

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

MITOCHONDRIÁLNÍ TOXINY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

AUTOR PRÁCE: Petra Blažková

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

MITOCHONDRIAL TOXINS

BACHELOR THESIS

2017

AUTHOR: Petra Blažková

SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra Blažková**
Osobní číslo: **C14187**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Mitochondriální toxiny**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Zpracujte literární rešerši zaměřenou na funkci mitochondrií v živočišné eukaryotické buňce. V kompilační práci se nejprve zaměřte na obecný popis funkcí a struktury mitochondrií, výpis biochemických dějů, které v nich probíhají a také popis membránových respiračních komplexů. Následně uveďte přehled vybraných mitochondriálních jedů s popisem jejich biochemické struktury, místa a principu účinku, popř. příkladu využití.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. ScienceDirect, HighWire, NCBI Pubmed, apod.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Martina Hauschke**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlášení:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 21/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne 19. 6. 2017

Petra Blažková

Poděkování:

Především bych ráda poděkovala doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině, za to, že mi umožnili studovat a podporovali mě po dobu mého studia.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá toxiny a inhibitory mitochondriálního respiračního procesu. V úvodní části této práce je stručně popsána mitochondrie, její funkce a metabolismus se zaměřením na glykolýzu a oxidativní fosforylaci. Elektrony uvolněné z Krebsova cyklu jsou dále přenášeny elektronovým transportním řetězcem na vnitřní membráně mitochondrie. Existuje řada přírodních i syntetických látek, které tento proces buněčného dýchání inhibují. Některé látky i zastavují syntézu ATP například tím, že inhibují glykolýzu, blokují přenos elektronů mezi jednotlivými komplexy elektronového transportního řetězce, zvyšují produkci reaktivních forem kyslíku, způsobují kolaps mitochondriálního membránového potenciálu a indukují apoptózu buňky. V této práci jsou popsány jednotlivé toxiny, jejich struktura, typ zásahu, způsob působení a příklady využití.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mitochondrie, respirační komplexy, rozpojovací proteiny, reaktivní formy kyslíku, inhibice buněčného dýchání.

ABSTRACT

This Bachelor thesis deals with toxins and inhibition of mitochondrial respiratory process. The introductory part of the thesis briefly describes mitochondria, its function and metabolism with focus on glycolysis and oxidative phosphorylation. The electrons produced by the citric acid cycle are further transported by the electron transport chain through the inner membrane of the mitochondria. There are numbers of natural and synthetic substances which inhibit the process of cellular respiration. Some substances even inhibit ATP synthesis by inhibiting glycolysis, blocking the transfer of electrons between particular electron-transport complexes, increasing the production of reactive oxygen species, causing collapse of the mitochondrial membrane potential, and inducing cell apoptosis. Finally, individual toxins are described, including their structure, type of intervention, targeting and examples of use.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mitochondria, respiratory complexes, uncoupling proteins, reactive oxygen species, inhibition of cellular respiration.

OBSAH

ÚVOD	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1. Mitochondrie	12
1.1 Metabolismus mitochondrií	14
1.2 Glykolýza	15
1.3 Oxidativní fosforylace	15
2. Mitochondriální toxiny	20
2.1 Inhibice glykolýzy	20
2.1.1 2-deoxyglukóza	21
2.1.2 Dichloracetát	22
2.1.3 Lonidamin	23
2.2 Inhibice oxidativní fosforylace	24
2.2.1 Inhibitory komplexu I	26
2.2.1.1 Rotenon	28
2.2.1.2 Piericidin A	29
2.2.1.3 Amytal	31
2.2.2 Inhibitory komplexu III	33
2.2.2.1 Myxothiazol	34
2.2.2.2 Antimycin A	35
2.2.3 Inhibitory komplexu IV	36
2.2.3.1 Oxid uhelnatý	36
2.2.3.2 Kyanidy	39
2.2.4 Inhibitory komplexu V	41
2.2.4.1 Oligomycin	41
2.2.4.2 Dicyklohexylkarbodiimid	44
2.2.5 Rozpojovací proteiny	45
2.2.5.1 Termogenin	49
ZÁVĚR	51
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2-DG	2-deoxy-D-glukóza
ADP	adenosindifosfát
AMO	amobarbital
ATP	adenosintrifosfát
BMCP	mozkový mitochondriální rozpojovací protein
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DCA	dichloracetát
DCCD	dicyklohexylkarbodiimid
FAD, FADH ₂	flavinadenindinukleotid oxidovaný, redukovaný
FMN	flavinmononukleotid
G-6-P	glukóza-6-fosfát
HK	hexokináza
KCN	kyanid draselný
LND	lonidamin
MCT	monokarboxylové transportéry
MPC	mitochondriální přenašeč pyruvátu
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazoliumbromid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
PDH	pyruvátdehydrogenáza
PDK	pyruvátkináza
Q	ubichinon
QH ₂	ubichinol
ROS	reaktivní formy kyslíku
TAG	triacylglycerol
UCP	rozpojovací protein
VDAC	napětově řízený iontový kanál

