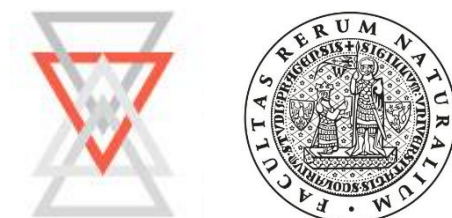


Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



Působení biguanidů na metabolismus jater

Effect of biguanides on liver metabolism

Eliška Švecová

Autoreferát dizertační práce

Doktorský studijní program

Fyziologie živočichů

Praha, 2015

Dizertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního a kombinovaného* studia doktorského studijního programu Fyziologie živočichů v Institutu Klinické a Experimentální Medicíny; na Fyziologickém ústav Akademie věd ČR a na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

Předseda oborové rady studijního programu Fyziologie živočichů:

Doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.

Autor: Mgr. Eliška Švecová
Oddělení metabolismu diabetu, Pracoviště experimentální medicíny
IKEM, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4

Školitel: Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.
Katedra buněčné biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova
v Praze, Viničná 7, 128 00 Praha 2

Školitel konzultant: RNDr. Monika Cahová PhD.
Oddělení metabolismu diabetu, Pracoviště experimentální medicíny
IKEM, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4

RNDr. Zdeněk Drahota, DrSc.
Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i., Vídeňská
1083, 142 20 Praha 4

Oponenti: RNDr. Pavel Flachs PhD.
Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i., Vídeňská
1083, 142 20 Praha 4

RNDr. Hana Hansíková CSc.
Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch – biochemie, Klinika
dětského a dorostového lékařství Všeobecné fakultní nemocnice
v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Ke Karlovu 2,
128 08 Praha 2

S dizertací je možné se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

1.	ABSTRAKT	4
2.	ÚVOD	5
3.	CÍLE PRÁCE	9
4.	MATERIÁL A METODY	9
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	9
6.	ZÁVĚRY	14
7.	ABSTRACT	15
8.	INTRODUCTION	17
9.	AIMS OF THE STUDY	17
10.	MATERIAL AND METHODS	20
11.	RESULTS AND DISCUSSION	21
12.	CONCLUSIONS	25
13.	REFERENCES/ POUŽITÁ LITERATURA	26
14.	CURRICULUM VITAE	27
15.	SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI DOKTORANDA	28

1. ABSTRAKT

Již od středověku se k léčbě některých příznaků provázejících diabetes mellitus, používal extrakt z jeřábiny lékařské (*Galega officinalis*), která obsahuje derivát guanidinu galegin. Pozitivní účinky léčby však byly často převáženy množstvím negativních vedlejších efektů, které mohly vést až k úmrtí pacienta. Guanidin byl posléze nahrazen syntetickými deriváty biguanidy se sníženou toxicitou. Do klinických studií byly zařazeny pouze tři: metformin (N,N-dimethylbiguanid), fenformin (fenyletylbiguanid) a buformin (butylbiguanid), přičemž buformin a fenformin byly z klinického použití staženy kvůli závažnému riziku laktátové acidózy (Schäfer, 1983). Méně toxický metformin je v léčbě diabetu 2. typu široce využíván do současnosti a je označován jako lék první volby. V současnosti se pozornost opět obrací také 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 i 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/reperfučním poškození jater, přičemž tento efekt byl výraznější ve steatózních játrech. Jednou z příčin může být přímý inhibiční vliv metforminu na tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) na komplexu I.

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

2. ÚVOD

Již od středověku se k léčbě některých příznaků provázejících diabetes mellitus používal extrakt z jeřábiny lékařské (*Galega officinalis*), která obsahuje derivát guanidinu galegin. V moderní farmakoterapii byl původně využíván přímo guanidin, ale jeho aplikace byla spojena s mimořádně závažnými vedlejšími účinky. Guanidin posléze byl nahrazen

syntetickými deriváty biguanidy, jejichž toxicita byla ve srovnání s původní látkou výrazně menší. Tři z těchto derivátů byly zařazeny do klinických studií: metformin, fenformin a buformin (butylbiguanid). Fenformin a buformin byly postupně staženy z klinického použití, méně toxický metformin je v léčbě diabetu 2. typu široce využíván do současnosti. K fenforminu se opět obrací pozornost vědců s důrazem na jeho silnější metabolické účinky. Ty by mohly přispět k objasnění přesného mechanismus působení metforminu, jež zatím není plně znám.

Fenformin, systematickým názvem 2-(N-fenetylkarbamimidoyl)-guanidin, je za fyziologických podmínek silná báze. Díky chemickému složení, tj. 2 guanidinové skupiny a fenyletylový aromatický kruh, je méně polární a více lipofilní než metformin. Oproti metforminu má vyšší afinitu k mitochondriálním membránám a vykazuje silnější inhibiční účinky na funkci mitochondriálního respiračního řetězce (Goodarzi and Bryer-Ash, 2005, Sogame *et al.*, 2013, Pernicova and Korbonits, 2014). Do 90. let 20. stol. byl fenformin zakázán ve většině zemí světa pro jeho spojitost se vznikem laktátové acidózy, která byla u lidí fatální z 30-50 % (Schäfer, 1983, Pernicova and Korbonits, 2014).

Metformin, systematickým názvem (N,N-dimetylimido)-dikarbonimidodiamid, je za fyziologických podmínek také báze. Tato alifatická molekula je snadno rozpustná ve vodné fázi a špatně solubilní v tukové vrstvě (Schäfer, 1976a, Hale *et al.*, 2002). Vstup metforminu do buňky je zajištěn především aktivním transportním systémem. Více než padesát let je metformin užíván jako antihyperglykemická látka vhodná pro léčbu cukrovky (Argaud *et al.*, 1993). Oproti jiným biguanidům a guanidům je inhibiční vliv metforminu na buněčnou respiraci slabší a je reverzibilní. Tato kombinace zřejmě hraje roli v udržení klíčové rovnováhy mezi akumulací - vyloučením látky a požadovaným terapeutickým účinkem bez laktátové acidózy (Bridges *et al.*, 2014).

Prvé pozorování mechanismu účinku derivátů biguanidů na oxidační fosforylaci bylo publikováno v 60. letech 20. století, kdy byla prokázána souvislost mezi zvýšenou glykolýzou a inhibicí buněčné respirace pod vlivem guanidinů (Hollunger, 1955). Téměř o 50 let později byl nastolen konsenzus ohledně primárního cíle metforminu v buňce. Tímto místem jsou mitochondrie, ve kterých metformin přechodně inhibuje komplex I. Tato inhibice vede k energetickému stresu způsobenému poklesem oxidační fosforylace a syntézy ATP (El-Mir *et al.*, 2000, Owen *et al.*, 2000, Carvalho *et al.*, 2008, Bridges *et al.*, 2014). Nedávná studie ukazuje vliv biguanidů na vazebné modifikace komplexu I. Komplex I může zaujímat dva reverzibilní konformační stavy: aktivní a ne-aktivní („de-active“). Po navázání metforminu do respiračního řetězce dojde ke konformační změně vazebného místa pro ubiquinon a

k „uzamčení“ komplexu I. Vazba metforminu inhibuje komplex v jeho „deactive-like“ konformaci, pravděpodobně v amfipatické oblasti na rozhraní hydrofilní a membránové domény v blízkosti matrixové kličky subjednotky ND3 (Bridges *et al.*, 2014, Matsuzaki and Humphries, 2015).

