UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Studium změn energetického metabolismu hepatocytů: působení oxidačního stresu a trijodtyroninu

DISERTAČNÍ PRÁCE

2010 *Mgr. René Endlicher*

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Hradci Králové

Studium změn energetického metabolismu hepatocytů: působení oxidačního stresu a trijodtyroninu

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce: Mgr. René Endlicher

Školitel: Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.

Školitel konzultant: RNDr. Zdeněk Drahota, DrSc.

Hradec Králové

2010

Charles University in Prague

Faculty of Medicine in Hradec Králové

Changes of energy metabolism of hepatocytes:

The effect of oxidative stress and triiodothyronine

PhD Thesis

Author: Mgr. René Endlicher

Tutor: Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.

Hradec Králové

2010

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Hradci Králové

Studium změn energetického metabolismu hepatocytů: působení oxidačního stresu a trijodtyroninu

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

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program:

Fyziologie a patologická fyziologie

Mgr. René Endlicher

Hradec Králové, 2010 Obhajoba dne: .....

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 12. 4. 2010 **……**

Na tomto místě bych rád poděkoval všem lidem, kteří mi v průběhu studia nějakým způsobem pomohli nebo mi přirostli k srdci.

V první řadě, děkuji své školitelce paní ***Prof. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc.*** *Dlouho jsem přemýšlel, co sem napsat, aby tu bylo řečeno vše. Pár lidí se mě za dobu studia ptalo: „Jaká je profesorka Červinková jako šéf?“ Lepšího školitele a šéfa bych těžko hledal, protože lepší prostě není! Důvěra, upřímnost, spolehlivost, vyrovnanost, nadhled ... Nesmírně si Vás vážím a jsem vděčný za to, že jsem mohl být Vaším studentem.*

Na druhém místě děkuji svému školiteli konzultantovi panu ***RNDr. Zdeňkovi Drahotovi, DrSc.*** *- Kouzelník v říši čar. Oxygraf, Spektrofotometr a Čáry. Ne, myšlenky přeměněné v data. Naučil jste mě spoustu užitečných věcí, za které jsem Vám vděčný. Na Vaše slova „Když ti jdou výsledky, tak měř a neptej se proč a jak!“ se opravdu zapomenout nedá.*

Mé poděkování patří též ***MUDr. Ottovi Kučerovi, Ph.D.*** *a* ***Mgr. Pavle Staňkové, Ph.D.*** *nejen za technickou podporu, ale i za skvělé společné sportovní zážitky. Dále děkuji* ***Doc. MUDr. Halce Lotkové, Ph.D.*** *a* ***MUDr. Davidu Rychtrmocovi*** *za cenné rady. Samozřejmě nesmím zapomenout na společné konference s* ***Mgr. Tomášem Roušarem, Ph.D.*** *a* ***MUDr. Tomášem Garnolem****.*

Děkuji i svým spolupracovníkům v laboratoři ***Mgr. Monice Pospíšilové****,* ***Janě Ondrákové*** *a* ***Bc. Majce Vaculové****. Mé poděkování patří i celému* ***kolektivu Ústavu fyziologie****. Každý z vás mě nějakým způsobem ovlivnil, posunul dál a za to vám všem děkuji. Děkuji* ***Ivance Altmannové****. Ivanko, pracovní hodiny počítat opravdu neumím.*

Říká se: „Pár přátel stačí mít ...“ Ano, je to pravda, někdy stačí i jeden. Druhý človíček, který mi za ty čtyři roky nejvíce ovlivnil život, je kamarádka a nejlepší přítel ***Helča Soukupová****. Hel, děkuji za ... Však Ty sama nejlíp víš za co. Chtěl bych Ti též poděkovat za korektury, neboť má ruka ne vždy psala to, co měl mozek na mysli.*

Děkuji též své ***rodině*** *za podporu a zázemí, které mi během studia vytvořila.*

Věda se dá dělat ze všeho, ale bez peněz se věda dělat nedá. Takže mé poděkování patří i grantovým agenturám: ***GAČR 303/03/H065****,* ***GAUK 90/2006 C****,* ***MSM VZ 0021620820*** *a* ***firmě Roche****, s jejichž podporou vznikla tato práce.*

Co říct na závěr? „Bylo to krásné, stálo to za to!“

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK 4

1. ÚVOD 6

2. TEORETICKÁ ČÁST 7

2.1. Játra 7
2.1.1. Morfologie jater 7
2.1.2. Jaterní acinus 9
2.1.3. Jaterní buňky 10
2.1.3.1. Hepatocyty 10
2.1.3.2. Kupfferovy buňky 11
2.1.3.3. Itovy buňky 11
2.1.3.4. Pit buňky – Pit cells 12
2.1.4. Funkce jater 12
2.1.5. Mitochondrie 13
2.1.5.1. Struktura mitochondrií 13
2.1.5.2. Funkce mitochondrií 14
2.1.5.3. Dýchací řetězec a oxidativní fosforylace 14
2.1.5.4. Metody hodnocení funkce mitochondrií a aktivity mitochondriálních enzymů 16

2.2. Toxické poškození jater 17
2.2.1. Volné radikály 17
2.2.2. ROS 17
2.2.3. Oxidační stres 19
2.2.4. Hlavní důsledky oxidačního stresu 19
2.2.4.1. Poškození DNA 20
2.2.4.2. Lipoperoxidace 20
2.2.4.3. Poškození proteinů 21
2.2.5. Antioxidační ochranný systém 21
2.2.6. Mitochondrie a ROS 23
2.2.7. Terciární butylhydroperoxid 24
2.2.8. Trijodtyronin 24
2.2.9. Metody hodnocení oxidačního stresu 25

2.3. MPTP 26
2.3.1. Složení MPTP 27
2.3.2. Funkce MPTP 27
2.3.3. Faktory, které regulují MPTP 28
2.3.3.1 Swelling mitochondrií a MPTP – dependentní a independentní mechanismy 28
2.3.3.2. Role Ca^{2+} 29
2.3.3.3. Role ROS 29
2.3.4. MPTP a buněčná smrt 30
2.3.5. Metody hodnocení MPT 32

3. CÍLE PRÁCE 33

4. METODIKY 34

4.1. Použité chemikálie 34

4.2. Laboratorní zvířata 34

4.3. Izolace hepatocytů **34**

4.4. Stanovení viability izolovaných hepatocytů pomocí exkluze trypanové modři **37**

4.5. Stanovení počtu buněk **37**

4.6. Použití suspenze hepatocytů **37**

4.7. Primární kultury izolovaných hepatocytů **38**

4.8. Izolace mitochondrií **39**

4.9. Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy **41**

4.10. Stanovení koncentrace malondialdehydu **42**

4.11. Měření respirace hepatocytů a mitochondrií **43**

4.12. Měření mitochondriálního membránového potenciálu **44**
4.12.1. Měření MMP kultivovaných hepatocytů pomocí akumulace Rhodaminu 123 44
4.12.2. Měření MMP izolovaných mitochondrií pomocí Safraninu O 45

4.13. Měření bobtnání mitochondrií **46**

4.14. Pokusy s trijodtyroninem v podmínkách *in vivo* **47**

4.15. Statistické zpracování výsledků **48**

5. VÝSLEDKY 49

5.1. Peroxidační poškození kultivovaných hepatocytů t-BHP **49**
5.1.1. Peroxidační poškození plazmatické membrány 49
5.1.2. Indukce lipoperoxidace t-BHP v kultivovaných hepatocytech 50

5.2. Vliv oxidačního stresu na energetický metabolismus hepatocytů **51**
5.2.1. Vliv t-BHP na mitochondriální membránový potenciál kultivovaných hepatocytů 52
5.2.2. Vliv t-BHP na aktivitu mitochondriálních enzymů v permeabilizovaných hepatocytech (v suspenzi) 53

5.3. Působení oxidačního stresu na funkci respiračního řetězce izolovaných mitochondrií **56**
5.3.1. Vliv t-BHP na aktivitu mitochondriálních enzymů: koncentrační a časová závislost 56
5.3.2. Vliv t-BHP na mitochondriální membránový potenciál 60

5.4. Mitochondriální pór přechodné permeability (Mitochondrial Permeability Transition Pore) jako součást mechanismů, indukujících poškození hepatocytů **62**
5.4.1. Zavedení a rozpracování nové metody pro vyhodnocování bobtnání mitochondrií jako indikátoru aktivace MPTP 62
5.4.1.1. Klasické křivky hodnocení bobtnání mitochondrií 63
5.4.1.2. Derivované křivky bobtnání mitochondrií 63
5.4.2. Vliv různých faktorů na funkci MPTP 66
5.4.2.1. Vliv Ca^{2+} na funkci MPTP 66
5.4.2.2. Vliv PO_4^{3-} na funkci MPT 69
5.4.2.3. Interakce Ca^{2+} a Pi při aktivaci MPTP 71
5.4.2.4. Aktivace kalciem indukovaného bobtnání jaterních mitochondrií působením t-BHP. Peroxidační stres aktivuje Ca^{2+}-indukované bobtnání 76

5.4.3. Vliv trijodtyroninu na funkci MPTP: *in vitro* a *in vivo* 77
5.4.3.1. Účinek *in vitro* aplikace trijodtyroninu na Ca^{2+}-indukované bobtnání jaterních mitochondrií 78
5.4.3.2. Vliv PO_4^{3-} na aktivační efekt trijodtyroninu na Ca^{2+}-indukované bobtnání jaterních mitochondrií 82
5.4.3.3. Vliv Pi a Ca^{2+} na průběh MPT po aplikaci T_3 *in vivo* 84
5.4.4. Tkáňová specifita citlivosti MPTP vůči Ca^{2+} iontům 87

6. DISKUZE 89

6.1. Působení peroxidačního stresu na hepatocyty a mitochondrie jater potkana 89

6.2. Endogenní a exogenní faktory regulující funkci nespecifického mitochondriálního póru přechodné permeability 92
6.2.1. Efekt Ca^{2+} na bobtnání mitochondrií 94
6.2.2. Efekt Pi na bobtnání mitochondrií a jeho interakce s Ca^{2+} 94
6.2.3. Efekt t-BHP na bobtnání mitochondrií 95
6.2.4. Efekt T_3 na bobtnání mitochondrií 96
6.2.5. Efekt CsA na bobtnání mitochondrií 96

7. ZÁVĚRY 98

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 100

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AIF	*apoptosis inducing factor*
ANT	adeninnukleotidový translokátor
APAF-1	*apoptosis protease activating factor 1*
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
Ca^{2+}	kalciové ionty
COX	cytochrom c oxidáza
CsA	cyklosporin A
Cyp D	cyklofilin D
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dig	digitonin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina etyléndiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykoldiamintetraoctová
FAD	flavinadenindinukleotid
FCCP	karbonylkyanid-m-chlorofenylhydrazon
GLUT	glutamát
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion (glutathiondisulfid)
H^+	vodíkový proton
hep	hepatocyty
$HO^{\cdot}$	hydroxylový radikál
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
$L^{\cdot}$	volný uhlíkový radikál
LDH	laktátdehydrogenasa
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
$LO^{\cdot}$	alkoxylový radikál
LOOH	lipidový hydroperoxid
$LOO^{\cdot}$	peroxylový radikál
MAL	malát

MDA	malondialdehyd
MK	mastná kyselina
MMP	mitochondriální membránový potenciál
MPT	*mitochondrial permeability transition*
MPTP	*mitochondrial permeability transition pore*
MS	hmotnostní spektrometr
NAD^+	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
$NADP^+$	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
O_2^-	superoxidový radikál
PC	palmityl karnitinu
Pi	anorganický fosfát
PUFA	polynenasycená mastná kyselina
PYR	pyruvát
RCI	index respirační kontroly
Rho123	rhodamin 123
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku (*reactive oxygen species*)
RNS	reaktivní sloučeniny dusíku (*reactive nitrogen species*)
ROT	rotenon
SOD	superoxiddismutáza
SUC	sukcinát
T_3	trijodtyronin
TAG	triacylglycerol
TBA	2-thiobarbiturová kyselina
t-BHP	terciární butylhydroperoxid
TNF	tumor nekrotizující faktor
Tris	tris-hydroxymetylaminometan
UCP	*uncoupling protein*
VDAC	*voltage dependent anion channel*
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
$\Delta\mu H^+$	elektrochemický potenciál

1. ÚVOD

Játra jsou životně důležitým orgánem s velkým množstvím nepostradatelných funkcí. Zároveň jsou vzhledem ke svému postavení v cirkulaci krve prvním orgánem, který se dostává do styku s řadou toxických látek. Častým cílem toxického působení těchto látek je respirační řetězec, lokalizovaný v mitochondriích. Mechanismy, které se podílejí na poškození hepatocytů mohou být různé, avšak významným mechanismem hepatototoxického účinku řady látek je zvýšená tvorba volných reaktivních radikálů.

Mitochondrie hrají velmi významnou úlohu v řadě základních biologických funkcí. Mimo jiné jsou největším producentem energie ve formě ATP, podílejí se na termoregulaci a udržování redoxního potenciálu. Mají významnou roli v buněčné signalizaci a v neposlední řadě spouštějí mechanismy vedoucí k buněčné smrti. Mitochondrie jsou nejen častým cílem oxidačního poškození, ale jsou považovány za hlavní buněčný zdroj ROS. Zvýšená produkce ROS může následně vyvolat změny v propustnosti mitochondriálních membrán a iniciovat tak apoptózu. Trijodtyronin stimuluje buněčnou respiraci, tvorbu ROS a indukuje děje, které vedou ke změnám ve složení lipidů mitochondriálních membrán. Poškození membrány vede k její depolarizaci, k bobtnání (swellingu) mitochondrií a následnému poškození funkce mitochondrií.

Studiu dopadu oxidačního stresu na buněčné úrovni je věnována již řadu let značná pozornost, detailní mechanismy odpovědné za poškození buněk nejsou však dosud zcela objasněny. Poškození dýchacího řetězce, tvorba ROS a významná úloha mitochondrií v regulaci buněčné smrti tak neustále přispívají k trvalému zájmu o tyto buněčné organely.

Tato práce navazuje na předchozí studie naší laboratoře věnované vlivu modelové prooxidační látky – terciárního butylhydroperoxidu. Cílem mé práce bylo komplexní posouzení změn energetického metabolismu izolovaných buněk, izolovaných mitochondrií a kultivovaných hepatocytů po působení terciárního butylhydroperoxidu. Druhá část práce byla zaměřena funkci *mitochondrial permeability transition pore* a hodnocení vlivu trijodtyroninu a řady dalších faktorů na změny v propustnosti mitochondriálních membrán.

2. TEORETICKÁ ČÁST

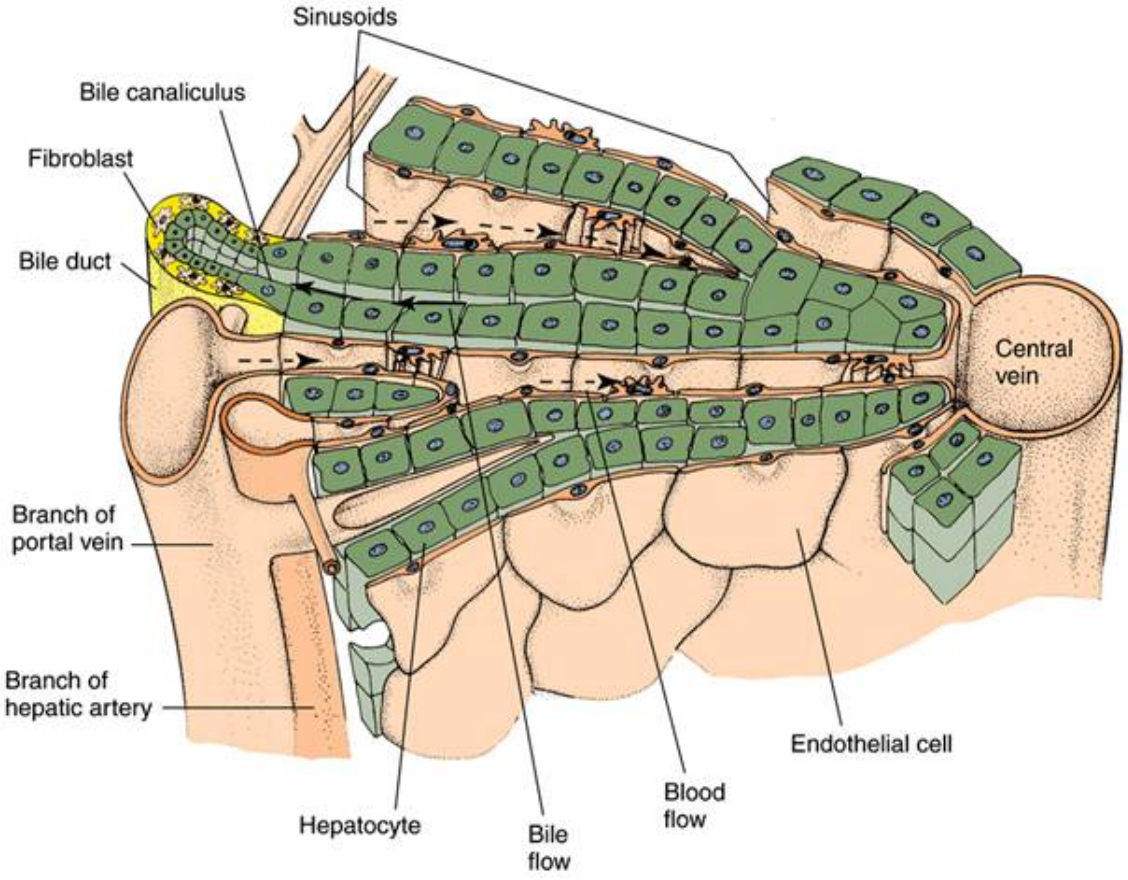
2.1. Játra

Játra jsou centrálním orgánem metabolismu obratlovců a největší žlázou v jejich těle. V organismu hrají klíčovou roli v energetickém a intermediárním metabolismu. Podílejí se výraznou měrou na metabolismu tuků, cukrů a bílkovin. Jsou nezastupitelná při biotransformaci cizorodých látek a detoxikaci organismu. Podílejí se též na tvorbě látek nezbytných pro trávení a vstřebávání potravy v tenkém střevě. Mezi jejich další funkce patří syntéza bílkovin krevní plazmy včetně srážecích faktorů. Slouží také jako zásobárna řady látek, jako je glykogen, železo nebo vitamíny. Kromě zásadní úlohy v intermediárním metabolismu vykonávají celou řadu dalších funkcí, mezi něž patří vaskulární funkce, imunitní funkce a tvorba, skladování a přeměna signálních molekul (Červinková, 2005).

2.1.1. Morfologie jater

Játra jsou uspořádána do lalůčků, uvnitř kterých protéká v sinusoidech krev kolem jaterních buněk. Morfologickou jednotkou jater je *lobus venae centralis* = jaterní lalůček (Obr. 1). Jedná se o cylindrickou strukturu, jejímž středem prochází *vena centralis*. Jaterní lalůček je tvořen hepatocyty, které jsou uspořádané do trámců. Tyto trámce buněk jdou odstředivě od *vena centralis* k periferii jaterního lalůčku. Každý trámec je tvořen dvěmi vrstvami hepatocytů. Trámce buněk jsou obklopeny krevními sinusoidami, ve kterých protéká krev. Sinusoidy spojují terminální větve portální vény s centrální vénou každého lalůčku. Mezi trámci jaterních buněk (hepatocyty) a endotelovými buňkami je tzv. Disseho prostor, sem je filtrována plazma a zde se začíná tvořit lymfa. Jak bylo řečeno, každý trámec tvoří dvě vrstvy hepatocytů. Mezi těmito hepatocyty jsou žlučové *intercelulární* kanálky, které v protisměru (od vena centralis) odvádí vznikající žluč na periferii jaterního lalůčku, do tzv. Heringových kanálků. Tím má každý hepatocyt svůj biliární a krevní pól, což zajišťuje maximální kontakt s krví a dostatečnou plochu pro odvod žluči. Endotelové buňky neleží na bazální membráně. Mezi endotelovými buňkami jsou široké póry *fenestrace* a plazma je tak v úzkém kontaktu s jaterními buňkami. Játra jsou orgánem, který má dvojí krevní oběh. Nutriční, kde cestou *arteria hepatica* přichází do jater krev bohatá na kyslík a funkční, který

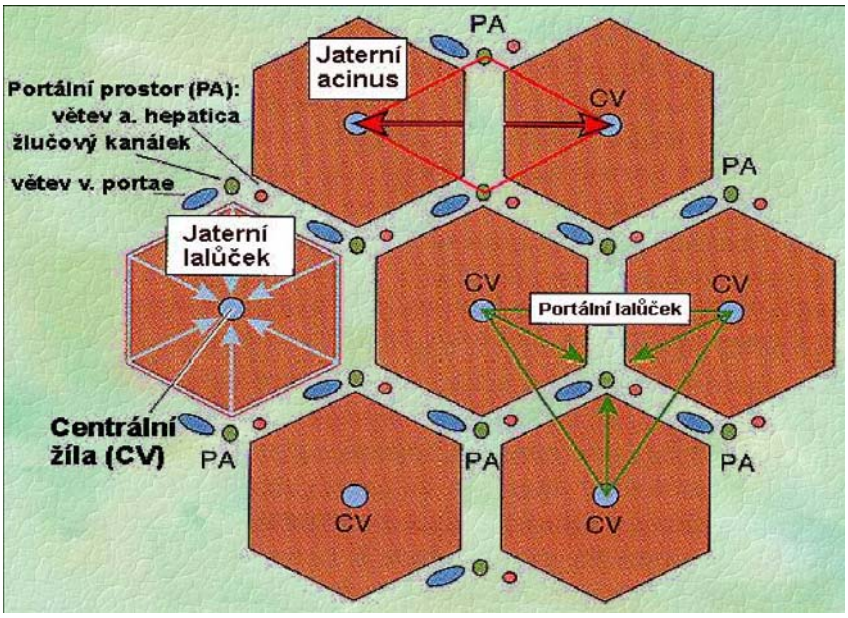
zajišťuje přísun živin cestou *vena portae* z gastrointestinálního traktu. Oba tyto oběhy se v jaterních sinusoidech spojují a pokračují cestou *vena centralis*, krev z jater je drénována do dolní duté žíly (Ganong, 1995).



Obr. 1: Morfologické uspořádání jaterního lalůčku.

Z funkčního hlediska se jaterní parenchym dělí podle vztahu hepatocytů k příhodným cévám. Funkční jednotkou jater je jaterní acinus (Obr. 2). Je tvořen hepatocyty uspořádanými kolem portobiliárního prostoru, odkud přitéká krev. Portobiliární prostor obsahuje větev jaterní arterioly, větev portální venuly, žlučovod, nerv a lymfatickou cévu. Každá tato arteriola a venula vydává ještě své terminální větve, které vybíhají mezi portobiliární prostory a ze kterých teprve odtéká krev do jaterních sinusoidů. Jaterní acinus je nepravidelný mikroskopický útvar uspořádaný kolem osy tvořené terminální jaterní arteriolou a terminální portální venulou. Takto definovaný acinus je uložen mezi dvěma portobiliárními prostory, odkud přitéká krev a mezi dvěma centrálními žilami, které se nacházejí na periferii acinu a kam odtéká krev z jaterních sinusoidů (Rappaport et al., 1954). Z toho vyplývá, že buňky umístěné

nejblíže cévnímu svazku terminálních větví, jaterní arterioly a portální venuly, dostávají nejvíce okysličenou krev a buňky na periferii lalůčku jsou hůře zásobeny kyslíkem a proto i citlivější na hypoxické poškození.

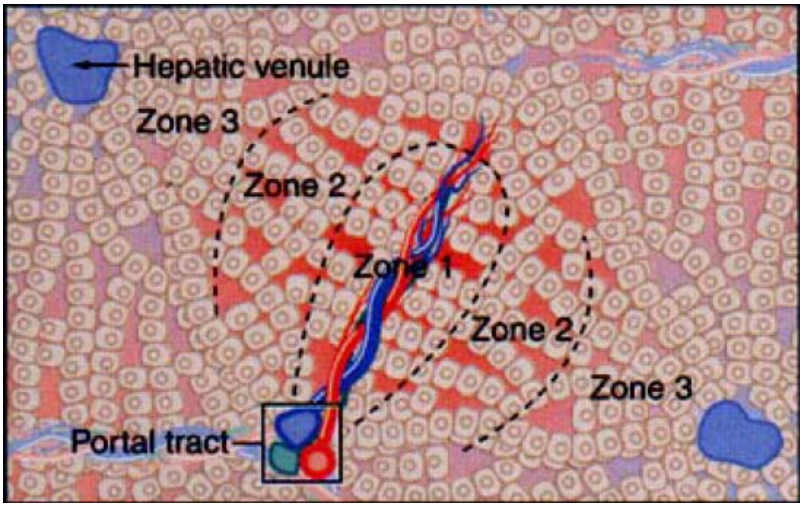


Obr. 2: Morfologické uspořádání jednotlivých jaterních lalůčků. Převzato z http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/GIT.pdf

2.1.2. Jaterní acinus

Buňky jaterního acinu se podle vzdálenosti od distribučních cév rozdělují do tří zón (Obr. 3). Každá zóna obsahuje hepatocyty které jsou zaměřený na určité funkce. Buňky v I. zóně, které jsou cévám nejbližší, dostávají krev, která obsahuje nejvíce kyslíku a živin. Buňky v této zóně jsou, ale také nejvíce vystaveny vlivům, které sebou přináší přitékající krev ze střeva. Tyto hepatocyty (periportální hepatocyty) jsou místem s převahou oxidačních dějů. Obsahují velké množství mitochondrií, probíhá zde β-oxidace mastných kyselin, katabolismus aminokyselin, tvorba močoviny, glukoneogeneze, uvolňování glukózy do krve, tvorba žluči, syntéza cholesterolu. Buňky II. zóny tvoří tzv. přechodnou zónu. III. zóna, která je na periferii acinu, v blízkosti vena centralis, je zásobena krví s nižší koncentrací kyslíku. Probíhají zde hlavně redukční děje, biotransformace a detoxikace. Perivenózní hepatocyty jsou odpovědné za vychytávání glukózy, syntézu glykogenu, glykolýzu, lipogenezi a ketogenezi. Dochází zde ke konjugaci bilirubinu a syntéze glutaminu z glutamátu (Červinková, 2005).

Přesné hranice mezi jednotlivými zónami ale neexistují. Periportální a perivenózní hepatocyty se navzájem liší především svou enzymovou výbavou, množstvím a uspořádáním buněčných organel, což je příčinou jejich rozdílné metabolické kapacity. Zonální heterogenita hepatocytů vykazuje často dynamiku a významně se mění v závislosti na aktuálním metabolickém stavu organismu.



Obr. 3: Jaterní acinus a jeho rozdělení na jednotlivé funkční zóny. Převzato z http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/GIT.pdf

2.1.3. Jaterní buňky

Četné jaterní funkce zajišťují vedle vlastních parenchymových buněk – hepatocytů, také neparenchymové buňky. Mezi ně řadíme Kupfferovy buňky, endotelové buňky, epitelové buňky žlučových cest, Itovy buňky a Pit buňky (Krejsek a Kopecký, 2004).

2.1.3.1. Hepatocyty

Hepatocyty reprezentují 60% všech jaterních buněk a 80% objemu celých jater. Jsou to jedno až dvou jaderné polygonální buňky, které vykazují vysokou metabolickou aktivitu. Zralé hepatocyty jsou velice stabilní a přežívají po dlouhou dobu (Guillouzo, 2002). Významnou vlastností jater je jejich regenerační schopnost po chirurgickém odstranění části jater. Regenerace jater probíhá nejen po odstranění části jater, ale poranění nebo toxické poškození hepatocytů vede k aktivaci tohoto děje. Regenerace hepatocytů spočívá v obnovení jejích plné funkční kapacity, ale též v tvorbě nových

buněk. Zdrojem nových buněk může být synchronizované, opakované, mitotické dělení zbylých hepatocytů. V posledních letech se hromadí důkazy o možnosti doplnění hepatocytů dělením kmenových buněk jaterního původu (Diehl a Rai, 1996) popř. kmenových buněk jiného původu např. z kostní dřeně (Lamy et al., 2000). Řízení jaterní regenerace je složitý proces a podílí se na něm řada faktorů zejména humorální povahy. Rozdílné vnější signály navodí fenotypové změny ve zbývajících buňkách, tím se aktivuje řada genů spojených s regenerací, proliferací buněk, ale též s terminací tohoto děje (Thorgeirsson, 1996).

2.1.3.2. Kupfferovy buňky

Ve stěně sinusoidů se nachází Kupfferovy buňky – fixní makrofágy. Mají výběžky, pomocí kterých jsou v kontaktu jak s endotelovými buňkami, tak s hepatocyty. Patří mezi buňky mononukleárního fagocytárního systému. Vyskytují se hlavně v periportální oblasti jaterního acinu a fagocytují toxické látky, bakterie, imunokomplexy, staré erytrocyty či zbytky rozpadlých buněk, které jsou přiváděné do jater portální krví a brání tak jejich přenosu do systémové cirkulace. Další jejich funkcí je tvorba cytokinů, které produkují antigenem aktivované buňky.

2.1.3.3. Itovy buňky

Nazývají se také *hepatic stellate cells* (HSC), hvězdicové buňky, lipocyty, *fat stroing cells* (FSC), stelátní buňky či pericyty. Tyto buňky se nacházejí v subendotelovém (Disseho) prostoru. Mají hvězdicovitý tvar a svými výběžky obklopují jaterní sinusoidy a ovlivňují tak portální tlak. Obsahují kontraktilní proteiny aktin a myozin. Reagují na vazokonstrikční endoteliny, kontrakce těchto výběžků vede k zúžení krevní sinusoidů a tím k nárůstu portálního tlaku. HSC obsahují velké množství lipidů a skladují v tucích rozpustný vitamín A. Po poškození hepatocytů se HSC aktivují, proliferují, mění svůj fenotyp na myofibroblastům podobné buňky. Produkují cytokiny, růstové faktory, kolagen a mezibuněčnou hmotu. Nepochybně tak přispívají k rozvoji jaterní fibrózy.

2.1.3.4. Pit buňky – Pit cells

Pit cells se nachází v jaterních sinusoidech. Patří mezi vysoce pohyblivé lymfocyty ze skupiny přirozených zabíječů – *natural killers*. Mají výraznou cytotoxickou aktivitu a slouží k ochraně proti virovým infekcím a metastatickým nádorovým buňkám.

2.1.4. Funkce jater

Játra zaujímají strategicky významnou pozici v cirkulaci, jsou prvním orgánem, který se dostává do styku s krví přicházející ze střeva, což představuje přísun vstřebaných živin, které je potřeba zpracovat, ale také xenobiotik, toxinů a mikroorganismů střevního původu. Jaterní funkce můžeme rozdělit do pěti základních skupin, a to na metabolické, sekreční, vaskulární, biotransformační (detoxikační) a další funkce jater.

K metabolickým funkcím lze stručně říct, že játra zasahují do metabolismu většiny složek, sacharidů, lipidů, bílkovin a dalších látek. Slouží jako glukózový pufr = zabezpečení konstantní hladiny glukózy v krvi. Podle potřeby vychytávají a uvolňují glukózu, syntetizují a skladují glykogen. Vytváří glukózu z necukerných složek nebo naopak konvertuje glukózu na mastné kyseliny (MK) a následně na triacylglyceroly (TAG). Játra jsou místem s vysokou aktivitou β-oxidace MK. Probíhá tu tvorba značného množství cholesterolu a fosfolipidů, tvoří se lipoproteiny. Játra jsou jediným místem v organismu, kde se degraduje cholesterol a tvoří ketolátky. Hlavně kyselina acetooctová, která v jiné tkáni může být přeměněna zpět na acetyl-CoA a následně využita jako zdroj energie. Játra zachycují velmi účinně glukoplastické aminokyseliny (alanin, serin a treonin). Zajišťují syntézu plazmatických bílkovin, což má zásadní význam pro udržení onkotického tlaku, produkují angiotenzinogen, čímž mají podíl na regulaci krevního tlaku. Jsou místem transaminace, deaminace aminokyselin. Jsou jediným místem v organismu, kde se vytváří močovina. Ze sekrečních funkci je významná tvorba žlučí a tím spojená resorpce lipidů, syntéza žlučových kyselin, jako produkt metabolismu cholesterolu a vylučování žlučových barviv, které vznikají rozpadem hemoglobinu. Neméně důležitou funkcí jater je jejich vaskulární funkce. Játra slouží jako významná zásobárna krve. Probíhají zde obě fáze biotransformace látek a to solubilizace (oxidace, redukce, hydrolýza) a konjugace s kyselinou glukuronovou,

sírovou nebo s glycinem či taurinem. K dalším jejich funkcím patří např. skladování železa, vitaminů (A, D, B12), termoregulace.

Játra jsou životně důležitým orgánem s velkým množstvím nepostradatelných funkcí, zároveň jsou vzhledem ke svému umístění vystavena jako první působení toxických látek, které sem přichází cestou *vena portae* z gastrointestinálního traktu. Při selhání jaterních funkcí dochází k poruše homeostázy, objevují se hormonální poruchy, poruchy metabolismu a srážení krve, ascites, selhání ledvin a poruchy funkce mozku, které mohou vést k jaternímu kómatu a smrti.

2.1.5. Mitochondrie

Zajištění výše zmíněných funkcí jater je energeticky mimořádně náročné, je proto třeba věnovat zvláštní pozornost mitochondriím, které zajišťují transformaci chemické energie živin do molekuly adenosintrifosfátu (ATP). Mitochondrie jsou subcelulární organely endosymbiotického původu, ve kterých probíhá energetický metabolismus buňky. Jsou to semiautonomní organely, obalené dvojitou membránou. Mají svou vlastní cirkulární deoxyribonukleovou kyselinu (DNA), jsou schopny proteosyntézy pomocí vlastních ribosomů a rostou a dělí se nezávisle na buňce. Jejich počet je různý, závisí na typu buňky a mění se v závislosti na aktuálním stavu buňky. Počet a také struktura mitochondrií je jiná za fyziologických a za patologických stavů (Shapira, 1999; Skulachev, 1999). V buňce vytvářejí mitochondriální sítě, množí procesem podobným binárnímu dělení bakterií. Může však docházet i opačnému procesu, tedy fúzi dvou mitochondrií dohromady (Scheffler, 2001). V mitochondriích je lokalizovaný dýchací řetězec, Krebsův cyklus. Probíhá v nich β-oxidace MK, syntéza některých látek a další metabolické funkce.

2.1.5.1. Struktura mitochondrií

Mitochondrie jsou cytoplazmatické organely, převážně oválného tvaru. Vnější membrána odděluje organelu od cytoplazmy, zatímco vnitřní membrána se vchlipuje do nitra mitochondrií a odděluje vnitřní mitochondriální prostor (matrix) od mezimembránového prostoru. Membrány se liší svou strukturou, chemickým složením a vlastnostmi. Vnější membrána je propustná pro ionty a menší molekuly a není propustná pro bílkoviny. Vnitřní membránou proniká jen O_2, CO_2 a lipofilní látky (Scheffler, 2001). Mezimembránový prostor má tedy složení podobné složení okolního

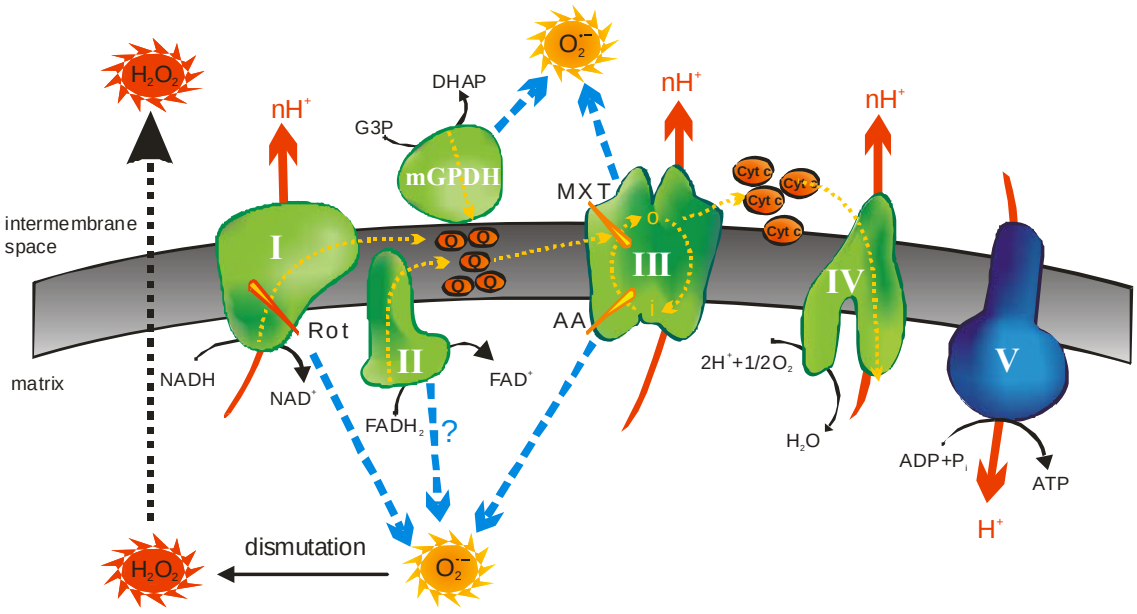
cytosolu. Obsahuje mnohem méně proteinů, než vnitřní mitochondriální prostor. Z bílkovin je v mezimembránovém prostoru zastoupen hlavně cytochrom c a různé kinázy. V obou membránách se nachází řada transportních komplexů. Mezi vnější a vnitřní membránou se vytvářejí kontaktní místa. Tato místa se pravděpodobně skládají ze složek zodpovědných za transport proteinů z cytosolu. Vytvářejí se díky přechodným interakcím mezi proteiny vnější a vnitřní membrány. Membrány spolu ale nefúzují. Bylo prokázáno, že počet kontaktních míst je závislý na energetickém stavu buňky (Perkins a Frey, 2000). Podobně jako bakteriální membrány obsahuje vnitřní membrána poměrně vysokou koncentraci kardiolipinu a nižší obsah cholesterolu (Scheffler, 1999; Skulachev, 1999). Kardiolipin je jediný lipid syntetizovaný v mitochondriích a je pro funkci mitochondrií nezbytný (Gohil et al., 2004). Vchlípeniny vnitřní membrány tvoří tzv. kristy. Mitochondriální DNA vykazuje několikanásobně vyšší stupeň mutací než jaderná DNA. To je dáno blízkostí míst vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS), nepřítomností histonů a omezeným reparačním aparátem (Wallace, 1999).

