§ $P > 0,01$ VTD + metformin vs. VTD.



Obr. 20 Vliv dlouhodobě podávaného metforminu na oxidaci sukcinátu v jaterním homogenátu.

Respirace samotného sukcinátu (Δ sukcinát) byla vypočítána jako rozdíl ve spotřebě kyslíku za přítomnosti malátu + ADP po a před přidáním sukcinátu. Absolutní hodnota kontroly SD: Δ sukcinát 204 ± 25 pmol/s/mg proteinu. Měření byla prováděna na přístroji OROBOROS. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku v kontrolním vzorku (na SD bez metforminu) a představují průměr triplikátu ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. SD standardní dieta, VTD vysokotuková dieta.

Výsledky získané měřením Clarkovou elektrodou v jaterním homogenátu jsme ověřili na izolovaných mitochondriích pomocí přístroje Seahorse. I touto metodou jsme prokázali významný inhibiční vliv metforminu na oxidaci NADH-dependentních substrátů ve „stavu 3“ a nulový vliv na oxidaci FADH₂-dependentního substrátu sukcinátu (obr. 21).



Obr. 21 Vliv dlouhodobě podávaného metforminu na oxidaci substrátů v izolovaných mitochondriích.

Absolutní hodnota kontroly VTD: malát + glutamát + ADP $16,9 \pm 1,8$ pmol/min/mg proteinu; malát + glutamát + ADP + rotenon $0,6 \pm 0,1$ pmol/min/mg proteinu; malát + glutamát + ADP + rotenon + sukcinát 62 ± 13 pmol/min/mg proteinu. Měření byla prováděna na přístroji XF24 analyzeru. Data jsou vyjádřena jako procento spotřeby kyslíku ve vzorku (na VTD bez metforminu) a představují průměr tetraplikátu z pěti nezávislých experimentů \pm SEM. VTD vysokotuková dieta. $^{\$ \$ \$}$ $P > 0,001$ VTD + metformin vs. VTD.

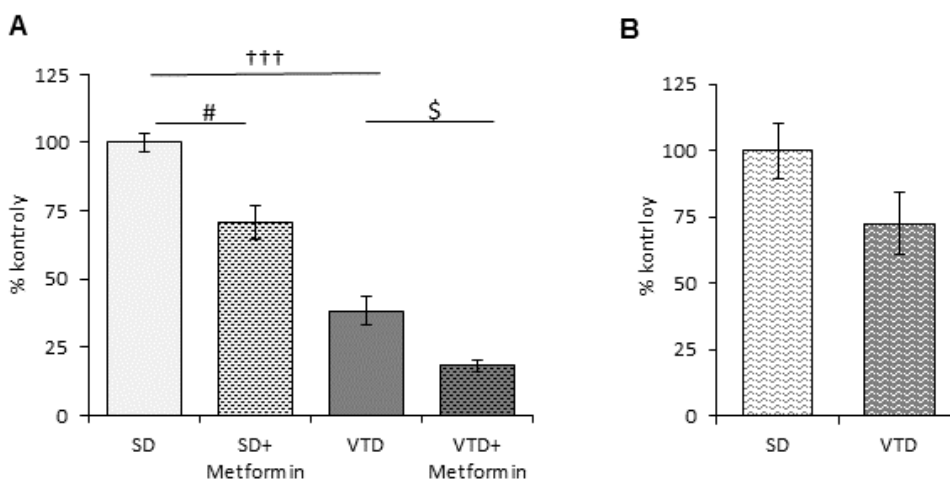
Předložené výsledky potvrzují, že metformin snižuje buněčné dýchání nejenom ve vysokých koncentracích *in vitro*, ale také v mnohem nižších koncentracích po podání *in vivo*.

4.3.3. Účinek metforminu a diety snižuje aktivitu mitochondriálních enzymů

Výsledky získané v jaterním homogenátu a na izolovaných mitochondriích jsme ověřili stanovením aktivit některých mitochondriálních enzymů. NADH: cytochrom c oxidoreduktáza senzitivní k rotenonu slouží jako marker vnitřní mitochondriální membrány a reflektuje aktivitu komplexů I + III mitochondriálního respiračního řetězce.

Aktivita tohoto enzymu byla snížena jak v důsledku podávání samotné vysokotukové diety, tak v důsledku aplikace metforminu. Působením obou faktorů došlo k aditivnímu poklesu (obr. 22 A). Závěrem lze říci, že měření aktivit izolovaných mitochondriálních enzymů potvrdila údaje získané na celých mitochondriích.

Citrátsyntáza se vyskytuje výlučně v mitochondriální matrix a poskytuje informace o množství mitochondrií. Stanovením aktivity tohoto enzymu jsme chtěli ověřit, zda má dieta s vysokým obsahem sádla vliv také na množství mitochondrií. Vlivem vysokotukové diety byla aktivita citrátsyntázy snížena o 30 % ve srovnání s kontrolou na standardní dietě (obr. 22 B).



Obr. 22 Vliv dlouhodobě podávaného metforminu na aktivitu mitochondriálních enzymů.

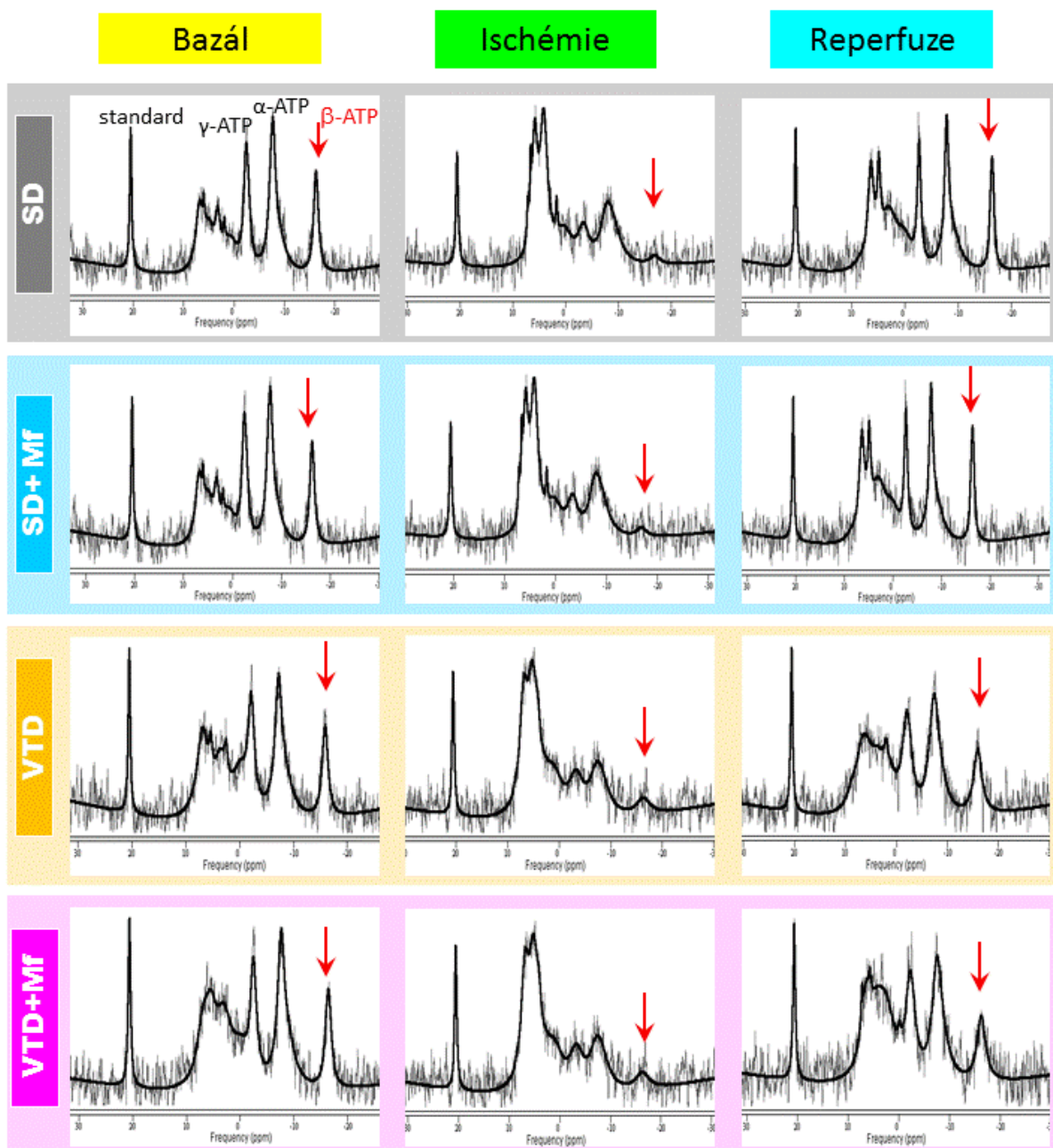
A: NADH: cytochrom c oxidoreduktáza v izolovaných mitochondriích; B: citrátsyntáza v homogenátu. Absolutní hodnota kontroly SD: NADH: cytochrom c oxidoreduktáza 316 ± 10 nmol cytochromu *c*/min/mg proteinu, citrátsyntáza $16 \pm 1,7$ nmol CoA/min/mg proteinu. Data jsou vyjádřena jako procento aktivity kontrolního vzorku (SD bez metforminu) a představují průměr triplicátu ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. # $P > 0,05$ SD + metformin vs. SD (kontrola), \$\$\$ $P > 0,001$ VTD vs. SD (kontrola), \$ $P > 0,05$ VTD + metformin vs. VTD. SD standardní dieta, VTD vysokotuková dieta, CoA koenzym A.

