

ABSTRAKT

Mitochondrie jsou multifunkční orgány hrající rozhodující roli v energetickém metabolismu buněk a v indukci buněčné smrti. Mitochondrie, a zvláště pak jejich respirační řetězec, jsou též hlavními producenty reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách. Metabolismus buňky může být ovlivněn jejím proliferačním stavem. Zároveň určité látky zvyšující oxidační stres vykazují antiangiogenní účinky spojené se selektivní eliminací proliferujících endoteliálních buněk (EB). Z těchto důvodů jsme v této práci zjišťovali, zda by mitochondrie mohly být zodpovědné za rozdílnou citlivost proliferujících a konfluentních (buněk v klidové fázi) EB k buněčné smrti. Zvláštní důraz byl kladen na systémy regulující hladinu ROS nebo apoptózy: respirační řetězec (produkce ROS), antioxidační ochrana (detoxifikace ROS) a proteiny rodiny Bcl-2 (regulace apoptózy). Nejdříve jsme vystavili EB s normálně fungujícím a defektním respiračním řetězcem působení rozličných látek vyvolávajících oxidační stres a apoptózu a stanovili produkci ROS a citlivost k apoptóze v proliferujícím a klidovém stavu. Tyto experimenty ukázaly, že funkční respirační řetězec do značné míry zvyšuje citlivost proliferujících EB k indukci tvorby ROS a apoptóze, zatímco v buňkách v klidovém stavu funkční řetězec naopak proti buněčné smrti chrání. Vzhledem k tomuto pozorování jsme porovnali aktivitu respiračního řetězce v proliferujících a konfluentních EB. Proliferující EB mají vyšší spotřebu kyslíku, což se projevuje především při respiraci na substrátech pro respirační komplex I. Stanovení exprese proteinových podjednotek respiračních komplexů toto pozorování nevysvětlilo. Nativní elektroforéza ovšem ukázala, že vyšší molekulární organizace komplexů respiračního řetězce do tzv. superkomplexů se liší v mitochondriích proliferujících a konfluentních buněk s největšími rozdíly pozorovanými pro komplex III. Tyto výsledky byly potvrzeny stanovením enzymové aktivity respiračních superkomplexů v nativním gelu. Zkoumali jsme též roli důležitých antioxidačních systémů jako superoxid dismutasy a redukovaného glutathionu v proliferujících a konfluentních buňkách s funkčním a defektním respiračním řetězcem. Výsledky naznačují, že zkoumané systémy nehrají v sensitivitě k oxidačnímu stresu rozhodující roli. Stanovení hladiny proteinů rodiny Bcl-2 pak ukázalo, že tyto proteiny jsou exprimovány obdobně v proliferujících a konfluentních buňkách bez ohledu na funkčnost respiračního řetězce a pravděpodobně též nehrají významnou roli v detekovaných rozdílech v citlivosti k buněčné smrti. Lze tedy vyvodit, že zvýšená citlivost proliferujících EB k oxidačnímu stresu a k apoptóze je do značné míry určena stavem jejich respiračního řetězce, a mitochondrie tak hrají rozhodující roli v tomto fenoménu.

Klíčová slova: mitochondrie, oxidační stres, apoptóza, buněčná respirace, respirační řetězec, proliferace