

## 8 SOUHRN

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

Hepatocyty jsme izolovali ze samců potkanů kmene Wistar metodou dvoustupňové perfúze pomocí kolagenázy. Část buněk byla využita pro měření spotřeby kyslíku (Oxygraf Oroboros-2k) a k posouzení mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) s využitím elektrody selektivní pro tetrafenylfosfonium ( $\text{TPP}^+$ ). Zbylé hepatocyty byly kultivovány v suspenzi, nebo na Petriho miskách potažených kolagenem. Morfologické změny buněk byly sledovány pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Olympus CK 40). K charakterizaci poškození hepatocytů sloužila aktivita laktátdehydrogenázy (LDH) v kultivačním médiu. Míra lipoperoxidace byla posuzována z produkce malondialdehydu. MMP jsme měřili pomocí akumulace Rho 123 a barvením fluorescenční sondou JC-1. Redoxní stav uvnitř buněk byl posuzován ze změn obsahu GSH resp. GSSG. Mitochondrie byly izolovány z jater potkanů metodou diferenční centrifugace. Mitochondriální produkci ROS jsme sledovali pomocí fluorescenční sondy CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (FDA) a bobtnání mitochondrií bylo hodnoceno spektrofotometricky jako úbytek absorbance při 520 nm.

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