4.3.4. Metformin zpomaluje ATP replaci v játrech *in vivo*

ATP replace je proces opětovného obnovení zásob ATP, které byly vyčerpány v důsledku určitého procesu (např. při ischemii). Pokud platí náš předpoklad, že metformin částečně inhibuje mitochondriální respirační řetězec, lze předpokládat také ovlivnění rychlosti replace ATP. Abychom tuto hypotézu ověřili, změřili jsme rychlost resyntézy ATP v játrech *in vivo* metodou ^{31}P NMR spektroskopie po krátkodobé

ischemii u potkanů, jimž byl metformin podáván ve standardní nebo vysokotukové dietě.

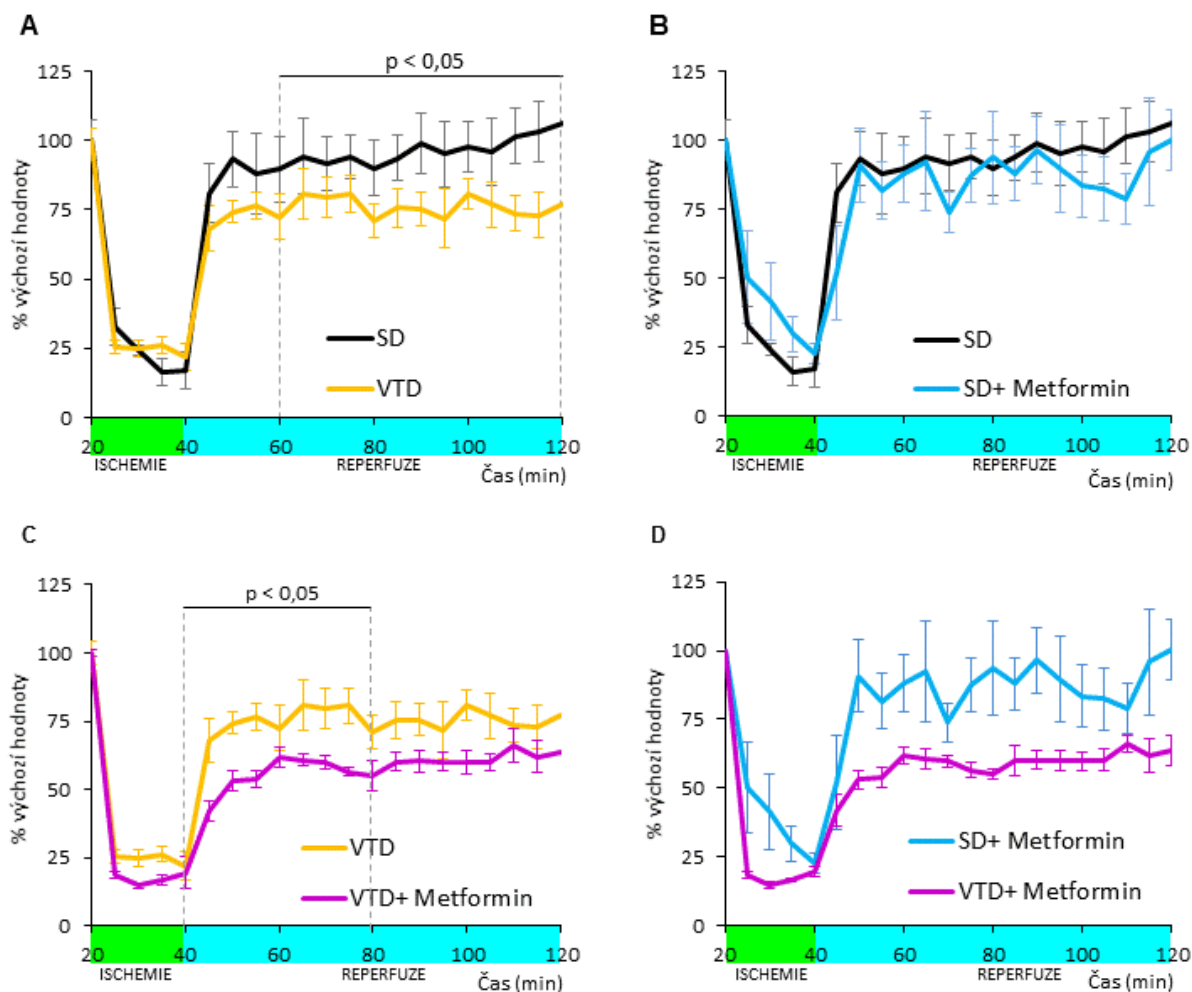
U všech experimentálních skupin jsme sledovali obsah ATP během tří různých fyziologických situací: před ischemií (bazální hodnota, ke které jsme vztahovali výsledky získané v dalších fázích experimentu), během ischemie a během následné reperfuze (80 min), viz Materiál a metody.



Obr. 23 Primární spektra v bazální, ischemické a reperfuční fázi.

Červená šipka označuje pozici β -fosfátového piku, ten jediný reflektuje molekulu ATP. Tento obrázek reprezentuje typický výsledek spekter 4 nezávislých experimentů. SD standardní dieta; SD + Mf standardní dieta s metforminem; VTD vysokotuková dieta; VTD + Mf vysokotuková dieta s metforminem.

Omezení přívodu krve do jater vedlo k rychlému poklesu hladin ATP u všech sledovaných skupin. Po obnovení krevního zásobení během reperfuze došlo ve skupině krmené standardní dietou k vyrovnání hladiny ATP na úroveň bazální hladiny, a to během prvních 15 min od navrácení krevního oběhu. Typický průběh spekter je znázorněn na obr. 23.



Obr. 24 Vliv diety a dlouhodobě podávaného metforminu na replaci ATP během reperfuze fáze.

Data jsou vyjádřena jako procento bazální hladiny ATP v játrech potkanů na standardní dietě bez metforminu a představují průměr 18 spekter ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. SD standardní dieta; SD + Mf standardní dieta s metforminem; VTD vysokotuková dieta; VTD + Mf vysokotuková dieta s metforminem.

Ve skupině krmené vysokotukovou dietou jsme nepozorovali rozdíl v rychlosti resyntézy ATP ve srovnání se standardní skupinou, ale zásoby ATP byly obnoveny pouze do úrovně 80 % bazálního stavu (obr. 24 A). Průběh resyntézy ATP se mezi skupinami na standardní dietě a vysokotukové dietě statisticky významně lišil