2.1.5.2. Funkce mitochondrií

Mitochondrie plní v buňce celou řadu funkcí. Jsou největším producentem energie ve formě ATP. Udržují redoxní potenciál a podílejí se na modulaci Ca^{2+} signálu. Produkují teplo a jsou zdrojem ROS (Křiváková et al., 2005). Kromě těchto základních funkcí se mitochondrie podílejí na dalších procesech, jako je buněčná signalizace a diferenciace buněk. Kontrolují buněčný cyklu a růst buněk (McBride et al,, 2006). V neposlední řadě se mitochondrie podílejí na indukci apoptotických a nekrotických procesů (Kaplowitz, 2002).

2.1.5.3. Dýchací řetězec a oxidativní fosforylace

Mitochondrie produkují 90 - 95% ATP procesem zvaným oxidativní fosforylace. Enzymové komplexy dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace jsou lokalizovány ve vnitřní mitochondriální membráně (Obr. 4).



Obr. 4: Enzymové komplexy respiračního řetězce. Mráček T., Fyziologický ústav AV ČR, Praha

Respirační řetězec se skládá ze čtyř enzymových lipoproteinových komplexů, které obsahují 4 - 46 peptidových podjednotek. Podjednotky jsou kódovány částečně mitochondriální DNA a částečně jadernou DNA. Výjimku tvoří komplex II, jehož 4 podjednotky jsou kódovány výhradně jadernou DNA. Komplexy respiračního řetězce tvoří soustavu oxidoredukčních článků s postupně se zvyšujícím redoxním potenciálem. NADH koenzym Q oxidoreduktáza (komplex I) přijímá vodík od NADH-dependentních dehydrogenáz a předává je na koenzym Q. Redukovaný koenzym Q přenáší vodík na komplex III. Komplex III předává elektrony cytochromu c a ten je přenáší na komplex IV (cytochrom c oxidáza (COX)). COX reaguje s molekulárním kyslíkem a vzniká kyslíkový anion, který se slučuje s protony na vodu. Koenzym Q přebírá vodík i od mitochodnriálních dehydrogenáz flavoproteinového typu, mezi něž patří komplex II (sukcinát koenzym Q oxidoreduktáza) a glycerofosfátdehydrogenáza. Energii uvolněnou při průchodu elektronů využívá komplex I, III a IV k pumpování protonů (H^+) z matrix do mezimembránového prostoru. Tím vzniká na vnitřní mitochondriální membráně elektrochemický potenciál ($\Delta\mu H^+$). Tento potenciál pak využívá ATP-syntáza (komplex V) pro tvorbu ATP (Rustin a Rötig, 2002; Senior et al., 2002; Weber a Senior, 2003). Většina ATP je z mitochondrií exportována pomocí ATP/ADP antiportu (ANT - adeninnukleotidový translokátor). $\Delta\mu H^+$ netvoří jen hnací sílu pro

syntézu ATP, ale také řídí transport iontů, substrátů a proteinů. $NAD(P)^+$ transhydrogenázy ve vnitřní mitochondriální membráně využívají $\Delta\mu H^+$ k přenosu vodíku z NADH na $NADP^+$ a podílejí se na udržování redoxního stavu buňky (Lemasters a Nieminen, 2001). Stupeň respirace závisí na $\Delta\mu H^+$. Při vysokém $\Delta\mu H^+$ respirační komplexy nemohou pumpovat H^+ a respirace je inhibovaná. ADP aktivuje ATP-syntázu, což vede k poklesu $\Delta\mu H^+$ a ke stimulaci respirace. $\Delta\mu H^+$ může být také snížen díky rozpřažení oxidativní fosforylace. H^+ tak obchází ATP-syntázu, a respirace se stává částečně nezávislou na syntéze ATP. Aktivita COX je alostericky ovlivňována množstvím ATP a ADP (Frank et al., 1996). Častým cílem chemického (toxického) účinku látek je právě respirační řetězec. Poškození dýchacího řetězce, tvorba ROS a významná úloha mitochondrií v regulaci buněčné smrti přispívají k trvalému zájmu o tyto buněčné organely (Kaplowitz, 2002).

2.1.5.4. Metody hodnocení funkce mitochondrií a aktivity mitochondriálních enzymů

K charakterizaci mitochondriálních respiračních funkcí se dnes využívá spektrofotometrické měření aktivit respiračních enzymových komplexů a vysoko-účinné oxygrafie (Barrientos, 2002; Barrientos et al., 2002). Spektrofotometrické měření aktivit jednotlivých enzymů respirace a oxidativní fosforylace je poměrně jednoduchá a citlivá metoda. Aktivita enzymů je měřena za maximální saturace enzymů substráty a kofaktory. Neměříme tedy aktivitu skutečnou, ale maximální. (Barrientos, 2002; Červinková et al., 2002). Oxygrafie je elektroanalytická metoda, kterou lze měřit konzumpci kyslíku v biologickém materiálu. Přidávání a kombinace specifických substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů respiračního řetězce umožní detailní posouzení změn energetického metabolismu a identifikovat místa případných defektů. Velkou výhodou oxygrafického měření je, že lze hodnotit všechny respirační komplexy najednou a odhalit i poruchy v jejich interakci (Barrientos, 2002; Červinková et al., 2002; Gnaiger a Kuznetsov, 2002; Gnaiger, 2001).

Jednou z dalších možností studia změn mitochondrií je turbidimetrické stanovení bobtnání (swelling) mitochondrií. Je to jednoduchá metoda, pomocí které lze sledovat jev *Mitochondrial permeability transition* (MPT) (Nicholls a Ferguson, 2001). Aktivace MPT vede k volné propustnosti vnitřní mitochondriální membrány pro protony s následným rozpřažením oxidativní fosforylace. Dochází k úniku iontů a substrátů do velikosti 1,5 kDa do cytosolu, což vede k osmotickým změnám uvnitř mitochondrií (Byrne et al., 1999; Lemaster, 1999).

2.2. Toxické poškození jater

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

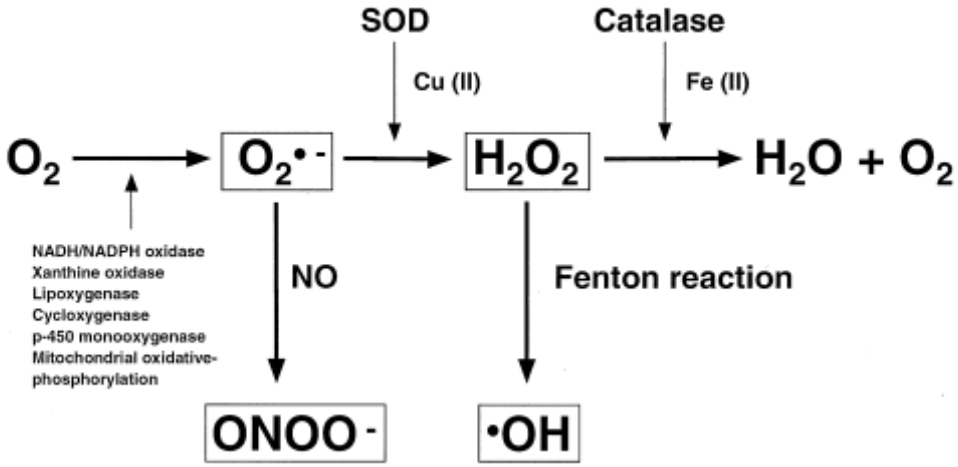
2.2.1. Volné radikály

Většina volných radikálu jsou deriváty kyslíku – reactive oxygen species (ROS) a deriváty dusíku – reactive nitrogen species (RNS). Jsou to velmi reaktivní látky, které obsahují jeden, nebo více nepárových elektronů a jsou schopné nezávislé existence (Southorn a Powis, 1988). Tyto látky jsou velmi heterogenní a vznikají ve velké míře při patologických procesech. Volné radikály vznikají všude tam, kde dochází k buněčnému poškození, ale velké množství vzniká v organismu i za fyziologických podmínek (Dröge, 2002). Jsou to látky, které velmi ochotně reagují s různými organickými molekulami (mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, nukleovými kyselinami, ale i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a dalších látek). Díky jejich reaktivitě se volné radikály staly velmi významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitního systému a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky, které oxidují buněčné komponenty a vedou k poškození nebo až ke smrti buněk (Thannickal a Fanburg, 2000).

2.2.2. ROS

Volné radikály a především ROS vznikají v organismu různými mechanismy. Ve velkém množství vznikají během infekce a nemoci. Významné množství volných radikálů vzniká činností mitochondrií. Vzhledem k faktu, že mitochondrie se nacházejí ve většině buněk, je jasné, že dýchací řetězec je jedním z největších producentů ROS. Redukce kyslíku v různých částech dýchacího řetězce generuje superoxidový radikál (O_2^-). Díky své chemické povaze má O_2^- tendenci přijímat volné elektrony a vytvářet

reaktivní radikál $O_2^{\cdot -}$. $O_2^{\cdot -}$ je samovolně nebo pomocí superoxiddismutázy (SOD) metabolizovám na H_2O_2. H_2O_2 je pak pomocí katalázy a peroxidázy rozložen na vodu a kyslík a nebo z něho vzniká další reaktivní radikál $HO^{\cdot}$ (hydroxylový radikál) (Obr. 5). Z toho vyplývá, že tvorba energie, která je nezbytná pro život organismu, je vždy spojena s tvorbou ROS (McCord, 1993; Siegel et al., 1999). Vedle redoxního systému dýchacího řetězce a cytochrom P450 monooxygenázy existuje ještě řada dalších zdrojů ROS. Mezi ně patří např. xantinoxidáza, cyklooxygenáza, lipoxygenáza, mitochondriální oxygenáza, NO-syntáza a NADH/NADPH oxidáza (Siegel et al., 1999). Volné radikály vznikají také působením ionizujícího záření s biologickými molekulami (Reily, 1994). Při větší produkci volných radikálů dochází k jejich akumulaci v organismu, což má za následek navození oxidačního stresu.



Obr. 5: Zdroje ROS tvořené endogenně buňkami a klíčové metabolické cesty. Převzato z (Yoshizumi et al., 2001).

ROS nejsou jen vedlejší produkty metabolismu, ale mají i fyziologickou funkci. ROS fungují jako důležité signální molekuly (Alberts et al., 1994; Elliott WH a Elliott DC, 1997). ROS a Ca^{2+} zajišťují komunikaci mezi mitochondriemi, jádrem a zbytkem buňky (Brookes et al., 2002). Reverzibilně modifikují některé proteiny a mění tak jejich enzymovou aktivitu (Orrenius, 2004). Jejich další významnou funkcí je zapojení v procesu fagocytózy. Vznikají při enzymatických interakcích fagocytů a makrofágů během aktivace imunitního systému. Neutrofilní leukocyty a makrofágy používají volné radikály k odstraňování zbytků mrtvých buněk a hlavně k usmrcování bakterií. Jejich plazmatická membrána je vybavena enzymovým komplexem – NADPH-oxidázou. Tento komplex se po pohlcení cizí částice aktivuje a redukuje kyslík na superoxid.

Dochází k respiračnímu vzplanutí. Vznikající superoxid se mění na peroxid vodíku a dále na hydroxylový radikál. Další enzym, který obsahují fagocytující buňky, je myeloperoxidáza, která katalyzuje tvorbu kyseliny chlorné z peroxidu vodíku a chloridových iontů. Kyselina chlorná reakcí se superoxidem dává vzniku dalšímu hydroxylovému radikálu (Babior, 1978).

Hladina volných radikálů musí být udržována na nízké úrovni a je regulována pomocí antioxidačních systémů. Vyčerpání těchto ochranných systémů vede porušení redoxní rovnovány a k následnému poškození a případně až ke smrti buňky (Lee a Wei, 2005).

2.2.3. Oxidační stres

Porušení rovnováhy mezi tvorbou a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku se nazývá oxidační stres. Může být vyvolán buď nadměrnou produkcí ROS, RNS nebo nedostatečnou funkcí antioxidačního systému, případně kombinací obou faktorů. Mezi hlavní příčiny oxidačního stresu patří infekce, záněty, toxemie, hypoxie-ischémie, xenobiotika (produkty metabolizmu léků, chemikálií, toxinů), dále hyperglykémie, hyperlipidemie, onkotické procesy a zvýšená metabolická aktivita. Kromě toho stárnoucí organismus (buňka) podléhá v určité fázi svého života oxidačnímu stresu (Djordjević, 2004).

2.2.4. Hlavní důsledky oxidačního stresu

Buňky obvykle snáší mírný oxidační stres, který často vyústí v zesílenou regulaci syntézy antioxidantů, které mají zajistit novou rovnováhu oxidačního-antioxidačního systému. Mírný oxidační stres může zesílit obranné mechanismy tak, aby chránily organismus před mnohem silnějším oxidačním stresem. Tyto adaptační mechanizmy často vyústí ve změny v genové expresi, které mají za následek zvýšení antioxidační obrany. Adaptace někdy ale nestačí zajistit dostatečnou ochranu a přetrvávající oxidační stres vede porušení homeostázy buněk. Buňky vstupují do stavu prodloužených buněčných změn, které vedou k poškození až ke smrti buňky (Halliwell a Gutteridge, 2003). V důsledku oxidačního stresu dochází k oxidaci DNA, lipoperoxidaci a oxidaci SH skupin proteinů (Kaplowitz et al., 2002).

2.2.4.1. Poškození DNA

ROS, hlavně hydroxylový radikál ($HO^{\cdot}$), reaguji s deoxyribózou a modifikují báze nukleových kyselin. Primární reakcí $HO^{\cdot}$ s DNA je vyjmutí vodíkového atomu z deoxyribózy, což vede k destrukci sacharidu a přerušení řetězce. $HO^{\cdot}$ se také snadno váže na purinové a pyrimidinové báze, za vzniku jejich hydroxyderivátů. Výsledkem těchto reakcí může dojít k chybnému párování bází při replikaci DNA a zavedení chyby do genetické informace. Poškození DNA vede k mutacím, přerušení polynukleotidového řetězce, ke vzniku kovalentních vazeb mezi DNA a proteiny. V konečném důsledku to může vest k inhibici proteosyntézy nebo k indukci apoptózy, stárnutí buněk a až k nekontrolovatelné proliferaci buněk (Geerts et al., 1994; Rice-Evans a Bruckdorfer, 1992; Wang a Hu, 2000; Wang et al., 1998).

2.2.4.2. Lipoperoxidace

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA – mastné kyseliny s více dvojnými vazbami) v buněčných membránách reagují s ROS za vzniku peroxidových radikálů. Nejprve vznikají tzv. prvotní intermediáty lipidové peroxidace. Tyto intermediáty jsou velmi reaktivní a rychle se přeměňují na stabilnější formy. V prvním kroku reaguje $HO^{\cdot}$ s dvojnou vazbou mastné kyseliny lipidové molekuly (LH) ($LH + HO^{\cdot} \Rightarrow L^{\cdot} + H_2O$). Dojde k vytržení vodíku z molekul lipidů v buněčné membráně. Tím z mastné kyseliny nebo lipidové molekuly vzniká uhlíkový radikál ($L^{\cdot}$), který spustí řetězovou reakci, v níž nově vzniklé volné radikály lipidových membrán reagují s dalším volným radikálem. Vzniklý $L^{\cdot}$ velmi ochotně reaguje s molekulárním kyslíkem. Výsledkem reakce je peroxylový radikál ($LOO^{\cdot}$) ($L^{\cdot} + O_2 \Rightarrow LOO^{\cdot}$). $LOO^{\cdot}$ je schopen vytrhnout elektron z mastné kyseliny sousedního lipidu, která se tak stává novým radikálem, zatímco peroxylový radikál se přemění na lipidový hydroperoxid (LOOH) ($LOO^{\cdot} + LH \Rightarrow LOOH + L^{\cdot}$). $L^{\cdot}$ opět reaguje s O_2 a celý cyklus se opakuje. Radikálová reakce se tak v lipidech propaguje, dokud se radikál PUFA nesetká s jiným radikálem (případně s vitamínem E), kdy se řetězová reakce ukončí vznikem stabilní sloučeniny (terminace). Tím však změny v lipidech nekončí. Výsledkem předchozích reakcí jsou hydroperoxidy a cyklické peroxidy mastných kyselin. Peroxidové radikály mohou způsobit značné poškození DNA a mohou být jednou z mutagenních složek oxidačního stresu. Peroxidové radikály se přeměňují v konečné produkty lipoleroxidace. Vznikají reaktivní aldehydy, např. malondialdehyd (MDA), které reagují s proteiny, za vzniku kovalentních sloučenin (Esterbauer et al., 1988; Madan et al., 2006; Tuma, 2002). Tyto

látky (MDA) mají delší biologický poločas a lze je použít jako markery stupně lipoperoxidace. Hydroperoxidy (LOOH) se chemicky chovají stejně jako peroxid vodíku, tj. jsou poměrně stabilní, dokud se nesetkají s tranzitními kovy, které katalyzuji Fentonovu reakci. Jde o dvojmocné železo a jednomocnou měď, které reagují s LOOH za vzniku alkoxylového radikálu ($LO^{\cdot}$) LOOH + Fe^{2+} (Cu^{+}) => $LO^{\cdot}$ + Fe^{3+} (Cu^{2+}) + OH^{-} (Siegel et al., 1999). Tyto změny ve struktuře membránových lipidů vyvolávají změny v propustnosti membrán a významně narušují jejich funkce, jako je transport iontů, rozpoznávání a signalizace receptorů a porušení osmotických gradientů (Tuma, 2002).

2.2.4.3. Poškození proteinů

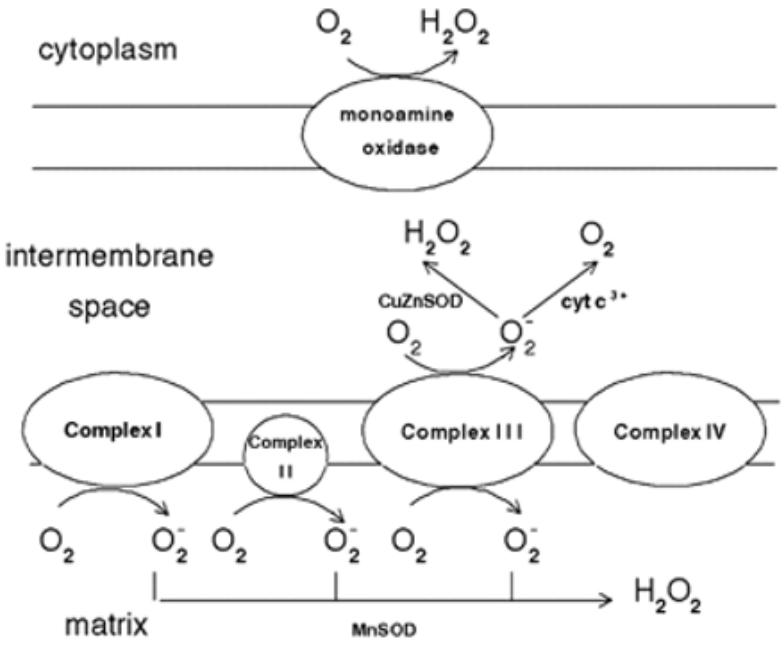
Dalším cílem působení volných radikálů jsou proteiny. Některé ROS a RNS mohou bezprostředně oxidovat aminokyselinové zbytky. Při oxidaci prolinu dojde k přerušení peptidového řetězce (Davies a Dean, 1997). Dochází k oxidaci membránových proteinů (transportních kanálů), lipoproteinů (LDL, VLDL) a enzymů. Následky těchto reakcí jsou pro funkci buněk velmi závažné. Enzymy mění svou aktivitu, transportní kanály nejsou schopny udržet iontovou homeostázu buňky. V cytosolu se hromadí Ca^{2+} ionty, čímž se aktivují proteázy a fosfolipázy. Mění se počet SH skupin proteinů a modifikované aminokyseliny vedou ke vzniku nových antigenních determinant a k rozvoji autoimunitních reakcí.

2.2.5. Antioxidační ochranný systém

Savčí mitochondrie mají několik mechanismů, kterými eliminují vznikající volné radikály (Obr. 6). Přestože při buněčném dýchání dochází neustále k produkci ROS, jsou tyto molekuly dostatečně odstraňovány a udržovány na nízké hladině (Andreyev et al., 2005; Qu et al., 2001).

Antioxidační systém buněk je složen z enzymatických a neenzymatických antioxidantů. Mezi antioxidační enzymy patří:

- superoxiddizmutáza, která katalyzuje reakci $2O_2^{\cdot -} + 2H^{+} => H_2O_2 + O_2$
- kataláza, která rozkládá peroxid vodíku $H_2O_2 => H_2O + O_2$
- glutathionperoxidáza, která katalyzuje reakci $2GSH + 2H_2O_2 => 2H_2O + GSSG$
- glutathionreduktáza, redukující glutathion $GSSG + NADPH + H^{+} => 2GSH + NADP^{+}$



Obr. 6: Mitochondriální ROS a antioxidační síť. Převzato z (Turrens, 2003).

Neenzymatické antioxidanty lze rozdělit na vysokomolekulární a nízkomolekulární endogenní antioxidanty. Mezi vysokomolekulární antioxidanty lze zařadit látky, které jsou schopné vázat přechodné prvky (železo a měď) a měnit jejich oxidoredukční vlastnosti. Jedná se o transferin, laktoferin, feritin, haptoglobin, hemopexin a ceruloplazmin. Reaktivitu volných radikálů též ovlivňují thiolové skupiny některých proteinů, např. albumin, který je schopen vázat Cu^{2+} ionty (Attieh et al., 1994; Aust, 1995; Reilly a Aust, 1998).

Mezi nejdůležitější neenzymatický (nízkomolekulární) antioxidant patří glutathion. Glutathion je tripeptid (γ-L-glutamyl-Lcysteinyl-L-glycin), který se v buňkách vyskytuje ve velmi vysokých koncentracích; cca 1 - 10 mM (Pastore et al., 2003). Nejvyšší nitrobuněčné koncentrace v lidském těle jsou nalézány v hepatocytech, leukocytech, erytrocytech či buňkách ledvin. Struktura této molekuly je zajímavá díky přítomnosti γ-glutamylové vazby, která brání proti naštěpení nejrůznějšími peptidázami. Glutathion také disponuje SH skupinou cysteinového zbytku, která zodpovídá za většinu z jeho důležitých funkcí a umožňuje snadné zapojení do mnoha oxidačně-redukčních pochodů. V organismu převažuje jeho redukovaná forma (GSH). GSH se velmi snadno oxiduje a s další molekulou GSH tvoří glutathiondisulfid (oxidovaný glutathion – GSSG) (Roušar et al., 2005). Hlavní funkcí glutathionu je spoluúčast na nejrůznějších antioxidačních pochodech v buňkách. Díky svým vlastnostem dokáže

GSH přímo eliminovat hydroxylový radikál, který způsobuje těžká poškození většiny biomolekul zásluhou své vysoké reaktivity. Glutathion též udržuje v redukované formě sulfhydrylové skupiny proteinů, cysteinu a koenzymu A. Další důležitou antioxidační úlohou tohoto tripeptidu je schopnost reparace DNA poškozené volnými radikály, stejně jako regenerace dalších antioxidantů – vitaminu C či α-tokoferolu (DeLeve a Kaplowitz, 1991).

2.2.6. Mitochondrie a ROS

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

V literatuře existuje mnoho údajů, které popisují peroxidační poškození jednotlivých enzymatických reakcí probíhajících v jaterních mitochondriích (Kennedy

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

2.2.7. Terciární butylhydroperoxid

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

2.2.8. Trijodtyronin

Účinky hormonů štítné žlázy na buněčný metabolismus jsou známy řadu let. Dřívější studie ukázaly, že tyto hormony zvyšují syntézu komponent dýchacího řetězce kodovaných jak v jádře, tak i v mitochondriích. Trijodtyronin indukuje děje, které vedou ke změnám ve složení lipidů mitochondriálních membrán, zvyšuje aktivitu

adenin nukleotidových translokáz a stimuluje buněčnou respiraci (Kalderon et al., 1995; Venditti et al., 2006). Je obecně uznáváno, že aerobní metabolismus zvyšuje tvorbu ROS a také skutečnost, že hormony štítné žlázy zvyšují aktivitu respiračního řetězce. Hypertyreóza vede ke zvýšení bazálního metabolismu, který je asociován se zvýšením buněčného dýchání v cílových tkáních, jako jsou játra, ledviny, srdce a kosterní svalovina (Schwarz a Oppenheimer, 1978; Venditti et al., 2003). V nedávné době se podařilo prokázat, že hypermetabolický stav indukovaný hypertyreózou má za následek oxidační poškození tkání. Schopnost hormonů štítné žlázy navodit oxidační stres lze demonstrovat zvýšenou lipoperoxidací v játrech, srdci a ve svalech u hyperthyreózních potkanů (Tapia et al., 1999). Naopak jsou práce, které uvádí, že trijodtyronin (T_3) působí spíše jako antioxidant (Grant, 2007).

2.2.9. Metody hodnocení oxidačního stresu

Možnosti stanovení míry oxidačního stresu v buňkách (tkáních, orgánech) je možné rozdělit celkem do tří skupin. První skupinu metod tvoří přímá stanovení hladiny volných radikálů (superoxid, hydroxylový radikál), což umožňuje např. metoda elektronspinové rezonance nebo spektrofotometrické stanovení ROS s využitím fluorescenčních sond. Další možností je detekce látek, které specificky vznikají následkem reakce volných radikálů s nejrůznějšími biomolekulami. Takto je možné detekovat produkty poškození DNA pomocí metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) či hmotnostní spektrometrie (MS), látky vznikající lipoperoxidací mastných kyselin, jako jsou MDA, konjugované dieny, 4-hydroxynonenal či specifické izoprostany (využití HPLC a spektrálních metod) a karbonylové sloučeniny, které vznikají následkem oxidace proteinů (HPLC, Western blotting, MS). Třetí skupinou stanovení, která poskytují informace o oxidačním stavu buněk, je analýza tzv. antioxidantů. Např. stanovení poměru oxidovaného a redukovaného glutathionu (Roušar et al., 2005). Glutathion se vyskytuje celkem ve dvou formách – redukované (GSH) a oxidované (GSSG). Poměr mezi těmito dvěma formami informuje o oxidačním stavu uvnitř buněk, přitom za fyziologického stavu je intracelulárně více než 99% glutathionu ve formě GSH (Deneke a Fanburg, 1989). Během nejrůznějších patologických dějů se ale tento poměr velmi intenzivně mění ve prospěch oxidované formy, a proto může sloužit pro posouzení oxidačně-redukčního stavu uvnitř buněk (Roušar et al., 2005).

Mezi další metody, pomocí který lze hodnotit oxidační stres patří měření spotřeby kyslíku pomocí *High Resolution Oxygraph OROBOROS 2k.* Pomocí tohoto přístroje lze hodnotit vliv prooxidačních látek na aktivitu jednotlivých komplexů dýchacího řetězce. Dále měření změn membránového potenciálu pomocí fluorescenčních sond (Safranin O, Rhodamin 123) a sledování bobtnání mitochondrií, jako indikátoru změn v propustnosti mitochondriálních membrán.

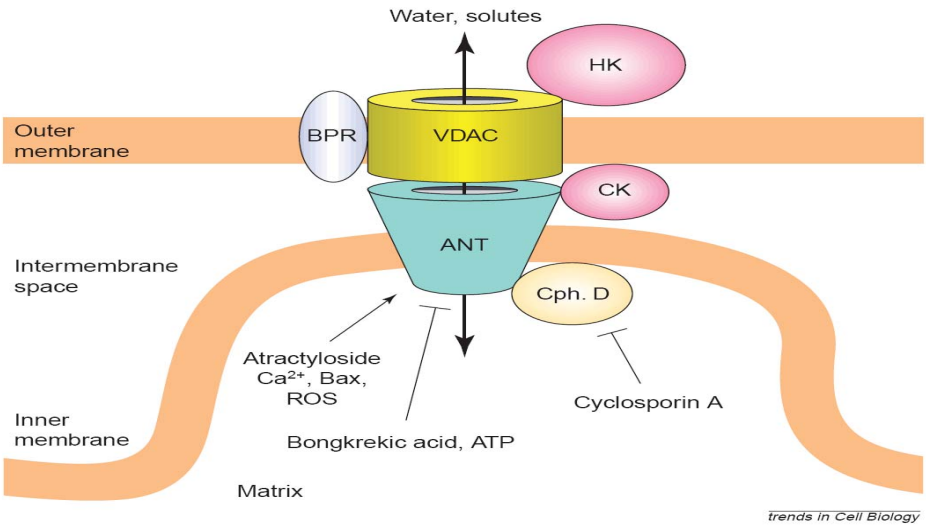
2.3. MPTP

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

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

2.3.1. Složení MPTP

MPTP je Ca^{2+} dependentní, cyklosporin A senzitivní kanál, který se nachází v místech kontaktu vnitřní a vnější mitochondriální membrány. MPTP byl definován na základě farmakologických a biochemických vlastností. Jde o multiproteinový komplex, jehož složení není zatím jednoznačně definováno. Součástí tohoto kanálu je napěťově řízený kanál *voltage dependent anion selective channel* (VDAC) vnější membrány, adenin nukleotidový translokátor (ANT) vnitřní membrány, cyklofilin D (Cyp D) a řada dalších proteinů jako je hexokináza, Bax, Bid a kreatinkináza jsou součástí tohoto komplexu (Obr. 7) (Connern et al.,1994; Crompton et al., 1998; Halestrap, 2002).



Obr. 7: Jednotlivé části MPTP. Převzato z (Desagher a Martinou, 2000).

2.3.2. Funkce MPTP

V podmínkách *in vitro*, otevření MPTP vede primárně k depolarizaci membrán a sekundárně k bobtnání mitochondrií. V podmínkách *in vivo* se MPTP podílí na regulaci koncentrace Ca^{2+} v matrix, pH, transmembránového potenciálu, a objemu. V tomto případě otevření tohoto póru hraje důležitou roli při toxickém, hypoxickém, či oxidačním poškozením buňky (Bernardi, 1996). MPT je zapojen jak do procesu apoptózy, tak nekrózy buněk (Crompton, 1999, Kroemeret a Reed, 2000).

Zvýšená koncentrace Ca^{2+}, anorganického fosfátu (Pi) v matrix mitochondrií, oxidační stres a deplece adenin nukleotidů vede k otevření MPTP. Otevření póru je za

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

2.3.3. Faktory, které regulují MPTP

MPTP se označuje jako Ca^{2+} dependentní, cyklosporin A senzitivní kanál. Na regulaci MPTP se podílí řada faktorů. Mezi nejznámější induktory MPTP patří porucha homeostázy Ca^{2+} nebo anorganického fosfátu či zvýšená tvorba ROS (Byrne et al., 1999; Lemaster, 1999). Nejznámějším inhibitorem tohoto póru je cyklosporin A (CsA), který se váže na cyklofilin D a tím ovlivňuje jeho schopnost navázat se na MPTP.

2.3.3.1 Swelling mitochondrií a MPTP – dependentní a independentní mechanismy

Studia hormonální regulace jaterního metabolismu demonstrovaly, že stimulace buněčné respirace a oxidativní fosforylace jsou kritické body při aktivaci tohoto póru (Halestrap, 1994). Podařilo se prokázat, že zvýšení mitochondrialní koncentrace Ca^{2+} vede k aktivaci tří kalcium senzitivních mitochondriálních dehydrogenáz (pyruvátdehydrogenáza, isocitrátdehydrogenáza a 2-oxoglutarátdehydrogenáza). Zvýšení $NADH/NAD^+$ pak stimuluje dýchání s následnou produkcí ATP (McCormack et al., 1990). Nicméně vzestup NADH je jen přechodný a je následován poklesem na původní úroveň, avšak rychlost respirace a produkce ATP zůstávají zvýšeny. Zvýšení matrixového objemu stimuluje oxidaci NADH tím, že zvyšuje rychlost toku elektronů z komplexu I na ubichinon (Halestrap, 1994; Halestrap, 1989). Kalcium dependentní zvýšení matrixového objemu je způsobené vstupem K^+ iontů. Tato změna v iontové

rovnováze vede k osmotickému nasávání vody (swelling mitochondrií). Rozsáhlé studie tohoto póru vedou k závěru, že protein odpovědný za tento transport je ANT. Jde o protein, který je součástí vnitřní membrány a jehož rolí je za normálních podmínek translokace ATP a ADP přes vnitřní membránu. Pokud nejsou vazebná místa pro ATP a ADP obsazena nukleotidy, což se za daných podmínek stává jen zřídka, se ANT konvertuje na kanál. Nicméně, při zvýšené koncentraci Ca^{2+} v matrix mitochondrií dochází také k akumulaci pyrofosfátu v matrix a může přechodně dojít k odstranění adeninových nukleotidů z některé z ANT molekul (Halestrap, 1989).

2.3.3.2. Role Ca^{2+}

Vzestup Ca^{2+} v matrix je považován za primární spouštěč, který vede k otevření MPTP. Koncentrace kalcia nutná pro otevření tohoto póru je, ale silně závislá na dalších faktorech (Bernardi et al., 1999; Gunter a Pfeiffer, 1990; Halestrap, 1999). Je známa celá řada faktorů, které značně zvyšují citlivost póru k Ca^{2+} iontům. Mezi tyto faktory patří: oxidační stres, deplece adenin nukleotidů, zvýšená koncentrace anorganického fosfátu a depolarizace mitochondrií. Za nízkoenergetického stavu je tento pór také citlivý ke konformačním změnám v uspořádání ANT a může být aktivován také pomocí karboxyatraktylosidu, případně inhibován kyselinou bongkrekovou. Nízké pH (< 7.0) je silným inhibitorem MPTP, což je důsledkem kompetice protonů s Ca^{2+} o vazebná místa (Bernardi et al., 1992; Halestrap, 1991; Haworth a Hunter, 1979). Vazebné místo pro vápník je důležitým místem v regulaci MPTP, neboť další bivalentní kationty (Sr^{2+}, Mn^{2+}, Ba^{2+} a Mg^{2+}) působí jako inhibitory tohoto póru (Bernardi, 1999; Haworth a Hunter, 1979).

2.3.3.3. Role ROS

Nejznámějšími induktory MPTP jsou Ca^{2+} ionty a ROS (Lemasters a Nieminen, 2001). Zvýšení hladiny Ca^{2+} stimuluje produkci ROS. ROS oxidují volné thiolové skupiny membránových komplexů včetně ANT a mění jejich konformaci. Mohou také oxidovat kardiolipin, což má za následek uvolnění cytochromu c z vazby na tento fosfolipid (Petrosillo et al., 2004). Ca^{2+} a ROS jsou navíc signální molekuly, které ovlivňují transkripci genů. Ca^{2+} a ROS spolu při otevírání pórů také spolupracují a vzájemně zvyšují svůj účinek (Brookes, 2004; Gordeeva et al., 2003; Iverson a Orrenius, 2004; Kanno et al., 2004; Starkov et al., 2004)

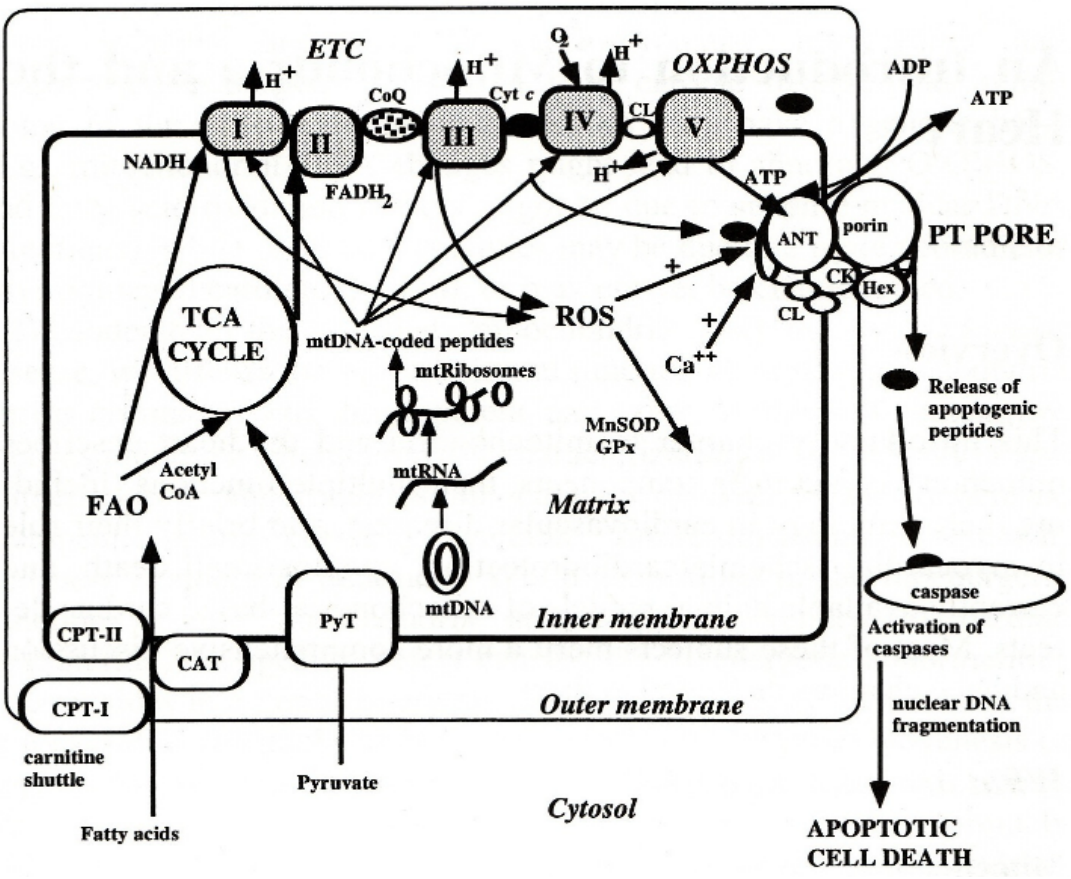
Fosfát a prooxidační činidla jako je např. t-BHP navozují MPT. Tento jev je v přítomnosti Ca^{2+} vyvolán zvýšením produkce ROS (Kowaltowski et al., 1995). ROS atakují SH skupiny proteinů, které jsou součástí mitochondriálních membrán, což vede k jejich oxidaci a vzájemnému propojení (crosslinkage) (Bindoli et al., 1997; Castilho et al., 1996; Castilho et al., 1995; Fagian et al., 1990). MPT navozený oxidací SH skupin, je reverzibilní a to pokud v krátkém časovém období (10 - 20) minut dojde k odčerpání Ca^{2+} iontů (Castilho et al., 1996). Po tomto časovém období se indukovaná permeabilizace membrán stává ireverzibilní. Naproti tomu je v přítomnosti vysoké koncentrace Pi ($\geq$ 4 mM) permeabilizace membrán nevratná prakticky okamžitě, což je zapříčiněno vysokým stupněm lipoperoxidace (Kowaltowski et al., 1996).