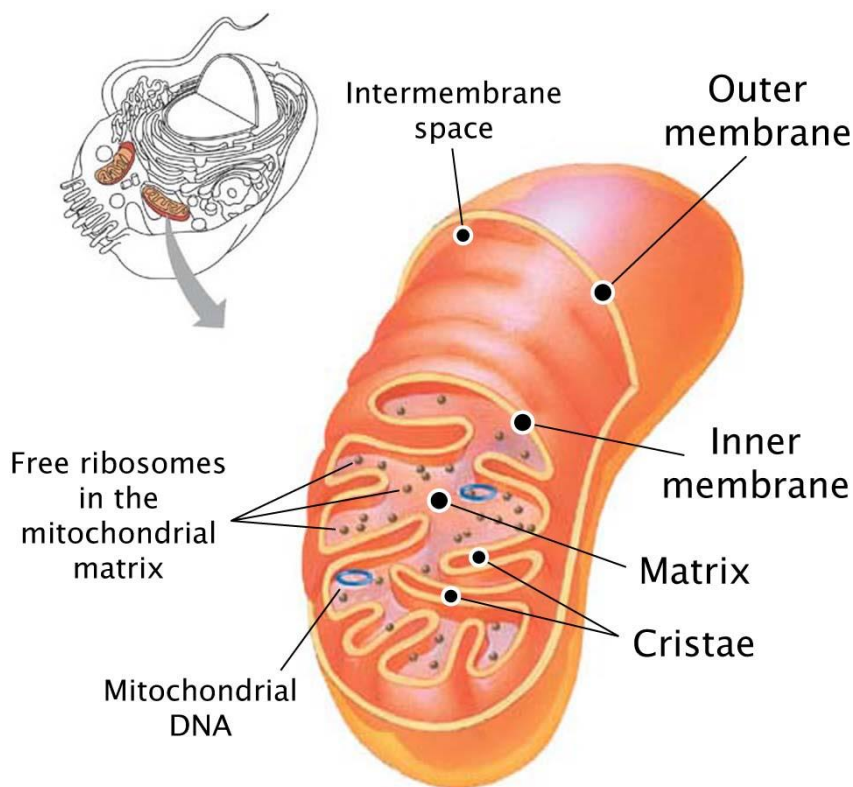
ÚVOD

Mezi mitochondriální toxiny řadíme látky, které inhibují metabolismus mitochondrie. Jelikož je mitochondrie složitá organela, existuje řada míst se kterými mohou toxické látky reagovat. Podle toho jsou jednotlivé inhibitory rozděleny do skupin na inhibitory glykolýzy, respiračních komplexů I–V, rozpojovací proteiny a inhibitory přeměny ADP na ATP.

Mitochondriální toxiny významně pomohly při studiích mechanismu mitochondriálního metabolismu. Pomohly objasnit funkce jednotlivých komplexů elektronového transportního řetězce, enzymů účastnících se metabolických reakcí, transportních membránových kanálů atd. Významnou nadějí jsou také coby nové strategie léčby různých civilizačních onemocnění.