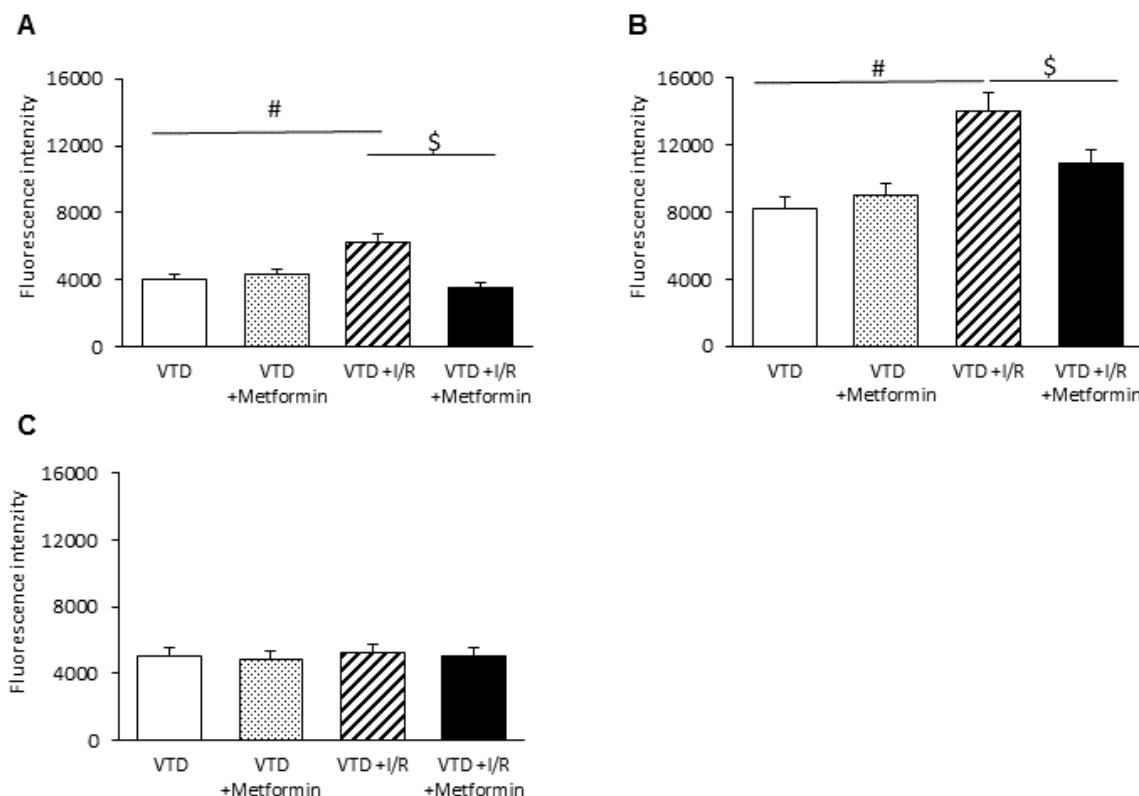
od 60 min do 120 min experimentu. Podávání metforminu neovlivnilo průběh resyntézy ATP v kombinaci se standardní dietou (obr. 24 B), ale významně potencovalo účinky vysokotukové diety (obr. 24 C). Na konci reperfuze dosáhla hladina ATP ve skupině krmené vysokotukovou dietou a metforminem pouze 60 % bazální hodnoty a rychlost resyntézy, tj. sklon křivky, byl významně odlišný ve srovnání se sklonem křivek ostatních skupin (obr. 24 D). Naše pozorování potvrdila, že předpokládaná inhibice respiračního řetězce metforminem se funkčně projevuje v pomalejší a méně efektivní obnově hladin ATP v důsledku prodělané ischemie.

4.3.5. Metformin snižuje tvorbu reaktivních forem kyslíku

Transport elektronů mitochondriálním respiračním řetězcem je vždy spojen s rizikem vzniku ROS (reaktivních forem kyslíku). Toto riziko se významně zvyšuje ve fázi reoxygenace, tj. ve fázi reperfuze, která následuje po ischemii. Ve studiích *in vitro* byly identifikovány tři potenciální místa možného antioxidantního působení metforminu: přímý tok elektronů komplexem I, reverzní elektronový tok z komplexu II na komplex I a přenos elektronů prostřednictvím mitochondriální glycerol-3-fosfátdehydrogenázy na komplex II (Kushnareva *et al.*, 2002, Kudin *et al.*, 2004, Matsuzaki and Humphries, 2015). Za podmínek *in vitro* utilizace NADH jako výhradního zdroje elektronů stimuluje přímý transport elektronů po spádu elektrochemického gradientu, zatímco využití sukcinátu v nepřítomnosti NADH potencuje jeho reverzní tok elektronů. V této studii jsme sledovali kombinovaný účinek vysokotukové diety, ischemie/reperfuze a metforminu na produkci ROS v submitochondriálních partikulích.

V první sérii experimentů jsme využili fluorescenční sondu DCFDA (2',7'-dichlorofluorescindiacetát) a sledovali jsme tvorbu ROS na modelu submitochondriálních partikulí po přidání tří různých substrátů: NADH, sukcinátu a glycerol-3-fosfátu (Obr. 25). Submitochondriální partikule připravené z mitochondrií zvířat vystavených ischemii/reperfuzi produkovaly ve srovnání s kontrolami významně větší množství ROS (sukcinát >> NADH). Pokud byl zvířatům před navozením ischemie/reperfuze dlouhodobě podáván metformin, následná

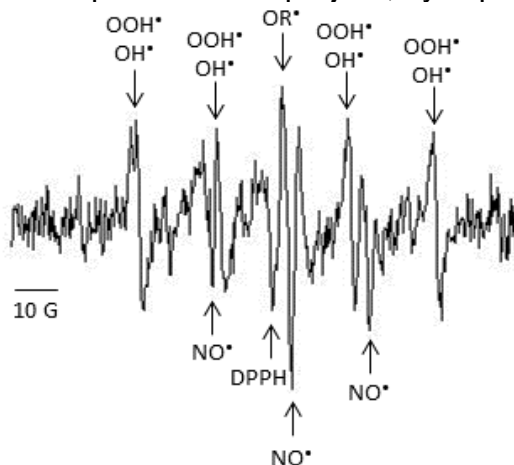
produkce ROS byla u obou substrátů významně nižší. Efekt metforminu se neprojevil u zvířat, která nebyla vystavena ischemii/reperfuzi. Efekt metforminu ani



Obr. 25 Tvorba ROS v submitochondriálních partikulích.

A: 10 mM NADH, B: 10 mM sukcinátu, C: 10 mM glycerol-3-fosfátu. Tvorba ROS byla měřena pomocí fluorescenční sondy DCFDA (10 μ M). Uvedené hodnoty představují arbitrární jednotky intenzity fluorescence a jsou normalizovány na 1 mg mitochondriálního proteinu. Data představují průměr pěti nezávislých experimentů \pm SEM. DCFDA 2,4-dichlorofluorescindiacetát.

ischemie/reperfuzi se neprojevil, byl-li použit jako substrát glycerol-3-fosfát.



Obr. 26 Typické EPR spektrum získané po přidání 10 mM NADH k suspenzi submitochondriálních partikulí a DMPO.

Adukty DMPO byly identifikovány podle hodnoty g faktoru, jako interní kontrolu jsme použili DPPH ($g = 2,0036$). OOH \cdot and OH \cdot radikály byly rozlišeny pomocí detailní analýzy překrývajících se OOH \cdot and OH \cdot signálů. OR \cdot volný organický radikál; NO \cdot nitroxylový radikál; OOH \cdot superoxidový radikál; OH \cdot hydroxylový radikál; DPPH 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl; DMPO 2,2-dimetyl-3,4-dihydropyrol-1-oxid;

EPR spektroskopie (elektronová paramagnetická rezonance) je jediná metoda, která dokáže přímo detekovat a identifikovat jednotlivé typy volných radikálů. My jsme tuto metodu využili pro detekci a identifikaci jednotlivých typů ROS vznikajících v submitochondriálních partikulích při použití NADH jako substrátu. Na obr. 26 jsou vyznačeny typy volných radikálů, které jsme detekovali jako adukty DMPO (2,2-dimetyl-3,4-dihydropyrol-1-oxid). Těmito sloučeninami jsou: OR· (organický volný radikál) v podobě symetrického singletového signálu; NO· (nitroxylový radikál) v tripletovém spektru 1:1:1; OOH· (superoxidový radikál) a OH· (hydroxylový radikál) v kvartetovém spektru 1:1:1:1 a 1:2:2:1. Intenzity jednotlivých signálů byly kvantifikovány ke standardům Mn²⁺/ ZnS a Cr³⁺/ MgO. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4. U zvířat, která podstoupila ischemii/reperfuzi, jsme prokázali zvýšenou tvorbu hydroxylového radikálu ve srovnání s kontrolami. Stejný trend jsme pozorovali i v případě superoxidového radikálu, i když rozdíl nedosáhl statistické významnosti (p = 0,061). Dlouhodobé podávání metforminu nemělo žádný efekt u kontrol, ale zcela eliminovalo zvýšenou tvorbu OOH· a OH· indukovanou ischemií/reperfuzí.