2.3.4. MPTP a buněčná smrt

Mitochondrie mohou ovlivnit smrt buňky celou řadou mechanismů. Tyto mechanismy se navzájem překrývají. Dýchací řetězec je jedním z největších endogenních zdrojů ROS. Poškození dýchacího řetězce vede ke zvýšené tvorbě ROS a vyčerpání kapacity antioxidačního ochranného systému (Wallace, 1999). Snížená tvorba ATP, porušení permeability mitochondriální membrány a oxidační poškození Ca^{2+} translokáz vede ke zvýšení cytoplazmatické koncentrace Ca^{2+} a následné aktivaci nespecifických hydroláz. Zvýšená produkce ROS aktivuje otevření MPTP a může vést k apoptóze (Jakus a Lopuchová, 1999; Kadenbach, 2003; Kaplowitz, 2002; Tsujimoto et al., 2006; Wallace, 1999; Wallace et al.,1997; Zhang et al., 2001). Propojení respiračního řetězce s MPTP a dalších faktoru regulujících tento pór je uvedeno v Obr. 8.

Apoptóza a nekróza jsou dva rozdílné typy buněčné smrti s odlišnými morfologickými a biochemickými znaky. Zatímco nekróza je často vyvolána vnějšími vlivy, apoptóza představuje striktně regulovaný proces zodpovědný především za odstranění starých, poškozených nebo nepotřebných buněk (Kim et al., 2003; Lemasters, et al., 2002; Lemasters, 1999;). Role mitochondrií v procesu buněčné smrti je velmi komplexní. Vysoká intramitochondriální koncentrace Ca^{2+}, Pi, ROS a dalších látek má za následek nespecifické zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány pro ionty a substráty do 1,5 kDa (Lemasters, 1999; Orrenius, 2004; Scheffler, 2001). Otevření pórů však souvisí i s apoptózou. Při prasknutí vnější mitochondriální membrány jsou z mitochondrií uvolněny různé proteiny včetně

cytochromu c. Cytochrom c se v cytoplazmě váže s APAF1 a dATP za vniku apoptozomu, ten následně aktivuje kaspázu 9. Některé proteiny jako AIF procházejí do jádra, kde aktivují endonukleázy (Bernardi et al., 1999; Honda et al., 2004; Lemasters, 1999; Orrenius et al., 2004). Apoptózu spouští také navázání některých ligandů na specifické receptory v plazmatické membráně (FAS, Apo-1, CD95, TNF-R atd.). Po navázání ligandu je aktivována kaspáza 8 a do mitochondriální membrány jsou integrovány proapoptické členy Bcl-2 rodiny (Bid, Bax). TNF zvyšuje produkci ROS. V některých typech buněk apoptóza nevyžaduje účast mitochondrií. (Andreyev a Fiskum, 1999; Brustovetsky et al., 2002; Petrosillo et al., 2004; Scheffler, 1999). Mechanismus uvolnění cytochromu c bez prasknutí vnější membrány není jasný. Předpokládá se účast proapoptických členů Bcl-2 rodiny a VDAC. Vzhledem k tubulárnímu uspořádání krist je možné, že nabobtnání matrix a narovnání krist je podmínkou masivnějšího uvolnění cytochromu c do cytosolu (Petrosillo et al., 2004). MPTP se tedy uplatňuje jak při nekróze, tak apoptóze.



Obr. 8: Propojení enzymových komplexů respiračního řetězce s MPTP. Převzato z Marin-Garcia, 2005).

2.3.5. Metody hodnocení MPT

Průběh MPT lze u izolovaných mitochondrii sledovat pomocí několika metod. Jednou z hlavních metod je hodnocení bobtnání mitochondrií, které je asociováno s poklesem rozptylu světla. Při bobtnání mitochondrií dochází ke změně indexu lomu a tím následně klesá množství rozptýleného světla. Tento pokles lze hodnotit turbidimetricky jako pokles absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce (520 nm).

Jako další metodu lze použít hodnocení změn mitochondriálního membránového potenciálního (MMP) za použití fluorescenčních barviv nebo $TPMP^+$ (Trifenylmethylfosfonium) elektrody. Mezi méně používané metody patří měření uvolněného naakumulovaného kalcia pomocí kalcium senzitivních barev nebo elektrod a měření koncentrace [^{14}C] v sacharóze, která prošla do mitochondrií. Jde o velmi spolehlivou techniku, která ale vyžaduje speciální přístrojové vybavení. Nevýhodou těchto technik je to, že rozpojení oxidativní fosforylace nemusí vždy znamenat, že došlo k otevření MPTP. Proto je u této metody nezbytné doplnit měření o záznam, kdy je použit CsA jako specifický inhibitor MPTP (Crompton, 1999; Halestrap et al., 2002; Halestrap, 1999).

Turbidimetrická metoda, která se nejvíce používá pro hodnocení MPTP, má jednu nevýhodu a to, že neposkytuje přesné hodnoty. Metoda poskytuje výsledky ve formě křivek, které charakterizují jen pokles absorbance v čase. Z těchto výsledků lze sice odvodit rozdíly v rychlosti a rozsahu bobtnáni, avšak z těchto křivek lze jen velmi obtížně získat přesné údaje o kinetice sledované reakce nezbytné pro hodnocení řady různých faktorů, které funkci kanálu ovlivňují. Proto jsme značnou část práce věnovali dopracování nové metody pro hodnocení funkce MPTP, kterou na našem pracovišti začal používat v rámci své diplomové (magisterské) práce Tichý (2006).

3. CÍLE PRÁCE

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

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

Specifické cíle:

1. Posouzení peroxidačního poškození hepatocytů v primární kultuře.

2. Studium vlivu t-BHP na změny aktivit enzymů respiračního řetězce na izolovaných mitochondriích jater potkana *in vitro.*

3. Optimalizace turbidimetrické metody pro měření bobtnání izolovaných mitochondrií jako ukazatele MPT.

4. Studium přímého účinku t-BHP a T_3 na Ca^{2+}-dependentní MPTP *in vitro.*

5. Posoudit, zda zvýšená tvorba ROS indukovaná podáním T_3 potkanům *in vivo* ovlivňuje propustnost mitochondriálních membrán (MPT).

6. Studium citlivosti Ca^{2+}-dependentního MPTP na úrovni tkání.

4. METODIKY

4.1. Použité chemikálie

Běžně používané chemikálie: NaCl, KCl, KOH, $CaCl_2$, $MgSO_4.xH_2O$, $Na_2HPO_4.12H_2O$, KH_2PO_4 a $NaHCO_3$ byly zakoupeny od firmy Lachema. Kolagenáza (Collagenasa cruda) byla od firmy SEVAC. Ostatní chemikálie, pokud není specifikováno jinak, byly od firmy Sigma-Aldrich.

4.2. Laboratorní zvířata

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

4.3. Izolace hepatocytů

Pro izolaci hepatocytů jsme použili dvoustupňovou kolagenázovou perfuzi jater, která byla zavedena v roce 1969 (Berry a Friend, 1969). Tento postup později modifikoval Seglen (Seglen, 1976). Jde o metodu, při které se játra nejprve promývají pufrem bez obsahu Ca^{2+} iontů a následně jsou perfundována roztokem s obsahem kolagenázy a Ca^{2+} iontů. Absence vápenatých iontů v izolačním médiu při prvním kroku perfuze je nezbytná pro rozrušení desmozomálních spojů mezi buňkami, v dalším kroku je přítomnost Ca^{2+} nutná pro funkci kolagenázy, která rozruší extracelulární matrix. Výhodou této metody je vysoký výtěžek buněk (z 1 g jaterní tkáně lze získat asi 40 - 60 x 10^6 hepatocytů) a malé poškození buněk způsobené izolací (viabilita 85 - 95%) (Berry et al., 1991), což prokazují i výsledky naší laboratoře. Nejčastěji se používá surová kolagenáza izolovaná z bakterií *Clostridium histolyticum*. Použitím

čištěné kolagenázy se dosahuje nižších výtěžků a viabilita získaných buněk je také nižší (Berry et al., 1991; Červinková et al., 2007).

Princip metody

1. Perfuze (bez recirkulace) jater médiem bez obsahu Ca^{2+} iontů.
2. Recirkulační perfuze jater médiem, které obsahuje kolagenázu a Ca^{2+} ionty.
3. Jemné mechanické rozvolnění tkáně, které naruší adhezní síly mezi jednotlivými buňkami a následně se hepatocyty oddělí od ostatních jaterních buněk pomocí centrifugace.

Postup izolace:

Odběry jater na izolaci hepatocytů byly prováděny v eterové narkóze potkanů. Stěnu břišní jsme zvířatům dezinfikovali jodovou tinkturou. Nástřihem kůže a svaloviny do tvaru písmene „V“ jsme otevřeli dutinu břišní. Orgány dutiny břišní jsme odsunuli k levé straně těla zvířete, čímž jsme získali přístup k *v. cava inferior*. Do *v. cava inferior* jsme aplikovali heparin v dávce 0,3 ml o koncentraci 833 m.j./ml (Heparin Léčiva, 10 ml o koncentraci 5 000 m.j./ml, ředěný fyziologickým roztokem). Uvolnili jsme si *v. portae* a vložili pod ní podvaz. Do takto připravené *v. portae* jsme zavedli kovovou kanylu, upevnili a napojili ji na perfuzní aparaturu (Obr. 9). Perfuzní roztoky byly temperovány na 37°C. V prvním kroku jsme játra propláchli *in situ* roztokem bez kalcia (roztok A), (složení roztoku A, viz níže). Důsledkem perfuze došlo k rychlému odbarvení jater, což je způsobeno vymytím krve izolačním roztokem. Vlivem promývání dochází ke zvětšení jater. Aby nedošlo k mechanickému poškození buněk zvýšeným tlakem je nutné prostřihnout aortu a dolní dutou žílu. Následně jsme zastavili průplach a co nejrychleji vyjmuli játra z dutiny břišní. Další kroky izolace hepatocytů se provádí už v podmínkách *in vitro*. Játra jsme opláchli v kádince s fyziologickým roztokem a upevnili do stojánku a poté dokončili jejich proplach roztokem A. Celkový objem roztoku A použitého pro jednu izolaci je 200 ml. V další části izolace jsme játra upevněná ve stojánku ponořili do kádinky s roztokem B a zahájili 14 min trvající recirkulační perfuzí jater roztokem B za konstantního perfuzního tlaku. Roztok B obsahoval kolagenázu (Collagenasa cruda, SEVAC, Česká Republika) a vápenaté ionty (složení roztoku B, viz níže). Po 14ti minutách jsme játra ponořili do Krebs-Henseleitova média s hovězím sérovým albuminem (roztok C, viz níže). Jaterní tkáň jsme jemně mechanicky rozvolnili. Suspenzi buněk jsme přefiltrovali přes 4 vrstvy

sterilní gázy přímo do centrifugační zkumavky a centrifugovali (5 min, 28 g, 4°C; Rotina 35R, Hettich). Supernatant jsme odsáli a opakovaně resuspendovali roztokem C a centrifugovali. Centrifugaci jsme opakovali třikrát. Ihned po izolaci jsme stanovili viabilitu a denzitu izolovaných hepatocytů.

Složení izolačních médií:

Roztok A: 8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,0977 g $MgSO_4.xH_2O$; 0,1206 g $Na_2HPO_4.12H_2O$; 0,06 g KH_2PO_4; 2,188 g $NaHCO_3$; 0,19 g EGTA, do 1000 ml doplněno destilovanou vodou, 7 min syceno směsí: 95% O_2 + 5% CO_2, aby výsledné pH bylo 7,3 - 7,4.

Roztok B: 4,8 g NaCl; 0,24 g KCl; 0,05862 g $MgSO_4.xH_2O$; 0,07236 g $Na_2HPO_4.12H_2O$; 0,036 g KH_2PO_4; 0,3528 g $CaCl_2.2H_2O$, 1,314 g $NaHCO_3$; doplněno do 600 ml destilovanou vodou, 7 min syceno směsí: 95% O_2 + 5% CO_2, aby výsledné bylo pH 7,3 - 7,40; 0,045 g surové kolagenázy do 200 ml recirkulačního roztoku.

Roztok C: 6,9 g NaCl; 0,36 g KCl; 0,1441 g $MgSO_4.xH_2O$; 0,13 g KH_2PO_4; 0,374 g $CaCl_2.2H_2O$; 2 g $NaHCO_3$; 0,9 g glukózy, doplněný do 1000 ml destilovanou vodou pro infúze; přidat 1,333 g albuminu do 100 ml C roztoku.

Obr. 9: Aparatura používaná k izolaci hepatocytů: Vodní lázeň zahřívá perfuzní roztoky v kádinkách na 37°C, odtud jsou roztoky vedeny do zásobníku s izolačními roztoky. Zásobník je umístěn přibližně 40 cm nad kádinkami s izolačními roztoky, jednotlivé části perfuzní aparatury jsou spojeny silikonovými hadicemi o průměru 5 mm.

4.4. Stanovení viability izolovaných hepatocytů pomocí exkluze trypanové modři

Trypanová modř je sodná sůl toluidin-diazo-diamino-naftol-disulfonové kyseliny, která má schopnost procházet plazmatickou membránou do buňky. Buňky, které mají neporušenou plazmatickou membránou, ji vylučují zpět. Naopak v buňkách, které ztratily vlivem poškození membránový potenciál, se akumuluje.

Postup:

Pro stanovení jsme použili 10 µl resuspendovaných izolovaných buněk, které jsme napipetovali do 990 µl Krebs-Henseleitova média. 10 µl takto naředěné suspenze buněk (100 x) jsme na podložním sklíčku smíchali s 10 µl 0,4% trypanové modři (Tryptan blue, Sigma-Aldrich) přikryli krycím sklíčkem. Pomocí světelného mikroskopu (LABOVAL 4, CARL ZEISS, JENA) při 200 násobném zvětšení jsme v 10 polích počítali živé (neobarvené) a mrtvé (modře zabarvené) buňky. Výsledek se udává jako poměr počtu živých buněk k celkovému počtu hodnocených buněk v procentech.

4.5. Stanovení počtu buněk

Izolované hepatocyty jsme opět naředili (100 x) v Krebs-Henseleitově médiu a naplnili Bürkerovu komůrku. Počet buněk stanovujeme počítáním pomocí světelného mikroskopu (LABOVAL 4, CARL ZEISS, JENA) stejně jako se stanovuje počet krevních elementů.

4.6. Použití suspenze hepatocytů

Hepatocyty pro krátkodobou inkubaci s testovanými chemikáliemi nevyžaduji kultivaci buněk adherovaných na vhodném povrchu. Pro pokusy lze použít suspenzi izolovaných hepatocytů (Obr. 10A). Dostatečná viabilita a funkční aktivita hepatocytů v suspenzi však přetrvává pouze po dobu několika hodin (4 - 6 hod). Suspenze hepatocytů (1 milión buněk v 1 ml kultivačního média) se kultivuje v kultivačních lahvičkách (Tissue Culture Flasks 50 ml, Becton-Dickinson) o objemu 50 ml v CO_2 inkubátoru (Sanyo, MCO-17AIC) v atmosféře s 5% CO_2 při 37°C. Jako kultivační médium se používá Krebs-Henseleitův roztok.

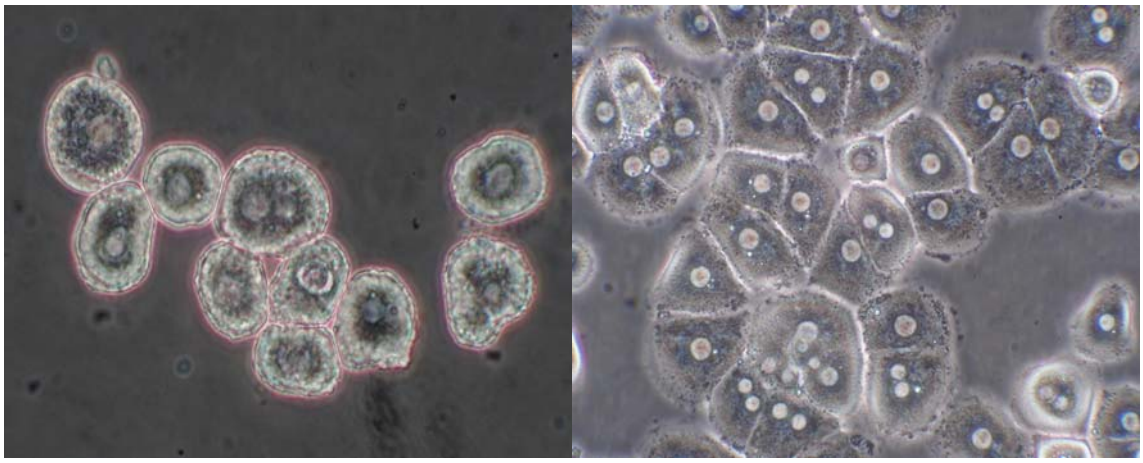
4.7. Primární kultury izolovaných hepatocytů

Pro pokusy, které jsou časově náročné je potřeba zajistit přežívání hepatocytů po dobu delší než několik hodin. Pokud chceme udržet specifické funkce a viabilitu hepatocytů, je nutné zajistit pro izolované hepatocyty kontakty se sousedními buňkami a dodat specifické substráty (Berry et al., 1991). Hepatocyty pro naše pokusy jsme kultivovali na kolagenovaných Petriho miskách (sterilní polystyrenové misky o průměru 60 mm), (Tissue Culture Dish 60 mm, Iwaki) potažených kolagenem typu I. Kolagen typu I (Collagen Type I from Rat Tail, Sigma-Aldrich) je špatně rozpustný ve vodě a proto ho je nutné rozpouštět v 20 mM kyselině octové (2 mg kolagenu do 6,66 ml 20 mM kyseliny octové). 1 ml roztoku kolagenu se nechá v kontaktu s povrchem Petriho misky po dobu 10 minut. Po 10ti minutách kolagen odsajeme. Přichycený kolagen obsahuje zbytky kyselin octové, které je nutné zneutralizovat. K tomuto účelu se používají 2 ml Krebs-Hensleitova roztoku nebo Williamsova E média. Dříve než se hepatocyty nasadí na Petriho misky, ředí se na denzitu 1 milion buněk v 1 ml ve Williamsově E médiu. Jde o médium, které je obohacené o některé další substráty (tzv. *kompletní* Williamsovo E médium). Složení média je uvedeno dále. Na kolagenované Petriho misky jsme nasadili 2 milióny hepatocytů na jednu misku (2 ml). Hepatocyty jsme ponechali 2 hodiny v CO_2 inkubátoru (5% CO_2, při 37°C). Po této době se hepatocyty přichytily ke kolagenu a vytvořily jednu vrstvu buněk tzv. *monolayer*. Po odsátí média a nepřichycených buněk bylo už možné využít primární kultury hepatocytů pro naše experimenty (Obr. 10B).

Do Petriho misek jsme aplikovali *kompletní* Williamsovo E médium, které obsahovalo t-BHP (Fluka) v příslušné koncentraci. Jako kontrolní skupiny jsme použili hepatocyty, ke kterým bylo přidáno pouze samotné *kompletní* Williamsovo médium. Misky s médiem jsme nechali inkubovat v atmosféře s 5% CO_2, při 37°C a po stanovenou dobu. Po jejím uplynutí jsme odebrali médium na biochemická stanovení. Stanovovali jsme aktivitu laktátdehydrogenázy (LDH) a koncentraci MDA v kultivačním médiu. Buňky jsme pak nechali dále kultivovat nebo je využili pro různá další měření. Na našem pracovišti se využívají ke stanovení obsahu intracelulárního GSH a měření MMP. Vzhledem k riziku kontaminace a znehodnocení kultur, je nutné veškerou manipulaci s buňkami, ale i s roztoky provádět v laminárním boxu za sterilních podmínek.

Složení kompletního Williamsova E média:

Do Williamsova E média bez L-glutaminu a fenolčerveně (Biotech) je přidáno fetální bovinní sérum (10%, Biotech), L-glutamin (2 mM, Biotech), penicilin (200 IU/ml, Biotech), streptomycin (0,2 mg/ml, Biotech), inzulín (0,08 IU/ml, Actrapid HM inj., Novo Nordisk), prednizolon (0,5 μg/ml, Solu-Decotin, Merck) a glukagon (0,008 μg/ml), Glukagen (1 mg inj HYPOKIT, Novo Nordisk).



A **B**

Obr. 10. A: Izolované hepatocyty v suspenzi, B: Izolované hepatocyty v primární kultuře

4.8. Izolace mitochondrií

K izolaci mitochondrií jsme použili metodu opakované centrifugace v sacharózovém médiu podle Bustamante et al. (1977).

Princip izolace:

Izolace mitochondrií je založena na několika po sobě jdoucích centrifugacích se zvyšujícím se počtem otáček. Při každé z nich dochází k sedimentaci jednotlivých frakcí původního jaterního homogenátu a v konečném sedimentu zůstávají izolované mitochondrie. Ostatní buněčné složky a rozpuštěné bílkoviny jsou odstraněny po jednotlivých centrifugacích.

Postup izolace:

Potkaní játra jsme odebírali v éterové narkóze. Oblast břicha jsme potřeli dezinfekčním roztokem. Nástřihem kůže a svaloviny do tvaru písmene „V“ jsme otevřeli dutinu břišní. Orgány dutiny břišní jsme odsunuli k levé straně těla zvířete. Tím jsme získali přístup k *v. cava inferior*. Zvířata byla usmrceno odebráním krve do injekční stříkačky z bifurkace aorty a následně prostřižením *v. cava inferior*. Játra jsme co nejrychleji výjmuli z dutiny břišní, zbavili je zbytků nejaterních tkání a opláchli v ledovém fyziologickém roztoku. Všechny následující kroky izolace jsme prováděli na miskách s ledovou tříští. Z jater jsme odebrali část tkáně o hmotnosti 2 g. Játra jsme v cca 5 ml čistého H-média nastříhali na malé kousky. Poté jsme odlili H-medium, přidali 5 ml nového H-média a směs přelili do homogenizační zkumavky. Směs jsme homogenizovali ve skleněném homogenizátoru s teflonovým pístem při otáčkách 800 ot/min. Homogenát jsme následně přelili do centrifugační zkumavky a doplnili ledovým H-médiem na celkový objem 20 ml (10% roztok). Část homogenátu (0,5 ml) jsme odebrali pro měření respirace a stanovení koncentrace proteinů. Zbytek jsme centrifugovali (Rottina 35R, Hettich) po dobu 4 min při 890 g a 4°C. Supernatant jsme přes čtyři vrstvy gázy přefiltrovali do nové centrifugační zkumavky, doplnili ledovým H-médiem na celkový objem 20 ml a opět centrifugovali 15 min při 5 580 g a 4°C. Po centrifugaci jsme opatrně odlili supernatant a sediment resuspendovali v 20 ml ledového H-média. Suspenzi jsme centrifugovali 10 min při 12 090 g a 4°C. Tento krok jsme ještě jednou opakovali, s tím že sediment jsme resuspendovali jen v 10 ml ledového H-média a centrifugovali 10 min při 15 560 g a 4°C. Poslední sediment jsme resuspendovali ve 2 ml ledového H-média a suspenzi izolovaných mitochondrií jsme rozpipetovali do připravených zkumavek (Eppendorf). Všechny kroky byly prováděny v ledové lázni. Před použitím suspenze izolovaných mitochondrií jsme folinovou metodou určili koncentraci proteinů (Lowry, 1951).

Složení izolačního média:

- Izolační médium (H-médium): obsahuje 40,08 g D-manitolu (220 mM); 23,96 g sacharózy (70 mM); 0,477 g HEPES (2 mM) a 0,5 g BSA a doplňuje se do 1000 ml destilovanou vodou. Nakonec upravíme pH na 7,2 pomocí KOH.

4.9. Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy

Laktátdehydrogenáza (LDH) je enzym, který se nachází v cytoplazmě, kde katalyzuje přeměnu kyseliny pyrohroznové na kyselinu mléčnou a zpět podle převahy substrátu. V podmínkách *in vitro* ho lze využít jako citlivý ukazatel poškození plazmatické membrány buněk. V primárních kulturách hepatocytů se LDH uvolňuje z poškozených hepatocytů a kumuluje se v mediu, kde ho můžeme stanovit (Berry et al., 1991).

Princip stanovení:

LDH katalyzuje přeměnu laktátu a NAD^+ na pyruvát a NADH a H^+. Rychlost přeměny NAD^+ na NADH lze stanovit fotometricky při 340 nm jako nárůst absorbance NADH.

Postup:

Pro stanovení aktivity LDH v médiu jsme používali diagnostickou soupravu LDH (Ecoline 15, Merk). Čtyři díly reakčního činidla R1 jsme smíchali s jedním dílem reakčního činidla R2. Takto připravené médium jsem umísili na 20 min do termobloku (Dry-block DB-3D, Techne), temperovaného na 37°C. Pro měření jsme použili křemennou kyvetu, do které jsme napipetovali 1 ml připraveného činidla a 20 μl média z buněčné kultury či suspenze. Kyvetu jsme uzavřeli parafilmem a otočením kyvety jsme směs promíchali. Měření jsme prováděli pomocí UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV – 1601 při vlnové délce λ = 340 nm proti deionizované vodě (blank). Absorbanci jsme měřili 60 a 120 s po promíchání (čas t_0 a čas t_1). Hodnota LDH se udává jako enzymová aktivita LDH v jednotkách [U/l].

Hodnotu aktivity laktátdehydrogenázy jsme stanovili podle vztahu:

$$LD(U/l) = \Delta A \times F$$

kde: $\Delta A = A_{t0} - A_{t1}$; A = absorbance; F = koeficient (pro vlnovou délku 340 nm je F = 8095)

Složení reakčních médií:

- Reakční činidlo R1: - fosfátový pufr (50 mmol/l, pH 7,5)
  - pyruvát (0,60 mmol/l)
- Reakční činidlo R2: - NADH (0,18 mmol/l)

4.10. Stanovení koncentrace malondialdehydu

Primární produkty lipoperoxidace (hydroperoxidy) jsou velmi reaktivní a nestabilní, proto je jejich detekce velmi obtížná. Pro stanovení míry lipoperoxidace se velmi dobře hodí detekce sekundárních oxidačních produktů (Fenaille et al., 2001). Velmi častou metodou pro hodnocení stupně lipoperoxidace je stanovení koncentrace malondialdehydu (MDA) pomocí kyseliny 2-thiobarbiturové (TBA). MDA je sloučenina, která vzniká peroxidací polynenasycených mastných kyselin, např. kyseliny arachidonové.

Princip stanovení:

Princip stanovení MDA je založen na spektrofotometrickém měření absorbance kondenzačního produktu, který vzniká reakcí MDA se dvěma molekulami TBA (Fenaille et al., 2001). Jde o velmi citlivou a nenáročnou metodu, ale je důležité brát v úvahu, že TBA též reaguje s různými dalšími sloučeninami, např. s kyselinou sialovou, s prostaglandiny, s deoxyribosou a s aldehydy (Lefevre et al., 1998). Vznikají tak produkty, které mohou s měřením interferovat. Během stanovení navíc může docházet k autooxidaci lipidů. MDA též vzniká i oxidací jiných látek (Hong et al., 2000). Přes svá omezení je tato metoda nejpoužívanější pro hodnocení stupně lipoperoxidace.

Postup:

Měření jsme prováděli ve zkumavkách. Do zkumavek jsme napipetovali 1 ml média odebraného z buněčné kultury nebo suspenze buněk a přidali 1 ml reakčního činidla (vodný roztok 15% kyseliny trichloroctové, 0,37% TBA a 0,25% HCl). Promíchali pomocí třepačky a poté jsme zkumavky umístili na 15 min do termobloku (100°C). Následně jsme reakční směs nechali vychladnout na laboratorní teplotu a centrifugovali (20 min, 1 590 g). Pomocí UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV – 1601 jsme změřili absorbance při 535 nm. Jako blank jsme použili 1 ml destilované vody + 1 ml reakčního činidla, inkubovaný za stejných podmínek.

4.11. Měření respirace hepatocytů a mitochondrií

Pro stanovení spotřeby kyslíku izolovaných mitochondrií nebo suspenzí hepatocytů jsme použili *High Resolution Oxygraph OROBOROS 2k* (Obr. 11). Jde o měření spotřeby kyslíku pomocí modifikované Clarkovy kyslíkové elektrody. Stanovení se provádí v uzavřené, temperované (30°C) komůrce o objemu 2 ml. Měří se množství kyslíku, které biologický materiál spotřebuje během své metabolické aktivity. Uzavřený systém brání volné difuzi kyslíku z okolního vzduchu (Gnaiger et al., 2002; Gnaiger, 2001; Hütter et al., 2006). Vzorky se dávkují pomocí Hamiltonovy pipety nebo lze použít automatické dávkovače. Přístroj je též vybaven míchacím systémem, který zajišťuje konstantní přísun kyslíku k elektrodě. Elektroda je složena z měrné platinové katody a referenční argentchloridové anody. Obě elektrody jsou od biologického materiálu odděleny semipermeabilní membránou, která propouští kyslík a brání adsorbci nežádoucích látek. Elektrody jsou ponořeny v 1 M KCl a mezi ně je vložen konstantní potenciál (0,6 V). Na katodě dochází k redukci kyslíku a vzniká voda. Na anodě dochází k oxidaci stříbra na chlorid stříbrný. Při této reakci vzniká proud, který je přímo úměrný koncentraci kyslíku v komůrce (Gnaiger et al., 2002; Gnaiger, 2001).

Postup měření:

Pro měření jsme používali buď suspenzi digitoninem permeabilizovaných hepatocytů nebo izolované mitochondrie. Do komůrky jsme napipetovali 2,1 ml K-média. Komůrku jsme uzavřeli a po ustálení signálu jsme pomocí Hamiltonovy pipety přidali biologický materiál. Hepatocyty jsme přímo v komůrce permeabilizovali digitoninem o koncentraci 20 µg/ml média. Výsledné množství buněk, které jsme pro měření používali bylo 250 000 buněk v 1 ml. Následovalo přidání specifických substrátů či inhibitorů komplexů dýchacího řetězce a měření aktivit jednotlivých respiračních komplexů (viz výsledky). Zpracování dat bylo provedeno pomocí softwaru DatLab 4. Křivky spotřeby kyslíku jsou vyjadřují první negativní derivaci změn parciálního tlaku kyslíku rozpuštěného v inkubačním médiu a spotřeba je udávána jako pmol O_2/s/milion buněk nebo jako pmol O_2/s/mg proteinu.

Složení K-média:

- 100 mM KCl, 10 mM Tris HCl, 4 mM fosforečnan draselný, 3 mM chlorid hořečnatý, 1 mM EDTA, výsledné pH bylo upraveno na 7,4

Obr. 11: High Resolution Oxygraph OROBOROS 2k

4.12. Měření mitochondriálního membránového potenciálu

MMP je elektrochemický potenciál, který vzniká na vnitřní mitochondriální membráně. Pohybuje se v rozmezí -120 až -180 mV. Tento potenciál vzniká v důsledku distribuce H^+ iontů. Porucha funkce mitochondrií často vede ke snížení až ke ztrátě MMP a depolarizaci mitochondriální membrány. MMP lze hodnotit pomocí několika metod. Mezi nejznámější patří fluorescenční sondy (Rhodamin 123, Safranin O, JC-1). Tyto sondy pronikají přes buněčné membrány a akumulují se v izolovaných mitochondriích s neporušenou membránou.

4.12.1. Měření MMP kultivovaných hepatocytů pomocí akumulace Rhodaminu 123

Rhodamin 123 (Rho 123) je fluorescenční sonda, která se v důsledku negativního náboje akumuluje v mitochondriích. Tato akumulace se mění v závislosti na MMP (Emaus et al., 1986; Nuydens et al., 1999; Palmeira et al., 1996; Salvioli et al., 1997). Nevýhodou Rho 123 je to, že se nespecificky váže na některé komponenty vnitřní mitochondriální membrány. Tato vazba nijak nesouvisí se změnou MMP, což snižuje citlivost stanovení a proto je potřeba provádět korekce na nespecifickou vazbu.

Postup měření:

Do Petriho misky s hepatocyty jsme přidali 3 ml 60 nM Rho 123 rozpuštěného v Krebs-Henseleitově médiu bez albuminu, přidali t-BHP a nechali inkubovat při 37°C. Doba inkubace a koncentrace t-BHP je uvedena ve výsledkové části. Po inkubaci jsme do zkumavek odsáli médium a zcentrifugovali (5 min, 28 g). Kalibrační křivku jsme vytvořili z koncentrací Rho 123: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 nM. Pro měření MMP jsme použili supernatant a fluorescenci měřili na spektrofluorimetru Perkin-Elmer LS50B. Použtá excitační vlnová délka byla 498 nm a emisní vlnové délka byla nastavena na 525 nm. Jednotlivé koncentrace Rho 123 ve vzorcích jsme odečetli z kalibrační křivky. Výsledky jsou uvedeny v procentech akumulace Rho 123 hepatocytech. Akumulace Rho 123 kontrolními hepatocyty byla považována za 100%.

4.12.2. Měření MMP izolovaných mitochondrií pomocí Safraninu O

Respirační řetězec transportuje protony z matrix mitochondrií a generuje tak elektrochemický membránový potenciál, který pak využívá mitochondrální ATP syntáza pro tvorbu ATP. Tento potenciál je hnací silou pro akumulaci pozitivně nabitých fluoroforů v mitochondriích. Pokud přidáme mitochondrie k médiu, které obsahuje fluorescenční sondu safranin O, dochází k akumulaci safraninu O v mitochondriích a k poklesu fluorescence v médiu. Při poklesu membránového potenciálu nedostatkem substrátu, inhibicí jeho oxidace nebo působením rozpřahujících protonoforů se akumulovaný safranin O z mitochondrií vyplaví a fluorescence v mediu stoupá (Akerman et al., 1976).

Postup měření:

Do měrné kyvety jsme napipetovali 1 ml média a přidali substrát. K médiu se substrátem jsme dále přidali mitochondrie (0,1 mg/ml), t-BHP (1,5 mM) a karbonylkyanid-m-chlorofenylhydrazon (FCCP) (1 μM). Jako substrát jsme postupně použili: sukcinát (10 mM), glutamát (10 mM) + malát (1,5 mM), pyruvát (10 mM) + malát (1,5 mM). K měření jsme použili fluorescenční spektrofotometr AMINCO-Bowman Series 2 (Obr. 12). Excitační vlnová délka byla 495 nm a emisní 586 nm. Pokles fluorescence je spojen s nárůstem MMP.

Složení média:

- 120 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EGTA, 1 mM K_3PO_4, 10 µM safranin O

Obr. 12: Aminco Bowman Series 2

4.13. Měření bobtnání mitochondrií

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

Postup:

Měření jsme prováděli v kyvetě o celkovém objemu 1 ml. Do kyvety jsme pipetovali patřičné množství média (1 ml mínus objem všech přídavků). Tuto hodnotu jsme nastavili jako hodnotu s nulovou absorbancí. Do měřící kyvety jsme dále přidali 15 µl suspenze izolovaných mitochondrií. Toto množství mitochondrií odpovídá absorbanci 1. K mitochondriální suspenzi v inkubačním médiu jsme dále přidávali vždy roztok 5 µl 1M sukcinátu. Ostatní složky, které jsme přidávali, se lišily v závislosti na tom, který aspekt jsme potřebovali sledovat. Roztok Ca^{2+} pro indukci bobtnání byl přidáván standardně mezi 50. a 60. s. Pro měření jsme použili spektrofotometr

(Shimadzu UV – 1601). Absorbanci jsme měřili při vlnové délce 520 nm a změny absorbance byly registrovány v 10ti sekundových intervalech.

Složení roztoků:

- inkubační médium: 42,79 g sacharóza (125 mM); 4,85 g KCl (65 mM); 2,38 g HEPES (10 mM); vše rozpustit a doplnit destilovanou vodou do objemu 1 000 ml a upravit pH na 7,2 pomocí KOH; přechovávat v lednici
- 1 M roztok sukcinátu: 162 mg sukcinátu rozpustit v 1 ml destilované vody
- 20 mM roztok Ca^{2+}: 22 mg $CaCl_2$ p.a. doplnit do 10 ml destilovanou vodou
- 10 mM roztok PO_4^{3-} (pH = 7,4): 15 mg NaH_2PO_4 . 2 H_2O rozpustit v 10 ml destilované vody
- 1 mM roztok cyklosporinu A: 1,2 mg cyklosporinu A (Fluka) rozpustit v 1 ml ethanolu
- 300 mM roztok t-BHP: 27 mg t-BHP (Fluka) rozpustit v 1 ml destilované vody
- 1 mM roztok T_3 pro aplikaci *in vitro*: 3,4 mg T_3 rozpustit v 4 ml 5 mM KOH, upravit pH na 7,4 pomocí 1 M HCl a doplnit na objem 5 ml destilovanou vodou

4.14. Pokusy s trijodtyroninem v podmínkách *in vivo*

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

Příprava roztoku T_3 pro aplikaci in vivo:

- 60 μM T_3: 2 mg T_3 rozpustit ve 2 ml 1 M NaOH, přidat cca 30 ml destilované vody, upravit pH na 7,4 pomocí 1 M HCl a doplnit na objem 50 ml destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku se aplikuje 0,5 ml/100 g váhy těla i.p.