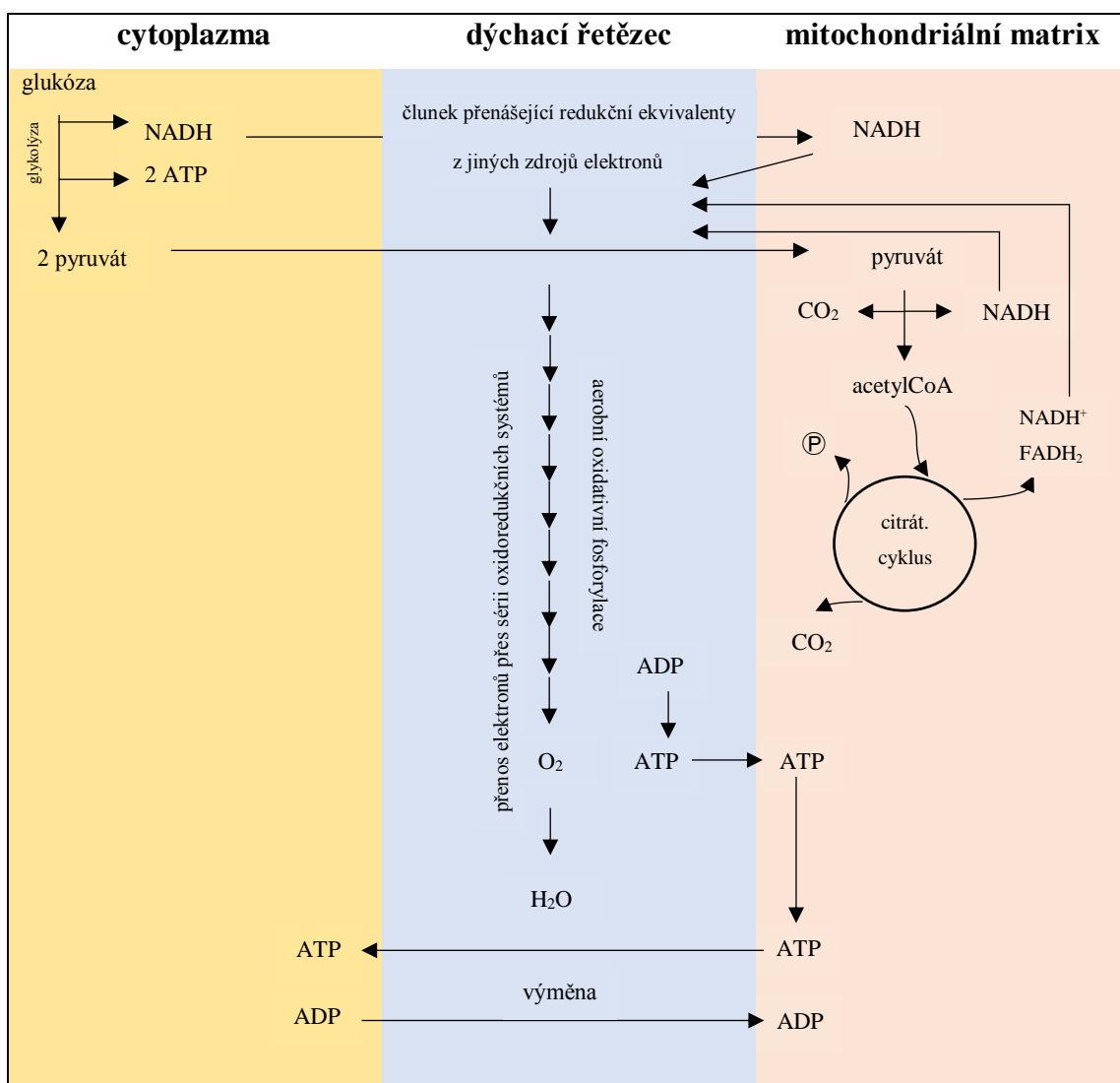
1. Mitochondrie

Mitochondrie (*obr. 1*) je buněčná organela složená ze dvou membrán – vnitřní a vnější membrány. Vnější membrána má jako u většiny ostatních organel funkci ochrannou. Hlavní složku tvoří lipidy. Je permeabilní, a to díky proteinům – porinům – což jsou napěťově řízené iontové kanály. Vnitřní mitochondriální membrána je na rozdíl od vnější zvrásněná a vytváří krysty. Díky nim má vnitřní membrána několikanásobně větší povrch. Je tvořena převážně proteiny a obsahuje transportní mechanismy zajišťující její selektivní propustnost. Obě membrány od sebe odděluje mezimembránový prostor. Mitochondriální matrix obsahuje vlastní mitochondriální DNA kruhového charakteru. Mitochondrie jsou proto schopny vlastní samostatné reprodukce bez ohledu na buněčné dělení, a mají také vlastní proteosyntetický aparát se znaky prokaryot, což podporuje teorii, že se mitochondrie vyvinuly ze samostatně žijících bakterií. Matrix obsahuje řadu enzymů – enzymy metabolismu mastných kyselin, metabolismu pyruvátu i Krebsova cyklu. Obsahuje i specifické ribosomy, které se svým složením liší od ribosomů cytoplazmatických.