Tabulka 4 Souhrn naměřených ROS v submitochondriálních partikulích

	VTD	VTD +Metformin	VTD +I/R	VTD +I/R +Metformin
<i>Organický radikál</i>	7,9 ± 1,10	7,9 ± 00,3	7,6 ± 0,80	6,9 ± 0,30
<i>Nitroxylový radikál</i>	3,8 ± 0,80	4,1 ± 0,20	4,3 ± 0,50	4,2 ± 0,60
<i>Superoxidový radikál</i>	4,1 ± 0,20	4,0 ± 0,25	5,1 ± 0,30 [#]	3,3 ± 0,40 [§]
<i>Hydroxylový radikál</i>	1,2 ± 0,03	1,1 ± 0,10	1,7 ± 0,20 [#]	1,2 ± 0,05 [§]

V rámci této publikace jsem provedla experimentální měření (oxygrafu, ³¹P NMR, spektrofotometru, fluorimetru) a podílela se na vyhodnocování výsledků a přípravě publikací. Měření na XF 24 analyzáru Seahorse jsem prováděla pod vedením RNDr. Moniky Cahové PhD., pro EPR měření jsem připravovala biologický materiál a vzorky, které v Ústavu anorganické chemie AV v.v.i. v Řeži změřil a vyhodnotil ing. Petr Stopka CSc.

5. DISKUZE

5.1. Vhodnost různých buněčných a sub-buněčných modelů pro studium účinků biguanidů *in vitro*

Inhibiční vliv metforminu byl studován na různých buněčných a sub-buněčných modelech s rozporuplnými výsledky. Skupina dr. Halestrapa (Owen *et al.*, 2000) přinesla důkazy, že metformin i fenformin inhibují respiraci NADH-dependentních substrátů (malátu a glutamátu) v permeabilizovaných hepatocytech, izolovaných mitochondriích i submitochondriálních partikulích. Míra inhibice byla závislá jednak na koncentraci konkrétního biguanidu, jednak na době (pre)inkubace testovaného modelu s metforminem/ fenforminem. U permeabilizovaných hepatocytů bylo dosaženo 30 % inhibice již s 50 μ M koncentrací metforminu, a to po 60 h inkubaci. U izolovaných mitochondrií bylo nutné použít významně vyšší koncentrace (10 mM). Po šestihodinové inkubaci s metforminem bylo možné dosáhnout až 70 % inhibice buněčné respirace. V přímém rozporu s těmito výsledky je studie skupiny prof. Leverage (El-Mir *et al.*, 2000). Její autoři prokázali koncentračně a časově závislý inhibiční účinek metforminu na respiraci NADH-dependentních substrátů u intaktních hepatocytů, ale nulový efekt metforminu na permeabilizované hepatocyty a izolované mitochondrie. Zásadní rozdíl mezi oběma studiemi je v délce a uspořádání experimentu. Ve studii Owena *et al.* byly permeabilizované hepatocyty inkubovány v bezprostřední přítomnosti metforminu až 60 h a izolované mitochondrie až 6 h (Owen *et al.*, 2000). V práci El-Mir *et al.* byl metformin buď podán *in vivo* intravenózně 30 min před zabitím zvířat a izolací mitochondrií nebo byly mitochondrie připraveny z jater perfundovaných 30 min roztokem 10 mM metforminu (El-Mir *et al.*, 2000). Metformin nebyl přímo přidáván k mitochondriím v průběhu měření respirace. Je pravděpodobné, že třicetiminutová expozice byť i vysokým koncentracím metforminu nebyla dostatečná k akumulaci účinné koncentrace metforminu v mitochondriích. V našem uspořádání jsme byli schopni prokázat inhibiční vliv bezprostředně přidaného metforminu na respiraci NADH-dependentních substrátů jak v izolovaných mitochondriích, tak i v jaterním homogenátu. Podmínkou prokazatelného inhibičního účinku metforminu bylo použití relativně vysokých koncentrací (izolované mitochondrie: $EC_{50} = 5$ mM; jaterní homogenát $EC_{50} = 10$ mM). Naopak jsme ani po dvouhodinové preinkubaci

jaterního homogenátu v přítomnosti sub-efektivní koncentrace metforminu nezjistili jeho inhibiční působení na respiraci. Naše výsledky tak v souladu s výsledky Owense ukazují, že účinek metforminu je úměrný nejen dávce, ale i době působení. Naopak, intaktní buňky nejsou potřeba pro vyjádření přímého účinku metforminu.

Novým aspektem naší práce je využití 10 % jaterního homogenátu jako experimentálního modelu. Prokázali jsme, že homogenát připravený z jater potkana reaguje na metformin srovnatelně s izolovanými mitochondriemi, a to jak při měření NADH-dependentní oxidace substrátů, tak při měření respirační kontroly. Nevýhodou homogenátu oproti izolovaným mitochondriím je jeho nižší citlivost. Naproti tomu omezení spojená s přípravou izolovaných mitochondrií, např. vyšší riziko mitochondriálního poškození a vyšší časová náročnost, v konečném důsledku omezují celkovou dobu experimentu.

Naše výsledky ukazují, že jaterní homogenát představuje velmi užitečný systém pro hodnocení inhibičního účinku metforminu na mitochondriální funkci.

5.2. Účinná koncentrace metforminu *in vitro* a *in vivo*

Studium mechanismu působení metforminu se dlouhodobě potýká s problémem rozdílných účinných koncentrací *in vitro* a *in vivo*. Stejně jako jiní autoři jsme byli schopni prokázat přímý efekt metforminu na izolované mitochondrie pouze v mM koncentracích (Brunmair *et al.*, 2004, Zakikhani *et al.*, 2006). Pokud byl metformin podáván potkanům v dávce 300 mg/kg/den *per os*, jeho koncentrace v séru se pohybovala v rozmezí pouze 3,4 - 10,7 μM , což je v souladu s dříve publikovanými údaji (Wiernsperger and Bailey, 1999). Dávka běžně aplikovaná hlodavcům, 50 - 500 mg/kg/den (Wilcock and Bailey, 1994, Wiernsperger and Bailey, 1999, Foretz *et al.*, 2014, Madiraju *et al.*, 2014) i optimální dávka pro člověka, tj. 1,5 - 2 g/den vede ke srovnatelným sérovým koncentracím, které se pohybují v řádech desítek μM (Klip and Leiter, 1990, Foretz *et al.*, 2010). Tisícinásobný rozdíl mezi dávkou, která je potřebná k dosažení účinku *in vitro*, a koncentrací přítomnou v séru laboratorních zvířat a pacientů nutně vzbuzuje pochybnosti, zda jsou experimentální data získaná *in vitro* relevantní i ve fyziologické situaci *in vivo*.

S cílem ověřit vliv metforminu aplikovaného *in vivo* na mitochondriální respiraci a energetický metabolismus buňky jsme ve studii podávali pokusným potkanům metformin *per os* (300 mg/kg/den) po dobu 10 týdnů a následně měřili respiraci izolovaných mitochondrií. Toto uspořádání zajistilo, že mitochondrie byly vystaveny pouze fyziologickým koncentracím metforminu. Inhibiční vliv metforminu *in vivo* jsme potvrdili několika nezávislými přístupy. Přímé měření na izolovaných mitochondriích ukázalo, že metformin aplikovaný *in vivo* snižuje respiraci NADH úplně (glutamát + malát) i částečně NADH-dependentních substrátů (palmitoylkarnitin). V souladu s výsledky získanými *in vitro* jsme nepozorovali žádný vliv metforminu na oxidaci FADH₂-dependentního substrátu sukcinátu. Nezávisle jsme prokázali i inhibiční vliv metforminu aplikovaného *in vivo* na aktivitu NADH:cytochrom c oxidoreduktázy.

Výše uvedená pozorování podporují hypotézu, že metformin podávaný *in vivo* snižuje mitochondriální respiraci. Pokud tento předpoklad platí, měl by metformin ovlivňovat i ATP syntézu a energetický náboj buňky. Literární údaje nejsou v tomto směru jednotné. Foretz *et al.* považuje za zásadní efekt metforminu pokles obsahu ATP v buňce a nedostatek energie pro energeticky náročné děje, jako je např. glukoneogeneze (Foretz *et al.*, 2010). Jeho hypotéza je podložena znatelným poklesem poměru ATP/ADP jak v cytozolu, tak v mitochondriálních kompartmentech, který byl prokázán i v pracích dalších autorů. (Argaud *et al.*, 1993, El-Mir *et al.*, 2000, Owen *et al.*, 2000).

