

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

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

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

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

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

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

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

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

Naše výsledky podporují hypotézu o pleiotropním mechanismu účinku biguanidů založeném na jejich interakci s mitochondriálním respiračním řetězcem spíše než teorii

jednoho unikátního molekulárního cíle. Toto komplexní působení biguanidů nabízí možnost vysvětlení jejich rozmanitých metabolických účinků.