Obr. 1: Struktura mitochondrie ⁽¹⁾

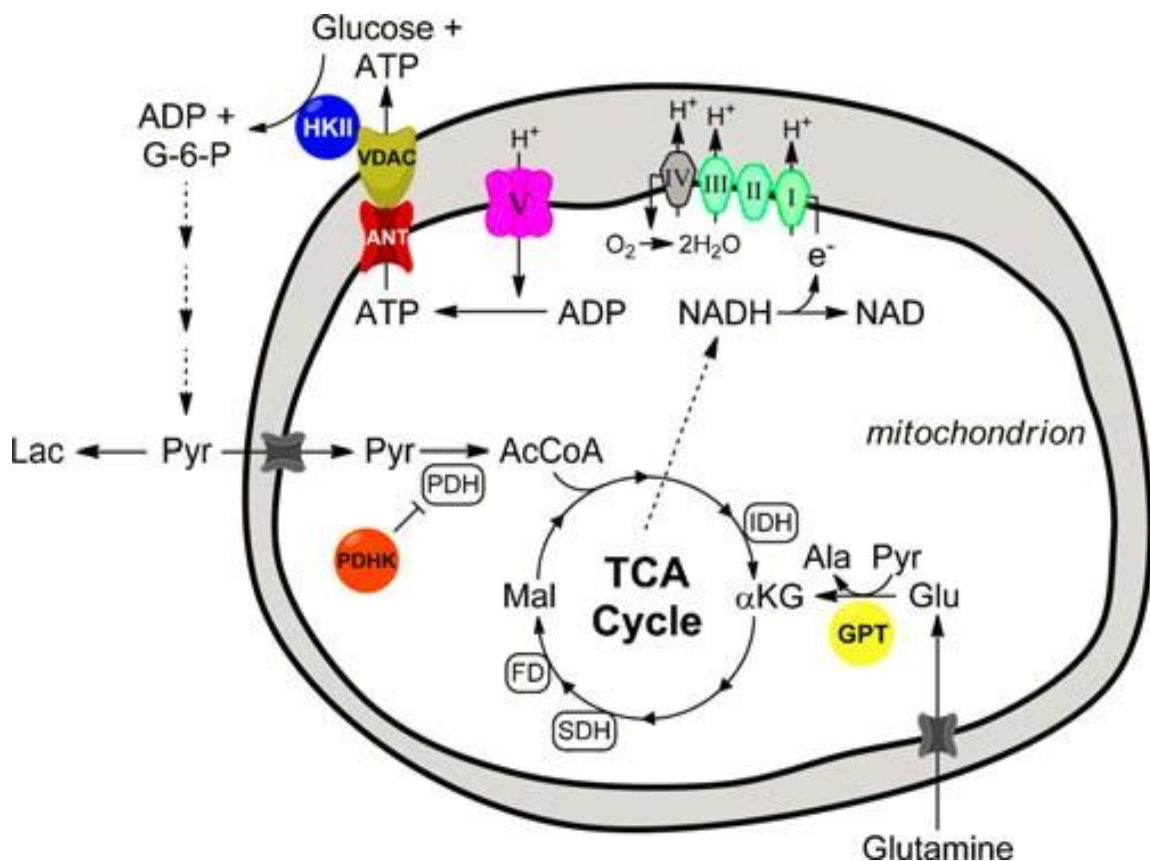
Hlavní funkcí mitochondrie v eukaryotických buňkách je generování ATP pomocí procesu tzv. oxidativní fosforylace ⁽²⁾. Organismus může složitou strukturu glukózy oxidací rozložit na vodu a oxid uhličitý (*obr. 2*). Uvolněná energie se z části přemění na teplo, zčásti konzervuje do anhydridové vazby v ATP. Celý sled reakcí začíná glykolýzou v cytoplasmě. Vzniklý pyruvát je přenesen do mitochondrie, dekarboxylován na acetylCoA a ten oxidován v citrátovém cyklu v mitochondriální matrix. Elektrony odebrané při těchto reakcích jsou odevzdány do série oxidoredukčních soustav ve vnitřní mitochondriální membráně (= dýchací řetězec) a jejich přenosem je poháněn transport protonů z matrix na zevní stranu vnitřní membrány, čímž se na této membráně vytvoří elektrochemický protonový gradient. Jeho energie je pak využita v ATPáze na syntézu a uvolnění ATP ⁽³⁾.