Kromě přímé interakce s komponenty mitochondriálního respiračního řetězce byly v souvislosti s biguanidy uvažovány i další možné mechanismy účinku. Koncem 80. let 20. století byl charakterizován jev známý jako *mitochondrial permeability transition* (MPT), který byl popsán jako ukazatel změn propustnosti vnitřní mitochondriální membrány (Hunter and Haworth, 1979). Příčinou MPT je otevření mitochondriálního póru přechodné permeability (MPTP) (Crompton *et al.*, 1998) jako odpověď na signály indikující poškození mitochondrií. Následně dochází k narušení vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru (Halestrap *et al.*, 2002). Metformin snižuje citlivost MPTP k vápenatým iontům a oddaluje otevření póru (Guigas *et al.*, 2004). Předpokládá se, že čím větší je inhibice komplexu I vyvolaná metforminem, tím delší je doba opožděného otevření MPTP. Inhibiční vliv biguanidů na mitochondriální respiraci byl vysvětlován také na základě zcela odlišného mechanismu, a to vlivem biguanidů na fluiditou membrán (Schäfer, 1976b). Příčinou inhibice elektronového toku respiračním řetězce pak není změna vazebných interakcí s membránovými proteiny, ale modifikace fyzikálních vlastností membrán vlivem metforminu. Zpomalení elektronového toku je úměrné velikosti vazebné afinity metforminu k fosfolipidové dvojvrstvě (Schäfer and Rieger, 1974, Viollet *et al.*, 2012).

V průběhu doby byl hypoglykemizující účinek metforminu vysvětlován pomocí různých teorií, ale v současnosti převládá hypotéza označující jako hlavní příčinu snížení hladiny krevní glukózy inhibici glukoneogeneze v játrech. Dosud však nepanuje shoda ohledně metabolického děje/dějů, které jsou zodpovědné za tento efekt. Pravděpodobným centrem metabolického účinku metforminu je změna energetického metabolismu a jedním z mediátorů enzym AMPK, který reaguje na snížení energetického náboje (Viollet *et al.*, 2009). Tento „metabolický senzor“ má hlavní slovo při přepnutí buňky z katabolického do anabolického stavu (Zheng *et al.*, 2015). Aktivace AMPK ovlivňuje řadu metabolických cest s cílem stimulovat katabolické a omezit anabolické děje, včetně inhibice glukoneogeneze (Zhou *et al.*, 2001). Ačkoliv několik dějů způsobených metforminem může aktivovat AMPK, bylo prokázáno, že tento enzym není nezbytný pro přímou inhibici jaterní glukoneogeneze metforminem (Foretz *et al.*, 2010). Tomu odpovídá zjištění, že hypoglykemický efekt metforminu byl potvrzen také u AMPK/LKB1 deficientních myší. U tohoto modelu pokles tvorby glukózy koreloval se sníženou hladinou intracelulárního ATP. Autoři studie vyslovili

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

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

3. CÍLE PRÁCE

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

4. MATERIÁL A METODY

V předkládané práci byly použity následující metody a postupy:

- Příprava jaterního homogenátu a izolace jaterních a srdečních a jaterních mitochondrií
- Měření mitochondriálního dýchání (Clarkova elektroda, XF 24 analyzátor Seahorse)
- Stanovení aktivity mitochondriálních enzymů *in vitro*
- Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu
- Stanovení mitochondriálního bobtnání
- Izolace, kultivace a permeabilizace hepatocytů
- ³¹P NMR analýza obsahu ATP v játrech *in vivo*
- Měření produkce ROS *in vitro*: fluorometrická metoda, elektronová paramagnetická spektroskopie (EPR)
- Rutinní biochemické analýzy
- Statistické analýzy

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Publikace A

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

Výsledky předchozích experimentálních studií naznačují, že metformin ovlivňuje respirační řetězec především na úrovni komplexu I, přesto však v této otázce panuje řada nejasností. V této části studie jsme se zaměřili na následující otázky: 1) porovnání vhodnosti modelu izolovaných jaterních mitochondrií a jaterního homogenátu pro studium vlivu metforminu na mitochondriální respiraci; 2) stanovení vlivu metforminu přidávaného *in vitro* na respiraci NADH-dependentních a NADH-independentních substrátů v játrech; 3) vliv délky preinkubace s metforminem na oxidační kapacitu jaterních mitochondrií *in vitro*; 4) vliv metforminu na respirační kontrolu jaterních mitochondrií/homogenátu; 5) porovnání působení metforminu na mitochondriální respiraci v játrech a v srdci.

Spotřeba kyslíku při oxidaci substrátů malátu a glutamátu +ADP za absence metforminu izolovaných jaterních mitochondrií činila 1100 ± 46 pmol/s/mg proteinu, u 10 % jaterního homogenátu byla o 45 % nižší (609 ± 31 pmol/s/mg proteinu). Při měření spotřeby kyslíku na Clarkově elektrodě 10 % homogenát a izolované mitochondrie reagovaly na *in vitro* přidávaný metformin obdobně, ale lišily se v citlivosti (EC_{50} homogenát = 10 mM, EC_{50} mitochondrie = 5 mM).

Ve všech testovaných kombinacích NADH-dependentních substrátů jsme prokázali vztah mezi inhibičním účinkem metforminu a jeho koncentrací. Naproti tomu respirace za přítomnosti FADH₂-dependentního substrátu (sukcinátu) nebyla ovlivněna rostoucí koncentrací metforminu. V přítomnosti 10 mM metforminu se po přidání ADP spotřeba kyslíku navýšila pouze o třetinu v porovnání s kontrolním vzorkem. Mitochondriální respirace inhibovaná metforminem byla plně obnovena po přidání elektronů prostřednictvím komplexu II (přidáním sukcinátu). Z toho usuzujeme, že metformin neovlivňuje vnitřní mitochondriální membránu jako rozpojovač (uncoupler). V rozporu s očekáváním jsme neprokázali zásadní rozdíly ve spotřebě kyslíku v závislosti na době preinkubace s metforminem.

Mitochondriální membránový potenciál slouží jako ukazatel charakterizující neporušenost mitochondriálního systému oxidační fosforylace. V přítomnosti 20 mM metforminu došlo k významnému snížení membránového potenciálu, a tedy k postupnému vyplavování sondy. Tento pokles potenciálu plynule rostoucí v čase byl pravděpodobně způsoben částečnou inhibicí respiračního řetězce metforminem. Přidání vápníku vedlo k rychlému otevření MPTP a úplnému poklesu membránového potenciálu. Metformin (20 mM) sice nezabránil porušení membránového potenciálu vyvolané přidáním vápníku, ale nástup tohoto děje výrazně zpomalil. Tuto skutečnost si vysvětlujeme sníženou citlivostí MPTP k vápníku v přítomnosti metforminu.