Vzhledem k technickým komplikacím spojeným s měřením absolutního množství adeninnukleotidů ve tkáni, zejména kvůli extrémně rychlému rozpadu ATP a nízkým koncentracím AMP, jsme se rozhodli v játrech sledovat rychlost resyntézy ATP po úplné depleci „v reálném čase“ pomocí ³¹P-NMR spektroskopie. U zvířat, jimž byl podáván metformin, jsme prokázali, že replece ATP probíhá pomaleji a nedosáhne výchozích hodnot. Naše předchozí výsledky (publikace A) potvrzují, že metformin nefunguje jako rozpojovač, a proto lze důvodně předpokládat, že snížená tvorba ATP je důsledkem menšího výkonu mitochondriálního respiračního řetězce.

Všechna tato zjištění podporují předpoklad, že alespoň jedním z cílů metforminu v buňce je mitochondriální respirace, konkrétně komplex I. Pro pozorovaný rozpor v podmínkách *in vitro* a *in vivo* existuje několik možných vysvětlení. Játra jsou zásobena krví přednostně z *vena portae*, ve které byly prokázány po perorálním

podání vyšší koncentrace metforminu (0,5 mM), než v celkovém oběhu (Wilcock and Bailey, 1994). Dále je metformin specificky vychytáván v játrech a ledvinách, kam je přenášen pomocí OCT1 (Pawlyk *et al.*, 2014, Pernicova and Korbonits, 2014). Kromě toho řada důkazů naznačuje, že metformin je díky svému pozitivnímu náboji aktivně zadržován v matrix mitochondrií s vysokým membránovým potenciálem. Odhad stupně obohacení mitochondriální matrix ve srovnání se sérovými koncentracemi metforminu se pohybuje v rozmezí 100 x (Bridges *et al.*, 2014) až 1000 x (Schulz and Schmoldt, 2003), což odpovídá zhruba 1 – 10 mM metforminu a tedy 20 - 80 % inhibici respirace NADH-dependentních substrátů

Ve světle těchto teorií je překvapující skutečnost, že jsme neprokázali efekt preinkubace izolovaných mitochondrií s metforminem *in vitro*. Inhibiční účinek nízkých koncentrací metforminu na mitochondriální respiraci se neprojevil ani po dvou hodinách preinkubace. V našich podmínkách nebylo možné zvolit dobu delší než 120 min, protože pak by již docházelo k výraznému snížení funkce mitochondrií. Je možné, že tato doba nebyla pro akumulaci inhibiční koncentrace metforminu dostačující, což je v souladu se závěry publikovanými El-Mirem a Owenem.

5.3. Specifita působení biguanidů

Na přelomu tisíciletí byly publikovány práce, které identifikovaly mitochondriální komplex I jako hlavní cíl metforminu a dalších biguanidů, alespoň co se týče jejich vlivu na energetický metabolismus buněk (El-Mir *et al.*, 2000, Owen *et al.*, 2000). Účinek biguanidů na další komplexy mitochondriálního respiračního řetězce zůstává sporný. Naše výsledky ukazují, že metformin inhibuje pouze komplex I, a to i v případě použití dávky až 20 mM. U fenforminu, který je přibližně 10 x účinnější než metformin, jsme při koncentraci 6 mM prokázali také částečnou inhibici komplexu II a komplexu IV. Z těchto zjištění vyplývá, že zatímco metformin má striktně specifický účinek na komplex I, fenformin má širší specifitu a díky svému silnějšímu účinku inhibuje také další složky řetězce. Vyšší účinnost fenforminu může souviset s vysokou afinitou k mitochondriální membráně v důsledku méně polární a více lipofilní struktury (Pernicova and Korbonits, 2014). Účinky metforminu by bylo možné vysvětlit jeho slabou a především reverzibilní vazbou na komplex I. Relativně slabá interakce

metforminu s komplexem I („fast and weak“) v kombinaci s akumulací uvnitř mitochondrie v důsledku pozitivního náboje na mitochondriální membráně umožňuje rychle reagovat na metabolické potřeby buňky. Pokud dojde k poklesu membránového potenciálu, metformin může být vyloučen z mitochondriální matrix, jeho intramitochondriální koncentrace poklesne pod účinnou hodnotu a intenzita respirace je obnovena. Tato hypotéza je v souladu s rozdílnými klinickými vlastnostmi obou hlavních biguanidů – zatímco metformin jen zřídka způsobuje laktátovou acidózu (důsledek příliš silné inhibice mitochondriální respirace), u fenforminu je tato komplikace poměrně častá (Bridges *et al.*, 2014).

5.4. Působení metforminu v srdci a v játrech

Metformin je považován za primární prevenci ischemické choroby srdeční. Jeho blahodárný vliv byl prokázán na kardiomyocytech. Metformin pomáhá srdečním buňkám lépe se adaptovat na ischemii/reperfuzi, jeho vlivem dochází k poklesu kardiomyocytární apoptózy, vykazuje ochranný účinek vůči srdečnímu selhání (Viollet *et al.*, 2012). Protektivní účinek metforminu byl mnohokrát zopakován v klinických a epidemiologických studiích (1998, Johnson *et al.*, 2002, Johnson *et al.*, 2005).

Z námi naměřených výsledků vyplývá, že metformin v játrech a srdci vykazuje jiný mechanismus účinku. V játrech metformin inhibuje mitochondriální respiraci již v koncentraci 2,5 – 5 mM, je patrná jeho inhibiční závislost na dávce. Abychom naměřili inhibiční účinek metforminu v srdci, bylo nutné zvýšit akutní dávku metforminu. Signifikantní inhibice oxidace NADH-dependentních substrátů byla prokázána až při koncentraci 20 mM. Ani toho navýšení dávky nebylo dostačující pro patrnou inhibici FADH₂-dependentní substrát.

Tyto meziorganové rozdíly v působení metforminu by si zasluhovaly intenzivnější studium. Protože však naše práce byla primárně zacílená na mechanismus metforminu v játrech, nepokračovali jsme v podrobnějším studiu účinku metforminu v srdci.

5.5. Vliv metforminu na *mitochondrial permeability transition pore*

Naše pozorování i výsledky jiných autorů ukazují, že biguanidy ovlivňují MPTP a zvyšují jeho odolnost k vápenatým iontům (Guigas *et al.*, 2004, Demaille *et al.*, 2005). V naší práci jsme se zaměřili na přesnou kvantifikaci odolnosti MPTP k vápníku. Stanovení bobtnání mitochondrií metodou turbidimetrie, při které je měřen pokles absorbance suspenze mitochondrií v čase, je poměrně užívaná technika. Z výsledků, které jsou ve formě křivek, lze sice odvodit rozdíly v rychlosti a rozsahu bobtnání, avšak jen velmi obtížně můžeme získat přesné údaje o kinetice reakcí. Pro naše potřeby jsme tuto metodu modifikovali ve spolupráci s Lékařskou fakultou v Hradci Králové a Fyziologického ústavu A.V. v.v.i. v Praze. Intenzita bobtnání, tj. rozdíl optické hustoty na začátku a na konci časové periody, je běžným parametrem měření. Díky derivaci primárních dat jsme získali další dva nové parametry. Mohli jsme hodnotit také maximální rychlost bobtnání a čas, při kterém maximální rychlost nastala (Drahota *et al.*, 2012).

Naše výsledky potvrzují teorii, že oba biguanidy zvyšují odolnost MPTP k působení vápníku. Čím vyšší je jejich koncentrace, tím více se prodlužuje čas potřebný pro dosažení maximální rychlosti bobtnání. Kvalitativní vliv fenforminu a metforminu na MPTP je obdobný, ovšem účinek fenforminu je výrazně silnější.