Obr. 2: Oxidace glukózy

1.1 Metabolismus mitochondrií

Palivo pro svůj růst získávají buňky především prostřednictvím katabolismu glukózy. První krok při glykolýze, tj. přeměna glukózy na glukóza-6-fosfát, je katalyzován hexokinázou. Hexokináza je vázána na mitochondrie v blízkosti napěťově řízeného iontového kanálu, kde získává preferenční přístup k mitochondriálnímu ATP, generovanému oxidativní fosforylací, přes adeninnukleotidtranslokázu na vnitřní membráně. Pyruvát generovaný glykolýzou je převeden na kyselinu mléčnou, nebo přejde do mitochondriální matrix, kde je katabolizován na acetylkoenzym A pomocí enzymu pyruvátdehydrogenáza⁽⁴⁾. AcetylCoA vstupuje do Krebsova cyklu (*obr. 3*).



Obr. 3: Mitochondriální metabolismus⁽⁴⁾

HK = hexokináza; VDAC = napěťově řízený iontový kanál; ANT = adeninnukleotidtranslokáza;
Pyr = pyruvát; Lac = kyselina mléčná; AcCoA = acetylkoenzym A;
PDH = pyruvátdehydrogenáza

1.2 Glykolýza

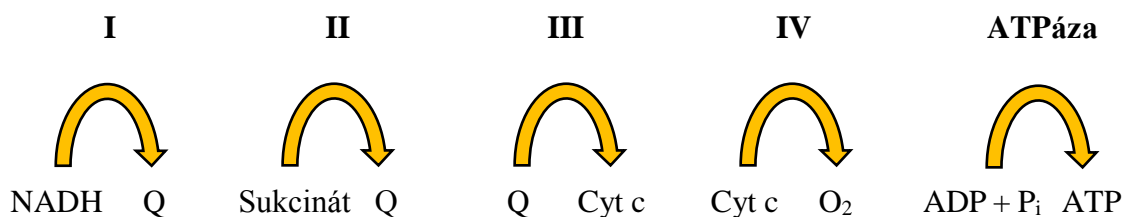
Při procesu glykolýzy dochází k přeměně jedné molekuly glukózy na dvě molekuly pyruvátu. Prvním krokem reakce je převedení glukózy na její aktivovanou formu glukóza-6-fosfát. Fosforylace glukózy probíhá za katalýzy enzymu hexokinázy (HK), který nalezneme ve většině buněk. Existují čtyři izoformy HK I až IV. Isoformy I a II umožňují interakci s vnější mitochondriální membránou, izoformu III nacházíme v perinukleárním prostoru a izoforma IV (též známá jako glukokináza) je v cytosolu ^(5; 6). HKI je exprimována převážně v mozku, HK II v inzulín-senzitivních tkáních, HK III se vyskytuje velmi zřídka, ale může být detekována v plicích a HK IV nalézáme v játrech a pankreatu ⁽⁶⁾. V buňkách zdravého jedince je exprese HK II potlačena z důvodu metylace jejího promotoru. Naopak v maligních buňkách je HK II nadprodukována a odpovídá za zvýšenou aktivitu hexokináz ⁽⁷⁾. HK II se váže na napěťově řízený iontový kanál (VDAC z anglického “voltage dependent anion channel“) uložený na vnější membráně mitochondrie, který interaguje s adeninnukleotidtranslokázou na vnitřní membráně mitochondrie ⁽⁸⁾.

Pyruvátdehydrogenáza (PDH) propojuje glykolýzu a Krebsův cyklus. Po vstupu pyruvátu do mitochondrie PDH katalyzuje jeho přeměnu na acetylCoA ⁽⁹⁾. Aktivita PDH je regulována fosforylací, jež je ovládána dvěma enzymy PDHkinázou a PDHfosfatázou. PDHkináza inhibuje rozklad pyruvátu, zatímco PDHfosfatáza je zodpovědná za aktivaci pyruvátdehydrogenázy ⁽¹⁰⁾.