Tento předpoklad jsme ověřili sledováním účinku 10 mM metforminu na bobtnání mitochondrií vyvolané vápenatými ionty v izolovaných mitochondriích. Intenzita bobtnání měřená jako absorbance při 520 nm (0,56 vs. 0,61) nebyla metforminem ovlivněna, ale v přítomnosti metforminu došlo ke zpomalení rychlosti bobtnání o 70 % a k prodloužení doby maximální rychlosti bobtnání z 90 s na 150 s. Naše výsledky tak potvrzují teorii, že metformin zvyšuje odolnost MPTP k působení vápníku.

Některé studie ukazují, že metformin ovlivňuje srdeční funkci a odolnost k ischemii (Roberts and Ryan, 2007, Bhamra *et al.*, 2008, Yin *et al.*, 2011). Při použití malátu + glutamátu + ADP jako substrátů oxidace vykazovaly srdeční mitochondrie u kontrolního vzorku ve srovnání s jaterními mitochondriemi o 50 % vyšší respirační kapacitu (1659 ± 53 vs. 1100 ± 25 pmol O₂/s/mg proteinu). Citlivost srdečních mitochondrií vůči rostoucí koncentraci metforminu byla ve srovnání s jaterními mitochondriemi výrazně nižší, EC₅₀ metformin, srdce pro malát+ glutamát při maximální rychlosti respirace bylo dosaženo až při 20 mM. Respirace sukcinátu nebyla metforminem ovlivněna s výjimkou izolovaného poklesu při koncentraci 2,5 mM, pro který zatím nemáme vysvětlení. U srdečních mitochondrií jsme nepozorovali zvyšující se podíl elektronů dodávaných přes komplex II v důsledku stoupající koncentrace metforminu, jenž je charakteristický pro jaterní mitochondrie. Odlišný průběh měly také křivky závislosti indexu respirační kontroly na koncentraci metforminu v srdci a v játrech.

Publikace B

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

Metformin i fenformin patří do rodiny biguanidů inhibujících mitochondriální respiraci. Aromatický fenformin je však na rozdíl od metforminu výrazně účinnější (cca 10 x), proto se zdá být vhodnějším nástrojem pro studium mechanismu účinků biguanidů, než jakým je klinicky používaný metformin. Podmínkou přenositelnosti výsledků získaných při studiu fenforminu je kvalitativně obdobné působení obou biguanidů. Naše výsledky prokázaly jak řadu společných rysů působení metforminu a fenforminu, tak určité rozdíly mezi oběma biguanidy.

Metformin i fenformin inhibují oxidaci NADH-dependentních substrátů, přičemž fenformin je přibližně 20 x účinnější (EC₅₀ fenformin = 0,25 mM). Fenformin způsobil pokles

indexu respirační kontroly u spřažených mitochondrií přímo úměrně se vzrůstající koncentrací. Zjištěná závislost odpovídala korelaci mezi dávkou fenforminu a inhibičním efektem na respiraci glutamátu + malátu + ADP. Na základě těchto výsledků vyvozujeme, že mechanismus působení obou biguanidů na utilizaci NADH-dependentních substrátů a na index respirační kontroly je obdobný.

Dále jsme prokázali, že fenformin, stejně jako metformin, snižuje membránový potenciál, a to přímým působením na enzymatické komplexy mitochondriálního respiračního řetězce. Stejně jako v případě metforminu naše data nenasvědčují tomu, že by fenformin působil jako rozpojovač.

Shodným rysem obou biguanidů je jejich vliv na MPTP. Fenformin (1 mM) snižuje rychlost bobtnání o 44 % a prodlužuje časový interval od přidání vápníku do dosažení maximální rychlosti bobtnání o 100 % (z 12 s na 24 s). Na rozdíl od metforminu fenformin snižuje také intenzitu bobtnání o 20 %. Vliv fenforminu na MPTP je přímo úměrný použité koncentraci.

Na rozdíl od metforminu, kdy byla inhibice respirace NADH-dependentních substrátů metforminem v plném rozsahu kompenzována sukcinátem i při nejvyšší použité koncentraci 20 mM, nebyl tento FADH₂-dependentní substrát schopen vyrovnat vliv fenforminu na respiraci pokud koncentrace fenforminu přesáhla 0,5 mM. V přítomnosti vyšší koncentrace fenforminu respirace při oxidaci sukcinátu dále nevzrůstala ani v přítomnosti malátu + glutamátu a sukcinátu. To ukazuje na celkový útlum respirační kapacity a možný přímý inhibiční vliv fenforminu na komplex I a komplex II. Při velmi vysoké koncentraci (6 mM) fenformin inhibuje nejenom komplex I, ale vykazuje signifikantní inhibiční vliv rovněž na komplex II a komplex IV. Z těchto poznatků vyplývá, že biguanidy nevykazují striktní specifitu pouze ke komplexu I, ale v závislosti na chemickém složení a dávce mohou interagovat také s dalšími enzymatickými systémy elektronového transportního řetězce.

Publikace C

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

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

Naše měření prokázala, že jak vysokotuková dieta, tak metformin *in vivo* snižují intenzitu maximální mitochondriální respirace plně (glutamát + malát) nebo částečně (palmitoylkarnitin) NADH-dependentních substrátů v jaterním homogenátu. Dále jsme zjistili, že účinek metforminu a diety je aditivní. V souladu s výsledky získanými po přidání metforminu *in vitro* jsme nezjistili vliv metforminu na respiraci sukcinátu. Výsledky získané v jaterním homogenátu a na intaktních izolovaných mitochondriích jsou v souladu se sníženou aktivitou NADH: cytochrom c oxidoreduktázy senzitivní k rotenonu. Tyto údaje potvrzují, že metformin snižuje buněčné dýchání nejenom ve vysokých koncentracích *in vitro*, ale také v mnohem nižších koncentracích po podání *in vivo*.

ATP replece je proces opětovného obnovení zásob ATP, které byly vyčerpány v důsledku určitého procesu (např. při ischemii). Pokud metformin částečně inhibuje mitochondriální respirační řetězec, lze předpokládat také ovlivnění rychlosti replece ATP. Abychom tuto hypotézu ověřili, změřili jsme rychlost resyntézy ATP v játrech *in vivo* metodou ^{31}P NMR spektroskopie po krátkodobé ischemii u potkanů, jimž byl metformin podáván ve standardní, nebo vysokotukové dietě. V souladu s předpoklady jsme prokázali sníženou resyntézu ATP v játrech během reperfuze u potkanů, kterým byl podáván metformin.

Transport elektronů mitochondriálním respiračním řetězcem je vždy spojen s rizikem vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). Toto riziko se významně zvyšuje ve fázi reoxygenace, tj. ve fázi reperfuze, která následuje po ischemii. V předložené studii jsme sledovali kombinovaný účinek vysokotukové diety, ischemie/reperfuze a metforminu na produkci ROS na modelu submitochondriálních partikulí (SMPs). SMPs připravené z mitochondrií zvířat vystavených ischemii/reperfuzi produkovaly ve srovnání s kontrolami významně větší množství ROS (sukcinát \gg NADH). Pokud byl zvířatům před navozením ischemie/reperfuze dlouhodobě podáván metformin, byla následná produkce ROS v SMPs

u obou substrátů významně nižší. Efekt metforminu se neprojevil u zvířat, které nebyly vystaveny ischemii/reperfuzi. Efekt metforminu ani ischemie/reperfuze se neprojevil, byl-li použit jako substrát glycerol-3-fosfát.