5.6. Metformin a tvorba volných radikálů

Naše výsledky ukazují, že dlouhodobé podávání metforminu chrání játra před akutním oxidačním stresem navozeným ischemií/reperfuzí (Publikace C). Mechanismus antioxidačního působení metforminu však dosud není zcela objasněn. Stupeň oxidačního stresu je výsledkem rychlosti tvorby ROS a aktivity antioxidačních mechanismů. Předchozí práce ukázaly, že metformin nereaguje se superoxidovým radikálem a pravděpodobně nepůsobí jako jeho „lapač volných radikálů“ (Pavlović *et al.*, 2000, Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003, Khouri *et al.*, 2004). U některých modelů byl antioxidační účinek metforminu připisován jeho primárnímu hypoglykemickému efektu, ale v naší studii vysokotuková dieta nevyvolala u potkanů hyperglykemii, a proto tento mechanismus nepřipadá v úvahu. Pomocí přímého měření produkce ROS

dvěma nezávislými metodami, fluorescenční a EPR, jsme ukázali, že metformin významně snižuje kapacitu mitochondrií produkovat ROS. Existuje několik mechanismů, které se v játrech mohou podílet na tvorbě ROS v reperfuzní fázi. Jedná se o systém: xantin/ xantin oxidázy, cytozolické NADPH oxidázy a systém elektronového transportního řetězce mitochondrií. NADPH oxidáza je aktivní zejména v makrofázích a je spojena s akutními zánětlivými stavy. Dřívější práce založené hlavně na využití selektivních inhibitorů identifikovaly jako hlavní zdroj ROS v hepatocytech xantin oxidázový systém (Adkison *et al.*, 1986). Později však bylo zjištěno, že použité inhibitory blokují rovněž enzymy mitochondriálního respiračního řetězce. Mitochondrie jsou v současnosti považovány za významný zdroj ROS v jaterních buňkách (Jaeschke and Mitchell, 1989). Odhad skutečného podílu mitochondrií na celkové produkci ROS je nesnadný, protože závisí na konkrétní fyziologické situaci, např. na podílu mitochondrií v klidovém stavu (vysoká produkce ROS), na podílu mitochondrií ve stavu maximální respirace a oxidační fosforylace (téměř nulová produkce ROS) a na aktuálních podmínkách podporujících reverzní tok elektronů. V játrech akutně vystavených intoxikaci alkoholem, ve kterých je zesílená nemitochondriální produkce ROS systémem CYP2E1, je podíl mitochondriální tvorby ROS odhadován na 22 – 46 % (Jezek and Hlavatá, 2005). Za ischemických nebo hypoxických podmínek, kde se podíl nefosforylujících mitochondrií významně zvyšuje a je stimulován reverzní tok elektronů, lze předpokládat, že podíl mitochondrií na tvorbě ROS bude významně vyšší.

V mitochondriálním respiračním řetězci bylo identifikováno několik míst, kde může docházet k nekanonickému přenosu elektronu na kyslík a vzniku radikálu. Jedná se zejména o komplex I (Kushnareva *et al.*, 2002) a komplex III (Kudin *et al.*, 2004). Komplex I je považován za klíčové místo regulace vzniku mitochondriálních ROS (Vinogradov and Grivennikova, 2005). Na úrovni komplexu I mohou být ROS vytvářeny zejména jako vedlejší efekt reverzního transportu elektronů, nebo v důsledku přímého toku elektronů z NADH-dependentních substrátů (Kushnareva *et al.*, 2002).

Na modelu izolovaných jater perfundovaných 10 mM roztokem metforminu bylo demonstrováno, že metformin účinně inhibuje produkci ROS spojenou s reverzním tokem elektronů (Vinogradov and Grivennikova, 2005). Nicméně, tyto výsledky byly získány při nefyziologické koncentraci metforminu a při krátkodobé perfuzi. V naší

práci jsme poprvé ukázali, že metformin podávaný *in vivo* má stejný účinek, když jsme prokázali významně sníženou produkci ROS v submitochondriálních partikulích připravených z jaterních mitochondrií. Zvířatům byl dlouhodobě podáván metformin a poté u nich byla navozena částečná krátkodobá ischemie jater. Význam podílu ROS vzniklých při reverzním toku elektronů je diskutabilní za podmínek normoxie, ale je pravděpodobně vysoce relevantní při hypoxii, resp. ischemii (Jezek and Hlavatá, 2005). Tento předpoklad je v souladu s naším pozorováním, že efekt metforminu na produkci ROS je patrný pouze u zvířat vystavených ischemii/reperfuzi, ale nikoli u kontrol. Tvorba ROS asociovaná s reverzním tokem elektronů se významně zvyšuje s poklesem membránového potenciálu (Vinogradov and Grivennikova, 2005). Z našich experimentů (Publikace B) vyplývá, že biguanidy snižují membránový potenciál jako důsledek inhibice komplexu I. Můžeme tedy předpokládat, že tento efekt metforminu je jedním z mechanismů, které přispívají ke snížení produkce ROS asociované s reverzním tokem elektronů.

Inhibice přímého toku elektronů na úrovni komplexu I specifickým inhibitorem rotenonem vede ke zvýšené produkci ROS (Murphy, 2009). Teoreticky by bylo možné předpokládat, že metformin jako slabý inhibitor komplexu I bude mít obdobný efekt. V rozporu s tímto předpokladem jsme pozorovali inhibiční vliv metforminu na NADH-dependentní produkci ROS. Tuto nesrovnalost lze vysvětlit na základě poznatků publikovaných v letošním roce skupinou prof. Humphries (Matsuzaki and Humphries, 2015). Komplex I může reverzibilně zaujímat dva konformační stavy: „active“ a „deactive“ (Grivennikova *et al.*, 2001). V „deactive“ stavu je tvorba ROS na komplexu I významně snížena. Matsuzaki prokázal, že biguanidy selektivně inhibují „deactive“ formu komplexu I a zároveň deaktivace komplexu I významně zvyšuje senzitivitu komplexu I k biguanidům. Vzniká tak zpětnovazebná smyčka, která konzervuje komplex I v deaktivovaném stavu, a tím dochází ke snížení tvorby superoxidových radikálů. Navíc, ischemie vytváří podmínky podporující deaktivaci komplexu I, což dále zvyšuje senzitivitu k biguanidům. Na základě těchto a našich poznatků vyvozujeme, že metformin může sloužit jako antioxidant, a to především v situacích spojených s ischemií/reperfuzí.

Dalším potenciálním zdrojem ROS může být mGPDH (mitochondriální glycerol-6-fosfátdehydrogenáza) klíčová součást glycerofosfátového člunku, který

zajišťuje transport redukovaných ekvivalentů z cytosolu na komplex II (Mráček *et al.*, 2013). V loňském roce byla publikována studie, která identifikovala mGPDH jako novou cílovou molekulu metforminu (Madiraju *et al.*, 2014). Významná úloha mGPDH v produkci ROS byla dokumentována v hnědé tukové tkáni (Vrbacký *et al.*, 2007), ale údaje týkající se jaterních mitochondrií nejsou dosud k dispozici. V naší studii jsme zjistili, že množství ROS vznikající v submitochondriálních partikulích *in vitro* z glycerolfosfátu je významně nižší, než při použití sukcinátu jako jediného zdroje redukovaných ekvivalentů. Na rozdíl od sukcinátu a NADH jsme v případě použití glycerol-3-fosfátu jako zdroje elektronů nepozorovali žádný efekt ischemie/reperfuze ani při podávání metforminu. Mimo to, játra patří ke tkáním s velmi nízkou expresí mGPDH (Koza *et al.*, 1996). Naše výsledky tak vedou k závěru, že antioxidační účinek metforminu není v játrech zprostředkován mGPDH.

5.7. Souhrn

V naší práci jsme potvrdili inhibiční vliv biguanidů na mitochondriální respiraci a tvorbu ATP po podávání metforminu *in vivo*, tedy za fyziologických podmínek. Kromě toho jsme ukázali, že biguanidy ovlivňují i další mitochondriální děje nezávislé na přeměně energie, konkrétně zvyšují odolnost MPTP k Ca^{2+} iontům. Demonstrovali jsme, že metformin omezuje oxidační poškození jater vyvolané ischemií/reperfuzí a prokázali jsme, že jedním z mechanismů podmiňujících antioxidační účinky metforminu je snížená tvorba ROS v mitochondriích.