4.15. Statistické zpracování výsledků

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

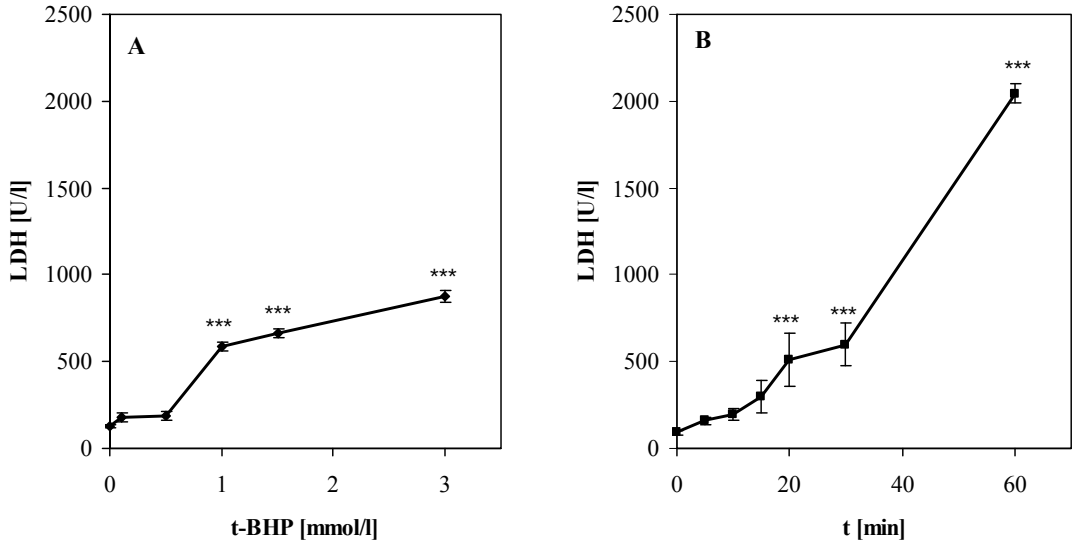
5. VÝSLEDKY

5.1. Peroxidační poškození kultivovaných hepatocytů t-BHP

První část práce navazuje na dřívější studie zaměřené na sledování mechanismů hepatotoxického působení oxidačního stresu (Červinková et al., 2007; Červinková et al., 2002) a jejím cílem bylo doplnit a rozšířit dřívější nálezy o působení oxidačního stresu na energetický metabolismus hepatocytů. Nejprve jsme se snažili zjistit, zda peroxidační poškození prokázané v dřívějších pokusech na izolovaných hepatocytech v suspensi (Kmoníčková et al., 2001) probíhá stejně, jsou-li peroxidačnímu působení vystaveny intaktní na kolagen fixované hepatocyty v primární kultuře. Dále jsme se snažili prokázat, jak probíhá působení peroxidačního agens na plazmatickou membránu a na strukturu a funkci mitochondrií. Funkci mitochondrií jsme testovali na intaktních hepatocytech v kultuře i v podmínkách *in situ,* tj. v permeabilizovaných hepatocytech a také při přímém působení t-BHP na izolované mitochondrie. U všech těchto parametrů jsme sledovali koncentrační a časovou závislost působení peroxidačního agens. Hodnotili jsme narušení celistvosti plazmatické membrány pomocí uvolňování LDH do média, vzestup koncentrace MDA, který indikuje intenzitu tvorby lipoperoxidů a změny mitochondriálního membránového potenciálu, jako indikátoru narušení mitochondriální tvorby ATP. Hodnotili jsme také koncentrační a časovou závislost působení t-BHP na funkci respiračního řetězce mitochondrií.

5.1.1. Peroxidační poškození plazmatické membrány

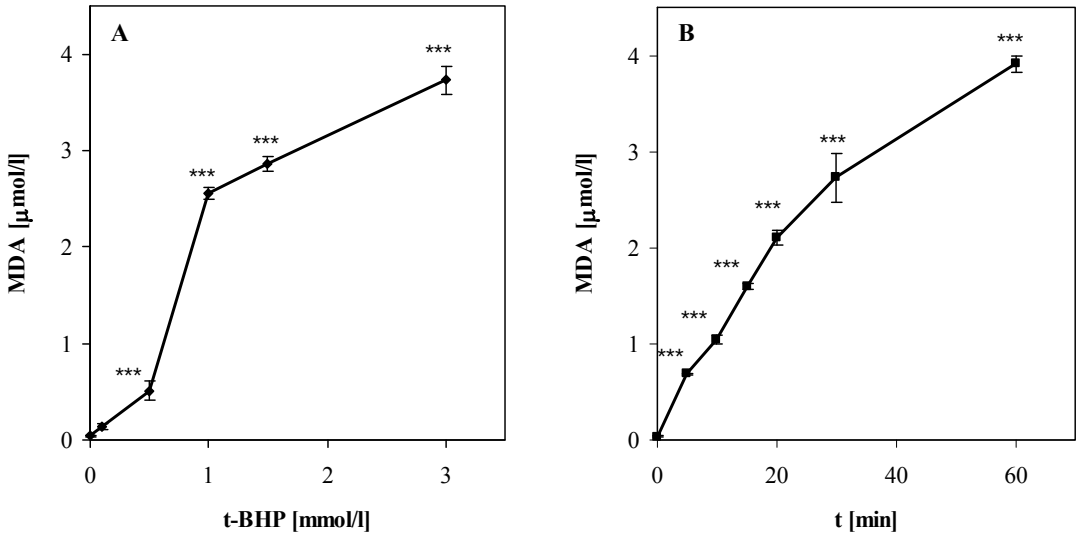
LDH je cytoplazmatický enzym, který je při poškození plazmatické membrány uvolňován z buněk. Hodnotili jsme jak časovou, tak koncentrační závislost účinku t-BHP na vyplavování LDH z buněk do kultivačního média. Jak ukazuje graf 1, působením t-BHP dochází k vzestupu aktivity LDH v inkubačním mediu. Z grafu 1A je patrné, že signifikantní vzestup aktivity LDH v inkubačním médiu lze pozorovat po 30ti minutové inkubaci (37°C, 95% O_2, 5% CO_2) s 1 mM t-BHP. Vyšší koncentrace t-BHP (1 - 3 mM) zvyšují uvolňování LDH již mnohem méně (Graf 1A). K dramatickému vzestupu aktivity LDH v médiu však dochází při delší době inkubace s 1,5 mM t-BHP. Po 60ti minutové inkubaci dochází k trojnásobnému vzestupu aktivity LDH ve srovnání s hodnotami zjištěnými po 30ti minutové inkubaci s t-BHP (Graf 1B).



Graf 1: Vliv t-BHP na aktivitu LDH v médiu hepatocytů. A: Koncentrační závislost (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 mM t-BHP, inkubace 30 min). **B:** Časová závislost (1,5 mM t-BHP, v časovém intervalu 5, 10, 15, 20, 30 a 60 min). (n = 6, ***P < 0,001 vs kontroly)

5.1.2. Indukce lipoperoxidace t-BHP v kultivovaných hepatocytech

Za stejných experimentálních podmínek jsme hodnotili vzestup koncentrace MDA jako indikátoru lipoperoxidačních dějů. Opět jsme hodnotili jak časovou, tak koncentrační závislost účinku t-BHP na množství vzniklého MDA. Je zřejmé, že k maximálnímu vzestupu koncentrace MDA po 30ti minutové inkubaci dochází v koncentračním rozmezí 0,5 - 1,0 mM t-BHP (Graf 2A), vyšší koncentrace peroxidačního agens vedly k dalšímu, avšak již pozvolnějšímu nárůstu množství MDA. Při testování časové závislosti tvorby MDA při inkubaci s 1,5 mM t-BHP jsme zaznamenali signifikantní vzestup již po 5 minutách inkubace (Graf 2B). Koncentrace MDA se téměř lineárně zvyšovala po dalších 20 minut inkubace; další nárůst byl pozvolnější. Hodnoty zjištěné po 60ti minutové inkubaci s 1,5 mM t-BHP byly téměř shodné s hodnotami, které jsme změřili po 30ti minutách inkubace s 3 mM t-BHP (Graf 2A, 2B). Výsledky těchto pokusů (5.1) ukazují, že jak porušení integrity cytoplazmatické membrány, tak tvorba MDA vykazují shodně nejvyšší nárůst v koncentračním rozmezí t-BHP 0,5 - 1 mM.



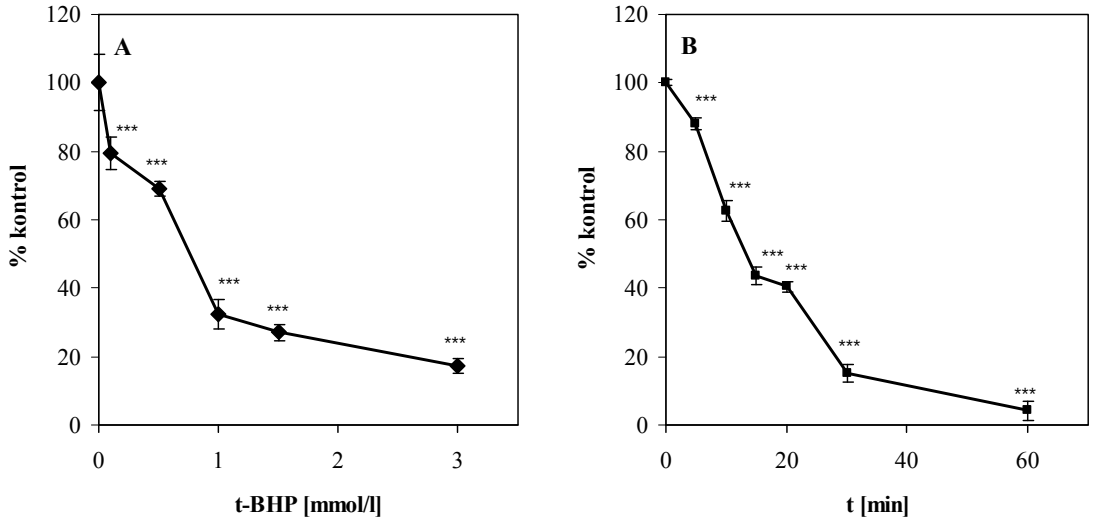
Graf. 2: Vliv t-BHP na koncentraci MDA v médiu hepatocytů. A: Koncentrační závislost (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 mM t-BHP, inkubace 30 min). **B:** Časová závislost (1,5 mM t-BHP, v časovém intervalu 5, 10, 15, 20, 30 a 60 min). ($n = 6$, ***$P < 0{,}001$ vs kontroly)

5.2. Vliv oxidačního stresu na energetický metabolismus hepatocytů

V dalších pokusech jsme hodnotili působení peroxidačního agens na mitochondrie. Měřili jsme na fixovaných hepatocytech vliv t-BHP na membránový potenciál mitochondrií, v další části studie jsme měřili respiraci mitochondrií *in situ* v digitoninem permeabilizovaných hepatocytech. Doplnili jsme tak dřívější práce naší laboratoře (Červinková et al., 2007; Drahota et al., 2005; Kmoníčková et al., 2001), které prokázaly, že peroxidační poškození hepatocytů se projevuje především v oblasti energetického metabolismu. Podrobněji jsme hodnotili časové a koncentrační závislosti inhibičního efektu t-BHP a rozdíly v jeho působení na udržování membránového potenciálu při oxidaci různých substrátů. Tyto pokusy rovněž prokázaly, že existují výrazné rozdíly v citlivosti jednotlivých komplexů dýchacího řetězce vůči peroxidačnímu poškození. Působení t-BHP na aktivitu mitochondriálních komplexů jsme hodnotili na izolovaných hepatocytech permeabilizovaných digitoninem (hepatocyty v suspenzi), kdy mitochondrie zůstávají v kontaktu s bílkovinnými komponentami buňky, i na mitochondriích izolovaných z jaterní tkáně, kdy jsou odstraněny cytosolové antioxidační komponenty.

5.2.1. Vliv t-BHP na mitochondriální membránový potenciál kultivovaných hepatocytů

V dřívějších experimentech naší laboratoře byl pomocí akumulace Rhodaminu 123 prokázán inhibiční vliv t-BHP na membránový potenciál izolovaných hepatocytů inkubovaných v suspenzi (Kmoníčková et al., 2001). Zopakovali jsme tato měření na hepatocytech v primární kultuře fixovaných na kolagenní podložku, abychom ověřili, zda na ně t-BHP působí obdobně jako na hepatocyty v suspenzi. Na grafu 3A vidíme, že k signifikantnímu poklesu akumulace Rhodaminu 123 hepatocyty, která je úměrná hodnotám mitochondriálního membránového potenciálu, dochází po 30ti minutové inkubaci již při použití nejnižší dávky t-BHP (0,1 mM). Avšak k nejprudšímu poklesu mitochondriálního membránového potenciálu došlo v koncentračním rozmezí 0,5 - 1,0 mM. Po 30ti minutách inkubace hepatocytů s nejvyšší koncentrací t-BHP (3 mM) činila hodnota mitochondriálního membránového potenciálu pouze 20% výchozí hodnoty (Graf 3A). Časová závislost inhibičního působení 1,5 mM t-BHP ukazuje téměř lineární pokles membránového potenciálu během 30ti minutové inkubace (Graf 3B). Výsledky měření ukázaly, že k poklesu membránového potenciálu dochází v přibližně stejném koncentračním rozmezí (0,5 - 1,0 mM t-BHP) v izolovaných i kultivovaných hepatocytech. Dále jsme zjistili, že v průběhu prvních 30ti minut inkubace s 1,5 mM t-BHP je pokles membránového potenciálu probíhá prakticky lineárně. Za tuto dobu dochází k poklesu MMP o 85% ve srovnání s výchozí hodnotou. Další pokles MMP jsme zaznamenali po 60ti minutách inkubace s t-BHP, kdy hodnota akumulace Rhodaminu 123 byla redukována na méně než 5% výchozí hodnoty (Graf 3B).

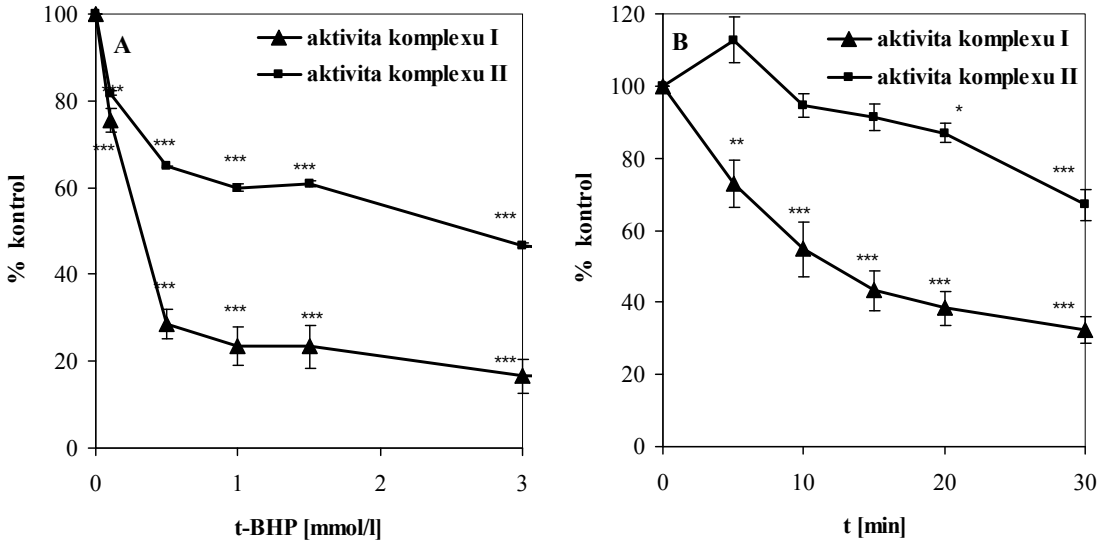


Graf 3: Vliv t-BHP na akumulaci Rho 123 hepatocyty v primární kultuře. A: Koncentrační závislost t-BHP na akumulaci Rho 123. Hepatocyty byly inkubovány s t-BHP o výsledné koncentraci (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 mM/l, 30 min). **B:** Časová závislost t-BHP na akumulaci Rho 123. Hepatocyty byly inkubovány s t-BHP (1,5 mM), v časovém intarvalu (5, 10, 15, 20, 30 a 60 min). Za 100% je považována akumulace Rho 123 hepatocyty bez přídavku t-BHP. ($n = 6$, $^{***}P < 0.001$)

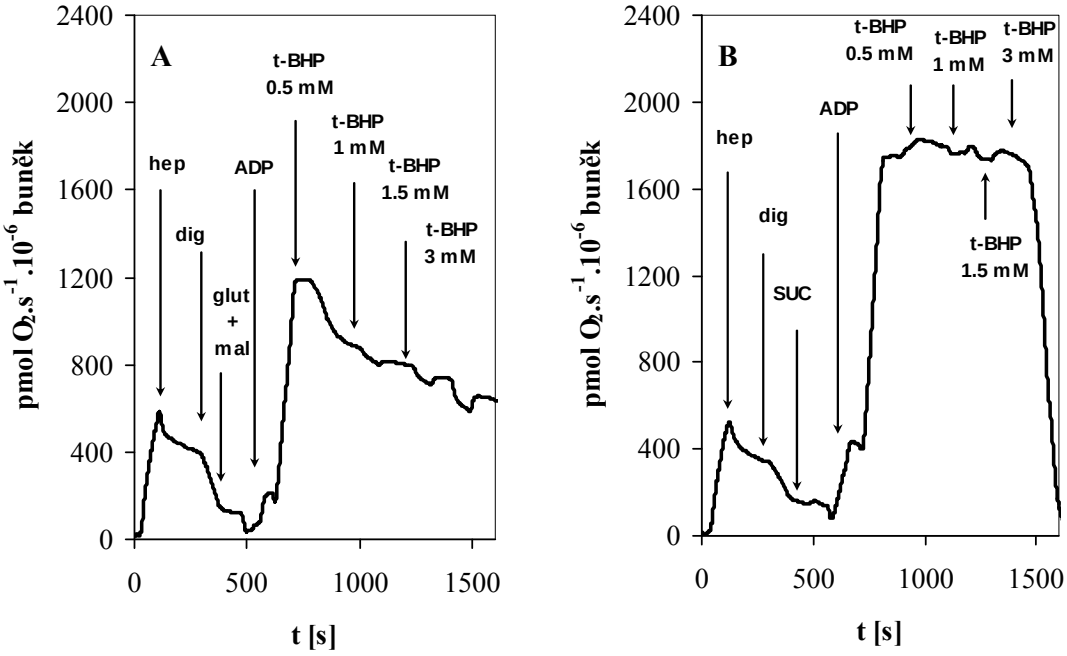
5.2.2. Vliv t-BHP na aktivitu mitochondriálních enzymů v permeabilizovaných hepatocytech (v suspenzi)

V dalších pokusech jsme sledovali vliv t-BHP na respiraci při oxidaci glutamátu + malátu ve srovnání s oxidací sukcinátu u permeabilizovaných hepatocytů v suspenzi. Permeabilizace digitoninem je nezbytná, aby byl zajištěn dostatečný přísun substrátů a ATP k mitochondriím a aby tak mohla být hodnocena maximální oxidační kapacita při saturaci substráty a ADP (Červinková et al., 2002). Zjistili jsme, že oxidace glutamátu + malátu je citlivější vůči působení peroxidu, než oxidace sukcinátu (Graf 4). Po 30ti minutové inkubaci hepatocytů s t-BHP došlo k maximální inhibici oxidace glutamátu + malátu při koncentraci 0,5 mM, kdy aktivita komplexu I byla snížena o 80%. Při aplikaci vyšších koncentrací t-BHP (0,5 - 3,0 mM) se již inhibiční efekt výrazněji nezvyšoval. Také oxidace sukcinátu byla po 30ti minutové inkubaci inhibována 0,5 mM t-BHP, avšak inhibiční efekt byl výrazně nižší. Aktivita komplexu II byla redukována přibližně o 40% (Graf 4A). Časová závislost inhibičního působení 1,5 mM t-BHP, při němž dochází v obou případech k maximální inhibici, ukázala, že oxidace sukcinátu není během 15ti minutové inkubace hepatocytů s t-BHP signifikantně inhibována, zatímco ve stejném časovém intervalu dosahuje inhibice glutamátu + malátu již

maximálních hodnot (Graf 4B). Stejné výsledky jsme získali při postupném přidávání t-BHP k suspenzi hepatocytů během měření spotřeby kyslíku (Graf 5A,B).



Graf 4: Koncentrační a časová závislost vlivu t-BHP na respiraci izolovaných hepatocytů permeabilizovaných digitoninem. A: Koncentrační závislost účinku t-BHP na aktivitu komplexu I a komplexu II. Hepatocyty (0,25 x 10^6/ml) byly inkubovány v K-médiu. Buňky byly permeabilizovány digitoninem (20 µg/ml), dále byl přidán glutamát (10 mM) + malát (2,5 mM). Respirace byla aktivována ADP (1 mM). Poté jsme přidali t-BHP o výsledné koncentraci (0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 mM/l) a inkubovali po dobu 30 min. V dalším kroku byl komplex I inhibován 10 µM rotenonem a přidán sukcinát (10 mM). **B:** Časová závislost efektu t-BHP na aktivitu respiračního komplexu I a II. Hepatocyty byly inkubovány s 1,5 mM t-BHP v časovém intervalu (5, 10, 15, 20 a 30 min). Ostatní přídavky byly stejné. Za 100% pro komplex I je považována respirace kontrolních hepatocytů po přídavku glut + mal + ADP bez přídavku t-BHP a pro komplex II respirace po přídavku rotenonu a sukcinátu bez přídavku t-BHP. ($n = 6$, *$P < 0,05$, **$P < 0,01$, ***$P < 0,001$ vs kontroly)



Graf 5: A: Efekt t-BHP na oxidaci glutamátu + malátu. Hepatocyty (0,25 x 10^6/ml) byly inkubovány v K-médiu. Buňky byly permeabilizovány digitoninem (20 µg/ml), dále byl přidán glutamát (10 mM) + malát (2,5 mM). Respirace byla aktivována ADP (1 mM). Poté jsme přidali t-BHP o výsledné koncentraci (0,5; 1,0; 1,5; 3,0 mM/l). **B: Efekt t-BHP na oxidaci sukcinátu.** Hepatocyty (0,25 x 10^6/ml) byly inkubovány v K-médiu. Buňky byly permeabilizovány digitoninem (20 µg/ml), dále byl přidán rotenon (1 µM) a sukcinát (10 mM). Respirace byla aktivována ADP (1 mM). Poté jsme přidali t-BHP o výsledné koncentraci (0,5; 1,0; 1,5; 3,0 mM/l).

Námi získané poznatky uvedené v kapitolách 5.1. a 5.2. zaměřených na hodnocení peroxidačního poškození hepatocytů ukazují, že při aplikaci t-BHP reaguje na nejnižší koncentraci (0,5 mM) oxidace NADH-dependentního substrátu glutamátu a membránový potenciál mitochondrií. K vzestupu tvorby lipoperoxidů a narušení integrity plazmatické membrány dochází až při vyšší koncentraci t-BHP (1 mM). Oxidace flavoprotein-dependentního substrátu sukcinátu je mnohem méně citlivá na působení prooxidačního agens a při 3 mM t-BHP dosahuje inhibice pouze 50%, zatímco oxidace glutamátu a malátu je inhibována na 80% kontrolní úrovně.

5.3. Působení oxidačního stresu na funkci respiračního řetězce izolovaných mitochondrií

Pro přesné hodnocení citlivosti různých mitochondriálních komponent vůči peroxidačnímu poškození je třeba doplnit nálezy získané na intaktních hepatocytech studiem izolovaných mitochondrií, abychom eliminovali působení faktorů spojených s penetrací noxy do buňky k mitochondriím a s působením cytoplazmatických antioxidačních systémů.

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

Hodnotili jsme citlivost oxidace pěti různých mitochondriálních substrátů vůči peroxidačnímu stresu. U všech substrátů jsme měřili spotřebu kyslíku za přítomnosti ADP, která udává maximální hodnoty respirace pro daný substrát (pikomoly kyslíku/s/mg proteinu). Jak ukazuje Tab. 1, všechny použité substráty vykazují vysoké hodnoty indexu respirační kontroly (RCI), který je indikátorem neporušené struktury izolovaných mitochondrií. Rychlost respirace sukcinátu, pyruvátu + malátu a glutamátu + malátu je přibližně dvakrát vyšší než oxidace palmitylkarnitinu + malátu a oxoglutarátu + malátu. Na grafu 6A,B vidíme uspořádání pokusu pro hodnocení inhibice oxidace palmitylkarnitinu. Palmitylkarnitin je třeba přidávat k mitochondriím v nízkých koncentracích (mikromolárních), protože při vyšších koncentracích vykazuje detergenční účinek na mitochondriální membrány. Po přidání nízké koncentrace palmitylkarnitinu dosáhne rychlost respirace maximální hodnoty. Po úplné oxidaci přidaného substrátu se rychlost respirace postupně snižuje. Nízké koncentrace lze přidávat opakovaně a přitom i po několikanásobném přidání palmitylkarnitinu zůstávají maximální hodnoty rychlosti respirace na stejné výši (Graf 6A). Jestliže po prvním přidání palmitylkarnitinu aplikujeme t-BHP (Graf 6B), je po dalším přidání palmitylkarnitinu dosažena nižší maximální rychlost oxidace a prodlouží se doba, za kterou se přidaný palmitylkarnitin zcela oxiduje (Červinková et al., 2008). Celkové množství kyslíku spotřebované na oxidaci přidaného palmitylkarnitinu však zůstane stejné.

Ostatní testované substráty lze přidávat v nadbytku v milimolárních koncentracích (2,5 - 10,0 mM), takže lze rychlost oxidace substrátu udržovat na

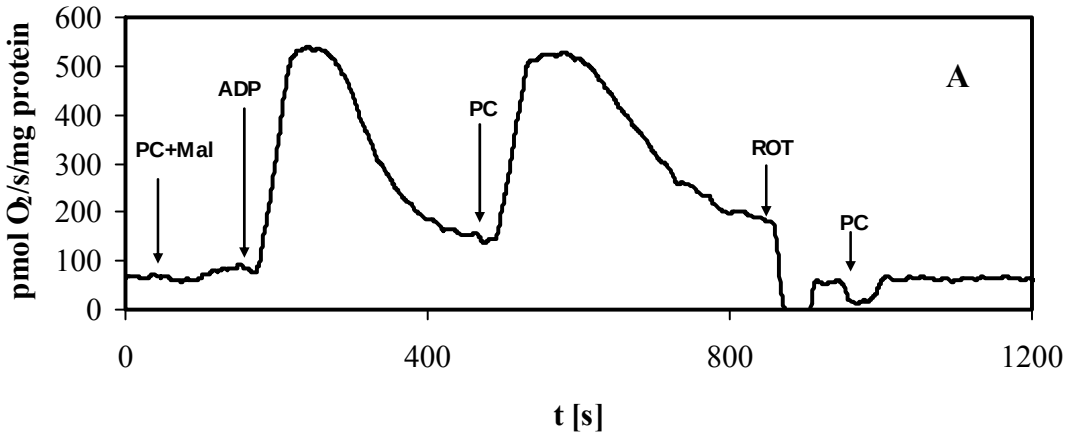
maximálních hodnotách po delší dobu (v tomto případě je limitující dostatek ADP) a postupně přidávat k suspenzi mitochondrií t-BHP a hodnotit pokles rychlosti respirace (Graf 6C). V takovémto uspořádání jsme získali hodnoty inhibice respirace pro sukcinát, pyruvát + malát, oxoglutrát + malát a glutamát + malát.

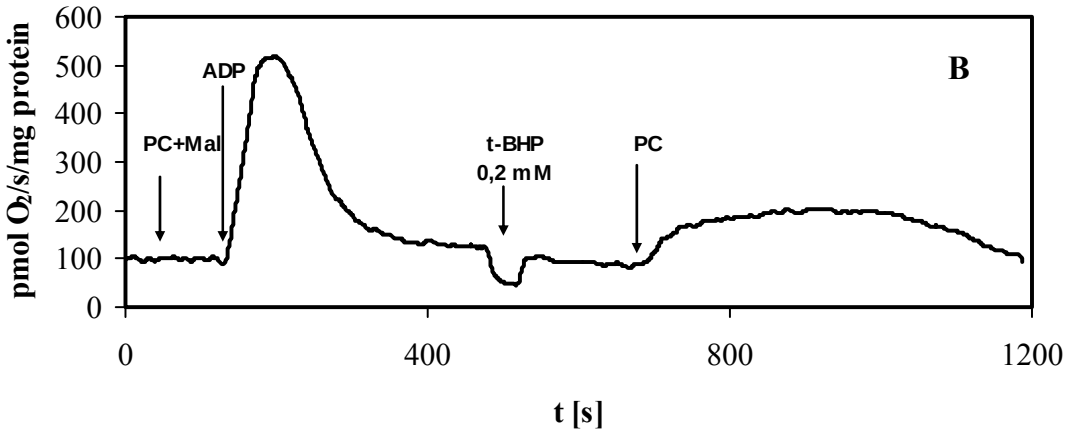
Inhibice respirace mitochondrií vlivem t-BHP pro jednotlivé substráty je vyhodnocena v grafech 6C a 7. Zatímco v daném časovém intervalu není oxidace sukcinátu inhibována ani 3,3 mM t-BHP (Graf 6C), oxidace NADH-dependentních substrátů je výrazně inhibována již 0,025 - 0,300 mM koncentrací t-BHP. Graf 7 dokumentuje, že i mezi jednotlivými NADH-dependentními substráty existují výrazné rozdíly v citlivosti vůči peroxidačnímu poškození, avšak všechny NADH-dependentní substráty mají minimálně 10x vyšší citlivost vůči peroxidačnímu poškození působením t-BHP než flavoprotein-dependentní substrát sukcinát (Graf 6C).

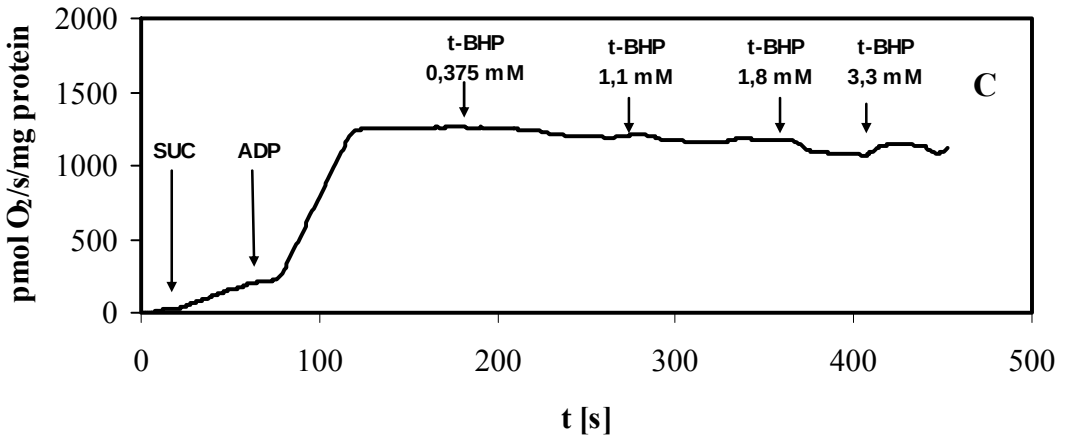
Tab. 1: Referenční hodnoty respiračních kontrol izolovaných mitochondrií pro různé substráty

	pmol O_2/s/mg protein
Palmitylkarnitin (10 μM) + malát (3 mM)	118,9 ± 20,5
+ ADP (1,5 mM)	773,7 ± 64,9
RCI	6,5 ± 1,3
Sukcinát (10 mM)	246,1 ± 72,7
+ ADP (1,5 mM)	1543,2 ± 387,1
RCI	6,3 ± 1,6
Pyruvát (10 mM) + malát (1,5 mM)	89,2 ± 16,8
+ ADP (1,5 mM)	1371,3 ± 98,1
RCI	15,4 ± 2,8
Glutamát (10 mM) + malát (1,5 mM)	108,4 ± 42,8
+ ADP (1,5 mM)	1300,2 ± 324,6
RCI	12,0 ± 3,6
Oxoglutarát (10 mM) + malát (1,5 mM)	80,2 ± 19,3
+ ADP (1,5 mM)	770,3 ± 139,8
RCI	9,6 ± 1,6

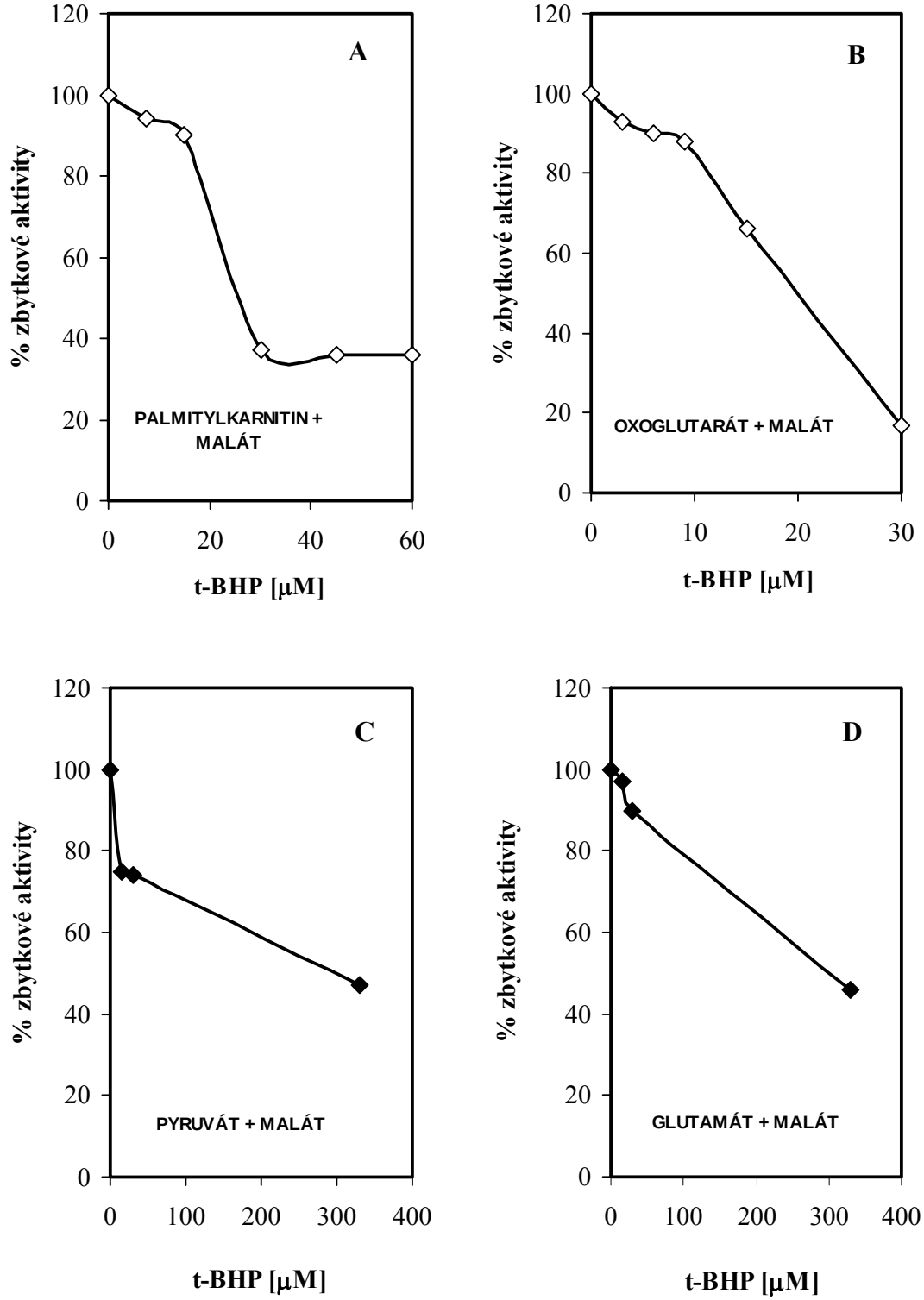
Data udávají průměr ± SD z 8 vzorků nezávisle izolovaných jaterních mitochondrií (0,2 mg protein/ml) (palmitylkarnitin, sukcinát) a ze 4 vzorků nezávisle izolovaných jaterních mitochondrií (pyruvát + malát, glutamát + malát, oxoglutarát + malát). RCI - index respirační kontroly.







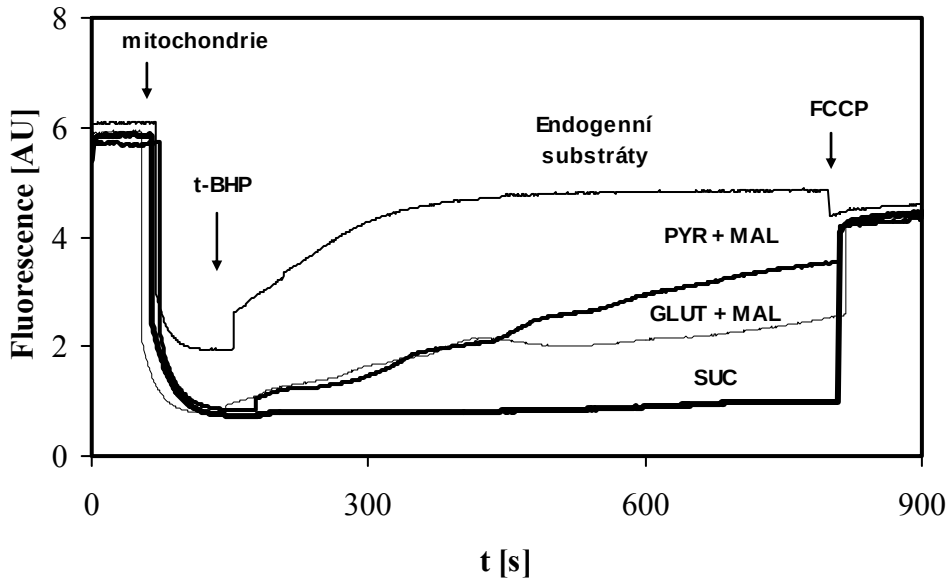
Graf 6: Inhibiční efekt t-BHP na respiraci izolovaných mitochondrií. A: Oxidace palmitylkarnitinu. **B:** Inhibiční efekt t-BHP na oxidaci palmitylkarnitinu. **C:** Inhibiční efekt t-BHP na oxidaci sukcinátu. Izolované mitochondrie (0,2 mg protein/ml) byly inkubovány ve 2 ml KCl media. Dále byl přidán palmitylkarnitin (12,5 µM) + malát (2,5 mM), ADP (1,5 mM), sukcinát (10 mM), 2 µM rotenon a t-BHP v různých koncentracích viz graf. Experiment byl 3x zopakován s různými mitochondriemi, se stejným výsledkem.