V naší práci jsme potvrdili inhibiční vliv biguanidů na mitochondriální respiraci a tvorbu ATP po podávání metforminu *in vivo* a tedy za fyziologických podmínek. Kromě toho jsme ukázali, že biguanidy ovlivňují i další mitochondriální děje nezávislé na přeměně energie, konkrétně zvyšují odolnost MPTP k vápníku. Demonstrovali jsme, že metformin omezuje oxidační poškození jater vyvolané ischemií/reperfuzí a prokázali jsme, že jedním z mechanismů podmiňujících antioxidační účinky metforminu je snížená tvorba ROS v mitochondriích. Jako možné cíle antioxidačního působení metforminu jsme za podmínek ischemie/reperfuze identifikovali přímý tok elektronů komplexem I a reverzní tok elektronů z komplexu II na komplex I.

6. ZÁVĚRY

- Prokázali jsme, že jaterní homogenát i izolované jaterní mitochondrie představují srovnatelné modely pro studium mechanismu účinku metforminu *in vitro*. Hlavní nevýhodou jaterního homogenátu je nižší citlivost k metforminu. Přínosem tohoto modelu je rychlost a jednoduchost přípravy, která minimalizuje poškození mitochondrií a umožňuje tak delší manipulaci v laboratorních podmínkách. Naše výsledky ukazují, že jaterní homogenát je vhodný alternativní model v experimentech, které vyžadují delší inkubaci s testovanou látkou nebo současné zpracování více vzorků.
- 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 prostřednictvím komplexu II. Dále jsme prokázali, že metformin zvyšuje odolnost MPTP k působení vápníku.
- Mechanismus účinku metforminu a fenforminu je obdobný, pozorované rozdíly lze připsat na vrub rozdílné účinnosti. Obě sloučeniny inhibují mitochondriální respiraci v závislosti na použité dávce. Fenformin inhibuje komplex I s výrazně vyšší účinností než metformin ($EC_{50} = 0,25 \text{ mM}$). Nové je naše zjištění, že ve vyšších koncentracích fenformin inhibuje i mitochondriální komplex II a IV a na rozdíl od působení metforminu nedochází k plné kompenzaci dodávky elektronů prostřednictvím komplexu II. Obě sloučeniny zvyšují odolnost MPTP k účinku vápníku. Účinky

metforminu i fenforminu nejsou závislé na integritě buňky a projevují se jak v jaterním homogenátu, tak 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 (citrátsyntáza a NADH:cytochrom c oxidoreduktáza). Dále jsme zjistili, že účinek metforminu je nezávislý na vlivu diety. V souladu s těmito pozorováními jsme prokázali i sníženou resyntézu ATP v játrech během reperfuze po ischemii u potkanů, kterým byl podáván metformin. Naše výsledky podporují teorii, že za podmínek *in vivo* dochází dosud neobjasněným mechanismem k akumulaci metforminu v mitochondriích a dosažení účinné koncentrace. Dále jsme prokázali, že metformin chrání játra před oxidačním poškozením spojeným s ischemií/reperfuzí. Naše výsledky ukazují, že antioxidační účinek metforminu je důsledkem inhibice tvorby ROS na úrovni komplexu I mitochondriálního respiračního řetězce.

7. ABSTRACT

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

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

enzymatic processes including membrane fluidity or MPTP (mitochondrial permeability transition pore) sensitivity to calcium.

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

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

We further found that *in vitro* metformin selectively inhibits the activity of complex I ($EC_{50} = 5 \text{ mM}$) and that it does not affect the activities of other components of mitochondrial respiratory chain. The metformin-induced partial inhibition of complex I may be compensated by the increased supply of electrons via complex II. The mechanism of action of metformin and phenformin shares a lot of common features. Both compounds inhibit mitochondrial respiration of NADH-dependent substrates in dose-dependent manner, phenformin being more effective ($EC_{50} = 0.25 \text{ mM}$) compared with metformin. We were first to demonstrate that in high doses phenformin inhibits also complex II and complex IV and in contrast to metformin, phenformin-induced inhibition of respiration could not be fully compensated by electron supply via complex II. Both biguanides increase the resistance of MPTP to calcium cations. Both metformin and phenformin action is not dependent on the cell integrity and could be demonstrated in the liver homogenate as well as in permeabilized hepatocytes.

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

metformin accumulates within mitochondria where it reaches sufficient effective concentration.

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

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

8. INTRODUCTION

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

Phenformin, 2-(N-fenetylkarbamimidoyl)-guanidin, is under physiological conditions a strong basis. Due to its chemical structure, i.e. two guanidine groups and phenylethyl aromatic circle, it is less polar and more hydrophobic compared with metformin and it has higher affinity to the mitochondrial membranes and has stronger inhibitory effect on mitochondrial respiratory chain function (Goodarzi and Bryer-Ash, 2005, Sogame *et al.*, 2013, Pernicova and Korbonits, 2014). It has been withdrawn from clinical use in most of the countries because of its strong adverse effects, particularly fatal lactate acidosis (Schäfer, 1983, Pernicova and Korbonits, 2014).

Metformin, (N,N-dimetylimido)dikarbonimidodiamid, has also basic character in cellular milieu. This aliphatic molecule is easily soluble in water but it has low solubility in non-polar structures, i.e. phospholipid bilayer (Schäfer, 1976a, Hale *et al.*, 2002). Metformin entry into the cell is ensured by active transport system. In the treatment of type 2 diabetes it is the drug of the first choice for the last fifty years. Compared with other guanidins and biguanides the inhibitory effect of metformin on cellular respiration is weaker

and reversible. This combination of properties is probably the key factor determining its clinical applicability allowing sufficient pharmacological effect without serious risk of harmful consequences (Bridges *et al.*, 2014).

The first observation regarding biguanide effect on oxidative phosphorylation was published in sixtieth of the last century when Hollunger reported the association between the increased glycolysis and the inhibition of cellular respiration after biguanide treatment. Despite an intensive research in this field, only some fifty years later at least the rough consensus regarding the main target of biguanide action in the cell was reached. Today, the mitochondria are considered to be the most probable site of metformin action. Biguanide-induced inhibition of mitochondrial respiration leads to the cellular energy stress due to the attenuation of oxidative phosphorylation and ATP synthesis (El-Mir *et al.*, 2000, Owen *et al.*, 2000, Carvalho *et al.*, 2008, Bridges *et al.*, 2014). Quite recent study brought detailed insight into the biguanide effect on the structure modification of mitochondrial complex I. Complex I can reach two reversible conformations: active and de-active. The metformin binding to the complex I prolongs the stability of de-active like conformation and also further increase its affinity to metformin binding. This feed-back loop “locks” complex I in de-active state and attenuates the mitochondrial respiratory chain performance (Bridges *et al.*, 2014, Matsuzaki and Humphries, 2015).