6. ZÁVĚRY

1. Prokázali jsme, že jaterní homogenát i izolované jaterní mitochondrie představují srovnatelné modely pro studium mechanismu účinku metforminu *in vitro*. Hlavní nevýhodou jaterního homogenátu je nižší citlivost k metforminu. Přínosem tohoto modelu je rychlost a jednoduchost přípravy, která minimalizuje poškození mitochondrií a umožňuje tak delší manipulaci v laboratorních podmínkách. Naše výsledky ukazují, že jaterní homogenát je vhodný alternativní model v experimentech, které vyžadují delší inkubaci s testovanou látkou.
2. Ukázali jsme, že metformin *in vitro* inhibuje specificky aktivitu komplexu I ($EC_{50} = 5 \text{ mM}$) a neovlivňuje další komplexy respiračního řetězce. Naopak, částečná inhibice komplexu I metforminem je kompenzována zvýšeným přísunem elektronů přes komplex II. Dále jsme prokázali, že metformin zvyšuje odolnost MTPT k působení vápníku.
3. Naše výsledky ukazují, že mechanismus účinku metforminu a fenforminu je obdobný, pozorované rozdíly lze připsat na vrub rozdílné účinnosti. Obě sloučeniny inhibují mitochondriální respiraci v závislosti na použité dávce, fenformin inhibuje komplex I s výrazně vyšší účinností než metformin ($EC_{50} = 0,25 \text{ mM}$). Nové je naše zjištění, že ve vyšších koncentracích fenformin inhibuje i mitochondriální komplex II a IV a na rozdíl od působení metforminu nedochází k plné kompenzaci dodávky elektronů prostřednictvím komplexu II. Obě sloučeniny zvyšují odolnost MTPT k účinku vápníkových iontů. Účinky metforminu i fenforminu nejsou závislé na integritě buňky a projevují se jak v jaterním homogenátu, tak v permeabilizovaných hepatocytech.
4. Účinné koncentrace metforminu *in vitro* jsou řádově ($10^3 \times$) vyšší než koncentrace prokázané v séru *in vivo*. Předložili jsme důkazy, že po dlouhodobém podávání metforminu *in vivo* lze v izolovaných mitochondriích

prokázat srovnatelné změny jako po přidání metforminu přímo k mitochondriím *in vitro* – tj. sníženou respiraci NADH-dependentních substrátů a sníženou aktivitu některých mitochondriálních enzymů (NADH:cytochrom c oxidoreduktáza a citrátsyntáza). Dále jsme zjistili, že účinek metforminu je nezávislý na vlivu diety. V souladu s těmito pozorováními jsme prokázali i sníženou resyntézu ATP v játrech během reperfuze po ischemii u potkanů, kterým byl podáván metformin. Naše výsledky podporují teorii, že za podmínek *in vivo* dochází dosud neobjasněným mechanismem k akumulaci metforminu v mitochondriích a dosažení účinné koncentrace.

5. Pozorovali jsme protektivní účinek metforminu při ischemicko/reperfuzním poškození jater, přičemž tento efekt byl výraznější ve steatózních játrech. Jednou z příčin může být přímý inhibiční vliv metforminu na tvorbu reaktivních forem kyslíku na komplexu I;

7. SEZNAM LITERATURY

- Adkison, D., Höllwarth, M.E., Benoit, J.N., Parks, D.A., McCord, J.M. & Granger, D.N., 1986. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl*, 548, 101-7.
- Akerman, K.E. & Wikström, M.K., 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett*, 68, 191-7.
- Alkalay, D., Volk, J., Roth, W., Khemani, L. & Bartlett, M.F., 1979. Metabolism, plasma or serum levels, and elimination of phenformin in guinea pigs, rats, and dogs. *J Pharm Sci*, 68, 156-60.
- Anon, 1998. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*, 352, 854-65.
- Appleyard, M.V., Murray, K.E., Coates, P.J., Wullschleger, S., Bray, S.E., Kernohan, N.M., Fleming, S., Alessi, D.R. & Thompson, A.M., 2012. Phenformin as prophylaxis and therapy in breast cancer xenografts. *Br J Cancer*, 106, 1117-22.
- Argaud, D., Roth, H., Wiernsperger, N. & Leverve, X.M., 1993. Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 213, 1341-8.
- Assan, R., Heuclin, C., Girard, J.R., LeMaire, F. & Attali, J.R., 1975. Phenformin-induced lactic acidosis in diabetic patients. *Diabetes*, 24, 791-800.
- Bailey, C.J., 2008. Metformin: effects on micro and macrovascular complications in type 2 diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther*, 22, 215-24.
- Bailey, C.J. & Turner, R.C., 1996. Metformin. *N Engl J Med*, 334, 574-9.
- Baur, J.A. & Birnbaum, M.J., 2014. Control of gluconeogenesis by metformin: does redox trump energy charge? *Cell Metab*, 20, 197-9.
- Bhamra, G.S., Hausenloy, D.J., Davidson, S.M., Carr, R.D., Paiva, M., Wynne, A.M., Mocanu, M.M. & Yellon, D.M., 2008. Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res Cardiol*, 103, 274-84.
- Bonnefont-Rousselot, D., Raji, B., Walrand, S., Gardès-Albert, M., Jore, D., Legrand, A., Peynet, J. & Vasson, M.P., 2003. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*, 52, 586-9.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Bridges, H.R., Jones, A.J., Pollak, M.N. & Hirst, J., 2014. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J*, 462, 475-87.
- Brunmair, B., Staniek, K., Gras, F., Scharf, N., Althaym, A., Clara, R., Roden, M., Gnaiger, E., Nohl, H., Waldhäusl, W. & Fürnsinn, C., 2004. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes*, 53, 1052-9.
- Bustamante, E., Soper, J.W. & Pedersen, P.L., 1977. A high-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria. *Anal Biochem*, 80, 401-8.
- Cahova, M., Vavrinkova, H., Meschisvilli, E., Markova, I. & Kazdova, L., 2004. The impaired response of non-obese hereditary hypertriglyceridemic rats to glucose load is associated with low glucose storage in energy reserves. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 112, 549-55.
- Carvalho, C., Correia, S., Santos, M.S., Seiça, R., Oliveira, C.R. & Moreira, P.I., 2008. Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment. *Mol Cell Biochem*, 308, 75-83.

- Crompton, M., Virji, S. & Ward, J.M., 1998. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*, 258, 729-35.
- Cusi, K., Consoli, A. & DeFronzo, R.A., 1996. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 4059-67.
- Czyzyk, A., Tawecki, J., Sadowski, J., Ponikowska, I. & Szczepanik, Z., 1968. Effect of biguanides on intestinal absorption of glucose. *Diabetes*, 17, 492-8.
- Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T. & Hardie, D.G., 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett*, 377, 421-5.
- DeFronzo, R.A., Barzilai, N. & Simonson, D.C., 1991. Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 73, 1294-301.
- Detaille, D., Guigas, B., Chauvin, C., Batandier, C., Fontaine, E., Wiernsperger, N. & Lèverve, X., 2005. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes*, 54, 2179-87.
- Dilman, V.M., Berstein, L.M., Ostroumova, M.N., Fedorov, S.N., Poroshina, T.E., Tsyrlina, E.V., Buslaeva, V.P., Semiglazov, V.F., Seleznev, I.K., Bobrov YuF, Vasilyeva, I.A., Kondratjev, V.B., Nemirovsky, V.S. & Nikiforov, Y.F., 1982. Metabolic immunodepression and metabolic immunotherapy: an attempt of improvement in immunologic response in breast cancer patients by correction of metabolic disturbances. *Oncology*, 39, 13-9.
- Drahota, Z., Endlicher, R., Staňková, P., Rychtrmoc, D., Milerová, M. & Cervinková, Z., 2012. Characterization of calcium, phosphate and peroxide interactions in activation of mitochondrial swelling using derivative of the swelling curves. *J Bioenerg Biomembr*, 44, 309-15.
- El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M. & Lèverve, X., 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*, 275, 223-8.
- Fasshauer, M., Paschke, R. & Stumvoll, M., 2004. Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. *Biochimie*, 86, 779-84.
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M. & Viollet, B., 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*, 20, 953-66.
- Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F. & Viollet, B., 2010. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*, 120, 2355-69.
- Gan, S.C., Barr, J., Arieff, A.I. & Pearl, R.G., 1992. Biguanide-associated lactic acidosis. Case report and review of the literature. *Arch Intern Med*, 152, 2333-6.
- Gnaiger, E., 2001. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol*, 128, 277-97.
- Goodarzi, M.O. & Bryer-Ash, M., 2005. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes Metab*, 7, 654-65.
- Grivennikova, V.G., Kapustin, A.N. & Vinogradov, A.D., 2001. Catalytic activity of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in intact mitochondria. evidence for the slow active/inactive transition. *J Biol Chem*, 276, 9038-44.
- Guest, D., King, L.J., Margetts, G. & Parke, D.V., 1980. The dose-dependent toxic effects of phenformin in the rat. *Biochem Pharmacol*, 29, 2291-5.
- Guest, D., King, L.J. & Parke, D.V., 1979. Metabolism of phenformin in the rat and guinea-pig. *Xenobiotica*, 9, 681-93.