1.3 Oxidativní fosforylace

Oxidativní fosforylace využívá redukční schopnosti NADH a FADH₂ produkovaných v Krebsově cyklu pro redukci molekulárního kyslíku na vodu. Vodíkové atomy, které přinesly zredukované koenzymy z Krebsova cyklu, jsou dále přenášeny supramolekulárními komplexy, které jsou zabudované do vnitřní membrány mitochondrií. Cytochromy si předávají elektrony a energii, která se uvolní při oxidačně-redukčních procesech, využívají k přečerpávání protonů do prostoru mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou. Elektronový transportní řetězec neboli dýchací řetězec, se skládá ze čtyř komplexů: NADH ubichinon-reduktázy (komplex I), sukcinát-Q-reduktázy (komplex II), cytochrom c oxidoreduktázy (komplex III), cytochrom c oxidázy

(komplex IV) a ATPázy ⁽⁴⁾ z nichž každý je schopen katalyzovat přenos elektronů přes část řetězce (obr. 4). Přehled jednotlivých komplexů a jejich proteinových složek se nachází v tabulce 1.



Obr. 4: Reakce komplexů oxidativní fosforylace (upraveno dle ⁽¹¹⁾)

Tabulka 1: Proteinové složky komplexů (upraveno dle ⁽¹¹⁾)

Enzymový komplex / Protein	Hmotnost (kDa)	Počet podjednotek	Prostetická skupina
I NADH dehydrogenáza	850	43	FMN, Fe-S
II Sukcinátdehydrogenáza	140	4	FAD, Fe-S
III Ubichinon cytochrom c oxidoreduktáza	250	11	Hemy, Fe-S
- (Cytochrom c)	13	1	Hem
IV Cytochrom oxidáza	160	13	Hemy, Cu _A , Cu _B

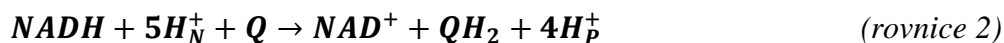
Pozn. Cytochrom c není součástí enzymových komplexů; pohybuje se mezi komplexem III a IV jako volný protein.

Komplex I, NADH ubichinonreduktáza nebo také NADH dehydrogenáza je velký enzym, který se skládá ze 42 různých polypeptidových řetězců, včetně flavoproteinu obsahujícího flavinmononukleotid (FMN) a alespoň 6 železosírných center, jež jsou různě velká (Fe-S, 2Fe-2S, 4Fe-4S). Železo je většinou koordinováno se čtyřmi atomy síry, zejména síry sulfhydrylových skupin cysteinů. Komplex I katalyzuje dva simultánní a obligátně vázané procesy ^(3; 11). Z NADH převádí dva elektrony koenzymu Q a přemísťuje čtyři protony do mezimembránového prostoru (rovnice 1). Komplex I je tedy protonová pumpa poháněná energií přenosu elektronů a reakce, kterou katalyzuje, je vektorová. To

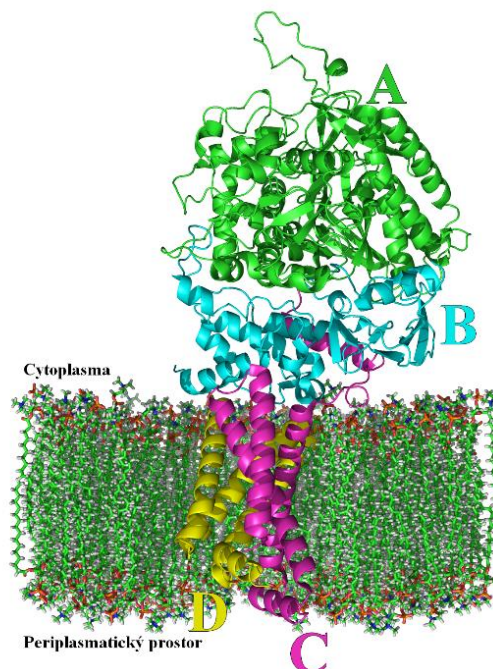
znamená, že protony se pohybují v určitém směru z jednoho místa (negativně nabitě matrix) na druhé (mezimembránový prostor je kladně nabitý). Proto v zápisu rovnice značíme lokalizaci protonů pro mezimembránový prostor jako P (positive) a pro matrix jako N (negative) (*rovnice 2*).

Koenzym Q pak nese elektrony ke komplexu III. Koenzym Q také nazýváme ubiquinon, zatímco redukovaný koenzym nesoucí elektrony, tedy QH₂, ubiquinol. V komplexu III je zpět oxidován na Q.