Beside the direct interaction with components of mitochondrial respiratory chain other mechanisms of biguanide action were proposed. The phenomenon called MPT (mitochondrial permeability transition) characterized by the altered permeability of inner mitochondrial membrane was described in late eighties of the last century (Hunter and Haworth, 1979). MPT is caused by the opening of MPTP (the mitochondrial permeability transition pore) (Crompton *et al.*, 1998) in response to the signals indicating mitochondrial injury, i.e. rapid increase of intracellular Ca^{2+} concentration (Halestrap *et al.*, 2002). Metformin decrease the MPTP sensitivity to Ca^{2+} cations and delays the MPTP opening (Guigas *et al.*, 2004). It is supposed that the resistance of MPTP is proportional to the level of complex I inhibition.

The inhibitory effect of biguanides in mitochondrial respiration has been explained also by mechanisms completely different than the direct interaction with mitochondrial respiratory chain enzymatic complexes. (Schäfer, 1976b) proposed that biguanides interact with and change the physical and chemical properties of membrane phospholipids. Consequently, the fluidity of biomembranes is altered and the modification of their physical properties disturbs the fluent electron flow through mitochondrial respiratory chain (Schäfer and Rieger, 1974, Viollet *et al.*, 2012).

The hypoglycemic effect of metformin has been explained by various theories but at present, the most accepted hypothesis works on the presumption that metformin inhibits hepatic gluconeogenesis. Nevertheless, there is still not agreement concerning the metabolic process(es) responsible for this effect. The main metabolic metformin effect in the cell is the alteration of energy metabolism. AMPK (AMP-activated protein kinase) is the key enzyme of energy metabolism responsible for sensing the decrease of cellular energy charge and switching catabolic processes on and anabolic processes, including gluconeogenesis, off and it has been proposed as the important mediator of metformin effect (Viollet *et al.*, 2009, Zheng *et al.*, 2015). Although several particular metformin effects definitely leads to the situation that activates AMPK, it has been shown that this enzyme is not a sine-qua-non condition for metformin-induced inhibition of hepatic gluconeogenesis as its effect was found also in AMPK/LKB1 deficient mice (Foretz *et al.*, 2010). In this model the decrease of gluconeogenesis correlated with the decreased ATP levels in the liver and authors proposed a theory that metformin inhibits gluconeogenesis simply because of shortage of ATP necessary for this energetically demanding metabolic reaction. An alternative mechanism has been recently proposed by Madiraju (Madiraju *et al.*, 2014). According to this theory the important factor regulating hepatic gluconeogenesis is the intracellular redox state in hepatocytes, particularly NADH:NAD ratio in the cytosol. Madiraju et al. demonstrated that metformin is able to mGPDH (mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase) even at low concentrations (50 μ M). mGPDH is a component of glycerol-3-phosphate shuttle which is located in the matrix-oriented side of inner mitochondrial membrane. This system transfers the reduced equivalents from cytosol to the coenzyme Q pool of mitochondrial respiratory chain. Its main physiological role is to regenerate cytosolic NADH to NAD (Mráček *et al.*, 2013, Orr *et al.*, 2014, Rauchová *et al.*, 2014). Inhibition of mGPDH prevents the glycerol utilization as the precursor for glucose synthesis because it prevents the necessary stop of glycerol-3-phosphate to dihydroxyacetonephosphate conversion. Besides this, the mGPDH inhibition leads to the accumulation of cytosolic NADH, what disfavors the lactate to pyruvate conversion and eliminates another significant gluconeogenic precursor.

Taken together, several decades of intensive research did not lead to the identification of one mechanism that is responsible for all metabolic effects of metformin. On the contrary, the present state of knowledge supports the presumption that the main metabolic effect of metformin, i.e. the decreased hepatic gluconeogenesis, is rather the result of more synergy processes.

9. AIMS OF THE STUDY

The general aim of the presented thesis is to study the effect of biguanides (metformin and phenformin) on the function of isolated liver mitochondria *in vitro* and on the energy metabolism in the liver *in vivo*. In order to fulfill this task the following specific aims were followed:

- Optimization of the model for the study of biguanide mechanism of action *in vitro*: the comparison of isolated liver mitochondria and liver homogenate
- Analysis of the effect of metformin on the activity of mitochondrial respiratory chain and particular enzymatic complexes *in vitro*
- Quantitative and qualitative comparison of two biguanide representatives (metformin and phenformin) mechanism of action in the model of isolated liver mitochondria
- Determination of the effect of *in vivo* administered metformin on energy metabolism in the liver
- Evaluation of the possible antioxidant metformin effect in ischemia/reperfusion liver injury, analysis of the possible mechanism.

10. MATERIAL AND METHODS

The following methods were employed in the presented studies:

- Preparation of liver homogenate and isolation of mitochondria
- Determination of mitochondrial respiration (Clark's electrode, XF 24 analyzer Seahorse)
- Determination mitochondrial enzyme activities *in vitro*
- Determination of mitochondrial membrane potential: fluorometric method
- Determination of mitochondrial swelling
- Isolation, cultivation and permeabilization of hepatocytes
- ³¹P NMR analysis of ATP content in real time *in vivo*
- ROS production *in vitro*: fluorometric method, electron paramagnetic spectroscopy (EPR)
- Routine biochemical analyses
- Statistical analysis

11. RESULTS AND DISCUSSION

Publication A

INHIBITORY EFFECT OF METFORMIN ON OXIDATION OF NADH-DEPENDENT SUBSTRATES IN RAT LIVER HOMOGENATE (Páleníčková, E., M.

Cahová, Z. Drahota, L. Kazdová and M. Kalous, 2011)

The previously published data suggest that metformin affects mitochondrial respiratory chain predominantly at the level of complex I but there still some uncertainty in this issue. This part of my thesis was focused on following questions: 1) comparison of the suitability of isolated mitochondria and unprocessed liver homogenate as models for the study of metformin effect on mitochondrial respiration; 2) quantitative analysis of the effect of *in vitro* added metformin on NADH-dependent and NADH-independent substrates respiration; 3) the effect of the length of mitochondria pre-incubation with metformin on mitochondrial respiration capacity; 4) determination of metformin effect on the respiration control index in isolated liver mitochondria and liver homogenate; 5) comparison of the metformin effect on liver and heart mitochondria.

In isolated liver mitochondria without metformin (control), the oxygen consumption for the respiration of malate+glutamate+ADP was 1100 ± 46 pmol O₂/sec/mg protein. In control liver homogenate, the oxygen consumption under the same condition was by 45 % lower (609 ± 31 pmol O₂/sec/mg protein). Both isolated mitochondria and liver homogenate responded similarly to the metformin added *in vitro* and the effect was dose-dependent but the homogenate was less sensitive than mitochondria (EC_{50} homogenate = 10 mM, EC_{50} mitochondria = 5 mM). The respiration of FADH₂-dependent substrate succinate was not affected by metformin in any of the models. The mitochondrial respiration inhibited by metformin was fully restored by the addition of succinate, i.e. when the electrons were supplied via complex II. Based on these findings we conclude that metformin does not function as an uncoupler. Surprisingly, we did not observe any effect of the length of mitochondria/liver homogenate preincubation with metformin on mitochondrial respiration with respect to the effective metformin dose.