- Guigas, B., Demaille, D., Chauvin, C., Batandier, C., De Oliveira, F., Fontaine, E. & Leverve, X., 2004. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J*, 382, 877-84.
- Hale, T.W., Kristensen, J.H., Hackett, L.P., Kohan, R. & Ilett, K.F., 2002. Transfer of metformin into human milk. *Diabetologia*, 45, 1509-14.
- Halestrap, A.P., McStay, G.P. & Clarke, S.J., 2002. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*, 84, 153-66.
- Hollunger, G., 1955. Guanidines and oxidative phosphorylations. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 11, 1-84.
- Hother-Nielsen, O., Schmitz, O., Andersen, P.H., Beck-Nielsen, H. & Pedersen, O., 1989. Metformin improves peripheral but not hepatic insulin action in obese patients with type II diabetes. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 120, 257-65.
- Hunter, D.R. & Haworth, R.A., 1979. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 195, 453-9.
- Hütter, E., Unterluggauer, H., Garedew, A., Jansen-Dürr, P. & Gnaiger, E., 2006. High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. *Exp Gerontol*, 41, 103-9.
- Jaeschke, H. & Mitchell, J.R., 1989. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 160, 140-7.
- Jezek, P. & Hlavatá, L., 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 2478-503.
- Johnson, J.A., Majumdar, S.R., Simpson, S.H. & Toth, E.L., 2002. Decreased mortality associated with the use of metformin compared with sulfonylurea monotherapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 25, 2244-8.
- Johnson, J.A., Simpson, S.H., Toth, E.L. & Majumdar, S.R., 2005. Reduced cardiovascular morbidity and mortality associated with metformin use in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med*, 22, 497-502.
- Kavazis, A.N., McClung, J.M., Hood, D.A. & Powers, S.K., 2008. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H928-35.
- Khoury, H., Collin, F., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., Jore, D. & Gardès-Albert, M., 2004. Radical-induced oxidation of metformin. *Eur J Biochem*, 271, 4745-52.
- Klip, A. & Leiter, L.A., 1990. Cellular mechanism of action of metformin. *Diabetes Care*, 13, 696-704.
- Kondrashova, M., Zakharchenko, M. & Khunderyakova, N., 2009. Preservation of the in vivo state of mitochondrial network for ex vivo physiological study of mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 2036-50.
- Kondrashova, M.N., Fedotcheva, N.I., Saakyan, I.R., Sirota, T.V., Lyamzaev, K.G., Kulikova, M.V. & Temnov, A.V., 2001. Preservation of native properties of mitochondria in rat liver homogenate. *Mitochondrion*, 1, 249-67.
- Koza, R.A., Kozak, U.C., Brown, L.J., Leiter, E.H., MacDonald, M.J. & Kozak, L.P., 1996. Sequence and tissue-dependent RNA expression of mouse FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 336, 97-104.
- Kruger, F.A., Altschuld, R.A., Hollobaugh, S.L. & Jewett, B., 1970. Studies on the site and mechanism of action of phenformin. II. Phenformin inhibition of glucose transport by rat intestine. *Diabetes*, 19, 50-2.
- Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E. & Kunz, W.S., 2004. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem*, 279, 4127-35.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N. & Andreyev, A., 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J*, 368, 545-53.
- Lage, R., Diéguez, C., Vidal-Puig, A. & López, M., 2008. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med*, 14, 539-49.

- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., Jurczak, M.J., Camporez, J.P., Lee, H.Y., Cline, G.W., Samuel, V.T., Kibbey, R.G. & Shulman, G.I., 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, 510, 542-6.
- Maida, A., Lamont, B.J., Cao, X. & Drucker, D.J., 2011. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. *Diabetologia*, 54, 339-49.
- Matsuzaki, S. & Humphries, K.M., 2015. Selective Inhibition of Deactivated Mitochondrial Complex I by Biguanides. *Biochemistry*.
- Miller, R.A., Chu, Q., Xie, J., Foretz, M., Viollet, B. & Birnbaum, M.J., 2013. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*, 494, 256-60.
- Mráček, T., Drahotá, Z. & Houštěk, J., 2013. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1827, 401-10.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417, 1-13.
- Orr, A.L., Ashok, D., Sarantos, M.R., Ng, R., Shi, T., Gerencser, A.A., Hughes, R.E. & Brand, M.D., 2014. Novel inhibitors of mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *PLoS One*, 9, e89938.
- Owen, M.R., Doran, E. & Halestrap, A.P., 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*, 348 Pt 3, 607-14.
- Pavlović, D., Kocić, R., Kocić, G., Jevtović, T., Radenković, S., Mikić, D., Stojanović, M. & Djordjević, P.B., 2000. Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 2, 251-6.
- Pawlyk, A.C., Giacomini, K.M., McKeon, C., Shuldiner, A.R. & Florez, J.C., 2014. Metformin pharmacogenomics: current status and future directions. *Diabetes*, 63, 2590-9.
- Pernicova, I. & Korbonits, M., 2014. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*, 10, 143-56.
- Rauchová, H., Vokurková, M. & Drahotá, Z., 2014. Inhibition of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by α -tocopheryl succinate. *Int J Biochem Cell Biol*, 53, 409-13.
- Roberts, F. & Ryan, G.J., 2007. The safety of metformin in heart failure. *Ann Pharmacother*, 41, 642-6.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M. & Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*, 228, 35-51.
- Schatz, H., Katsilambros, N., Nierle, C. & Pfeiffer, E.E., 1972. The effect of biguanides on secretion and biosynthesis of insulin in isolated pancreatic islets of rats. *Diabetologia*, 8, 402-7.
- Schulz, M. & Schmoldt, A., 2003. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie*, 58, 447-74.
- Schäfer, G., 1976a. On the mechanism of action of hypoglycemia-producing biguanides. A reevaluation and a molecular theory. *Biochem Pharmacol*, 25, 2005-14.
- Schäfer, G., 1976b. Some new aspects on the interaction of hypoglycemia-producing biguanides with biological membranes. *Biochem Pharmacol*, 25, 2015-24.
- Schäfer, G., 1983. Biguanides. A review of history, pharmacodynamics and therapy. *Diabete Metab*, 9, 148-63.
- Schäfer, G. & Rieger, E., 1974. Interaction of biguanides with mitochondrial and synthetic membranes. Effects on ion conductance of mitochondrial membranes and electrical properties of phospholipid bilayers. *Eur J Biochem*, 46, 613-23.

- Segal, E.D., Yasmeen, A., Beauchamp, M.C., Rosenblatt, J., Pollak, M. & Gottlieb, W.H., 2011. Relevance of the OCT1 transporter to the antineoplastic effect of biguanides. *Biochem Biophys Res Commun*, 414, 694-9.
- Sogame, Y., Kitamura, A., Yabuki, M., Komuro, S. & Takano, M., 2013. Transport of biguanides by human organic cation transporter OCT2. *Biomed Pharmacother*, 67, 425-30.
- Vigneri, R. & Goldfine, I.D., 1987. Role of metformin in treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 10, 118-22.
- Vinogradov, A.D. & Grivennikova, V.G., 2005. Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 120-7.
- Viollet, B., Guigas, B., Leclerc, J., Hébrard, S., Lantier, L., Mounier, R., Andreelli, F. & Foretz, M., 2009. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf)*, 196, 81-98.
- Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M. & Andreelli, F., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*, 122, 253-70.
- Vrbacký, M., Drahotá, Z., Mráček, T., Vojtísková, A., Jesina, P., Stopka, P. & Houstek, J., 2007. Respiratory chain components involved in the glycerophosphate dehydrogenase-dependent ROS production by brown adipose tissue mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1767, 989-97.
- Wiernsperger, N.F. & Bailey, C.J., 1999. The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms. *Drugs*, 58 Suppl 1, 31-9; discussion 75-82.
- Wilcock, C. & Bailey, C.J., 1994. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica*, 24, 49-57.
- Witters, L.A., 2001. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest*, 108, 1105-7.
- Wollen, N. & Bailey, C.J., 1988. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by metformin. Synergism with insulin. *Biochem Pharmacol*, 37, 4353-8.
- Yin, M., van der Horst, I.C., van Melle, J.P., Qian, C., van Gilst, W.H., Silljé, H.H. & de Boer, R.A., 2011. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H459-68.
- Zakikhani, M., Dowling, R., Fantus, I.G., Sonenberg, N. & Pollak, M., 2006. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res*, 66, 10269-73.
- Zheng, J., Woo, S.L., Hu, X., Botchlett, R., Chen, L., Huo, Y. & Wu, C., 2015. Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. *Front Med*.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J. & Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108, 1167-74.