Předčasné prosakování elektronů se v komplexu I běžně vyskytuje a je jedním z hlavních míst produkce reaktivních forem kyslíku. Amytal (sodíková sůl amobarbitalu), rotenon (organická sloučenina, která se používá v širokém spektru jako insekticid a pesticid) a piericidin A (derivát polyhydroxylovaného pyridinu) inhibují tok elektronů z Fe-S center komplexu na koenzym Q ^(11; 12)



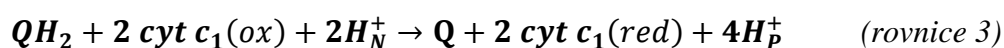
Komplex II, sukcinátdehydrogenáza, či sukcinát-Q-reduktáza přenáší 2 elektrony od sukcinátu z Krebsova cyklu jako FADH₂ na koenzym Q. Jedná se o enzymatický komplex navázaný v membráně mitochondrií, který je menší a jednodušší než komplex I a skládá se ze 4 různých podjednotek (*obr. 5*). Podjednotky C a D jsou integrační membránové proteiny. Obsahují hemovou skupinu, hem b a vazebné místo pro ubiquinon. Spíše než přenášet elektrony je smyslem hemu b chránit před tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS), peroxidu vodíku a superoxidových radikálů. Podjednotky A a B vyčnívají do matrix, obsahují tři Fe-S centra, kovalentně navázaný koenzym flavinadenindinukleotid (FAD) a vazebné místo pro substrát. Přenos elektronů probíhá cestou z vazebného místa pro sukcinát na FAD a dále pak přes Fe-S centra na ubiquinonové vazebné místo ^(11; 13).



Obr. 5: Sukcinátdehydrogenáza ve fosfolipidové membráně (upraveno dle ⁽¹⁴⁾)

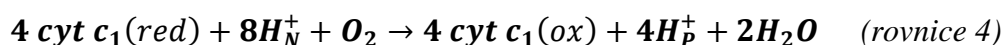
Komplex III, také nazýván jako cytochrom bc_1 komplex, či cytochrom c oxidoreduktáza přenáší pár elektronů z ubichinolu (QH_2) na cytochrom c , a současně čerpá další čtyři protony do mezimembránového prostoru (*rovnice 3*). Takzvaný Q cyklus přepíná mezi přenášením dvou elektronů na ubichinonu a jednoelektronovými nosiči, cytochromy b_{562} , b_{566} , c_1 , c a vysvětluje stechiometrii čtyř protonů vyměněných za jeden pár elektronů. I když přesun elektronů přes tento segment dýchacího řetězce je složitý, finální efekt převodu je jednoduchý: QH_2 je oxidován na Q a dvě molekuly cytochromu c jsou redukovány ^(11; 15).

Cytochrom c je velmi malý protein s navázanou hemovou skupinou rozpustný ve vodě. Nachází se v mezimembránovém prostoru, volně navázán na vnější stranu vnitřní mitochondriální membrány. Po přijetí jednoho elektronu z komplexu III hemem se cytochrom c přesouvá na komplex IV předat elektron binukleárnímu centru s atomy mědi ^(11; 13).



Komplex IV neboli cytochrom c oxidáza katalyzuje oxidaci cytochromu c, tedy přenáší elektron z cytochromu c na molekulární kyslík, následně redukovaný na dvě molekuly H₂O. Další dva protony jsou čerpány do inter-membránového prostoru. Jedná se o velký enzym, složený ze 13 podjednotek, uložený na vnitřní mitochondriální membráně. Mitochondriální podjednotka II obsahuje dva měděné ionty v komplexu s -SH skupinami dvou cysteinových zbytků, tvořící binukleární centra (Cu_A), které se podobají Fe-S centrům železo-sirných proteinů. Podjednotka I obsahuje dvě hemové skupiny nazvány *a* a *a*₃, a další ionty mědi (Cu_B). Hem *a*₃ a Cu_B tvoří sekundární binukleární centrum, které přijímá elektrony z hemu *a* a přenáší je na O₂ vázáný na hem *a*₃. Podjednotka čtyři je podjednotka regulační. Za hypoxických podmínek přepne z izoformy 1 do druhé izoformy, což umožňuje regulaci optimální aktivity cytochrom c oxidázy ^(11; 16).

Přenos elektronu napříč komplexem IV je veden z cytochromu c na Cu_A centrum, na hemovou jednotku *a*, na centrum *a*₃-Cu_B a konečně na kyslík. Za každé čtyři elektrony prošlé skrz tento komplex spotřebuje enzym čtyři H⁺ z matrix na přeměnu O₂ na dvě molekuly H₂O (rovnice 4) ^(11; 16).