Mitochondrial membrane potential serves as an indicator of preserved mitochondrial function and high level of oxidative phosphorylation. As expected, the addition of Ca²⁺ cations resulted in the immediate MPTP opening and dissipation of membrane potential. Metformin (20 mM) was not able to completely prevent the membrane potential dissipation induced by calcium but significantly delayed this process. We explain this observation by the lower MPTP sensitivity to Ca²⁺ in the presence of metformin. We

tested this hypothesis by the direct determination of metformin (10 mM) effect on the Ca^{2+} induced mitochondrial swelling. The swelling intensity measured as absorbance at 520 nm was not affected by metformin but the swelling rate was decreased by 70% and the time interval preceding the maximum swelling rate after CaCl_2 addition was prolonged from 90 to 150 sec in metformin presence. All these results confirm that phenformin can increase the mitochondrial transition pore resistance to calcium and influence mitochondrial membrane bound complex which is not involved in the energy transformation process.

Several studies reported the positive metformin effect on heart function and resistance to ischemia (Roberts and Ryan, 2007, Bhamra *et al.*, 2008, Yin *et al.*, 2011). In our study, unaffected heart mitochondria exhibited nearly 50 % higher O_2 consumption than liver mitochondria when metabolizing glutamate+malate+ADP (1659 ± 53 vs 1100 ± 25 pmol O_2 /sec/mg protein). Heart mitochondria were less sensitive to metformin ($\text{EC}_{50}^{\text{mal+glu+ADP}} = 20$ mM). The succinate respiration was not affected by metformin in spite of the isolated drop at the 2.5 mM metformin which we now cannot explain. In heart mitochondria, the metformin-induced restraint in electron flow from complex I was not compensated by the increased supply from complex II as it was observed in liver mitochondria.

Publication B

Biguanides Inhibit Complex I, II and IV of Rat Liver Mitochondria and Modify Their Functional Properties (Drahota, Z., E. Palenickova, R. Endlicher, M. Milerova, J. Brejchova, M. Vosahlikova, P. Svoboda, L. Kazdova, M. Kalous, Z. Cervinkova, and M. Cahova, 2014)

Metformin and phenformin both inhibit mitochondrial respiration. Nevertheless, phenformin is significantly more efficient than metformin what predetermines it as more suitable experimental model for the analysis of biguanide action mechanisms. The essential condition for the transmissibility of the results obtained on phenformin is qualitatively similar action of both biguanides. The aim of this study is to determine the effect of phenformin on respiration of NADH- and FADH-dependent substrate, respiratory control, membrane potential and MPTP. Our data show that both biguanides share many common features but that they also differ in some aspects.

Both metformin and phenformin attenuate the respiration of NADH-dependent substrates, phenformin being approx. 20 times more efficient ($\text{EC}_{50}^{\text{phenformin}} = 0.25$ mM). Respiratory control index decreased proportionally to the increased dose of phenformin

in coupled mitochondria. We further found that phenformin, similarly to metformin, dissipates membrane potential, probably due to its direct effect on enzymatic complexes of mitochondrial respiratory chain. Similarly to metformin, we found no evidence indicating that phenformin acts as an uncoupler.

Both biguanides similarly affects MPTP sensitivity to the Ca^{2+} cations. Three parameters characterising the kinetics of the membrane permeability pore function were evaluated - the extent of swelling, the maximum rate of swelling and the time interval between the calcium addition and the time, when the swelling rate reaches its maximum rate (Drahota *et al.*, 2012). The maximum rate of swelling after addition of 0.1 mM CaCl_2 decreased due to the phenformin treatment (1 mM) by 44 % and the time interval preceding the maximum swelling rate after CaCl_2 addition was prolonged two-fold from 0.2 to 0.4 min. In contrast to metformin, phenformin also decreased the extent of swelling by 20 %. The effect of phenformin was dose-dependent.

On the other and we found some differences in the action of the compared biguanides. Metformin inhibits the respiration of NADH-dependent substrates but the electron flow and oxygen consumption could be fully restored when the reduction equivalents are provided by succinate via complex II. This phenomenon was observed even at the highest metformin concentration (20 mM) that nearly completely inhibits complex I. In contrast, phenformin-induced inhibition of mitochondrial respiration was reversed by succinate only if phenformin concentration did not exceed 0.5 mM. This result indicates the general decline of respiratory capacity and suggests the possible direct effect of phenformin not only on complex I but also on complex II. We tested this possibility using isolated mitochondria and substrates specific for individual complexes and found that at very high concentration (6 mM) phenformin inhibits complexes II and IV. Our data thus have shown that biguanides do not specifically inhibit complex I activity, but depending on the dose and chemical structures they interact also with other components of the mitochondrial respiratory chain.

Publication C

Metformin prevents ischemia reperfusion-induced oxidative stress in the fatty liver by attenuation of reactive oxygen species formation (Cahova, M., E. Palenickova, H. Dankova, E. Sticova, M. Burian, Z. Drahota, Z. Cervinkova, O. Kucera, Ch. Gladkova, P. Stopka, J. Krizova, Z. Papackova, O. Oliyarnyk and L. Kazdova, 2015)

As we and the others have previously shown metformin added to the isolated mitochondria *in vitro* effectively inhibits complex I and attenuates mitochondrial respiration. Nevertheless, the effective *in vitro* metformin concentration was in mM order but the concentrations usually found in serum are nearly 1000times lower. Therefore, we were interested whether metformin administered *in vivo* affects mitochondrial respiration in the same way as when applied *in vitro* and whether its effect is modulated by the type of diet. In order to fulfill this task we provided male Wistar rats (300 g \pm 20) either standard or high-fat diet for 10 weeks and then determined of NADH- and FADH-dependent substrate respiration in isolated mitochondria. We further focused on the possible mechanisms of metformin antioxidant action, particularly on those related to metformin interaction with the mitochondrial respiratory chain and ROS production.

Our data showed that both high-fat diet and metformin administered *in vivo* decrease maximal respiration rate of fully (glutamate, malate) or partially (palmitoylcarnitine) NADH-dependent substrates in liver homogenate and that their effect is additive. In accordance with the data obtained *in vitro* we did not observe any effect of metformin on succinate respiration. These results correspond well with the decreased activities of rotenone-sensitive NADH:cytochrome c oxidoreductase and citrate synthase in mitochondria isolated from metformin-treated animals. Taken together, these data indicate that metformin attenuates mitochondrial respiration not only at high concentrations *in vitro* but also at physiological concentration *in vivo*.

The evidence given in the previous paragraph strongly indicates that metformin administered *in vivo* attenuates mitochondrial respiration. If so, metformin should also affect ATP synthesis. In order to confirm this hypothesis, we measured the extent and rate of ATP repletion during reperfusion after partial liver ischemia using ^{31}P MR spectroscopy. In accordance with our hypothesis we confirmed the decreased rate and extent of ATP resynthesis during reperfusion after ischemia in the liver of rats long-term treated with metformin.

In principal, electron transport through the mitochondrial respiratory chain is associated with potential ROS generation. This risk is further exacerbated during re-oxygenation after ischemia. In order to characterize the combined effect of *in vivo* metformin treatment and HFD administration on ROS formation, we used a model of submitochondrial particles (SMPs). ROS production *in vitro* was measured using a fluorescent probe DCFDA on three different substrates – NADH as a source of electrons for complex I, glycerol-3-phosphate for mGPDH and succinate for succinate dehydrogenase. SMPs isolated from rats subjected

to ischemia/reperfusion without metformin treatment exhibited significantly increased ROS production from NADH and succinate (succinate >> NADH) when compared with sham-operated controls. Previous metformin administration reduced ROS production from both these sources. No effect of metformin was observed in animals that were not exposed to ischemia/reperfusion. Rather surprisingly, we observed no effect of either ischemia/reperfusion or metformin on ROS production from glycerol-3-phosphate.