Graf 7: Koncentrační závislost inhibičního účnku t-BHP na oxidaci substrátů. A: palmitylkarnitin + malát, **B:** oxoglutarát + malát, **C:** pyruvát + malát, **D:** glutamát + malát. Za 100% je považována respirace bez přídavku t-BHP. Inhibiční účinek t-BHP na oxidaci palmitylkarnitinu (12,5 mM) + malátu (1,5 mM), oxoglutarátu (10 mM) + malátu (1,5 mM), pyruvátu (10 mM) + malátu (1,5 mM) a glutamátu (10 mM) + malátu (1,5 mM) byl stanoven za stejných podmínek jaké jsou uvedeny v grafu 6. Jednotlivé hodnoty udávají průměr ze tří měření.

5.3.2. Vliv t-BHP na mitochondriální membránový potenciál

Různou citlivost mitochondriálních enzymů vůči peroxidačnímu stresu jsme testovali i pomocí dalšího indikátoru charakterizujícího neporušenost mitochondriálního systému oxidativní fosforylace, a to pomocí hodnot mitochondriálního membránového potenciálu. Respirační řetězec transportuje protony z mitochondrií a generuje tak elektrochemický membránový potenciál, který pak využívá mitochondrální ATP syntáza pro tvorbu ATP. Tento potenciál je hnací silou pro akumulaci pozitivně nabitých fluoroforů v mitochondriích. Pokud přidáme mitochondrie k mediu, které obsahuje fluorescenční sondu safranin O, dochází k akumulaci safraninu O v mitochondriích a k poklesu fluorescence v mediu. Při poklesu membránového potenciálu buď nedostatkem substrátu, inhibicí jeho oxidace nebo působením rozpřahujících protonoforů, se akumulovaný safranin O z mitochondrií vyplaví a fluorescence v mediu stoupá. Graf 8 ukazuje výsledky změn fluorescence po přidání t-BHP při oxidaci různých substrátů, které jsou zcela v souladu s našimi předchozími experimenty. Přidání mitochondrií do media se safraninem O vede k jeho akumulaci v mitochondriích a k poklesu jeho fluorescence v mediu což ukazuje na vysoký membránový potenciál mitochondrií. Po přidání 1,5 mM t-BHP dochází k poklesu membránového potenciálu za přítomnosti endogenních substrátů, pyruvátu či glutamátu. V přítomnosti sukcinátu zůstává membránový potenciál nezměněn. Přidání rozpřahovače FCCP vede k depolarizaci mitochondriální membrány a k poklesu membránového potenciálu indukovaného oxidací sukcinátu, pyruvátu + malátu nebo glutamátu + malátu (Graf 8).



Graf 8: Vliv t-BHP na mitochondriální membránový potenciál. MMP byl detegován pomocí fluorescenční sondy – safranin O. Pokles fluorescence je spojen s nárůstem MMP. Médium obsahovalo 120 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EGTA, 1 mM K_3PO_4, 10 μM safranin O a různé mitochondriální substráty: sukcinát (10 mM), glutamát (10 mM) + malát (1,5 mM), pyruvát (10 mM) + malát (1,5 mM). K médiu se substrátem byli postupně přidány mitochondrie (0,1 mg/ml), t-BHP (1,5 mM) a FCCP (1 μ). Experiment byl 3x zopakován s různými mitochondriemi, se stejným výsledkem.

Výsledky působení t-BHP na izolované mitochondrie v podmínkách *in vitro* (kap. 5.3.) ukazují v souladu s dřívějšími nálezy (kap. 5.2.) vysokou citlivost NADH-dependentních dehydrogenáz na působení peroxidu ve srovnání s flavoprotein-dependentní sukcinát dehydrogenázou. Při hodnocení oxidace pěti různých NADH-dependentních substrátu se ukázalo, že i v této skupině existují značné rozdíly v citlivosti na peroxid. Nejvyšší citlivost vykazovala oxidace palmitylkarnitinu a oxoglutarátu + malátu (10 - 30 μM t-BHP), zatímco inhibiční efekt t-BHP na oxidaci pyruvátu a glutamátu se projevoval až při 10x vyšších koncentracích. Stejné závěry poskytuje i měření membránového potenciálu, takže pokles membránového potenciálu působením t-BHP je zřejmě důsledkem inhibičního působení na příslušné dehydrogenázy.

5.4. Mitochondriální pór přechodné permeability (*Mitochondrial Permeability Transition Pore*) jako součást mechanismů, indukujících poškození hepatocytů

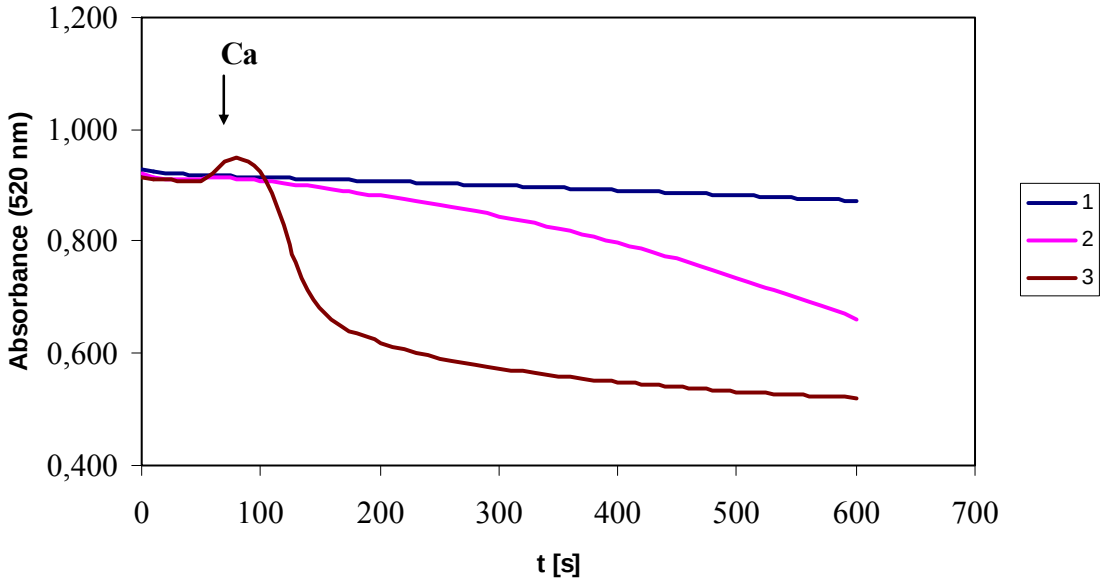
Zvláštní pozornost jsme v této část práce věnovali hodnocení funkce mitochondriálního póru přechodné permeability (MPTP) a studiu faktorů, které ovlivňují jeho funkci, protože existuje řada studií, které prokazují jeho podíl v patogenezi širokého spektra nemocí. Především u nekrotických procesů, kde indukční roli hrají kyslíkové radikály. Otevření póru vede k uvolňování cytochromu c vázaného na povrch vnitřní mitochondriální membrány, k následné aktivaci kaspázové kaskády a k indukci apoptotických a nekrotických procesů (viz teoretická část práce). Ukazuje se, že zvláště riziková je kombinace oxidačního stresu a zvyšování cytosolové koncentrace kalcia. Funkci MPTP však ovlivňuje celá řada endogenních i exogenních faktorů, např. fosfátové a magnesiové ionty, nukleotidy, mastné kyseliny, T_3 a řada dalších (Hagen et al., 2003; Petronilli et al., 1993). Snažili jsme se přispět k objasnění interakcí různých endogenních i exogenních faktorů na aktivaci (otevírání) póru. Značnou pozornost jsme věnovali dopracování nového metodického přístupu k vyhodnocování křivek popisujících bobtnání mitochondrií, který byl zahájen v diplomové práci řešené dříve na našem pracovišti (Tichý, 2006), protože bobtnání mitochondrií je ve světové literatuře používáno jako hlavní metodický postup pro hodnocení funkce MPTP. Podkladem tvrzení, že bobtnání mitochondrií je důsledkem otevírání MPTP, je jeho citlivost k imunomodulátoru cyklosporinu A nebo sanglifehrinu (Clarke et al., 2002), které otevření póru inhibují. Roli vápníku potvrzuje i fakt, že bobtnání mitochondrií lze zcela zamezit vyvázáním kalciových iontů pomocí EDTA (Labajová et al., 2006).

5.4.1. Zavedení a rozpracování nové metody pro vyhodnocování bobtnání mitochondrií jako indikátoru aktivace MPTP

Cílem této části práce bylo dopracovat způsob přesnějšího vyhodnocování průběhu křivek Ca^{2+}-indukovaného bobtnání mitochondrií. Klasický způsob zaznamenává změnu absorbance při 520 nm v čase. Z těchto grafických záznamů se jen obtížně hodnotí kinetické parametry procesu bobtnání, což je zvláště důležité pro další hodnocení vlivu různých faktorů na funkci MPTP.

5.4.1.1. Klasické křivky hodnocení bobtnání mitochondrií

Doposud je ve světové literatuře používán pouze jeden způsob vyhodnocování křivek popisujících bobtnání, který spočívá v pouhém vynesení naměřených hodnot změn absorbance mitochondrální suspenze v čase (Graf 9). Z těchto křivek lze dobře hodnotit tendence procesu bobtnání, jeho rozsah i rozdíly v čase nástupu bobtnání. Tyto údaje umožňují získat obecné představy o procesu bobtnání, neumožňují však získat pro jednotlivé hodnocené parametry přesné číselné údaje. Primární data po vynesení do grafu dávají soustavu pozvolna klesajících křivek (Graf 9), které udávají obecnou informaci, např. že vyšší koncentrace kalciových iontů míru bobtnání mitochodrii zvyšují. Za přítomnosti 1 µM cyklosporinu A a 100 µM $CaCl_2$ je křivka zcela identická s křivkou bez kalcia.

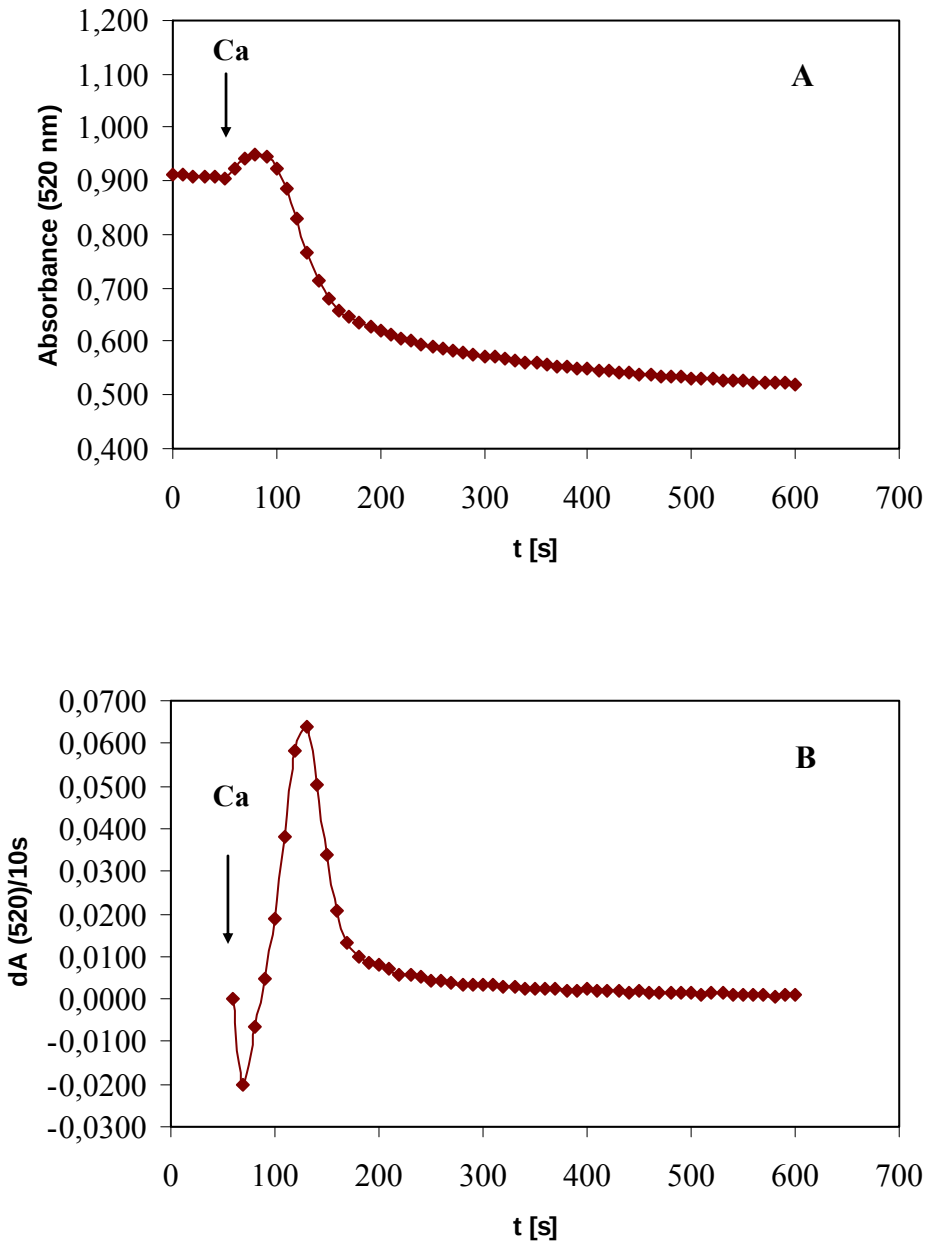


Graf 9: Bobtnání suspenze mitochondrií indukované Ca^{2+} ionty. Záznam udává změny absorbance suspenze mitochondrií (A 520 nm) v 1 ml inkubačního media za přítomnosti 5 mM sukcinátu a 0,1 mM K-fosfátu pH 7,2). Bobtnání je indukováno přidáním 12,5 (křivka 2) a 100,0 (křivka 3) µM $CaCl_2$ v čase 60 s inkubace. Křivka 1 je bez přidání $CaCl_2$.

5.4.1.2. Derivované křivky bobtnání mitochondrií

Jak je patrné z křivek (viz Graf 9) mění se strmost klesání v různých časových intervalech. Pro zpřesnění odečítání konkrétních výsledků, jsme ale potřebovali mnohem přesnější způsob hodnocení naměřených dat, tak aby bylo možné jim přiřadit konkrétní číselné hodnoty. Toho lze dosáhnout derivací primárních dat změn bobtnání. Tento způsob hodnocení prvně použil ve své magisterské práci Tichý (2006).

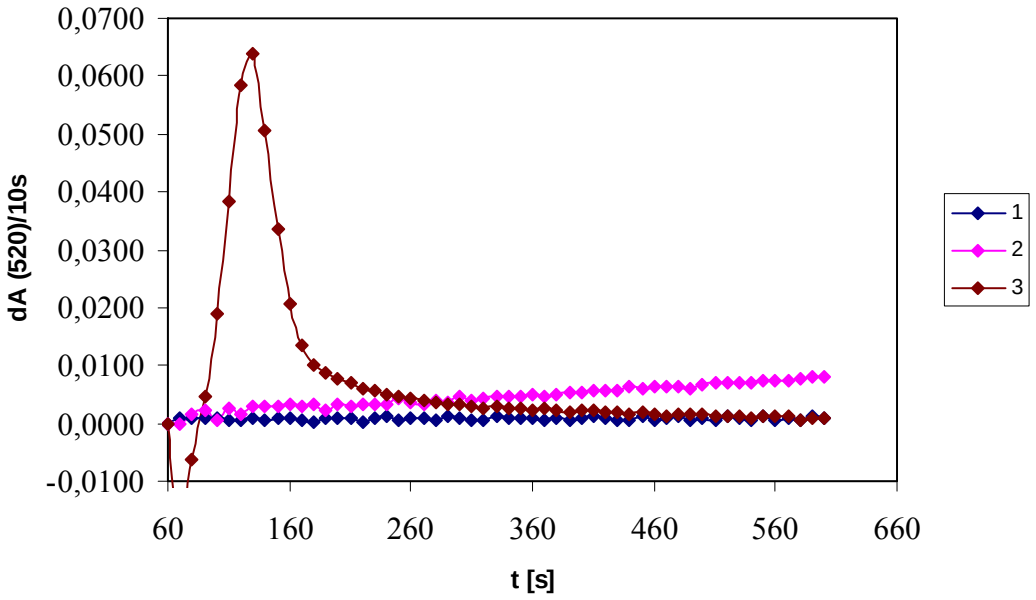
Derivační interval jsme zvolili 10 sekund. Ten s dostatečnou přesností zvýrazňuje změnu strmosti poklesu křivek i dobu, kdy rychlost bobtnání dosahuje maxima. Z grafu, který znázorňuje negativní hodnoty primární derivace, vyjádřené jako změna absorbance v 10ti s. intervalech, lze získat hodnoty rychlosti bobtnání vyjádřené jako dA520/10 s. Následující graf (Graf 10A,B) demonstruje, jakým způsobem se změní finální výstup a jaké to přináší výrazné zlepšení možnosti interpretace dat. Graf 11 ukazuje zpracování grafu 9 v derivované formě.



Graf 10: A: Registrace dat bobtnání (křivka 3 graf 9) v 10ti s intervalech. B: Derivace dat uvedených v grafu 10A.

Tento postup hodnocení naměřených dat není zatím v literatuře popsán. Jeho výhody jsou patrné na první pohled. Z derivovaných dat lze jednoduše odečíst několik důležitých informací, které z původních grafů bylo možné odečítat jen obtížně či značně nepřesně. Jedná se zejména o počátek nástupu bobtnání po přidání vápenatých iontů a o přesný údaj maximální rychlosti bobtnání. Z derivované křivky lze odečíst i dobu, kdy rychlost bobtnání dosahuje maximálních hodnot. Lze tedy shrnout, že způsob zpracování dat založený na derivování primárních dat sebou přináší hned několik výrazných zlepšení oproti dřívějšímu způsobu.

Pro posouzení funkce MPTP je vhodné kombinovat oba způsoby vyhodnocení získaných dat. Z primárních dat lze získat orientační údaje o průběhu bobtnání, z derivovaných dat pak číselné hodnoty pro jednotlivé sledované parametry.



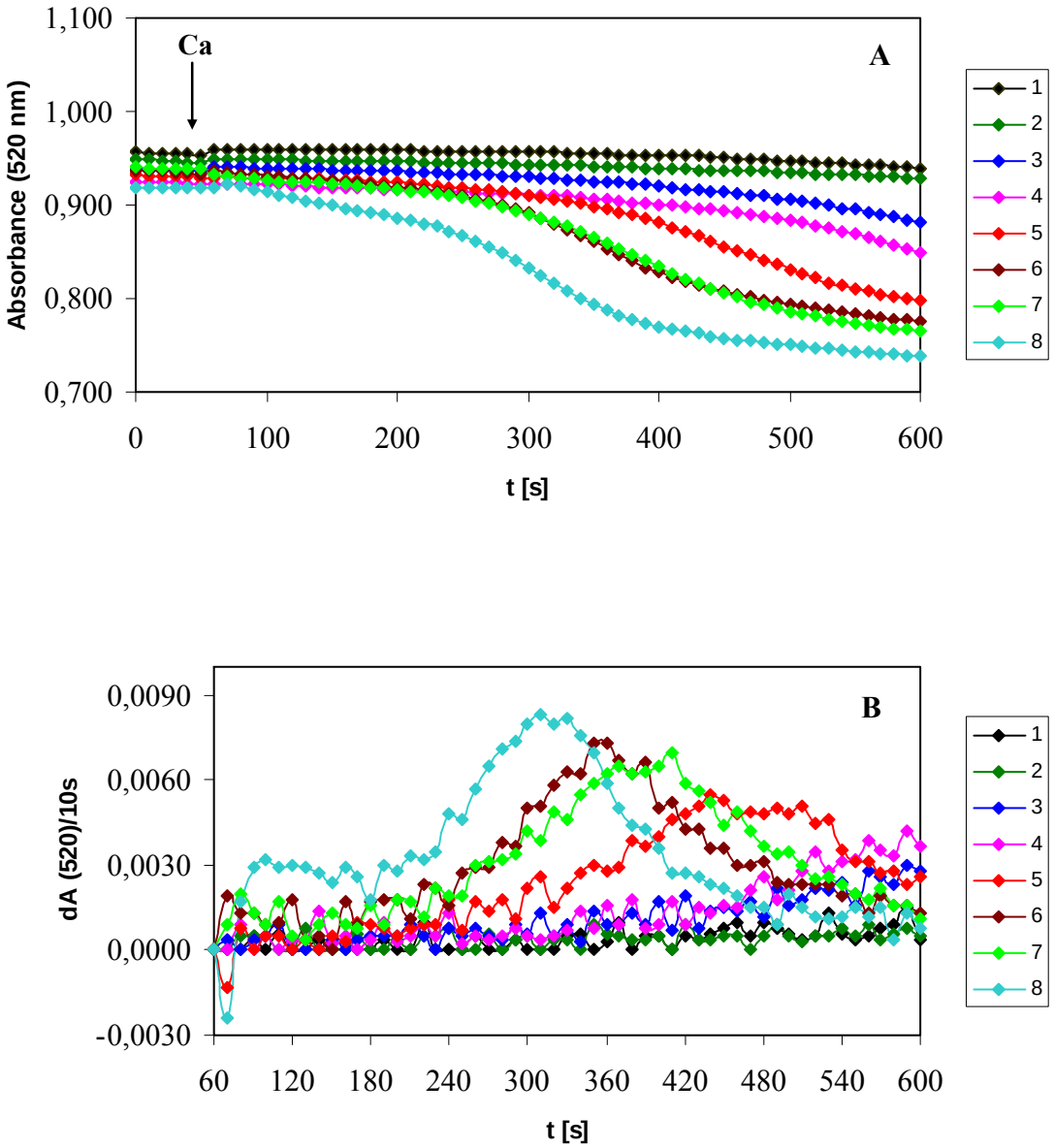
Graf 11: Derivace křivek bobtnání mitochodrií uvedených v grafu 9. Záznam udává změny absorbance suspenze mitochondrií (A 520 nm) v 1 ml inkubačního média za přítomnosti 5 mM sukcinátu a 0,1 mM K-fosfátu pH 7,2). Změny bobtnání byly registrovány v 10ti s intervalech a následně byla provedena derivace dat (viz graf 10 A,B). Křivka 1 je bez přidání $CaCl_2$. Bobtnání je indukováno přidáním 12,5 (křivka 2) a 100 µM $CaCl_2$ v čase 60 s inkubace.

5.4.2. Vliv různých faktorů na funkci MPTP

Naším úkolem bylo sledovat vliv řady faktorů na funkci MPTP izolovaných jaterních mitochondrií v podmínkách *in vitro*. Izolované mitochondrie byly vystaveny postupnému či současnému účinku Ca^{2+}, PO_4^{3-}, T_3 a t-BHP a byl sledován vliv těchto látek na průběh bobtnání.

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

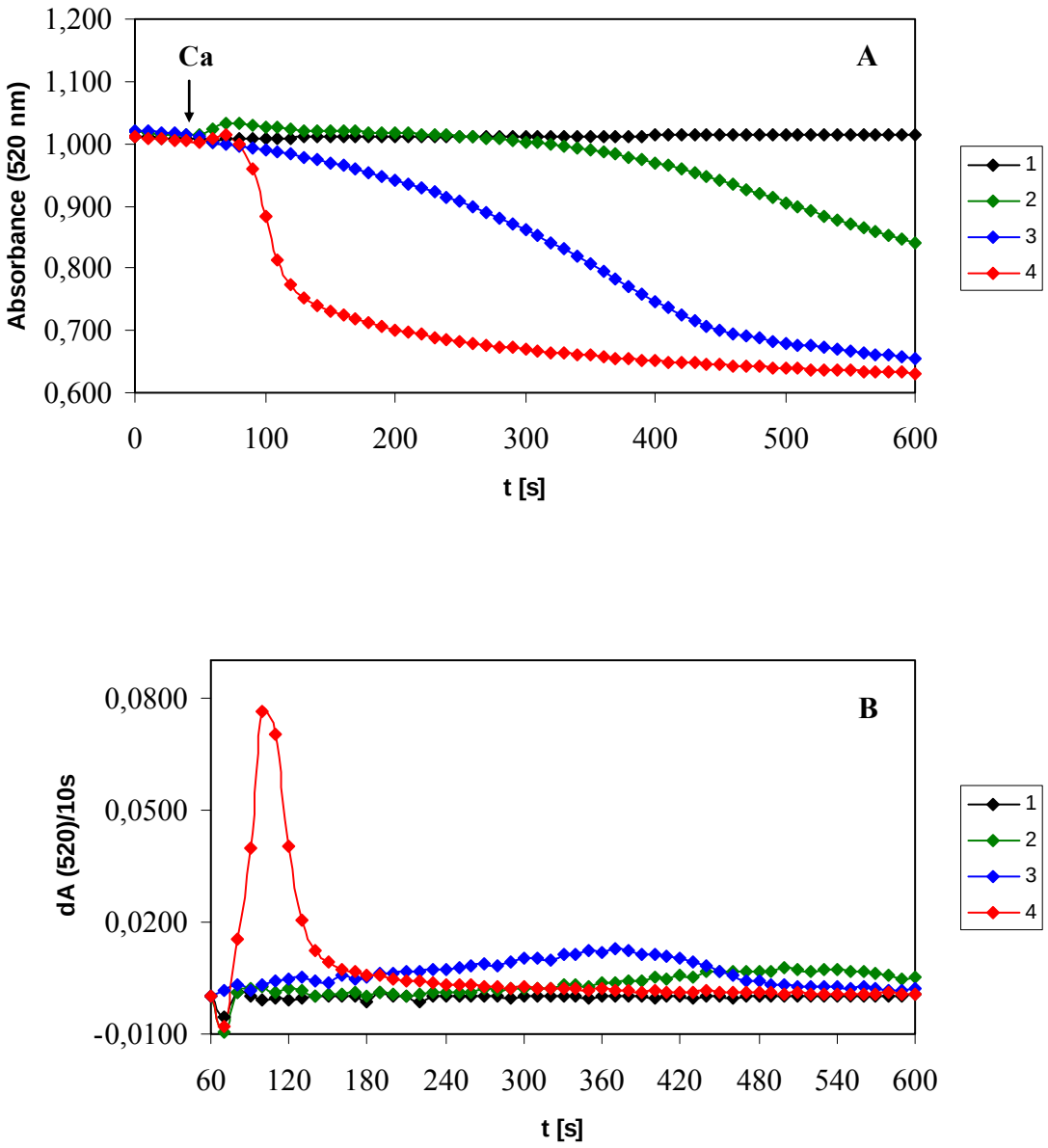
V prvních experimentech jsme pomocí nové metody potvrdili dřívější nálezy dokazující, že Ca^{2+} je induktorem otevírání membránového póru a Pi ionty působení Ca^{2+} aktivují. V našich pokusech jsme testovali vliv samotného Ca^{2+} na bobtnání mitochondrií. Jak vyplývá z grafu 12, samotné Ca^{2+} ve fyziologických koncentracích (5 - 12 μM) má na bobtnání mitochondrí jen minimální vliv. Teprve až vyšší koncentrace Ca^{2+} (100 - 400 μM) indukují bobtnání mitochondrií (Graf 12). Nástup bobtnání je velmi pomalý. Maximální hodnota rychlosti bobtnání je dosažena až u nejvyšší použité koncentrace 400 μM Ca^{2+}. Reakční směs obsahovala médium, suspenzi mitochondrií, sukcinát a Ca^{2+}. Roztok Ca^{2+} byl dávkován mezi 50. a 60. s od počátku měření a bylo použito Ca^{2+} ($CaCl_2$) o výsledné koncentraci 5 - 400 μM.



Graf 12: Swelling mitochondrií indukovaný Ca^{2+} bez přídavku Pi. A: klasické vyhodnocení dat, **B:** derivace původní křivky. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, s přídavkem Ca^{2+} v 50 - 60 s (1) 5,0 µM Ca^{2+}, (2) 12,5 µM Ca^{2+}, (3) 25,0 µM Ca^{2+}, (4) 50,0 µM Ca^{2+}, (5) 100,0 µM Ca^{2+}, (6) 150,0 µM Ca^{2+}, (7) 200,0 µM Ca^{2+}, (8) 400,0 µM Ca^{2+}.

Tato měření jsme doplnili srovnáním aktivace bobtnání přídavkem Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM při aplikaci 15 a 150 µM $CaCl_2$ (viz Graf 13). Roztok Ca^{2+} byl dávkován opět mezi 50. a 60. s od počátku měření. Vidíme, že za přítomnosti 0,1 mM Pi se zvyšuje jak rychlost bobtnání, tak se i zkracuje doba, kdy po přidání kalciových iontů dosahuje rychlost bobtnání maximálních hodnot. I z klasického

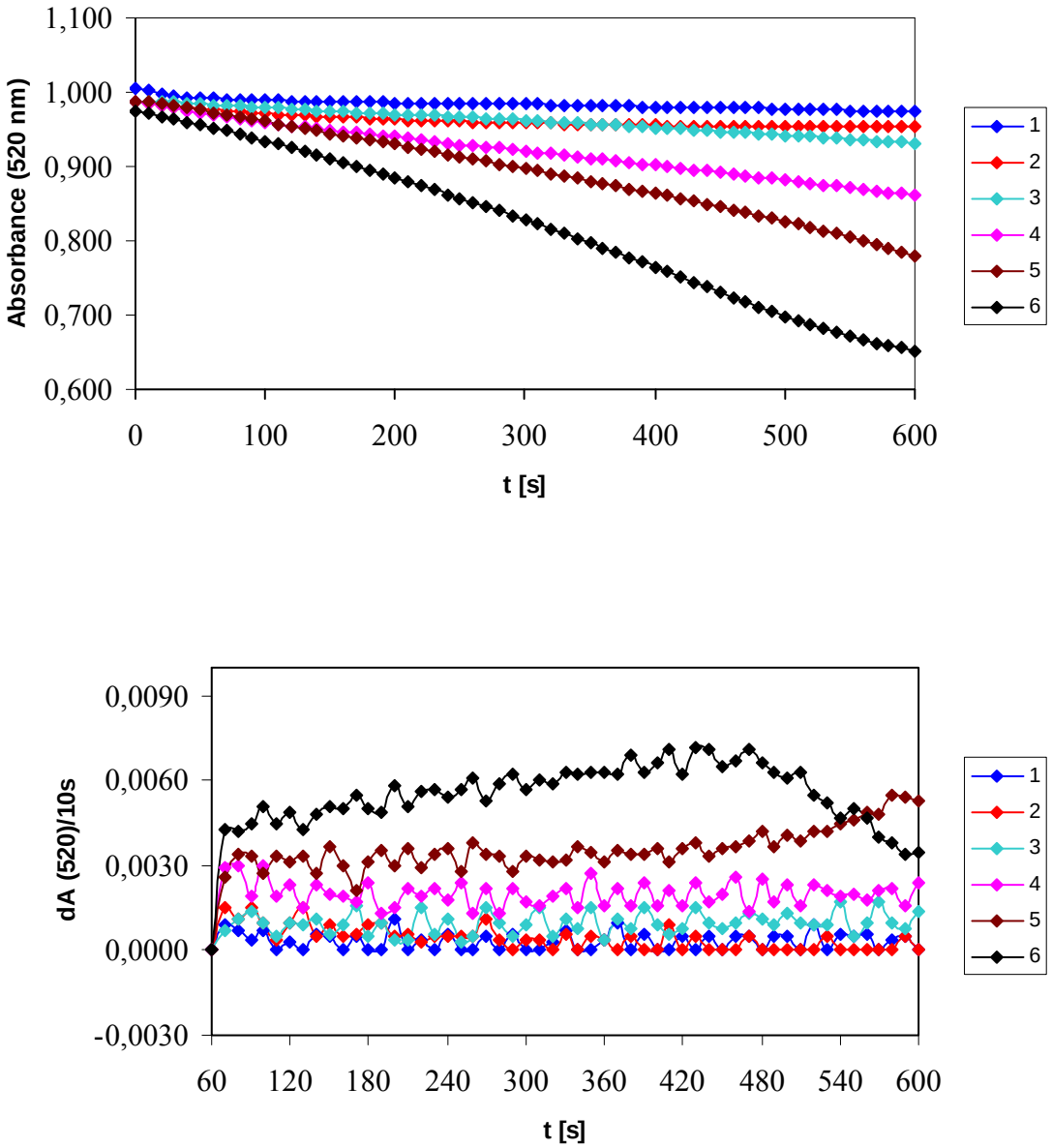
záznamu křivek je zřejmé, že 0,1 mM Pi značně potencuje bobtnání indukované 15 i 150 µM $CaCl_2$. Derivace naměřených hodnot bobtnání však umožní aktivační efekt Pi lépe kvantifikovat. Vidíme zde výrazné rozdíly u obou koncentrací $CaCl_2$ a to jak v maximální rychlosti bobtnání, tak i v době nástupu po aplikaci Ca^{2+}. Na základě těchto orientačních experimentů jsme mohli přistoupit k podrobnějšímu hodnocení koncentrační závislosti Ca^{2+} a Pi na průběh aktivace MPTP.



Graf 13: Swelling mitochondrií indukovaný Ca^{2+} za přítomnosti 0,1 mM Pi. A: klasické vyhodnocení dat, **B:** derivace původní křivky. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu. (1) bez Pi, 15,0 µM Ca^{2+}, (2) bez Pi, 150,0 µM Ca^{2+}, (3) 0,1 mM Pi, 15,0 µM Ca^{2+}, (4) 0,1 mM Pi, 150,0 µM Ca^{2+}.

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

Nepřítomnost Pi v reakční směsi je v literatuře popisována jako faktor vedoucími k inhibici funkce MPTP (Byrne et al., 1999; Hagen et al., 2003). Vzhledem k těmto poznatkům jsem se rozhodli doplnit naše měření i o sledování vlivu samotného Pi na bobtnání mitochondrií. Jak je patrné z grafu 14, je MPT závisly na koncentraci Pi v inkubačním médiu. Rostoucí koncentrace Pi v reakční směsi zvyšuje míru bobtnání a tím i větší pokles absorbance suspenze mitochondrií. Reakční směs obsahovala médium, suspenzi mitochondrií, sukcinát a Pi. V naší studii jsme použili 0,05; 0,10; 0,50; 1,00 mM Pi. Vzhledem k přítomnosti stopového množství Ca^{2+} v inkubačním médiu, které je přítomno ve vodě a v chemikáliích, bylo toto měření doplněno o měření, kdy do inkubačního média s 1,00 mM Pi bylo přidáno chelatační činidlo EGTA (o výsledné koncentraci 250 μM), které vyváže v médiu veškeré Ca^{2+}. Prokázali jsme, že za těchto podmínek je samotný vliv 1 mM Pi na bobtnání mitochondrií prakticky nulový. Z tohoto měření je patrné, že samotný Pi bez Ca^{2+} není schopen navodit MPT. Protože jedním z naších cílů bylo sledovat vliv Ca^{2+} na MPT, nebylo možné v dalších krocích používat chelatační činidlo a počítali jsme s tím, že v roztoku bude vždy určité množství Ca^{2+}. Vzhledem k tomu, že jsme potřebovali sledovat indukční vliv několika látek na MPT, rozhodli jsme se pro další pokusy používat Pi o koncentraci 0,10 mM. Tato koncentrace Pi se nám zdála jako nejvhodnější. 0,10 mM Pi byl už schopen navodit bobtnání mitochondrií, které jsme chtěli dále modulovat přídavkem dalších látek ovlivňujících bobtnání.



Graf 14: Swelling mitochondrií indukovaný fosfátovými ionty. A: klasické vyhodnocení dat, **B:** derivace naměřených hodnot. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním mediu bez přidání vápenatých iontů. Koncentrace fosfátu v inkubačním mediu byly: křivka (1) bez Pi, (3) 0,05 mM Pi, (4) 0,10 mM Pi, (5) 0,50 mM Pi, (6) 1 mM Pi, (2) 1,00 mM Pi + EDTA přidané v 50. s inkubace o výsledné koncentraci 250 µM.