12. CONCLUSIONS

- Our data confirmed that both liver homogenate and isolated liver mitochondria may serve as a suitable model for the study of biguanide action mechanism(s) *in vitro*. The main disadvantage of liver homogenate in comparison with isolated mitochondria is its lower sensitivity to biguanides. On the plus side is low labor and time requirements what minimize the mitochondrial damage and allows longer manipulation in laboratory conditions. We propose that liver homogenate is a suitable and advantageous model in experiments requiring longer preincubation with the tested substance or handling more samples concurrently.
- *In vitro*, metformin selectively inhibits complex I activity ($EC_{50} = 5 \text{ mM}$) and does not affect other mitochondrial respiratory chain complexes. The metformin-induced complex I inhibition could be completely compensated by reduction equivalents supply via complex II.
- Metformin and phenformin share several common features. Both biguanides inhibit mitochondrial respiration of NADH-dependent substrates in dose-dependent manner, phenformin being approx. 20times more effective than metformin, and both of them increase MPTP resistance to Ca^{2+} cations. These effects are not dependent on the cell integrity and could be determined in liver homogenate, isolated liver mitochondria as well as in permeabilized hepatocytes. In contrast to metformin, phenformin in high concentrations (6 mM) inhibits not only complex I, but also complex II and complex IV and mitochondrial respiration could not be fully restored by the electron supply through complex II from succinate.
- We brought evidence that long-term metformin administration induce similar changes in mitochondria as those imposed by metformin added *in vitro*, i.e. attenuated respiration of NADH-dependent substrates and the decreased activity of some mitochondrial enzymes under *in vitro* conditions. We also showed that metformin

protects the fatty liver from acute oxidative stress-related mitochondrial injury. We propose that antioxidant effect of metformin is related to the direct metformin-induced inhibition of ROS formation at complex I.

13. POUŽITÁ LITERATURA/ REFERENCES

- Argaud, D., Roth, H., Wiernsperger, N. & Leverve, X.M., 1993. Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 213, 1341-8.
- Bhamra, G.S., Hausenloy, D.J., Davidson, S.M., Carr, R.D., Paiva, M., Wynne, A.M., Mocanu, M.M. & Yellon, D.M., 2008. Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res Cardiol*, 103, 274-84.
- Bridges, H.R., Jones, A.J., Pollak, M.N. & Hirst, J., 2014. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J*, 462, 475-87.
- Carvalho, C., Correia, S., Santos, M.S., Seiça, R., Oliveira, C.R. & Moreira, P.I., 2008. Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment. *Mol Cell Biochem*, 308, 75-83.
- Crompton, M., Virji, S. & Ward, J.M., 1998. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*, 258, 729-35.
- Drahota, Z., Endlicher, R., Stankova, P., Rychtrmoc, D., Milerova, M. & Cervinkova, Z., 2012. Characterization of calcium, phosphate and peroxide interactions in activation of mitochondrial swelling using derivative of the swelling curves. *J Bioenerg Biomembr*, 44, 309-15.
- El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M. & Leverve, X., 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*, 275, 223-8.
- Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F. & Viollet, B., 2010. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*, 120, 2355-69.
- Goodarzi, M.O. & Bryer-Ash, M., 2005. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes Metab*, 7, 654-65.
- Guigas, B., Detaille, D., Chauvin, C., Batandier, C., De Oliveira, F., Fontaine, E. & Leverve, X., 2004. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J*, 382, 877-84.
- Hale, T.W., Kristensen, J.H., Hackett, L.P., Kohan, R. & Ilett, K.F., 2002. Transfer of metformin into human milk. *Diabetologia*, 45, 1509-14.
- Halestrap, A.P., McStay, G.P. & Clarke, S.J., 2002. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*, 84, 153-66.
- Hollunger, G., 1955. Guanidines and oxidative phosphorylations. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 11, 1-84.
- Hunter, D.R. & Haworth, R.A., 1979. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 195, 453-9.
- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., Jurczak, M.J., Camporez, J.P., Lee, H.Y., Cline, G.W., Samuel, V.T., Kibbey, R.G. & Shulman, G.I., 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, 510, 542-6.
- Matsuzaki, S. & Humphries, K.M., 2015. Selective Inhibition of Deactivated Mitochondrial Complex I by Biguanides. *Biochemistry*.
- Mráček, T., Drahota, Z. & Houštěk, J., 2013. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1827, 401-10.
- Orr, A.L., Ashok, D., Sarantos, M.R., Ng, R., Shi, T., Gerencser, A.A., Hughes, R.E. & Brand, M.D., 2014. Novel inhibitors of mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *PLoS One*, 9, e89938.
- Owen, M.R., Doran, E. & Halestrap, A.P., 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*, 348 Pt 3, 607-14.
- Pernicova, I. & Korbonits, M., 2014. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*, 10, 143-56.
- Rauchová, H., Vokurková, M. & Drahota, Z., 2014. Inhibition of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by α -tocopheryl succinate. *Int J Biochem Cell Biol*, 53, 409-13.
- Roberts, F. & Ryan, G.J., 2007. The safety of metformin in heart failure. *Ann Pharmacother*, 41, 642-6.

- Schäfer, G., 1976a. On the mechanism of action of hypoglycemia-producing biguanides. A reevaluation and a molecular theory. *Biochem Pharmacol*, 25, 2005-14.
- Schäfer, G., 1976b. Some new aspects on the interaction of hypoglycemia-producing biguanides with biological membranes. *Biochem Pharmacol*, 25, 2015-24.
- Schäfer, G., 1983. Biguanides. A review of history, pharmacodynamics and therapy. *Diabete Metab*, 9, 148-63.
- Schäfer, G. & Rieger, E., 1974. Interaction of biguanides with mitochondrial and synthetic membranes. Effects on ion conductance of mitochondrial membranes and electrical properties of phospholipid bilayers. *Eur J Biochem*, 46, 613-23.
- Sogame, Y., Kitamura, A., Yabuki, M., Komuro, S. & Takano, M., 2013. Transport of biguanides by human organic cation transporter OCT2. *Biomed Pharmacother*, 67, 425-30.
- Viollet, B., Guigas, B., Leclerc, J., Hébrard, S., Lantier, L., Mounier, R., Andreelli, F. & Foretz, M., 2009. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf)*, 196, 81-98.
- Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M. & Andreelli, F., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*, 122, 253-70.
- Yin, M., van der Horst, I.C., van Melle, J.P., Qian, C., van Gilst, W.H., Silljé, H.H. & de Boer, R.A., 2011. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H459-68.
- Zheng, J., Woo, S.L., Hu, X., Botchlett, R., Chen, L., Huo, Y. & Wu, C., 2015. Metformin and metabolic diseases: a focus on hepatic aspects. *Front Med*.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J. & Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108, 1167-74.