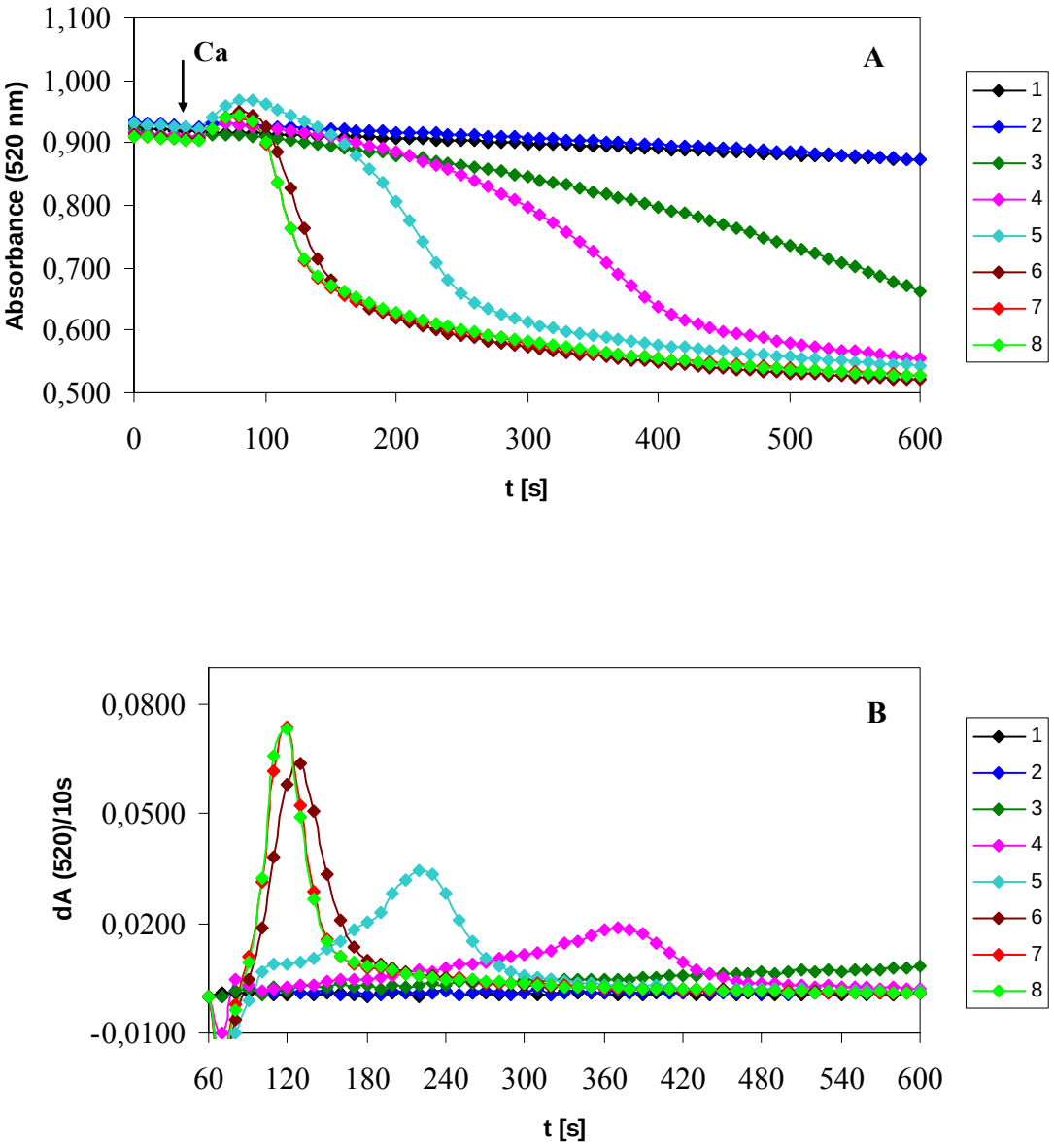
Jak vyplývá z grafu 14, Pi v koncentraci pod 0,05 mM má minimální efekt na bobtnání mitochondrií. U vyšších koncentrací Pi (0,10; 0,50 a 1,00 mM) lze prokázat minimální vzestup bobtnání v závislosti na koncentraci přidaného Pi (křivky 4, 5, 6).

Toto bobtnání, ale souvisí s přítomnosti Ca^{2+} iontů v mediu. Jak ukazuje srovnání křivky 6 a 2, EGTA zcela inhibuje bobtnání indukované 1,00 mM Pi.

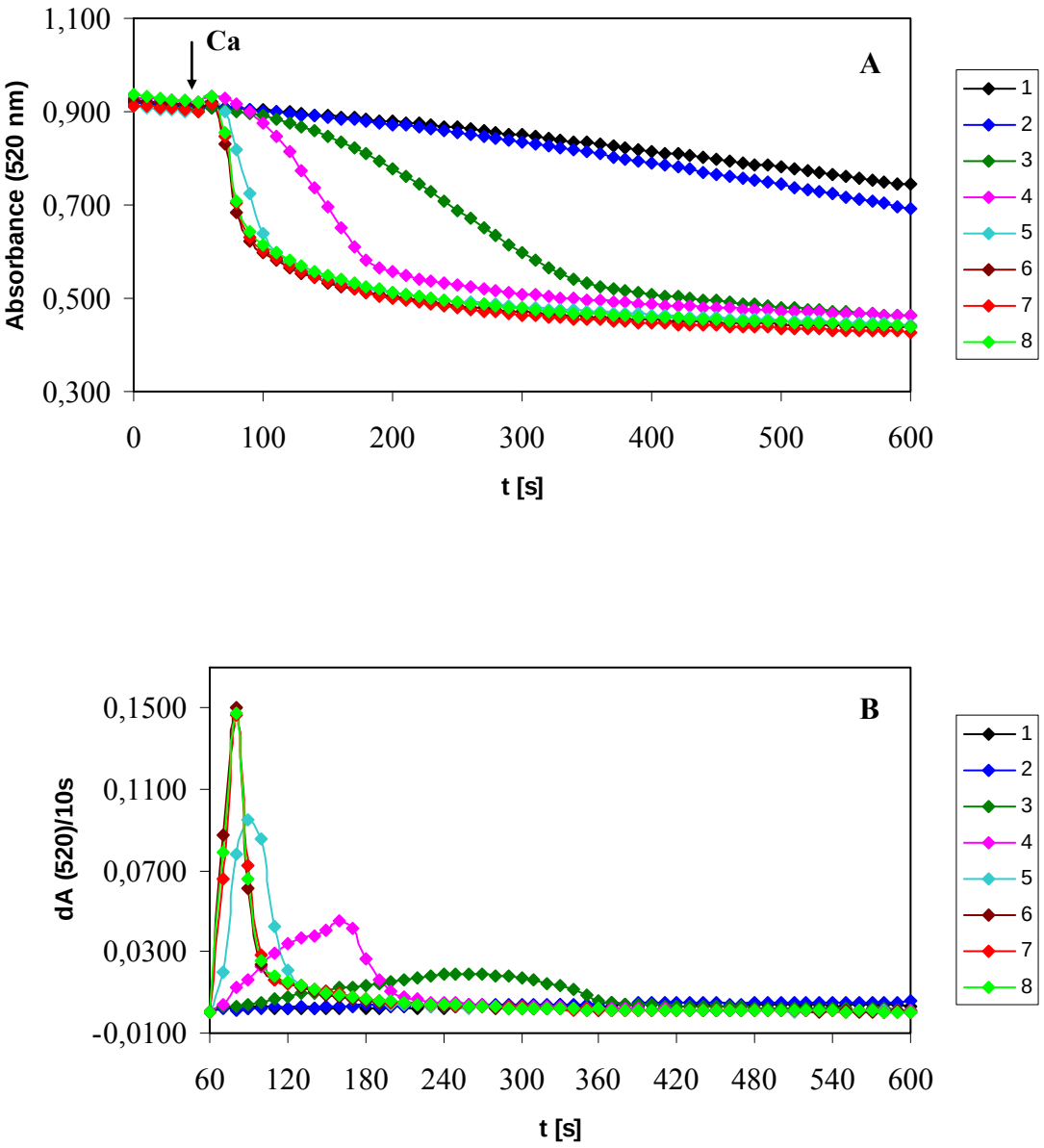
5.4.2.3. Interakce Ca^{2+} a Pi při aktivaci MPTP

Cílem této části bylo sledovat průběh Ca^{2+}-indukovaného bobtnání a hodnotit působení různých aktivačních faktorů (Pi, ROS, T_3) při různých koncentracích Ca^{2+} a při různých koncentracích jednotlivých aktivátorů. Hodnotili jsme nejprve koncentrační závislost vlivu Ca^{2+} v přítomnosti 0,1 mM Pi, které samo o sobě, jak jsme zjistili v předešlých pokusech (Graf 12), indukuje bobtnání minimálně, ale vykazuje již značný aktivační efekt za přítomnosti Ca^{2+}. Tyto výsledky jsou shrnuty v grafech 15A,B. Výsledky ukazují, že zvyšování koncentrace Ca^{2+} v inkubačním mediu vede jak k růstu rychlosti bobtnání, tak i ke zkracováni doby nástupu maximální rychlosti. Z grafu je též patrné, že maximální rychlosti bobtnání za daných experimentálních podmínek je dosaženo při výsledné koncentraci 100,0 μM Ca^{2+}.

V druhé sérii měření byl použit Pi o výsledné koncentraci 1,0 mM (Grafy 16A,B). Reakční směs obsahovala médium, suspenzi mitochondrií, sukcinát. Roztok Ca^{2+} byl dávkován mezi 50. a 60. s od počátku experimentu. Bylo přidáváno Ca^{2+} o výsledné koncentraci 5,0 až 150,0 μM. Jak je patrné z grafů 15 a 16, při vyšší koncentraci fosfátu (1 mM) byl charakter změn při rostoucí koncentraci Ca^{2+} v reakční směsi přibližně stejný, hodnoty rychlosti bobtnání však byly přibližně dvojnásobné.

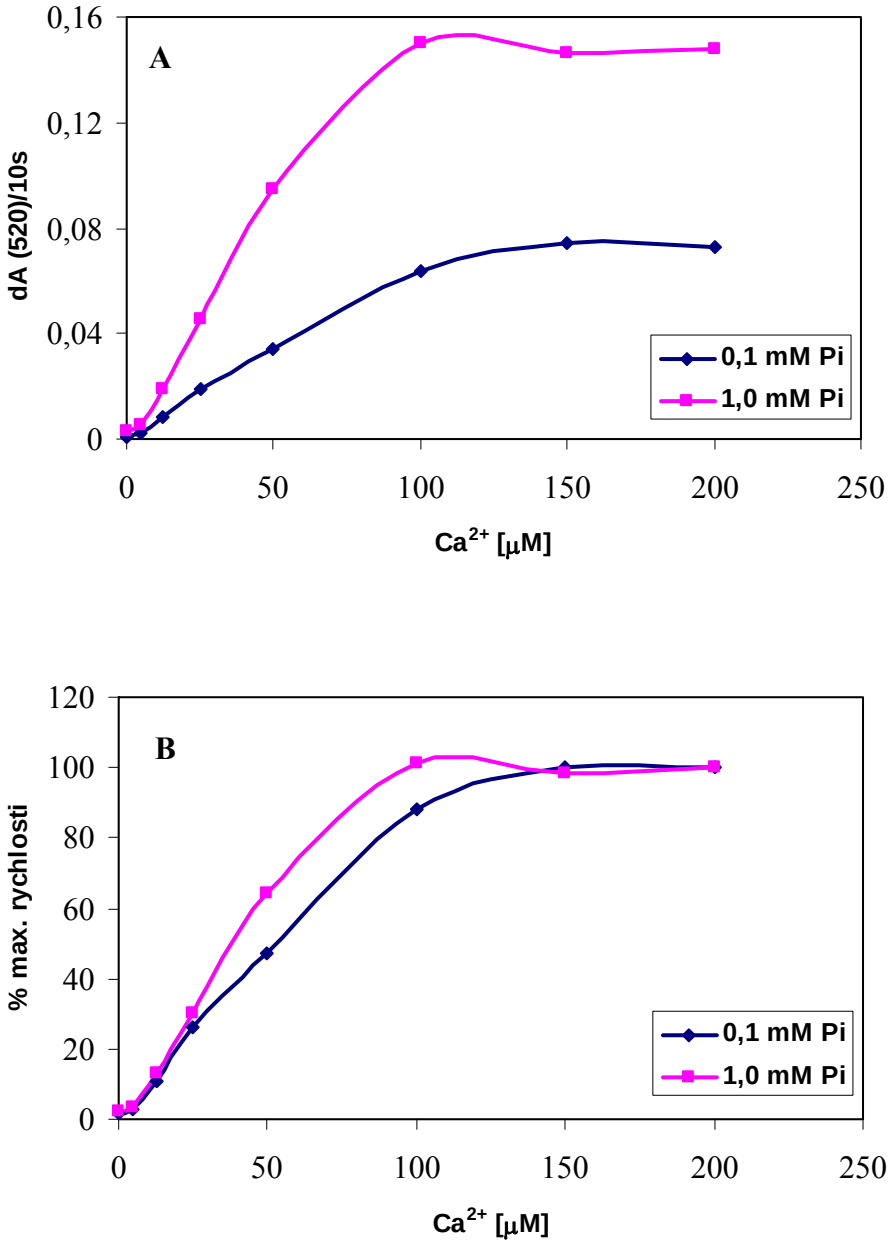


Graf 15: Swelling mitochondrií indukovaný Ca^{2+}, za přítomnosti 0,1 mM Pi. A: klasické vyhodnocení dat, **B:** derivace původní křivky. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu s Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM. (1) 0,0 µM Ca^{2+}, (2) 5,0 µM Ca^{2+}, (3) 12,5 µM Ca^{2+}, (4) 25,0 µM Ca^{2+}, (5) 50,0 µM Ca^{2+}, (6) 100,0 µM Ca^{2+}, (7) 150,0 µM Ca^{2+}, (8) 200,0 µM Ca^{2+}.

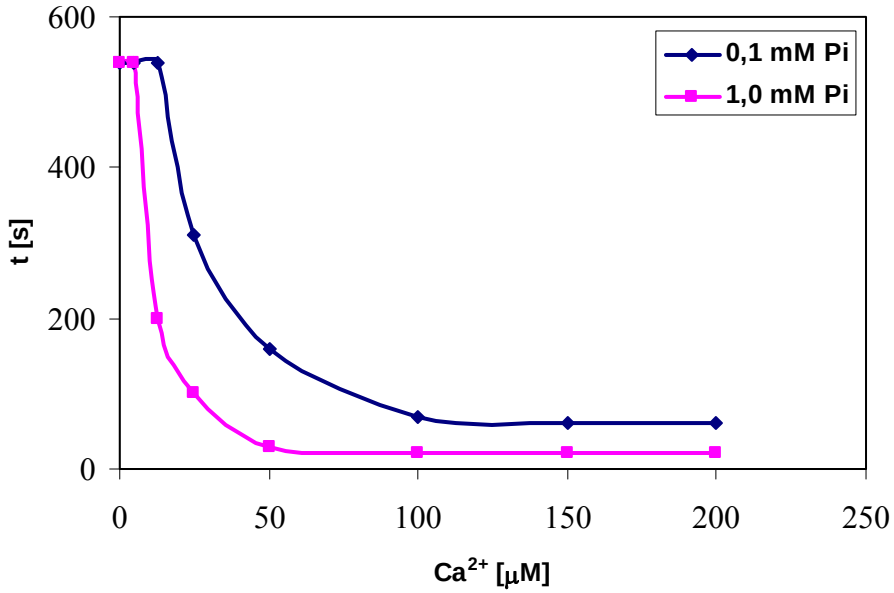


Graf 16: Swelling mitochondrií indukovaný Ca^{2+}, za přítomnosti 1,0 mM. A: klasické vyhodnocení dat, **B:** derivace původní křivky. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu s Pi o výsledné koncentraci 1,0 mM. (1) 0,0 µM Ca^{2+}, (2) 5,0 µM Ca^{2+}, (3) 12,5 µM Ca^{2+}, (4) 25,0 µM Ca^{2+}, (5) 50,0 µM Ca^{2+}, (6) 100,0 µM Ca^{2+}, (7) 150,0 µM Ca^{2+}, (8) 200,0 µM Ca^{2+}.

Údaje v grafech 15A,B a 16A,B jsou vyhodnoceny v grafech 17A,B a 18. Z grafu 17A vyplývá, že v přítomnosti 0,1 mM Pi v inkubačním mediu dosahuje kalcium maximálního aktivačního efektu při 100 μM $CaCl_2$. Další zvyšování koncentrace Ca^{2+} již dále rychlost bobtnání neovlivní. Při použití 1,0 mM Pi, má Ca^{2+} podstatně vyšší aktivační efekt. Také v tomto případě zvyšování rychlosti bobtnání při zvyšující se koncentraci $CaCl_2$ dosahuje maxima při 100 μM $CaCl_2$. Můžeme tedy uzavřít, že fosfátové ionty ovlivňují především rychlost bobtnání mitochondrií. Jak vyplývá z charakteru křivek v grafech 15A a 16A v obou případech 0,1 a 1,0 mM Pi dosahuje maximální rozsah bobtnání přibližně stejných hodnot a koncentrace Pi ovlivňuje především rychlost s jakou je toto maximum dosaženo. Jak je patrné z grafu 17B, je průběh aktivačního efektu různých koncentrací Pi stejný. Hodnoty z grafu 17A jsou zde vyjádřeny v % maximální rychlosti, při dané koncentraci Pi. Z hodnot v grafech 15B a 16B můžeme také vyhodnotit čas, kdy indukce bobtnání Ca^{2+} ionty dosáhne maximální rychlosti. I zde je vliv koncentrace Pi patrný. Je však daleko nižší, než při ovlivňování rychlosti bobtnání (Graf 18).



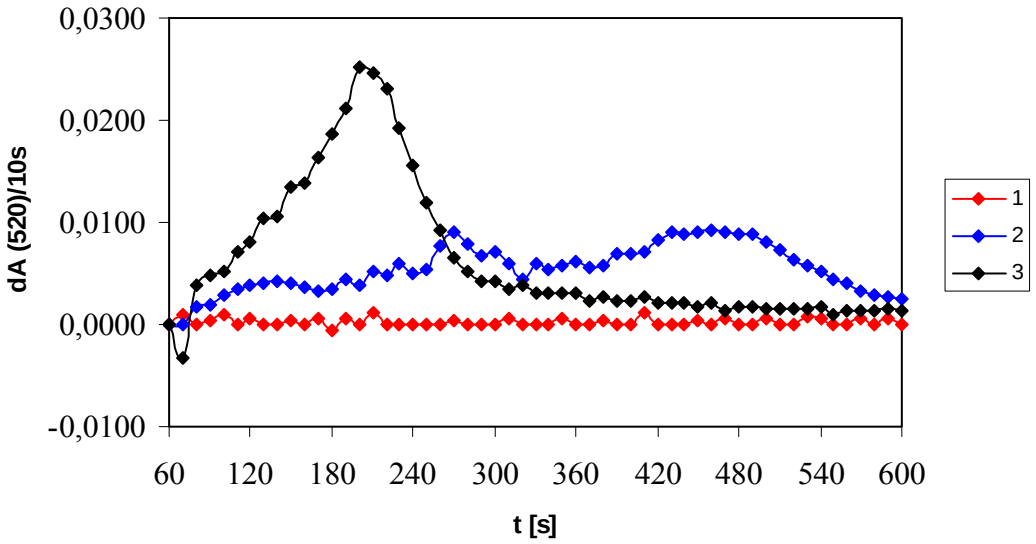
Graf 17: A: Aktivace rychlosti bobtnání jaterních mitochondrií zvyšující se koncentrací $CaCl_2$ za přítomnosti 0,1 a 1,0 mM Pi. **B:** Hodnoty křivek A vyjádřené v % maximální rychlosti. Inkubační podmínky byly stejné jako v grafech 15A a 16A.



Graf 18: Doba nástupu maximální rychlosti bobtnání indukovaného různou koncentrací $CaCl_2$ za přítomnosti 0,1 a 1,0 mM Pi. Jednotlivé hodnoty jsou vypočítány z křivek v grafech 15B a 16B.

5.4.2.4. Aktivace kalciem indukovaného bobtnání jaterních mitochondrií působením t-BHP. Peroxidační stres aktivuje Ca^{2+}-indukované bobtnání

Řada publikovaných prací ukazuje, že oxidační stres významně aktivuje Ca^{2+}-indukované bobtnání mitochondrií (Kowaltowski et al., 2001; Venditti et al., 2003). Někteří autoři předpokládají, že oxidační stres může být i hlavním induktorem tohoto procesu (Lemasters et al., 1998). Snažili jsme se proto tyto nálezy zopakovat v našich experimentálních podmínkách. Jak ukazuje Graf 19, přídavek 1,5 mM t-BHP výrazně zvyšuje rychlost bobtnání jaterních mitochondrií indukovanou 25 μM $CaCl_2$. Protože jsme chtěli prokázat, že aktivační efekt t-BHP ovlivňuje nespecifický MPTP, použili jsme CsA jako specifický inhibitor funkce MPTP (Byrne et al., 1999; Hagen et al., 2003). CsA se váže na Cyp D, čímž mění jeho schopnost navázat na se vnitřní mitochondriální membránu, na komplex proteinů které tvoří MPTP. Tím, že CsA zamezí vazbě Cyp D na MPTP, inhibuje jeho funkční aktivitu. Bobtnání indukované 25 μM $CaCl_2$ a 0,1 mM Pi, stejně jako bobtnání indukované 25 μM $CaCl_2$ a 1,5 mM t-BHP, lze zcela inhibovat 5 μM CsA, což ukazuje, že toto bobtnání je důsledkem otevření MPTP.



Graf 19: Swelling mitochondrií indukovaný pomocí t-BHP. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu s Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM a s přídavkem Ca^{2+} o výsledné koncentraci 25,0 µM. (1) 5,0 µM CsA, 1,5 mM t-BHP, (2) bez CsA, bez t-BHP, (3) bez CsA, 1,5 mM t-BHP.

5.4.3. Vliv trijodtyroninu na funkci MPTP: in vitro a in vivo

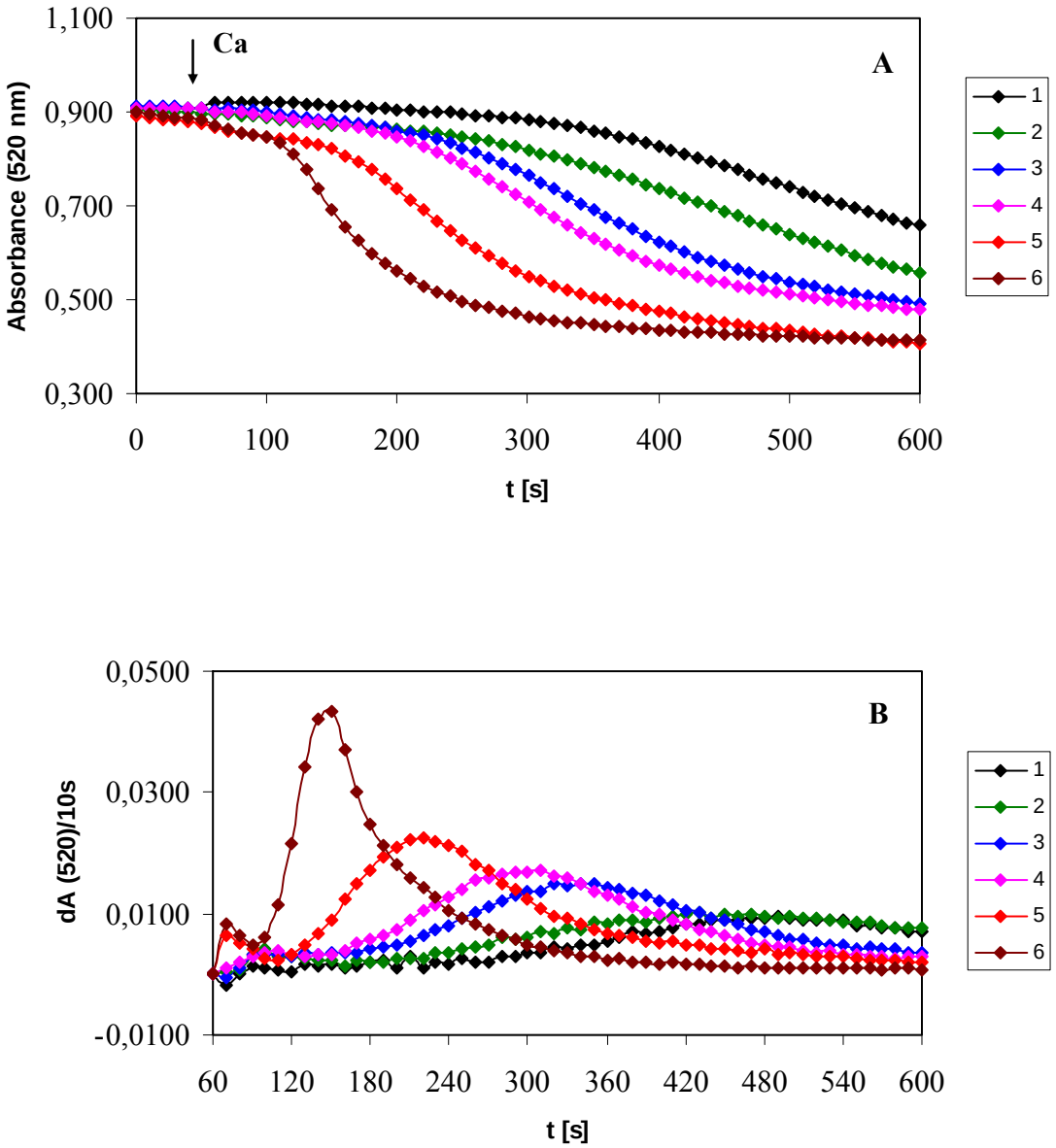
Hormony štítné žlázy svými účinky zasahují jak do biogeneze, tak i do energetického metabolizmu mitochondrií. Již dřívější studie prokázaly, že tyto hormony zvyšují syntézu komponent dýchacího řetězce kódovaných jak v jádře, tak i v mitochondriích. Indukují děje, které vedou ke změnám ve složení lipidů mitochondriálních membrán, zvyšují aktivitu adenin nukleotidových translokáz a stimulují buněčnou respiraci a eflux Ca^{2+} iontů (Drahota et al., 1999; Goglia et al., 1999; Lombardi et al., 2007; Mráček et al., 2005; Weitzel et al., 2003). V nedávné době se podařilo prokázat, že T_3 aplikovaný potkanům v podmínkách *in vivo* aktivuje MPTP izolovaných mitochondrií. T_3 v přítomnosti Ca^{2+} indukuje oxidaci SH skupin membránových proteinů, což vede ke změně v produkci ROS a následně k aktivaci MPTP (Halestrap et al., 1997; Kowaltowski et al., 1997).

Již velmi staré práce ukazují, že thyroidální hormony indukují bobtnání mitochondrií (Tapley, 1956). V té době však nebyla ještě prokázána existence MPTP v mitochondriální membráně a efekt thyroidálních hormonů byl přisuzován poškození mitochondriální membrány. Teprve v posledních letech byl efekt T_3 studován v souvislosti s funkcí MPTP jako Ca^{2+}-indukované, cyklosporin-sensitivní bobtnání.

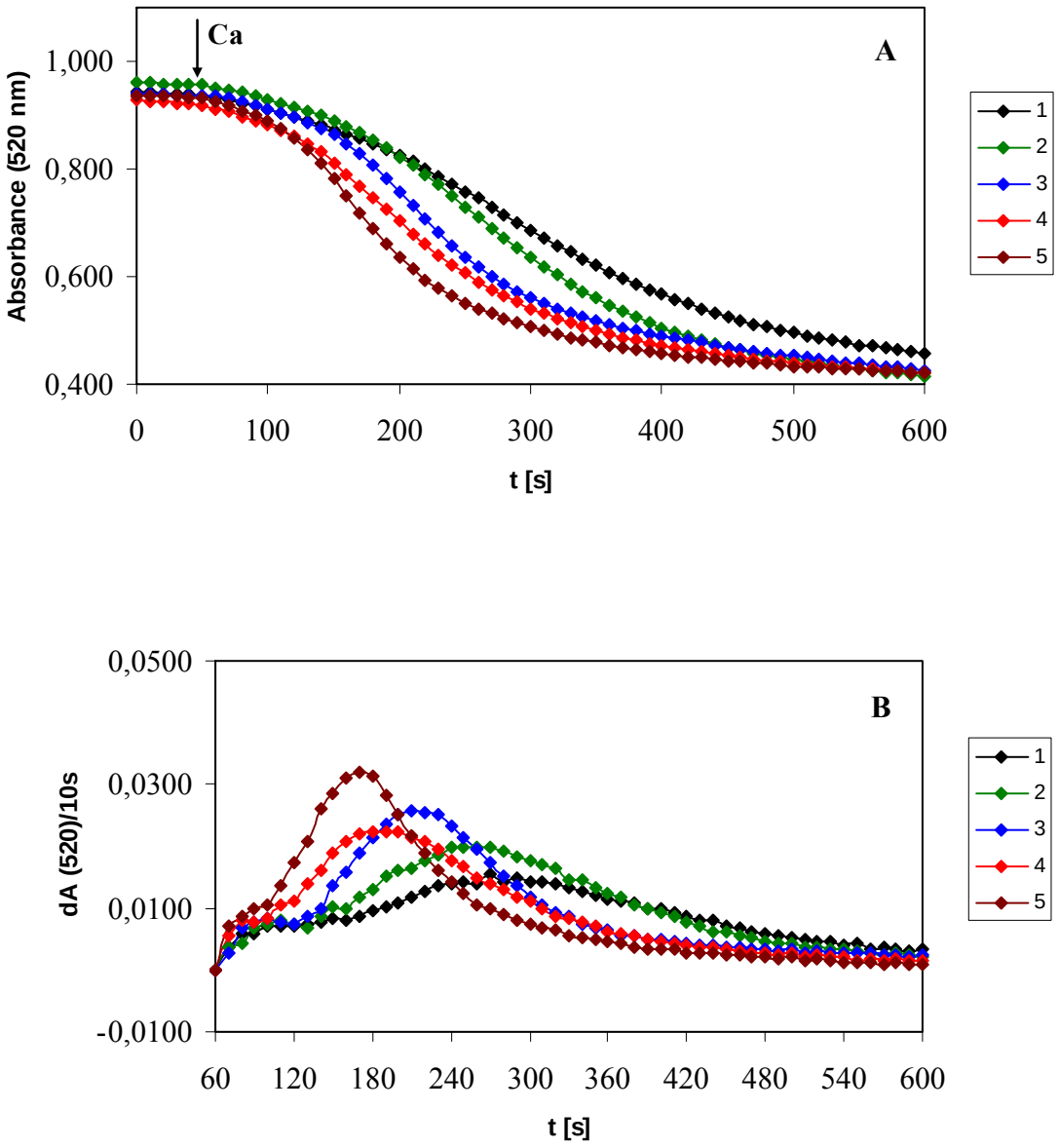
Protože v literatuře neexistují jednoznačné závěry o působení T_3 na Ca^{2+}-indukované bobtnání a na vzájemné interakce Ca^{2+}, Pi a T_3, rozhodli jsme se v dalších experimentech tento účinek prověřit a vyhodnotit pomocí naší nové metody. Vliv T_3 na rychlost bobtnání izolovaných mitochondrií jsme hodnotili jak při aplikaci *in vitro*, tak po aplikaci T_3 potkanům *in vivo*.

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

V první fázi pokusů jsme sledovali účinek různých koncentrací T_3 na bobtnání mitochondrií. K inkubačnímu médiu, které neobsahovalo Pi, jsme přidávali T_3 o výsledné koncentraci: 1,25; 2,50; 5,00; 15,00 a 25,00 μM. Jako induktor bobtnání jsme použili 50,0 μM Ca^{2+}, který byl přidáván mezi 50. a 60. s od počátku inkubace (Graf 20). Zjistili jsme, že zvyšující se koncentrace T_3 aktivuje bobtnání indukované 50 μM Ca^{2+}. V dalším pokusu jsme indukovali bobtnání vyšší koncentrací Ca^{2+} (200,0 μM). Koncentrace T_3 byla v tomto pokusu: 1,25; 2,50; 5,00; 7,50 a 10,00 μM (Graf 21). Jak je patrné z grafů 20A a 21A, rostoucí koncentrace T_3 v reakčním mediu způsobuje rostoucí intenzitu bobtnání. Koncentrace T_3 v rozmezí 2,5 - 25 μM se liší jak dobou nástupu bobtnání, tak i maximální rychlostí. V průběhu bobtnání však celkový rozsah tohoto jevu dosáhne přibližně stejných hodnot (Grafy 20A a 21A). Podrobněji a daleko přesněji lze tyto parametry vyhodnotit po derivaci klasických křivek bobtnání mitochondrií (Grafy 20B a 21B).

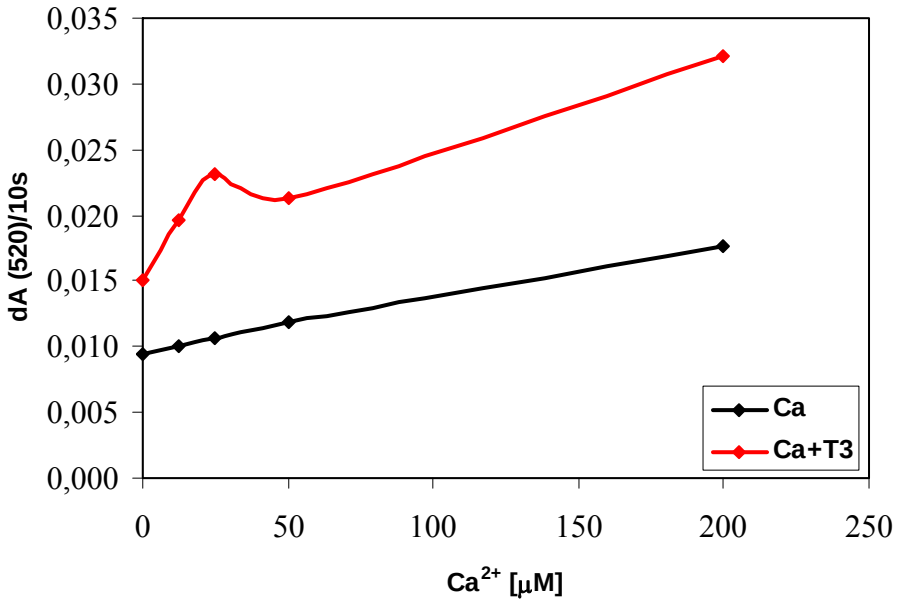


Graf 20: Swelling mitochondrií indukovaný trijodtyroninem. A: klasické vyhodnocení dat, **B:** derivace původní křivky. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, bez Pi a s přídavkem Ca^{2+} o výsledné koncentraci 50,00 µM. (1) bez T_3, (2) 1,25 µM T_3, (3) 2,50 µM T_3, (4) 5,00 µM T_3, (5) 15,00 µM T_3, (6) 25,00 µM T_3.

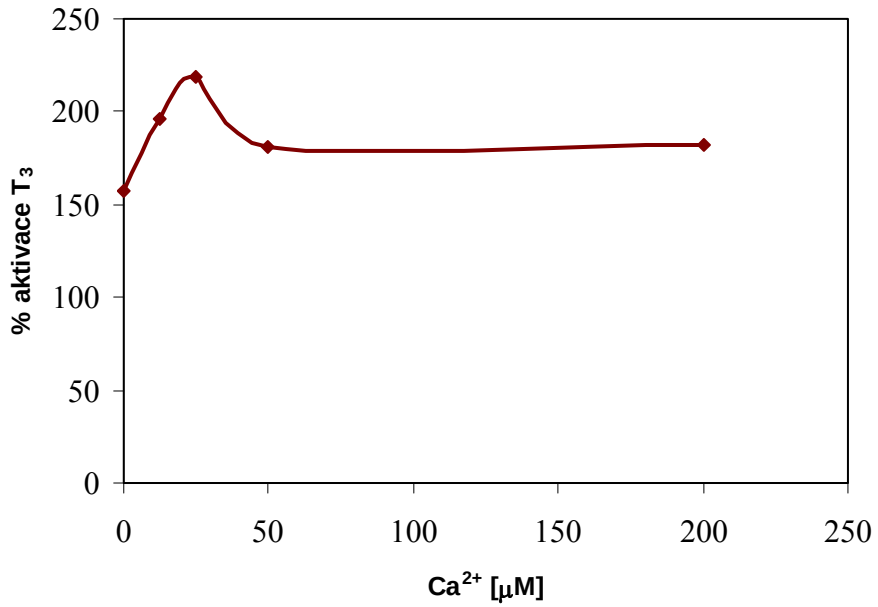


Graf 21: Swelling mitochondrií indukovaný trijodtyroninem. A: klasické vyhodnocení dat, **B:** derivace původní křivky. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, bez Pi a s přídavkem Ca^{2+} o výsledné koncentraci 200,00 µM. (1) 1,25 µM T_3, (2) 2,50 µM T_3, (3) 5,00 µM T_3, (4) 7,50 µM T_3, (5) 10,00 µM T_3.

Z derivovaných křivek lze zcela přesně odečíst jak maximální hodnotu rychlosti bobtnání, tak i dobu, kdy je této rychlosti dosaženo po aplikaci Ca^{2+}. Souhrnně jsou tyto hodnoty uvedeny v grafech 22 a 23. T_3 zvyšuje rychlost bobtnání i bez přítomnosti Ca^{2+} na 157% hodnoty bez T_3. Při použitých koncentracích Ca^{2+} se nárůst rychlosti bobtnání pohybuje v rozmezí 180 - 220% (Graf 23).



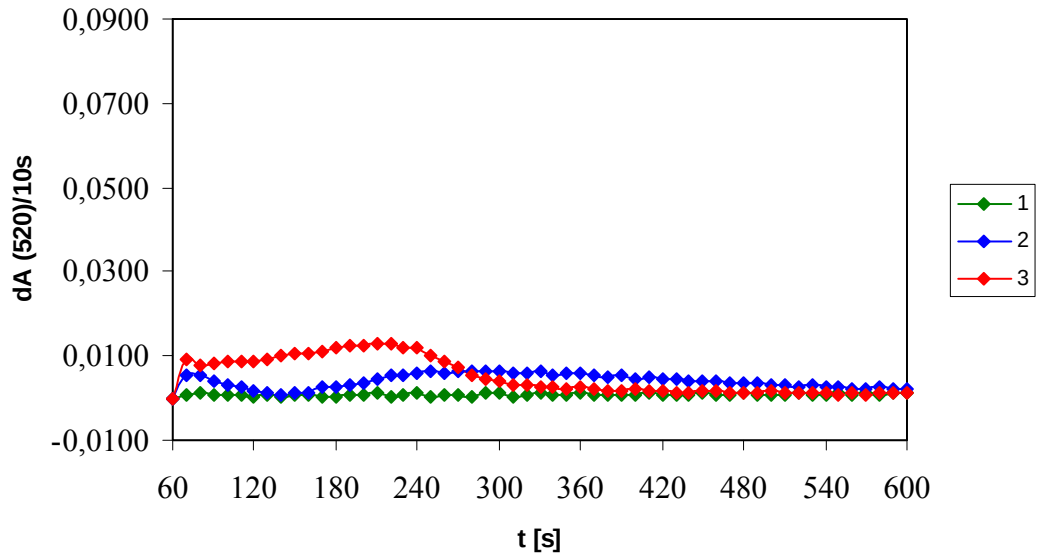
Graf 22: Aktivace bobtnání mitochondrií T_3 při různých koncentracích Ca^{2+}. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, bez Pi a s přídavkem Ca^{2+} o výsledné koncentraci: 0,00; 12,5; 25,0; 50,0; 200,0 µM. (1) bez T_3, (2) s přídavkem 25,0 µM T_3.