14. CURRICULUM VITAE

Mgr. Eliška Švecová (roz. Páleníčková)

Email: eliska.palenickova@seznam.cz

VZDĚLÁNÍ

- 2010 – současnost Univerzita Karlova - Přírodovědecká fakulta, postgraduální studium (**Ph.D.**), obor Fyziologie živočichů, téma **dizertační práce: Působení biguanidů na metabolismus jater**. Školitel: Doc. RNDr Martin Kalous CSc.
- 2008 – 2010 Univerzita Karlova - Přírodovědecká fakulta, magisterské studium (**Mgr.**), obor Klinická a toxikologická analýza, téma **diplomové práce: Jaterní steatóza a mitochondriální dysfunkce**. Školitel: Doc. RNDr. František Novák CSc.
- 2004 – 2007 Univerzita Karlova - Přírodovědecká fakulta, bakalářské studium (**Bc.**), obor Klinická a toxikologická analýza, téma **bakalářské práce: Sledování procesu eutrofizace rybníční vody v závislosti na typu okolní zemědělské půdy**. Školitel: Doc. RNDr. Petr Rychlovský CSc.

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

2007 – současnost IKEM, Centrum experimentální medicíny, Oddělení metabolismu diabetu Odborný pracovník v laboratorních metodách bez registrace, přírodovědné zaměření (výzkum). Vědecký pracovník v oblasti metabolismu lipidů, in-vivo a in-vitro modely. Zaměření na jaterní steatózu, inzulinovou rezistenci. Role poruch lipidového metabolismu v patofyziologii rozvoje inzulinové rezistence a NIDDM.

M.Sc. Eliska Svecova (née Palenickova)

Email: eliska.palenickova@seznam.cz

EDUCATION

Since 2010 Charles University in Prague – Faculty of Science, specialization in Animal Physiology – **Ph.D. Thesis:** *Effect of biguanides on the liver metabolism*. Supervisor: Doc. Dr. Martin Kalous CSc.

2008 – 2010 Charles University in Prague – Faculty of Science, specialization in Clinical and Toxicological Analysis – **Diploma Thesis:** *Steatosis of liver and mitochondrial dysfunction*. Supervisor: Doc. Dr. Frantisek Novak CSc.

2004 – 2007 Charles University in Prague – Faculty of Science, specialization in Clinical and Toxicological Analysis – **Bachelor Thesis:** *Monitoring of the pond water eutrophication process in dependence on surrounding soil type*. Supervisor: Doc. Dr. Petr Rychlovsky CSc.

WORK EXPERIENCE

Since 2007 IKEM, Center for Experimental Medicine, Department of Metabolism and Diabetes. Researcher in science.

15. SEZNAM PUBLIKACÍ/ LIST OF PUBLICATION

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertace/ Publications *in extenso* related to the Dissertation

- 1) **Páleníčková, E.**, M. Cahová, Z. Drahota, L. Kazdová, and M. Kalous, 2011, Inhibitory effect of metformin on oxidation of NADH-dependent substrates in rat liver homogenate: *Physiol Res*, 60, 835-9. IF v roce 2011 1,555
- 2) Drahota, Z., **E. Palenickova**, R. Endlicher, M. Milerova, J. Břejchova, M. Vosahlikova, P. Svoboda, L. Kazdova, M. Kalous, Z. Cervinkova, and M. Cahova, 2014, Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties: *Physiol Res*, 63, 1-11. IF v roce 2014 1,487
- 3) Cahova, M., **E. Palenickova**, E., H. Dankova, E. Sticova, M. Burian, Z. Drahota, Z. Cervinkova, O. Kucera, Ch. Gladkova, P. Stopka, J. Krizova, Z. Papackova, O. Oliyarnyk and L. Kazdova, 2015 Metformin prevents ischemia reperfusion-induced oxidative stress in the fatty liver by attenuation of reactive oxygen species formation: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, manuscript number GI-00329-2014R1 was submitted on 9th Apr 2015.

Ostatní publikace/ The other Publications

- 1) Cahova, M., P. Chrastina, H. Hansikova, Z. Drahota, J. Trnovska, V. Skop, J. Spacilova, H. Malinska, O. Oliyarnyk, Z. Papackova, **E. Palenickova**, and L. Kazdova, 2015, Carnitine supplementation alleviates lipid metabolism derangements and protects against oxidative stress in non-obese hereditary hypertriglyceridemic rats: *Appl Physiol Nutr Metab*, 40, 280-91. IF za rok 2015 2,23.
- 2) Škop, V., M. Cahova, H. Dankova, Z. Papackova, **E. Palenickova**, P. Svoboda, J. Zidkova, and L. Kazdova, 2014, Autophagy inhibition in early but not in later stages prevents 3T3-L1 differentiation: Effect on mitochondrial remodeling: *Differentiation*, 87, 220-9. IF v roce 2014 2,836.
- 3) Cahova, M., **E. Palenickova**, Z. Papackova, H. Dankova, V. Skop, and L. Kazdova, 2012, Epinephrine-dependent control of glucose metabolism in white adipose tissue: the role of α - and β -adrenergic signalling: *Exp Biol Med (Maywood)*, 237, 211-8. IF v roce 2012 1,825.
- 4) Cahova, M., H. Dankova, **E. Palenickova**, Z. Papackova, R. Komers, J. Zdychova, E. Sticova, and L. Kazdova, 2012, The increased activity of liver lysosomal lipase in nonalcoholic Fatty liver disease contributes to the development of hepatic insulin resistance: *Biochem Res Int*, 2012, 135723. IF v roce 2012 0,775.
- 5) Cahova, M., H. Dankova, **E. Palenickova**, Z. Papackova, and L. Kazdova, 2012, The opposite effects of high-sucrose and high-fat diet on Fatty Acid oxidation and very low density lipoprotein secretion in rat model of metabolic syndrome: *J Nutr Metab*, 2012, 757205. IF v roce 2012
- 6) Papáčková, Z., H. Daňková, **E. Páleníčková**, L. Kazdová, and M. Cahová, 2012, Effect of short- and long-term high-fat feeding on autophagy flux and lysosomal activity in rat liver: *Physiol Res*, 61 Suppl 2, S67-76. IF v roce 2012 1,531.

- 7) Papackova, Z., **E. Palenickova**, H. Dankova, J. Zdychova, V. Skop, L. Kazdova, and M. Cahova, 2012, Kupffer cells ameliorate hepatic insulin resistance induced by high-fat diet rich in monounsaturated fatty acids: the evidence for the involvement of alternatively activated macrophages: *Nutr Metab (Lond)*, 9, 22. IF v roce 2012 3,156.
- 8) Škop, V., M. Cahová, Z. Papáčková, **E. Páleníčková**, H. Daňková, M. Baranowski, P. Zabielski, J. Zdychová, J. Zídková, and L. Kazdová, 2012, Autophagy-lysosomal pathway is involved in lipid degradation in rat liver: *Physiol Res*, 61, 287-97. . IF v roce 2012 1,531.
- 9) Cahová, M., H. Daňková, **E. Páleníčková**, Z. Papáčková, and L. Kazdová, 2010, The autophagy-lysosomal pathway is involved in TAG degradation in the liver: the effect of high-sucrose and high-fat diet: *Folia Biol (Praha)*, 56, 173-82. IF v roce 2010 0,7