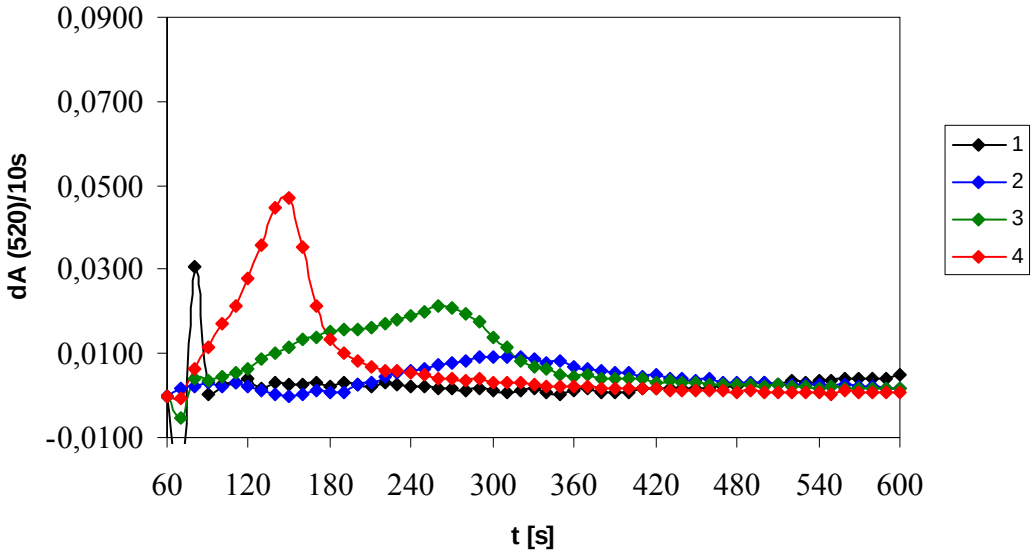
Graf 23: Procento aktivace bobtnání mitochondrií T_3 při různých koncentracích Ca^{2+}.

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

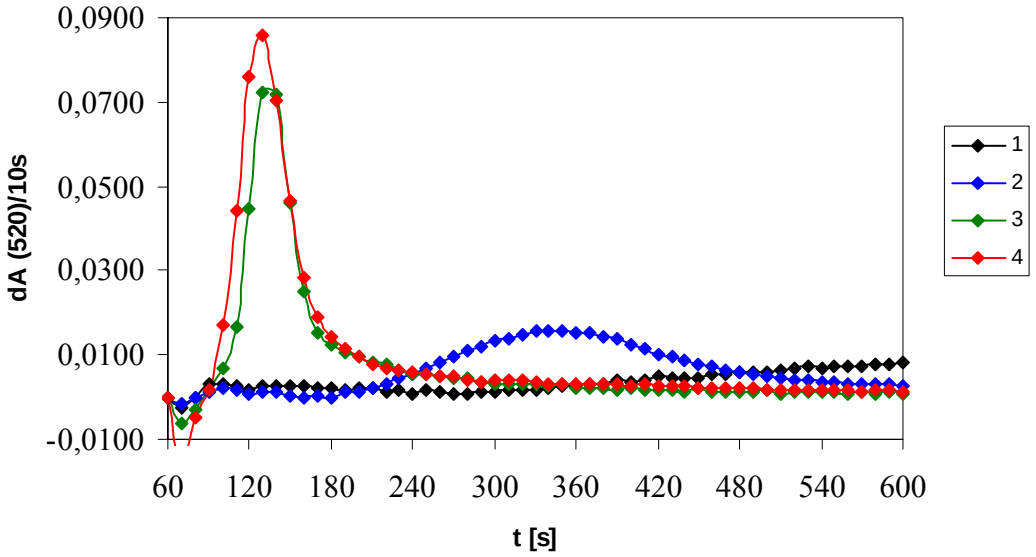
V další fázi pokusů s T_3 jsme sledovali vliv 0,1 mM Pi v inkubačním médiu na aktivační efekt trijodtyroninu. V této části jsme opět použili různé koncentrace Ca^{2+} pro indukci bobtnání. Nejprve jsem zjišťovali, jak dalece aktivuje T_3 bobtnání za přítomnosti 0,1 mM Pi v nepřítomnosti Ca^{2+}. Jak ukazuje graf 24, samotný Pi není schopen navodit bobtnání v nepřítomnosti Ca^{2+} a T_3 vykazuje malý aktivační efekt. Přítomnost Pi jej zdvojnásobí a urychlí nástup bobtnání. Po přidání 50 µM Ca^{2+}, jak vyplývá z našich dřívějších pozorování, je v médiu bez Pi bobtnání minimální; přidání T_3 bobtnání jen mírně aktivuje. Ca^{2+} v přítomnosti Pi indukuje bobtnání a kombinace všech tří komponent: Ca^{2+}, Pi a T_3 poskytuje nejvyšší hodnoty bobtnání a také výrazně zkracuje dobu jeho nástupu (Graf 25). Při indukci bobtnání vyšší koncentrací Ca^{2+} (200 µM) je vidět, že aktivační efekt T_3 se příliš neliší od předešlého experimentu s 50 µM Ca^{2+}, avšak efekt samotného Ca^{2+} je podstatně vyšší při použití tak vysoké dávky kalcia. Přidání T_3 vede pak jen k minimální další aktivaci (Graf 26). Z těchto pokusů můžeme uzavřít, že pro sledování aktivačního efektu T_3 je třeba používat pro indukci bobtnání nižší koncentrace Ca^{2+}, kdy rychlost a rozsah bobtnání nedosahuje maximálních hodnot, takže je poskytnut prostor pro sledování aktivačního účinku T_3.



Graf 24: Swelling mitochondrií indukovaný trijodtyroninem bez přídavku Ca^{2+}. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, bez Ca^{2+} s přídavkem Pi. (1) 0,1 mM Pi, bez T_3, (2) bez Pi, 25,0 µM T_3, (3) 0,1 mM Pi, 25,0 µM T_3.



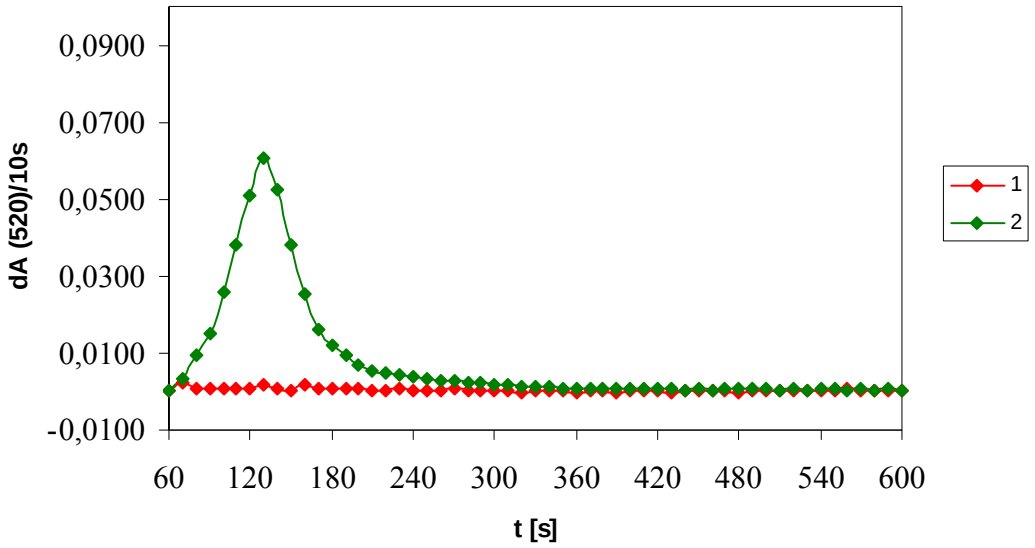
Graf 25: Swelling mitochondrií indukovaný trijodtyroninem s přídavkem Ca^{2+} a Pi. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, s přídavkem Ca^{2+} o výsledné koncentraci 50,0 µM. (1) bez Pi, bez T_3, (2) bez Pi, 25,0 µM T_3, (3) 0,1 mM Pi, bez T_3, (4) 0,1 mM Pi, 25,0 µM T_3.



Graf 26: Swelling mitochondrií indukovaný trijodtyroninem s přídavkem Ca^{2+} a Pi. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, s přídavkem Ca^{2+} o výsledné koncentraci 200,0 µM. (1) bez Pi, bez T_3, (2) bez Pi, 25,0 µM T_3, (3) 0,1 mM Pi, bez T_3, (4) 0,1 mM Pi, 25,0 µM T_3.

Protože jsme chtěli prokázat, zda T_3 ovlivňuje nespecifický MPTP, použili jsme CsA jako jeho specifický inhibitor (Byrne et al., 1999; Hagen et al., 2003). Reakční směs obsahovala: médium, suspenzi mitochondrií, sukcinát a T_3 o výsledné koncentraci

25,0 µM. Po přidání Ca^{2+} o výsledné koncentraci 50,0 µM byl zaznamenán průběh bobtnání mitochondrií, který byl následně porovnán s měřením bobtnání mitochondrií za stejných podmínek s přídavkem CsA o výsledné koncentraci 5,0 µM. Z grafu 27 je patrné, že CsA zcela inhiboval průběh MPT. Můžeme proto uzavřít, že i aktivace bobtnání působením T_3 je důsledkem otevření MPTP.

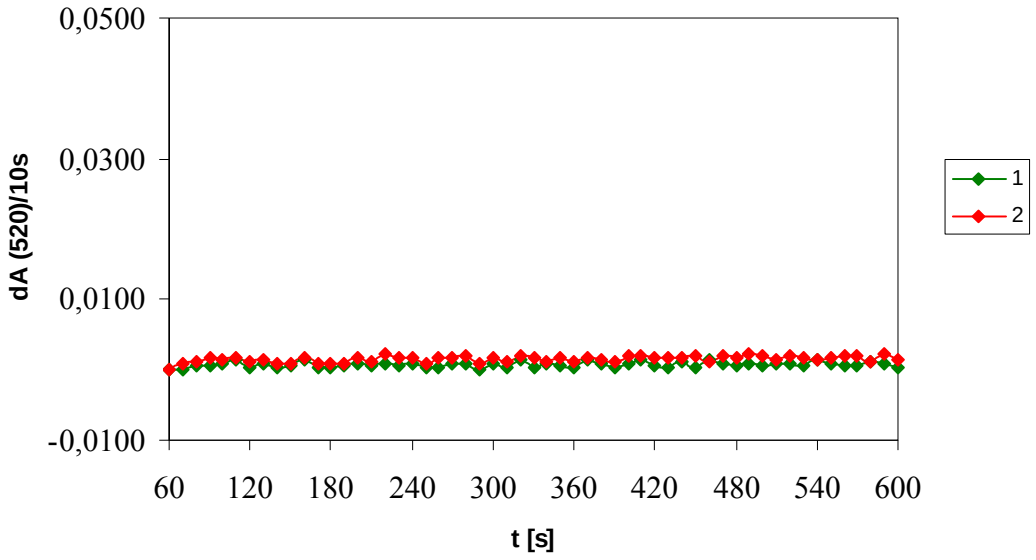


Graf 27: Swelling mitochondrií inhibovaný cyklosporinem A. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, bez Pi, s přídavkem T_3 o výsledné koncentraci 25,0 µM a Ca^{2+} o výsledné koncentraci 50,00 µM. (1) 5,0 µM CsA, (2) bez CsA.

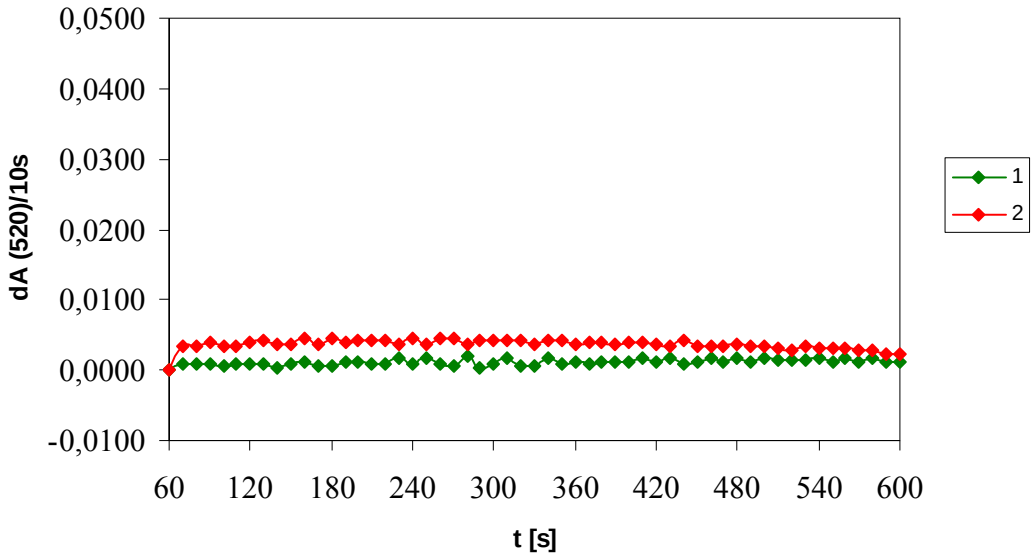
5.4.3.3. Vliv Pi a Ca^{2+} na průběh MPT po aplikaci T_3 in vivo

Předmětem této část práce bylo porovnat aktivační vliv Pi a Ca^{2+} na MPTP po aplikaci T_3 v podmínkách *in vivo*. Potkany jsme utratili za 24 hodin po jednorázové aplikaci T_3 v dávce 200 µg/kg tělesné hmotnosti i. p., izolované mitochondrie jsme inkubovali ve standardním mediu se sukcinátem a s přídavkem Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM a sledovali průběh bobtnání. Toto bobtnání jsme následně porovnali s bobtnáním mitochondrií izolovaných z jater potkanů neovlivněných T_3. Obdobně jsme porovnali kontrolní mitochondrie s mitochondriemi, které byly izolovány z jater potkanů, kterým byl aplikován 3x ve 24 hodinových intervalech T_3 v dávce 200 µg/kg tělesné hmotnosti i. p., poslední dávka byla podána 24 hodin před izolací mitochondrií (Grafy 28 a 29). Při inkubaci izolovaných mitochondrií za přítomnosti samotného fosfátu (0,1 mM) jsme ani u kontrol ani u mitochondrií po aplikaci 1x T_3 (Graf 28) nebo 3x T_3 (Graf 29) žádné bobtnání neprokázali. Jestliže jsme však bobtnání

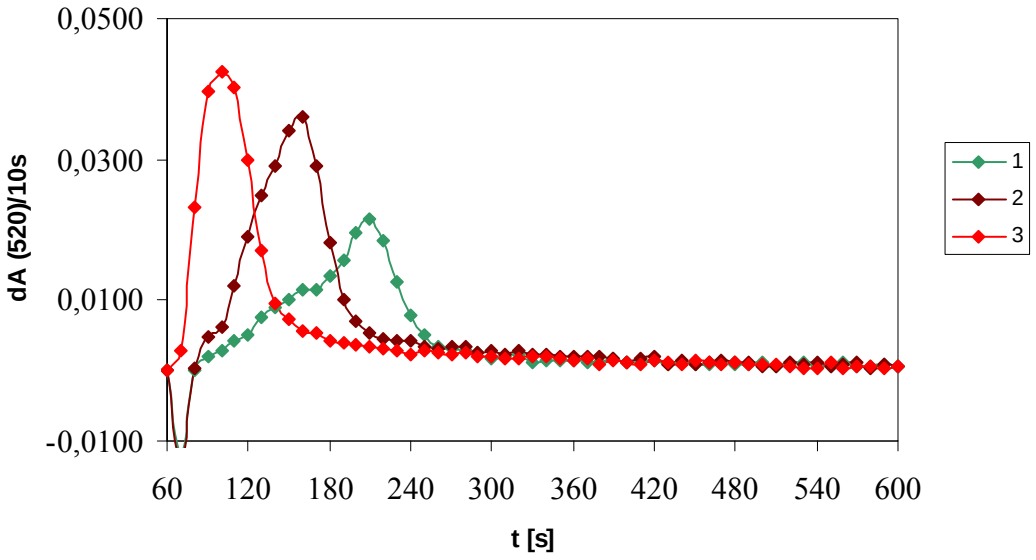
indukovali ve standardním médiu s obsahem sukcinátu a Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM) přidáním 50 μM Ca^{2+}, pak byla indukce bobtnání vyšší jak u mitochondrií izolovaných z jater potkanů s jednou dávkou T_3, tak se třemi dávkami T_3 (Graf 30) a v obou případech byl po aplikaci T_3 nástup bobtnání rychlejší ve srovnání s kontrolními mitochondriemi. Rychlost nástupu bobtnání byla významně vyšší po opakovaném podávání T_3.



Graf 28: Swelling mitochondrií indukovaný Pi, po aplikaci 1x T_3. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, s přídavkem Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM. (1) kontrola, (2) aplikace 1x T_3.



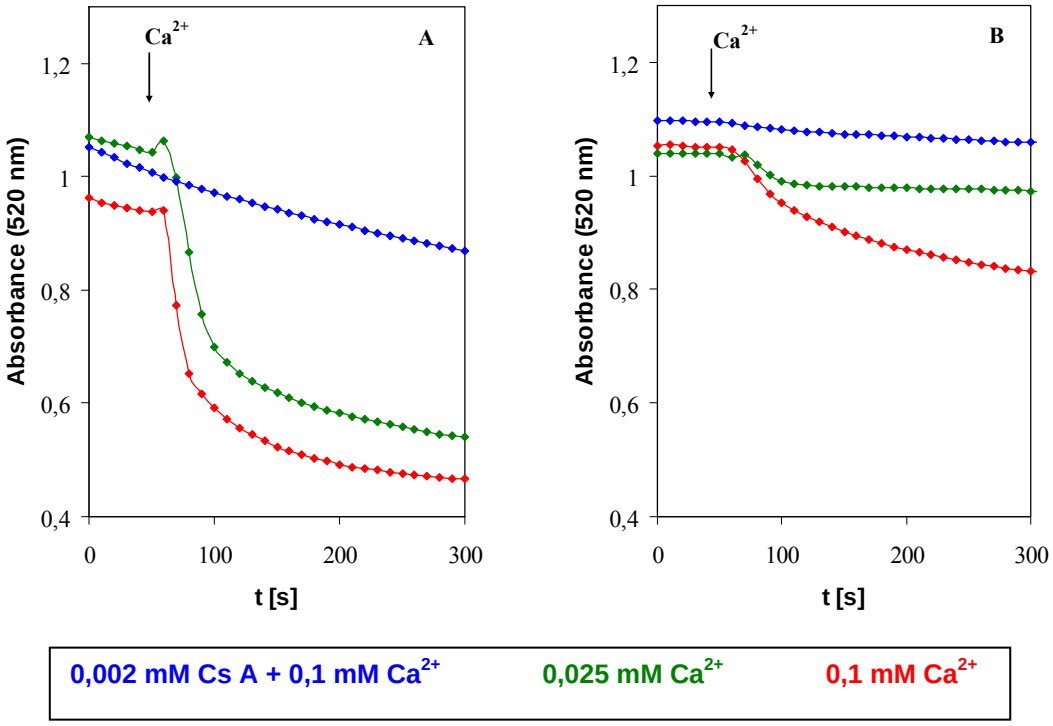
Graf 29: Swelling mitochondrií indukovaný Pi, po aplikaci 3x T_3. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, s přídavkem Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM. (1) kontrola, (2) aplikace 3x T_3.



Graf 30: Swelling mitochondrií indukovaný Ca^{2+}, po aplikaci 1x T_3 a 3x T_3. Mitochondrie byly inkubovány ve standardním médiu, s přídavkem Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM a Ca^{2+} o výsledné koncentraci 50,0 µM. (1) kontrola, (2) aplikace 1x T_3, (3) aplikace 3x T_3.

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

Panov et al. (2007) prokázali, že mitochondrie izolované z mozku vykazují menší citlivost MPTP vůči Ca^{2+} iontům než mitochondrie srdeční. Autoři pak spekulují o tom, že existuje druhová i tkáňová specifita tohoto jevu a že různé orgány tak volí různou strategii zřejmě z hlediska, jak dalece je kalciový inzult nebezpečný pro funkční aktivitu daného orgánu a jak intenzivně probíhá v daném orgánu buněčná regenerace. Snažili jsme se tyto nálezy rozšířit a doplnit srovnáním citlivosti MPTP mitochondrií jater a srdečního svalu vůči Ca^{2+} iontům. Zjistili jsme, jak je uvedeno v grafu 31, že jaterní mitochondrie reagují na stejnou koncentraci $CaCl_2$ mnohem intenzivnějším bobtnáním než mitochondrie srdeční. Jestliže u obou preparátů mitochondrií vyhodnotíme rozsah poklesu optické denzity, který indikuje bobtnání mitochondrií, za 4 minuty po aplikaci $CaCl_2$, kdy bobtnání dosahuje maximálních hodnot, je tento rozdíl u nízké koncentrace (25 µM $CaCl_2$) sedminásobný, při aplikaci vyšší koncentrace (100 µM $CaCl_2$) je trojnásobný (viz Tab. 2).



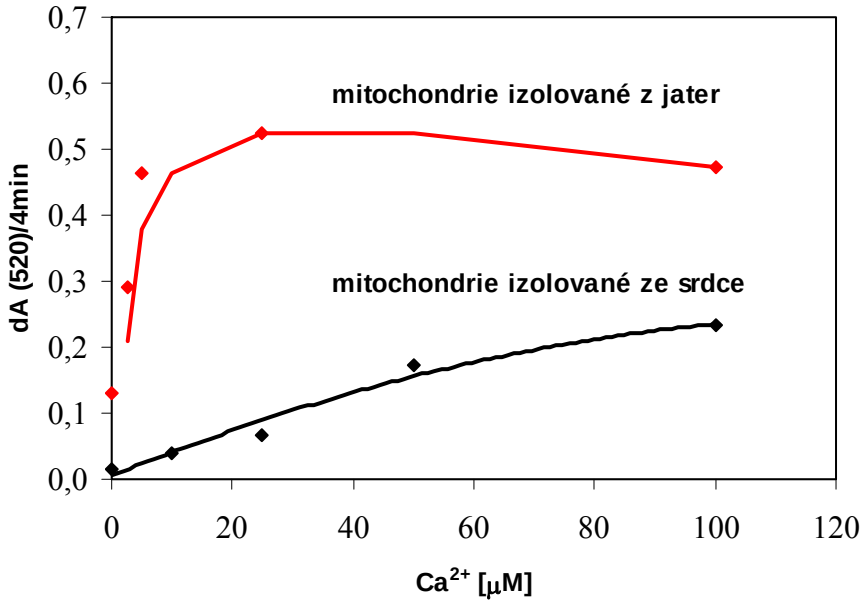
Graf 31: Kalciem indukovaný swelling mitochondrií: koncentrační Ca^{2+} závislost. A: izolované jaterní mitochodrie, **B:** izolované srdeční mitochondrie. Mitochondrie (0,4 mg proteinu/ml) byly inkubovány ve standardním médiu s Pi o výsledné koncentraci 1,0 mM.

Tab. 2: Míra kalciem indukovaného bobtnání jaterních a srdečních mitochondrií

	25 μM Ca^{2+}	100 μM Ca^{2+}
RLM		
Izolované jaterní mitochondrie	0,564 ± 0,08	0,508 ± 0,05
RHM		
Izolované srdeční mitochondrie	0,0768 ± 0,01 ***	0,173 ± 0,02 ***
RLM / RHM	7,32	2,93

Data udávají průměrnou hodnotu mitochochondriálního swellingu v čase 4 min po přidání Ca^{2+}. Experimentální podmínky jsou stejné jak je popsáno u grafu 31. ($n = 5$, ***$P < 0.001$)

Jak je vidět z hodnocení koncentrační závislosti rozsahu bobtnání na koncentraci $CaCl_2$ (Graf 32), signifikantní vzestup bobtnání lze u jaterních mitochondrií pozorovat již při 2,5 μM koncentraci $CaCl_2$, maximální hodnoty rozsahu bobtnání v rozmezí koncentrace $CaCl_2$ 10 - 30 μM. U srdečních mitochondrií stoupá rozsah bobtnání až do 100 μM koncentrace $CaCl_2$. Naše výsledky doplňují nálezy Panova et al. (2007) a ukazují, že nejen mozkové, ale i srdeční mitochondrie mají ve srovnání s jaterními mitochondriemi menší citlivost a tím i lepší protekci vůči Ca^{2+}-indukovanému otevření MPTP, a tak i iniciaci apoptotických procesů.



Graf 32: Koncentrační závislost kalcia na míru (rozsah) bobtnání mitochondrií během 4 min. Experimentální podmínky byly stejné jak je popsáno u grafu 31. Data udávají rozdíl absorbance před přídavkem Ca^{2+} (v 50 s) a v čase 4 min po přidání Ca^{2+}.

6. DISKUZE

6.1. Působení peroxidačního stresu na hepatocyty a mitochondrie jater potkana

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

Všeobecně je dnes přijímáno, že hlavní roli v mechanismu poškození jater nejrůznějšími hepatotoxickými látkami představuje indukce peroxidačních procesů (Jaeschke et al., 2002), a že peroxidační poškození primárně zasahuje funkci mitochondriální přeměny energie. Mitochondrie tak představují nejen místo, kde kyslíkové radikály mohou vznikat, ale i cílovou strukturu jejich působení (Boveris a Chance, 1973; Hyslop et al., 1988; Mehendale, 1994; Turrens, 2003). Ve světové literatuře je tomuto problému věnovaná mimořádná pozornost (Kennedy et al., 1992; Kmoníčková et al., 2001; Kowaltowski a Vercesi, 1999; Křiváková et al., 2007; Nieminen et al., 1997; Nulton-Presson a Szweda, 2001). Stále však není dostatek údajů o kinetice působení prooxidačních agens na jednotlivé buněčné struktury a různé enzymové funkce, což je nezbytné především pro správnou volbu strategie antioxidační prevence a pro stanovení optimálních podmínek pro reparaci poškozené tkáně.

Mechanismus působení ROS je velmi komplexní. Mohou jimi být inhibovány různé enzymy a to buď přímo modifikací redox-sensitivních molekul nebo v důsledku peroxidačního poškození buněčných membrán, které vyvolává změny jejích fluidity a s tím spojené konformační změny bílkovinných molekul (Kim et al., 2003). Peroxidační poškození může zahrnovat lipoperoxidaci cytoplazmatických membrán (Klauning et al., 1998; Masaki et al., 1989), poškození jaderné či mitochondriální DNA (Sandström a Marklund, 1990), oxidaci pyrimidinových nukleotidů a glutathionu (Nulton-Persson et al., 2003). Peroxidační stres narušuje funkci mitochondrií (především tvorbu ATP

nezbytnou pro zabezpečení nejrůznějších funkcí hepatocytů) na mnoha úrovních: (a) inhibicí mitochondriálních dehydrogenáz, (b) inhibicí transportu elektronů respiračním řetězcem, (c) rozpřažením oxidativní fosforylace v mitochondriích. V důsledku rozpřažení oxidativní fosforylace dochází ke kolapsu membránového potenciálu buď ireverzibilně porušením nepropustnosti vnitřní mitochondriální membrány pro protony, nebo reversibilně aktivací vápníkem indukovaného membránového póru, jehož funkce je regulovatelná, takže pokles membránového potenciálu může být reversibilní. Všechny tyto reakce mají významnou úlohu při indukci apoptotických a nekrotických procesů v jaterní tkáni.

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

Zvláštní pozornost jsme věnovali mechanismu, který indukuje apoptotické a nekrotické procesy po peroxidačním ataku a to funkci nespecifického mitochondriálního póru přechodné permeability, jehož otevření indukované Ca^{2+} ionty vede k bobtnání mitochondrií, poruše vnější mitochondriální membrány a k následnému vyplavování cytochromu c z mezimembránového prostoru a vnitřní mitochondriální membrány. To vede následně k inhibici transportu elektronů respiračním řetězcem, ke zvýšenému redukčnímu stavu mitochondriálních oxidoredukčních komponent a tím k aktivaci tvorby ROS mitochondriemi. Tento pór byl popsán před 40 lety (Hunter a Haworth, 1979), přes to však dosud jeho složení a mechanismy regulace nejrůznějšími cytosolovými látkami nebyly plně objasněny (Leung a Halestrap, 2008).

V první části práce jsme se soustředili na doplnění dřívějších nálezů prováděných na hepatocytech v suspenzi hodnocením peroxidačního působení na hepatocyty v primární kultuře přisedlé na kolagenní podložce. Hodnotili jsme časovou i koncentrační závislost působení t-BHP na cytoplazmatickou membránu z hlediska její propustnosti, intenzitu lipoperoxidace buněčných membrán a poškození funkce mitochondrií. Na hepatocytech v kultuře jsme hodnotili schopnost mitochondrií

generovat a udržovat membránový potenciál. Na hepatocytech v suspenzi, permeabilizovaných digitoninem, jsme hodnotili peroxidační poškození respirace mitochondrií při použití NADH- a flavoprotein-dependentního substrátu. Na izolovaných mitochondriích jsme hodnotili působení t-BHP na aktivitu různých mitochondriálních enzymů a na schopnost izolovaných mitochondrií generovat a udržovat membránový potenciál při působení peroxidačního stresu.

Naše výsledky na intaktních hepatocytech ukázaly (Graf 1 a 2), že tvorba lipoperoxidů se prudce zvyšuje v rozmezí 0,5 - 1 mM t-BHP. V tomto koncentračním rozmezí také dochází ke ztrátě integrity buněčné membrány hodnocené uvolňováním LDH do kultivačního média. Časová závislost působení t-BHP ukazuje, že zatímco vzestup koncentrace MDA pokračuje téměř lineárně v průběhu 60ti min inkubace, vzestup propustnosti pro LDH se dramaticky zvyšuje mezi 30. a 60. min inkubace. Vzestup množství lipoperoxidů v koncentračním rozmezí do 1 mM t-BHP zřejmě zahrnuje i lipoperoxidační poškození mitochondrií, protože ve stejném koncentračním rozmezí paralelně klesá i mitochondriální membránový potenciál (Graf 3). Při hodnocení respirační aktivity permeabilizovaných hepatocytů se ukázalo, že při stejné koncentraci t-BHP je daleko více inhibována oxidace NADH-dependentních substrátů glutamátu + malátu než oxidace flavoprotein-dependentního sukcinátu (Graf 4 a 5). Inhibiční efekt t-BHP byl patrný bezprostředně po přidání 0,5 mM t-BHP, zatímco oxidace sukcinátu nebyla ovlivněna ani 3 mM t-BHP (Graf 5).

Tyto výsledky naznačují vyšší citlivost komplexu I na peroxidační poškození ve srovnání s citlivostí komplexu II. Pokles respirace obou komplexů lze pozorovat v koncentračním rozmezí t-BHP do 0,5 mM. Při této koncentraci ale nedochází ještě k maximálnímu poklesu mitochondriálního potenciálu zřejmě proto, že flavoprotein-dependentní substráty jsou jen minimálně inhibovány a jsou schopné generovat membránový potenciál (Graf 3).

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

Pokusy na hepatocytech ukázaly, že existuje rozdílná citlivost jednotlivých mitochondriálních komponent vůči peroxidačnímu poškození. Proto jsme tyto nálezy doplnili studiem inhibičního působení t-BHP na oxidaci pěti NADH-dependentních

substrátů oxidovaných izolovanými mitochondriemi. Srovnávali jsme peroxidační poškození oxidace palmityl karnitinu + malátu, pyruvátu + malátu, glutamátu + malátu, oxoglutarátu + malátu a sukcinátu (Tab. 1). Získané výsledky prokázaly, že všechny NADH-dependentní substráty jsou t-BHP inhibovány při mnohem nižších koncentracích než oxidace sukcinátu (Graf 6B a 6C). Avšak mezi jednotlivými NADH-dependentními substráty jsme pozorovali podstatné rozdíly. Oxidace palmityl karnitinu a oxoglutarátu byla inhibována podstatně nižšími koncentracemi t-BHP než oxidace pyruvátu a glutamátu (Graf 7A, B, C, D).

V souladu s těmito nálezy i s nálezy na hepatocytech bylo i měření změn membránového potenciálu mitochondrií působením t-BHP za přítomnosti různých substrátů (Graf 8). Použitá koncentrace t-BHP (1,5 mM) výrazně snížila během inkubace hodnoty membránového potenciálu za přítomnosti pyruvátu + malátu a glutamátu + malátu, avšak nijak neovlivnila schopnost mitochondrií udržovat vysoký membránový potenciál za přítomnosti sukcinátu.

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

6.2. Endogenní a exogenní faktory regulující funkci nespecifického mitochondriálního póru přechodné permeability

Jak bylo výše zmiňováno, při indukci apoptotických a nekrotických procesů působením peroxidačního stresu hraje významnou roli otevření nespecifického Ca^{2+}-dependentního membránového póru přechodné permeability, které vede k bobtnání mitochondrií a uvolňování cytochromu c do cytosolu. Tento nespecifický

pór se otevírá při zvýšení koncentrace kalciových iontů v cytosolu buď jejich uvolňováním z intracelulárních zásob, nebo zvýšením transportu kalcia přes cytoplazmatickou membránu. Kanál se může opět zavřít, jestliže dojde k poklesu koncentrace kalcia v cytosolu. Studiu tohoto mechanismu byla v posledních letech věnována mimořádná pozornost. Byla identifikována řada komponent, které jej tvoří, a popsána úloha cyklofilinu, bílkovinné molekuly přítomné v intramitochondriálním prostoru. Ten se musí navázat na komplex proteinů, které tvoří MPTP, aby mohl být pór otevřen. Byla také objevena funkce imunomodulátoru cyklosporinu A, který vazbě cyklofilinu zamezí a membránový pór tak nelze aktivovat. Hlavním problémem studia MPTP je skutečnost, že původní schéma, které pór definovalo jako kalciem aktivovaný a cyklosporinem inhibovaný systém, se v průběhu let značně zkomplikovalo, protože se stále hromadily další látky, endogenní i exogenní, které citlivost póru ke kalciovým iontům výrazně (positivně i negativně) ovlivňovaly. Takže detailní popis mechanismů regulujících funkci MPTP byl stále obtížnější. Problém byl a je i v metodické oblasti. Hlavní metodou používanou pro hodnocení funkce MPTP již více než 40 let (viz např. Lehninger, 1960) je spektrofotometrické či spektrofluorometrické sledování indukce Ca^{2+}-dependentního a CsA-senzitivního bobtnání izolovaných mitochondrií. K bobtnání dochází po otevření póru důsledkem toku vody z cytosolu do mitochondriálního prostoru, který má vyšší osmolaritu. Tato metoda turbidimetrického hodnocení objemu mitochondrií je velmi jednoduchá. Poskytuje však výsledky ve formě křivek, ze kterých lze sice odvodit rozdíly v rychlosti a rozsahu bobtnáni, avšak z těchto křivek lze jen velmi obtížně získat přesné číselné údaje o kinetice sledované reakce nezbytné pro hodnocení řady různých faktorů, které funkci kanálu ovlivňují. Proto jsme značnou část práce věnovali dopracování nové metody pro hodnocení funkce MPTP, kterou na našem pracovišti začal používat v rámci své diplomové (magisterské) práce Tichý (2006). Pomocí této metody, která dosud nebyla v literatuře popsána, jsme mohli získat celou řadu údajů, které nám umožnily charakterizovat proces bobtnání. Metoda nám umožnila: (a) přesně vyhodnotit maximální rychlost bobtnání v daných experimentálních podmínkách jako změnu absorbance za časovou jednotku, (b) stanovit čas, kdy je dosaženo maximální rychlosti bobtnání, (c) určit celkový rozsah bobtnání jako celkovou změnu absorbance daného množství mitochondrií.

Pomocí tohoto přístupu jsme pak hodnotili závislost bobtnání na koncentraci kalciových iontů, interakci kalcia a fosfátu, T_3 a t-BHP.

6.2.1. Efekt Ca^{2+} na bobtnání mitochondrií

V literatuře nejvíce studovaným faktorem, který ovlivňuje MPTP jsou Ca^{2+} ionty (Baumgartner et al., 2009; Ruiz-Meana et al., 2007; Wilson et al., 1991). Ca^{2+} jako induktor MPTP se v mitochondriích váže na proteinové komplexy a na kardiolipin (Lemasters a Nieminen, 2001; Petrosillo et al., 2004). Zvýšení hladiny Ca^{2+} v cytosolu stimuluje produkci ROS. ROS oxidují volné thiolové skupiny membránových komplexů včetně ANT a mění jejich konformaci. Mohou také oxidovat kardiolipin, což má mimo jiné za následek uvolnění cytochromu c z vazby na tento fosfolipid (Petrosillo et al., 2004). Ca^{2+} a ROS jsou navíc signální molekuly, které ovlivňují transkripci genů. Ca^{2+} a ROS spolu při otevírání pórů spolupracují a vzájemně zvyšují svůj účinek (Brookes et al., 2004; Gordeeva et al., 2003; Iverson a Orrenius, 2004; Kanno et al., 2004; Lemasters, 1999; Starkov et al., 2004). Protože jsme chtěli porovnat účinek různých faktorů na funkci MPTP, bylo nutné nejdřív některé pokusy zopakovat a nastavit tak výchozí podmínky pro naše měření. V první části jsme sledovali vliv cytosolové koncentrace Ca^{2+} na MPT. Podle očekávání se potvrdilo, že zvyšující se koncentrace Ca^{2+} vede k otevření Ca^{2+}-dependentního membránového póru a k nástupu jevu MPT (Graf 12). Rychlost nástupu a intenzita MPT vykazovala pozitivní korelaci se zvyšující se hladinou Ca^{2+} v inkubačním médiu. V každé sérii našich měření byla zařazena i kontrola, která spočívala v tom, že jsme sledovali chování mitochondriální suspenze bez přídavku iontů Ca^{2+}. Tato suspenze nevykazovala známky bobtnání mitochondrií, což mimo jiné svědčí o tom, že mitochondrie jsou nepoškozené a mohli jsme k nim tak přidávat další látky, které modulovaly MPT a funkci MPTP.

6.2.2. Efekt Pi na bobtnání mitochondrií a jeho interakce s Ca^{2+}

Jako nezbytný faktor, nutný k tomu, aby bylo možno vyvolat jev MPT, se potvrdila i přítomnost PO_4^{3-} v reakční směsi. Jak je z patrné z grafu 14, je MPT závislý na koncentraci anorganického fosfátu v inkubačním médiu. Rostoucí koncentrace PO_4^{3-} v reakční směsi způsobuje rostoucí intenzitu jevu MPT. Vzhledem k přítomnosti stopového množství Ca^{2+} v inkubačním médiu bylo toto měření též doplněno o měření, kdy do inkubačního média s 1,0 mM Pi byla přidána EGTA o výsledné koncentraci 250 μM. Po vysycení zbytků Ca^{2+} přítomných ve vodě a v chemikáliích pomocí EGTA, je vidět, že vlastní vliv PO_4^{3-} na bobtnání mitochondrií je prakticky nulový (Graf 14). Z tohoto měření je patrné, že samotný PO_4^{3-}, bez Ca^{2+} (i stopového množství) není

v daných koncentracích schopen indukovat bobtnání. CsA a nepřítomnost PO_4^{3-} v reakční směsi jsou v literatuře často popisovanými faktory vedoucími k inhibici jevu MPT. Je zřejmé, že chybí-li v reakční směsi fosfát, dochází k nástupu bobtnání až při vyšších koncentracích Ca^{2+}. Nutnost přítomnosti fosfátu v reakční směsi může souviset s činností Ca^{2+}-dependentních dehydrogenáz, které jsou odpovědné za syntézu ATP z ADP a fosfátu. Nedostatek fosfátu se může projevit vyřazením činnosti těchto dehydrogenáz, jež mohou hrát určitou roli v nástupu bobtnání. Nám se podařilo prokázat (Graf 14), že samotný Ca^{2+} bez PO_4^{3-} má na bobtnání mitochondrií jen minimální vliv. Teprve až značně vysoké (100 a více μM) koncentrace Ca^{2+} navozují bobtnání mitochodnrií. Tato měření jsme doplnili srovnáním aktivace MPT pomocí PO_4^{3-} o výsledné koncentraci 0,1 mM při aplikaci 15 a 150 μM $CaCl_2$ (Graf 13). Vidíme, že za přítomnosti 0,1 mM PO_4^{3-} se zvyšuje jak rychlost bobtnání, tak se i zkracuje doba, kdy po přidání kalciových iontů dosahuje rychlost bobtnání maximálních hodnot. Je zřejmé, že 0,1 M PO_4^{3-} značně potencuje bobtnání indukované jak 15 tak 150 μM $CaCl_2$. Dále jsme sledovali koncentrační závislost Ca^{2+} v přítomnosti 0,1 a 1,0 mM PO_4^{3-}. Jak je patrné z grafů 15 a 16, při vyšší koncentraci fosfátu (1 mM) byl charakter změn při rostoucí koncentraci Ca^{2+} v reakční směsi přibližně stejný, hodnoty rychlosti bobtnání však byly přibližně dvojnásobné.

6.2.3. Efekt t-BHP na bobtnání mitochondrií

K zajímavým výsledkům jsme dospěli poté, co jsme do reakční směsi přidali t-BHP, látku která navozuje oxidační stres a svými účinky ovlivňuje funkci Ca^{2+} dependentního membránového póru. Přídavek t-BHP měl zásadní účinek na nástup a zejména velikost rozsahu bobtnání. Bylo prokázáno, že t-BHP indukuje otevření MPTP i v intaktních buňkách (Collins et al., 2002; Kmoníčková et al., 2001; Lemasters, 1998; Nieminen et al., 1997). Indukci bobtnání předchází zvýšení Ca^{2+} v mitochondriální matrix a zvýšená produkce ROS (Lemasters, 1999). t-BHP zvyšuje koncentraci Ca^{2+} zejména vyplavením z intracelulárních zásob (Martínez-Burgos et al., 2006) a oxiduje SH skupiny (Halestrap et al., 1997; Huang et al., 2005; Kowaltowski et al., 1997). Je třeba též zdůraznit, že ne všechny mitochondrie v buňce jsou stejně náchylné k otevření MPTP a jeho otevření nemusí být vždy synchronní proces (Batandier et al., 2004; Collins et al., 2002). Tato různá citlivost mitochondrií (MPTP) k oxidačnímu poškození (t-BHP) byla prokázána i na úrovni orgánů (Endlicher et al., 2009; Panov et al., 2007).

6.2.4. Efekt T_3 na bobtnání mitochondrií

Hormony štítné žlázy svými účinky významně zasahují do energetického metabolismu mitochondrií. Již dřívější studie prokázaly, že tyto hormony indukují děje, které vedou ke změnám ve složení lipidů mitochondriálních membrán, zvyšují aktivitu adenin nukleotidových translokáz a stimulují buněčnou respiraci, zvyšují koncentraci Ca^{2+} v cytosolu a mohou vést až k rozpřažení oxidativní fosforylace (Kadenbach, 2003). V nedávné době se podařilo prokázat, že T_3 v přítomnosti Ca^{2+} indukuje oxidaci SH skupin membránových proteinů (Halestrap et al., 1997; Kowaltowski et al., 1997; Venditti et al., 2003), což vede ke změně v produkci ROS a vyčerpání kapacity antioxidačních systémů. Jak je patrné z našich výsledků, rostoucí koncentrace T_3 v reakční směsi zvyšuje míru bobtnání mitochondrií (Graf 20). Vyšší koncentrace Ca^{2+} v inkubačním médiu též značně zvyšuje rychlost nástupu bobtnání i jeho rozsah a to hlavně při použití nižších koncentrací T_3 (Graf 21). Jak je z patrné z grafů 25 a 26, je bobtnání mitochondrí závislé nejen na koncentraci Ca^{2+}, T_3, ale též na přítomnosti PO_4^{3-} v reakční směsi. PO_4^{3-} výrazně potencuje účinek T_3 a Ca^{2+}. Pro porovnání jsme přidali měření, kde jsme sledovali samotný vliv Pi a T_3 na intenzitu bobtnání bez přídavku kalcia. Při porovnání těchto záznamů je velmi dobře patrný vliv PO_4^{3-} na bobtnání mitochondrií. Podařilo se nám tedy jednoznačně prokázat, že PO_4^{3-} výrazně potencuje i efekt T_3 na bobtnání mitochondrií.

6.2.5. Efekt cyklosporinu A na bobtnání mitochondrií

Jak bylo už výše zmíněno, je CsA považován za inhibitor funkce MPTP. Součástí MPTP je cyklofilin D. Cyklofilin D se nachází v matrix mitochondrií a během indukce bobtnání se váže na vnitřní mitochondriální membránu. Cyklofilin D je mitochondriální peptidyl prolyl-cis-trans-isomeráza, která má rozhodující roli při prostorovém uspořádání bílkovin. CsA (specifický inhibitor cyklofilinů) se specificky váže na cyklofilin D, čímž mění jeho schopnost navázat se na vnitřní mitochondriální membránu a tím inhibuje funkci MPTP (Li, et al., 2004). Inhibiční účinek CsA jsme v našich pokusech využívali k potvrzení toho, že sledované bobtnání mitochondrií indukované Ca^{2+}, PO_4^{3-}, T_3 a t-BHP je spojené právě s funkcí MPTP. Z grafů 19 a 27 je dobře patrný inhibiční účinek CsA na Ca^{2+}-indukované bobtnání. Pokud byly mitochondrie inkubovány s CsA, pokles absorbance nebyl zaznamenán. CsA se choval jako totální inhibitor. Na jeho inhibiční účinek neměla vliv prakticky žádná z námi

testovaných látek. Reakční směsi s přídavkem CsA nevykazovaly žádné známky bobtnání ani po stimulaci vysokými koncentracemi iontů Ca^{2+}, t-BHP či T_3, popř. kombinací těchto faktorů. Tím jsme jednoznačně potvrdili, že bobtnání mitochondrií navozené vlivem Ca^{2+}, t-BHP, a T_3 bylo vyvolané právě otevřením CsA-senzitivního MPTP. Působení trijodthyroninu na funkci MPTP se nám podařilo prokázat i při *in vivo* aplikaci jedné i tří dávek trijodthyroninu (Graf 30).

V závěrečné části naší práce jsme doplnili nálezy Panova a spol, (2007), který srovnával bobtnání mitochondrií mozku a jater indukované kalciovými ionty. Prokázal, že mitochondrie mozku mají vyšší resistenci vůči indukci bobtnání ionty Ca^{2+}. V našich pokusech jsme srovnávali bobtnání jaterních mitochondrií a mitochondrií srdečního svalu. Jak ukazují naše výsledky (Graf 31 a 32, Tab. 2) i mitochondrie srdečního svalu obdobně jako mitochondrie mozku vykazují vyšší resistenci vůči Ca^{2+}-indukovanému bobtnání. Tyto nálezy tak podporují a rozšiřují představu, že různé buněčné populace mají specifické strategie, jak čelit následkům peroxidačního poškození. Hepatocyty, zřejmě v souladu s vysokou regenerační schopností, mají méně vyvinutou antioxidační ochranu než buňky mozku či srdečného svalu. Tuto představu však bude třeba ještě doplnit dalšími údaji o aktivitě antioxidačních enzymů případně i o resistenci lipoproteinových struktur buňky vůči působení kyslíkových radikálů.

7. ZÁVĚRY

1. Vliv peroxidačního poškození na kultivované hepatocyty

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Ahmed-Choudhury J, Orsler DJ, Coleman R. *Hepatobiliary effects of tertiary-butylhydroperoxide (tBOOH) in isolated rat hepatocyte couplets.* Toxicol Appl Pharmacol 1998;152(1):270-5.
2. Akerman KE, Wikström MK. *Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential.* FEBS Lett 1976;68(2):191-7.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd edition. New York, London: Garland Publishing, 1994.
4. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species.* Biochemistry (Mosc) 2005;70(2):200-14.
5. Andreyev A, Fiskum G. *Calcium induced release of mitochondrial cytochrome c by different mechanisms selective for brain versus liver.* Cell Death Differ 1999;6(9):825-32.
6. Attieh ZK, Mukhopadhyay CK, Seshadri V, Tripoulas NA, Fox PL. *Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism.* J Biol Chem 1999;274(2):1116-23.
7. Aust SD. *Ferritin as a source of iron and protection from iron-induced toxicities.* Toxicol Lett 1995;82-83:941-4.
8. Babior M. *Oxygen-dependent microbial killing phagocytes.* N Engl J Med 1978; 298: 659-68.
9. Barrientos A. *In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities.* Methods 2002;26(4):307-16.
10. Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rötig A, Rustin P, Tzagoloff A. *Cytochrome oxidase in health and disease.* Gene 2002;286(1):53-63.
11. Batandier C, Leverve X, Fontaine E. *Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I.* J Biol Chem 2004;279(17):17197-204.
12. Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne C, Ferdek P, Pozzan T, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R, Watson AJ, Gerasimenko OV. *Calcium elevation in mitochondria is the main Ca^{2+} requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening.* J Biol Chem 2009;284(31):20796-803.
13. Bernardi P. *Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition.* Physiol Rev 1999;79(4):1127-55.
14. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. *Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues.* Eur J Biochem 1999;264(3):687-701.
15. Bernardi P. *The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death.* Biochim Biophys Acta 1996;1275(1-2):5-9.
16. Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabó I, Zoratti M. *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations.* J Biol Chem 1992;267(5):2934-9.

17. Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ. *Isolated hepatocytes preparation, properties and application. In: Bichemistry and Molecular Biology* (R. H. Burdon and P. H. van Knippenberg, eds), New York, Oxford: Elsevier Amsterda, 1991:1-460.
18. Berry MN, Friend DS. *High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study.* J Cell Biol 1969;43(3):506-20.
19. Bindoli A, Callegaro MT, Barzon E, Benetti M, Rigobello MP. *Influence of the redox state of pyridine nucleotides on mitochondrial sulfhydryl groups and permeability transition.* Arch Biochem Biophys 1997;342(1):22-8.
20. Boveris A, Chance B. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.* Biochem J 1973;134(3):707-16.
21. Brookes PS, Freeman RS, Barone MC. *A shortcut to mitochondrial signaling and pathology: a commentary on "Nonenzymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress".* Free Radic Biol Med 2006;41(1):41-5.
22. Brookes PS. *Mitochondrial H^+ leak and ROS generation: an odd couple.* Free Radic Biol Med 2005;38(1):12-23.
23. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. *Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle.* Am J Physiol Cell Physiol 2004;287(4):C817-33.
24. Brookes PS, Levonen AL, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM. *Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species.* Free Radic Biol Med 2002;33(6):755-64.
25. Brustovetsky N, Brustovetsky T, Jemmerson R, Dubinsky JM. *Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane.* J Neurochem 2002;80(2):207-18.
26. Bustamante E, Soper JW, Pedersen PL. *A high-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria.* Anal Biochem 1977;80(2):401-8.
27. Byrne AM, Lemasters JJ, Nieminen AL. *Contribution of increased mitochondrial free Ca^{2+} to the mitochondrial permeability transition induced by tert-butylhydroperoxide in rat hepatocytes.* Hepatology 1999;29(5):1523-31.
28. Castilho RF, Kowaltowski AJ, Vercesi AE. *The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking.* J Bioenerg Biomembr 1996;28(6):523-9.
29. Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE. *Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria.* Free Radic Biol Med 1995;18(3):479-86.
30. Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. *Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals.* J Biol Chem 1979;254(11):4764-71.
31. Chen Q, Crosby M, Almasan A. *Redox Regulation of Apoptosis before and after Cytochrome C Release.* Korean J Biol Sci 2003;7(1):1-9.

32. Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. *Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A.* J Biol Chem 2002;277(38):34793-9.
33. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. *Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells.* EMBO J 2002;21(7):1616-27.
34. Connern CP, Halestrap AP. *Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel.* Biochem J 1994;302 (Pt 2):321-4.
35. Crompton M. *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.* Biochem J 1999;341 (Pt 2):233-49.
36. Crompton M, Virji S, Ward JM. *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 1998;258(2):729-35.
37. Crompton M, Costi A, Hayat L. *Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+}-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria.* Biochem J. 1987;245(3):915-8.
38. Červinková Z, Rauchová H, Křiváková P, Drahota Z. *Inhibition of palmityl carnitine oxidation in rat liver mitochondria by tert-butyl hydroperoxide.* Physiol Res 2008;57(1):133-6.
39. Červinková Z, Lotková H, Křiváková P, Roušar T, Kučera O, Tichý L, Červinka M, Drahota Z. *Evaluation of mitochondrial function in isolated rat hepatocytes and mitochondria during oxidative stress.* Altern Lab Anim 2007;35(3):353-61.
40. Červinková Z. *Metabolismus a játra.* Sanquis 2005;40:14-16.
41. Červinková Z, Kučera O, Lotková H, Drahota Z, Houštek J. *Hodnocení ergetického metabolismu izolovaných hepatocytů pomocí oxygrafie.* Acta Medica (Hradec Kralové) 2002;45(Supp2):65-76.
42. Davies MJ. *Detection of peroxyl and alkoxyl radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions.* Biochem J 1989;257(2):603-6.
43. Davies MJ, Dean RT. *Radical-mediated protein oxidation. from chemistry to medicine.* Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1997.
44. DeLeve LD, Kaplowitz N. *Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity.* Pharmacol Ther. 1991;52(3):287-305.
45. Deneke SM, Fanburg BL. *Regulation of cellular glutathione.* Am J Physiol 1989;257(4 Pt 1):L163-73.
46. Desagher S, Martinou JC. *Mitochondria as the central control point of apoptosis.* Trends Cell Biol 2000;10(9):369-77.
47. Diehl AM, Rai RM. *Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines.* J Gastroenterol Hepatol 1996;11(5):466-70.
48. Diehl AM, Rai RM. *Liver regeneration 3*: *Regulation of signal transduction during liver regeneration.* FASEB J 1996;10(2):215-27.
49. Djordjević VB. *Free radicals in cell biology.* Int Rev Cytol 2004;237:57-89.

50. Drahota Z, Milerová M, Stieglerová A, Škarka L, Houštěk J, Ošťádal B. *Development of cytochrome-c oxidase activity in rat heart: downregulation in newborn rats.* Cell Biochem Biophys 2005;43(1):87-94.
51. Drahota Z, Křiváková P, Červinková Z, Kmoníčková E, Lotková H, Kučera O, Houštěk J. *Tert-butyl hydroperoxide selectively inhibits mitochondrial respiratory-chain enzymes in isolated rat hepatocytes.* Physiol Res 2005;54(1):67-72.
52. Drahota Z, Rauchová H, Sedlák V, Kočí J, Červinková Z. *The effect of triiodothyronine on changes of membrane fluidity in regenerating rat liver.* Physiol Res 1999;48(2):167-70.
53. Dröge W. *Free radicals in the physiological control of cell function.* Physiol Rev 2002;82(1):47-95.
54. Elliott WH, Elliott DC. *Biochemistry and Molecular Biology.* Oxford, New York, Melbourne. Oxford University Press, 1997.
55. Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. *Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties.* Biochim Biophys Acta 1986;850(3):436-48.
56. Endlicher R, Křiváková P, Lotkova H, Milerová M, Drahota Z, Červinková Z. *Tissue specific sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to Ca^{2+} ions.* Acta Medica (Hradec Kralove) 2009;52(2):69-72.
57. Esterbauer H, Jürgens G, Quehenberger O. *Modification of human low density lipoprotein by lipid peroxidation.* Basic Life Sci 1988;49:369-73.
58. Fagian MM, Pereira-da-Silva L, Martins IS, Vercesi AE. *Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants.* J Biol Chem 1990;265(32):19955-60.
59. Fedotcheva NI, Sokolov AP, Kondrashova MN. *Nonezymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress.* Free Radic Biol Med 2006;41(1):56-64.
60. Fenaille F, Mottier P, Turesky RJ, Ali S, Guy PA. *Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders.* J Chromatogr A 2001;921(2):237-45.
61. Frank V, Kadenbach B. *Regulation of the H+/e- stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios.* FEBS Lett 1996;382(1-2):121-4.
62. GANONG, WILLIAM F. *Přehled lékařské fyziologie.* H&H: 419, 1995.
63. Geerts A, Feltkamp D, Rosahl S. *Expression of lipoxygenase in wounded tubers of Solanum tuberosum L.* Plant Physiol 1994;105(1):269-77.
64. Gnaiger E, Kuznetsov AV. *Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c.* Biochem Soc Trans 2002;30(2):252-8.
65. Gnaiger E. *Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply.* Respir Physiol 2001;128(3):277-97.
66. Goglia F, Moreno M, Lanni A. *Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target.* FEBS Lett 1999;452(3):115-20.

67. Gohil VM, Hayes P, Matsuyama S, Schägger H, Schlame M, Greenberg ML. *Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent.* J Biol Chem 2004;279(41):42612-8.

68. Gordeeva AV, Zvyagilskaya RA, Labas YA. *Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells.* Biochemistry (Mosc) 2003;68(10):1077-80.

69. Grant N. *The role of triiodothyronine-induced substrate cycles in the hepatic response to overnutrition: thyroid hormone as an antioxidant.* Med Hypotheses 2007;68(3):641-9.

70. Guillouzo A. *Culture of Epithelial Cells.* Edited by R. Ian Freshney and Mary G. Freshney. Wiley-Liss. Inc, 2002.

71. Gunter TE, Pfeiffer DR. *Mechanisms by which mitochondria transport calcium.* Am J Physiol 1990;258(5 Pt 1):C755-86.

72. Hagen T, Lagace CJ, Modica-Napolitano JS, Aprille JR. *Permeability transition in rat liver mitochondria is modulated by the ATP-Mg/Pi carrier.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003;285(2):G274-81.

73. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. *The permeability transition pore complex: another view.* Biochimie 2002;84(2-3):153-66.

74. Halestrap AP. *The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury.* Biochem Soc Symp 1999;66:181-203.

75. Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP. *Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase.* J Biol Chem 1997;272(6):3346-54.

76. Halestrap AP. *Regulation of mitochondrial metabolism through changes in matrix volume.* Biochem Soc Trans 1994;22(2):522-9.

77. Halestrap AP. *Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage.* Biochem J 1991;278 (Pt 3):715-9.

78. Halestrap AP. *The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism.* Biochim Biophys Acta 1989;973(3):355-82.

79. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford (UK): Oxford University Press; 2003.

80. Han D, Canali R, Rettori D, Kaplowitz N. *Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria.* Mol Pharmacol 2003;64(5):1136-44.

81. Haworth RA, Hunter DR. *The Ca^{2+}-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site.* Arch Biochem Biophys 1979;195(2):460-7.

82. Honda H, Kondo T, Zhao QL, Feril LB Jr, Kitagawa H. *Role of intracellular calcium ions and reactive oxygen species in apoptosis induced by ultrasound.* Ultrasound Med Biol 2004;30(5):683-92.

83. Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. *Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method.* Clin Biochem 2000; 33(8):619-25.

84. Huang HM, Chen HL, Xu H, Gibson GE. *Modification of endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores by select oxidants produces changes reminiscent of those in cells from patients with Alzheimer disease.* Free Radic Biol Med 2005;39(8):979-89.

85. Hunter DR, Haworth RA. *The Ca^{2+}-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms.* Arch Biochem Biophys 1979;195(2):453-9.

86. Hütter E, Unterluggauer H, Garedew A, Jansen-Dürr P, Gnaiger E. *High-resolution respirometry-a modern tool in aging research.* Exp Gerontol 2006;41(1):103-9.

87. Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey WA Jr, Schraufstätter IU, Sauerheber RD, Spragg RG, Jackson JH, Cochrane CG. *Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide.* J Biol Chem 1988;263(4):1665-75.

88. Imberti R, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. *Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine.* J Pharmacol Exp Ther 1993;265(1):392-400.

89. Iverson SL, Orrenius S. *The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis.* Arch Biochem Biophys 2004;423(1):37-46.

90. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. *Mechanisms of hepatotoxicity.* Toxicol Sci 2002;65(2):166-76.

91. Jakus V, Lopuchová M. *Role of free radicals, oxidative stress and antioxidant system in liver diseases.* Bratisl Lek. Listy 1999;100:548-559.

92. Kadenbach B. *Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation.* Biochim Biophys Acta 2003;1604(2):77-94.

93. Kalderon B, Hermesh O, Bar-Tana J. *Mitochondrial permeability transition is induced by in vivo thyroid hormone treatment.* Endocrinology 1995;136(8):3552-6.

94. Kanno T, Sato EE, Muranaka S, Fujita H, Fujiwara T, Utsumi T, Inoue M, Utsumi K. *Oxidative stress underlies the mechanism for Ca^{2+}-induced permeability transition of mitochondria.* Free Radic Res 2004;38(1):27-35.

95. Kaplowitz N. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. Semin Liver Dis 2002;22(2):137-44.

96. Kennedy CH, Church DF, Winston GW, Pryor WA. *tert-Butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria.* Free Radic Biol Med 1992;12(5):381-7.

97. Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. *Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes.* Curr Mol Med 2003;3(6):527-35.

98. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr. *The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis.* Environ Health Perspect 1998;106 Suppl 1:289-95.

99. Kmoníčková E, Drahota Z, Kameníková L, Červinková Z, Mašek K, Farghali H. *Modulatory effect of cyclosporin A on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in hepatocytes.* Immunopharmacol Immunotoxicol 2001;23(1):43-54.

100. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. *Mitochondrial permeability transition and oxidative stress.* FEBS Lett 2001;495(1-2):12-5.

101. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. *Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress.* Free Radic Biol Med 1999;26(3-4):463-71.

102. Kowaltowski AJ, Vercesi AE, Castilho RF. *Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+}: correlation with mitochondrial permeability transition.* Biochim Biophys Acta 1997;1318(3):395-402.

103. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Grijalba MT, Bechara EJ, Vercesi AE. *Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation.* J Biol Chem 1996;271(6):2929-34.

104. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. *Ca^{2+}-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state.* Am J Physiol 1995;269(1 Pt1):C141-7.

105. Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie.* Hradec Králové. Nucleus HK, 2004. 968 s. ISBN 80-86225-50-X.

106. Kroemer G, Reed JC. *Mitochondrial control of cell death.* Nat Med 2000;6(5):513-9.

107. Křiváková P, Lábajová A, Červinková Z, Drahota Z. *Inhibitory effect of t-butyl hydroperoxide on mitochondrial oxidative phosphorylation in isolated rat hepatocytes.* Physiol Res 2007;56(1):137-40.

108. Křiváková P, Červinková Z, Lotková H, Kučera O, Roušar T. *Mitochondrie a jejich úloha v buněčném metabolismu.* Acta Medica (Hradec Kralove) Suppl 2005;48(2):57-67.

109. Lábajová A, Vojtíškova A, Krivakova P, Kofránek J, Drahota Z, Houstek J. *Evaluation of mitochondrial membrane potential using a computerized device with a tetraphenylphosphonium-selective electrode.* Anal Biochem 2006;353(1):37-42.

110. Lamy I, Corlu A, Guguen-Guillouzo C. *Differentiation of hepatic and hematopoietic stem cells: study of liver regulation protein (LRP).* Ann Pharm Fr 2000;58(4):260-5.

111. Lee HC, Wei YH. *Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress.* Int J Biochem Cell Biol 2005;37(4):822-34.

112. Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Thérond P, Torreilles J. *Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances.* Ann Biol Clin 1998;56(3):305-19.

113. Lehninger AL. *Thyroxine and the swelling and contraction cycle in mitochondria.* Ann N Y Acad Sci 1960;86:484-93.

114. Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA. *Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy.* Antioxid Redox Signal 2002;4(5):769-81.

115. Lemasters JJ, Nieminen AL. *Mitochondria in pathogenesis.* New York: Kluwer Academic 2001.

116. Lemasters JJ. V. *Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis.* Am J Physiol 1999;276(1 Pt 1):G1-6.
117. Lemasters JJ, Qian T, Elmore SP, Trost LC, Nishimura Y, Herman B, Bradham CA, Brenner DA, Nieminen AL. *Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy.* Biofactors 1998;8(3-4):283-5.
118. Lemasters JJ. *The mitochondrial permeability transition: from biochemical curiosity to pathophysiological mechanism.* Gastroenterology 1998;115(3):783-6.
119. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. *The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy.* Biochim Biophys Acta 1998;1366(1-2):177-96.
120. Leung AW, Halestrap AP. *Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore.* Biochim Biophys Acta 2008;1777(7-8):946-52.
121. Li Y, Johnson N, Capano M, Edwards M, Crompton M. *Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis.* Biochem J 2004;383(Pt 1):101-9.
122. Lombardi A, Lanni A, de Lange P, Silvestri E, Grasso P, Senese R, Goglia F, Moreno M. *Acute administration of 3,5-diiodo-L-thyronine to hypothyroid rats affects bioenergetic parameters in rat skeletal muscle mitochondria.* FEBS Lett 2007;581(30):5911-6.
123. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem 1951;193(1):265-75.
124. Lyamzaev KG, Pletjushkina OY, Saprunova VB, Bakeeva LE, Chernyak BV, Skulachev VP. *Selective elimination of mitochondria from living cells induced by inhibitors of bioenergetic functions.* Biochem Soc Trans 2004;32(Pt 6):1070-1.
125. Madan K, Bhardwaj P, Thareja S, Gupta SD, Saraya A. *Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).* J Clin Gastroenterol 2006;40(10):930-5.
126. Marin-Garcia J. *Mitochondria and the heart.* Springer, 2005
127. Martínez-Burgos MA, Granados MP, González A, Rosado JA, Yago MD, Salido GM, Martínez-Victoria E, Mañas M, Pariente JA. *Involvement of ryanodine-operated channels in tert-butylhydroperoxide-evoked Ca^{2+} mobilisation in pancreatic acinar cells.* J Exp Biol 2006;209(Pt 11):2156-64.
128. Masaki N, Kyle ME, Serroni A, Farber JL. *Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide.* Arch Biochem Biophys 1989;270(2):672-80.
129. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. *Mitochondria: more than just a powerhouse.* Curr Biol 2006;16(14):R551-60.
130. Mehendale HM. *Amplified interactive toxicity of chemicals at nontoxic levels: mechanistic considerations and implications to public health.* Environ Health Perspect 1994;102 Suppl 9:139-49.

131. Montero M, Alonso MT, Albillos A, García-Sancho J, Alvarez J. *Mitochondrial Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release mediated by the Ca^{2+} uniporter.* Mol Biol Cell 2001;12(1):63-71.
132. McCord JM. *Oxygen-derived free radicals.* New Horiz 1993;1(1):70-6.
133. McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. *Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism.* Physiol Rev 1990;70(2):391-425.
134. Mráček T, Ješina P, Křiváková P, Bolehovská R, Červinková Z, Drahota Z, Houštěk J. *Time-course of hormonal induction of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase biogenesis in rat liver.* Biochim Biophys Acta 2005;1726(2):217-23.
135. Nicholls AG, Ferguson SJ. *Bioenergetics 3*, Academic Press, 2001
136. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. *Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species.* Am J Physiol 1997;272(4 Pt 1):C1286-94.
137. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. *Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide.* Biochem J 1995;307 (Pt 1):99-106.
138. Nohl H, Gille L, Staniek K. *Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria.* Biochem Pharmacol 2005;69(5):719-23.
139. Nulton-Persson AC, Starke DW, Mieyal JJ, Szweda LI. *Reversible inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in response to alterations in the mitochondrial glutathione status.* Biochemistry 2003;42(14):4235-42.
140. Nulton-Persson AC, Szweda LI. *Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide.* J Biol Chem 2001;276(26):23357-61.
141. Nuydens R, Novalbos J, Dispersyn G, Weber C, Borgers M, Geerts H. *A rapid method for the evaluation of compounds with mitochondria-protective properties.* J Neurosci Methods 1999;92(1-2):153-9.
142. Orrenius S. *Mitochondrial regulation of apoptotic cell death.* Toxicol Lett 2004;149(1-3):19-23.
143. Palmeira CM, Moreno AJ, Madeira VM, Wallace KB. *Continuous monitoring of mitochondrial membrane potential in hepatocyte cell suspensions.* J Pharmacol Toxicol Methods 1996;35(1):35-43.
144. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Hemendinger R, Greenamyre JT, Rosenfeld J. *Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice.* Am J Physiol Cell Physiol 2007;292(2):C708-18.
145. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. *Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification.* Clin Chim Acta 2003;333(1):19-39.
146. Perkins GA, Frey TG. *Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy.* Micron 2000;31(1):97-111.
147. Petronilli V, Cola C, Massari S, Colonna R, Bernardi P. *Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria.* J Biol Chem 1993;268(29):21939-45.

148. Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G. *Ca^{2+}-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin.* J Biol Chem 2004;279(51):53103-8.

149. Qu B, Li QT, Wong KP, Tan TM, Halliwell B. *Mechanism of clofibrate hepatotoxicity: mitochondrial damage and oxidative stress in hepatocytes.* Free Radic Biol Med 2001;31(5):659-69.

150. Rappaport AM, Borowy ZJ, Lougheed WM, Lotto WN. *Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology.* Anat Rec 1954;119(1):11-33.

151. Reilly CA, Aust SD. *Iron loading into ferritin by an intracellular ferroxidase.* Arch Biochem Biophys 1998;359(1):69-76.

152. Reily PA. *Free radicals in biology: oxidative stress and the effect of ionizing radiation.* Int J Radiat Biol 1994;65(1):27–33.

153. Rice-Evans C, Bruckdorfer KR. *Free radicals, lipoproteins and cardiovascular dysfunction.* Mol Aspects Med 1992;13(1):1-111.

154. Roušar T, Červinková Z, Mužáková V, Kučera O, Lotková H, Křiváková P. *Glutathion a metody stanovení.* Acta Medica (Hradec Kralove) Suppl. 2005;48(1):15-20.

155. Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Garcia-Dorado D. *Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca^{2+} overloaded cardiac myocytes.* Basic Res Cardiol 2007;102(6):542-52.

156. Rustin P, Rötig A. *Inborn errors of complex II--unusual human mitochondrial diseases.* Biochim Biophys Acta 2002;1553(1-2):117-22.

157. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A. *JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis.* FEBS Lett 1997;411(1):77-82.

158. Sandström BE, Marklund SL. *Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide.* Biochem J 1990;271(1):17-23.

159. Scheffler IE. *Mitochondria make a come back.* Adv Drug Deliv Rev 2001;49(1-2):3-26.

160. Scheffler IE., *Mitochondria.* John Wiley and Sons, Inc. 1999.

161. Schwartz HL, Oppenheimer JH. *Physiologic and biochemical actions of thyroid hormone.* Pharmacol Ther B 1978;3(3):349-76.

162. Seglen PO. *Preparation of isolated rat liver cells.* Methods Cell Biol 1976;13:29-83.

163. Senior AE, Nadanaciva S, Weber J. *The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase.* Biochim Biophys Acta 2002;1553(3):188-211.

164. Shapira AHV. *Mitochondrial involvement in Parkinson´s disease, Huntington´s disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich´s ataxia.* Biochim Biophys Acta 1999;1410:159-170.

165. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. 6th edition.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 1999;567-70.

166. Skulachev VP, Bakeeva LE, Chernyak BV, Domnina LV, Minin AA, Pletjushkina OY, Saprunova VB, Skulachev IV, Tsyplenkova VG, Vasiliev JM, Yaguzhinsky LS, Zorov DB. *Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis.* Mol Cell Biochem 2004;256-257(1-2):341-58.
167. Skulachev VP. *Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms.* Mol Aspects Med 1999;20(3):139-84.
168. Southorn PA, Powis G. *Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions.* Mayo Clin Proc 1988;63(4):381-9.
169. Starkov AA, Chinopoulos C, Fiskum G. *Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury.* Cell Calcium 2004;36(3-4):257-64.
170. Starkov AA, Fiskum G. *Regulation of brain mitochondrial H_2O_2 production by membrane potential and NAD(P)H redox state.* J Neurochem 2003;86(5):1101-7.
171. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. *Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain.* J Biol Chem 2002;277(47):44784-90.
172. Tapia G, Cornejo P, Fernández V, Videla LA. *Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation.* Toxicol Lett 1999;106(2-3):209-14.
173. Tapley DF. *The effect of thyroxine and other substances on the swelling of isolated rat liver mitochondria.* J Biol Chem 1956;222(1):325-39.
174. Thannickal VJ, Fanburg BL. *Reactive oxygen species in cell signaling.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000;279(6):L1005-28.
175. Thorgeirsson SS. *Hepatic stem cells in liver regeneration.* FASEB J 1996;10(11):1249-56.
176. Tichý L. *Posouzení energetického metabolismu izolovaných hepatocytů a mitochondrí v průběhu oxidačního stresu.* Diplomová práce, Univerzita Pardubice, Fakulta Chemicko-technologická, 2006
177. Tsujimoto Y, Nakagawa T, Shimizu S. *Mitochondrial membrane permeability transition and cell death.* Biochim Biophys Acta 2006;1757(9-10):1297-300.
178. Tuma DJ. *Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury.* Free Radic Biol Med 2002;32(4):303-8.
179. Turrens JF. *Mitochondrial formation of reactive oxygen species.* J Physiol 2003;552(Pt 2):335-44.
180. Venditti P, Pamplona R, Portero-Otin M, De Rosa R, Di Meo S. *Effect of experimental and cold exposure induced hyperthyroidism on H_2O_2 production and susceptibility to oxidative stress of rat liver mitochondria.* Arch Biochem Biophys 2006;447(1):11-22.
181. Venditti P, De Rosa R, Di Meo S. *Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues.* Free Radic Biol Med 2003;35(5):485-94.
182. Venditti P, De Rosa R, Di Meo S. *Effect of thyroid state on H_2O_2 production by rat liver mitochondria.* Mol Cell Endocrinol 2003;205(1-2):185-92.
183. Wallace DC. *Mitochondrial diseases in man and mouse.* Science 1999;283(5407):1482-8.
184. Wallace KB, Eells JT, Madeira VM, Cortopassi G, Jones DP. *Mitochondria-mediated cell injury.* Fundam Appl Toxicol 1997;38(1):23-37.
185. Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM. *Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions.* Mutat Res 1998;400(1-2):99-115.

186. Wang YF, Hu ML. *Use of rat liver slices for the study of oxidative DNA damage in comparison with isolated rat liver nuclei and HepG2 human hepatoma cells.* Food Chem Toxicol 2000;38(5):451-8.
187. Weber J, Senior AE. *ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase.* FEBS Lett 2003;545(1):61-70.
188. Weitzel JM, Iwen KA, Seitz HJ. *Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone.* Exp Physiol 2003;88(1):121-8.
189. Wilson JA, Lau YS, Gleeson JG, Wilson JS. *The action of MPTP on synaptic transmission is affected by changes in Ca^{2+} concentrations.* Brain Res 1991;541(2):342-6.
190. Yoshizumi M, Tsuchiya K, Tamaki T. *Signal transduction of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases in cardiovascular disease.* J Med Invest 2001;48(1-2):11-24.
191. Zhang JG, Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemski FA, Fariss MW. *Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid peroxidation-dependent and –independent cell death: protective role of antioxidants.* Arch Biochem Biophys 2001;393(1):87-96.
192. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. *Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes.* J Exp Med 2000;192(7):1001-14.
193. http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/GIT.pdf