Finální krok oxidativní fosforylace je katalyzován ATPázou, která se někdy řadí mezi komplexy a je tedy **komplexem V**. ATPáza využívá protonového gradientu přes vnitřní mitochondriální membránu k řízení produkce ATP z ADP a anorganického fosfátu ⁽⁴⁾. V membráně je komplex proteinů F₀, který funguje jako protonový kanál, a ten je propojen s komplexem F₁ vyčnívajícím do cytoplazmy. Celý komplex F₁ se skládá z 9 proteinů. Samotná hlavička je složena ze tří dimerů α β, ostatní podjednotky jsou ve spojovací části – stonku. ADP a fosfát, resp. ATP, se vážou na protein β. Celá syntéza ATP probíhá ve třech krocích – O, L, T. Konformace O (open) je prázdná, L (loose) váže ADP a fosfát a T (tight) váže ATP. Současně všechny tři dimery αβ kooperují. Jsou-li jednotkou F₀ vpuštěny protony (po spádu svého protonového gradientu), lze jejich energii zachytit a využít ji v komplexu F₁ k syntéze ATP. Vazba ADP a fosfátu na konformaci O, znamená přechod do konformace L, přičemž sousední podjednotka přejde z L do T a dalším uvolněním molekuly ATP z T do O. Malá molekula ATP tak už není vázána na membránu a může v buňce snadno difundovat tam, kde je jí třeba ⁽¹⁷⁾.

2. Mitochondriální toxiny

2.1 Inhibice glykolýzy

Výzkum v oblasti chemoterapie rakoviny je zaměřen na využití biochemických rozdílů mezi nádorovými buňkami a metabolismem nezměněných buněk ⁽¹⁸⁾. Jednou ze zásadních změn, která se vyskytuje u většiny maligních rakovinných buněk, je posun v energetickém metabolismu výroby ATP z oxidativní fosforylace na aerobní glykolýzu ATP (tj. Warburg efekt) ⁽¹⁹⁾. Vzhledem k tomu, že generace ATP prostřednictvím glykolýzy je mnohem méně účinná (dvě molekuly ATP na 1 molekulu glukózy), než přes oxidativní fosforylaci (36 molekul ATP na 1 molekulu glukózy), rakovinné buňky spotřebují mnohem více glukózy než normální buňky s cílem zachovat dostatečný přísun ATP pro jejich aktivní metabolismus a proliferaci. Udržení takové vysoké úrovně glykolytické aktivity je nezbytné pro přežití a růst rakovinné buňky. Tato metabolická funkce vedla k hypotéze, že inhibice glykolýzy může vést ke snížení generace ATP v rakovinných buňkách, a tím následně ke zničení nádorových buněk ⁽²⁰⁾. Když je glykolýza inhibována v normálních buňkách, neporušená mitochondrie umožní využít alternativních energetických zdrojů, například mastných kyselin a aminokyselin pro výrobu metabolických meziproduktů odváděných do Krebsova cyklu pro produkci ATP. A proto se očekávalo, že buňky s normálními mitochondriemi budou méně citlivé na látky, které inhibují glykolýzu. Studie poté poskytly důkazy, že inhibice glykolýzy může působit přednostně na buňky s poruchou mitochondriální funkce ^(20; 21).

Některé látky, které specificky inhibují metabolismus glykolýzy, byly použity jako účinná protirakovinová činidla v buněčných systémech a na zvířecích modelech ⁽²²⁾.

Jedním z nejčastěji používaných anti-glykolytických činidel je 2-deoxy-D-glukóza (2-DG), která je fosforylována hexokinázou a následně inhibuje ATP generovaný prostřednictvím glykolýzy ⁽²³⁾. Nedávná strategie "hypersenzitivovat" nádorové buňky zahrnuje kombinované použití mitochondriálních inhibitorů (oligomycin a antimycin) s 2-DG ⁽²⁴⁾. Duální zacílení mitochondriálních a glykolytických drah bylo navrženo jako slibná chemoterapeutická strategie ⁽²⁵⁾. Tabulka 2 uvádí několik sloučenin, které inhibují glykolýzu, nebo potlačují pentózový cyklus. Jejich mechanismy působení a terapeutický potenciál jsou popsány níže ⁽²³⁾.

Tabulka 2: Účinné látky, zasahující do glykolýzy (upraveno dle ⁽²³⁾)

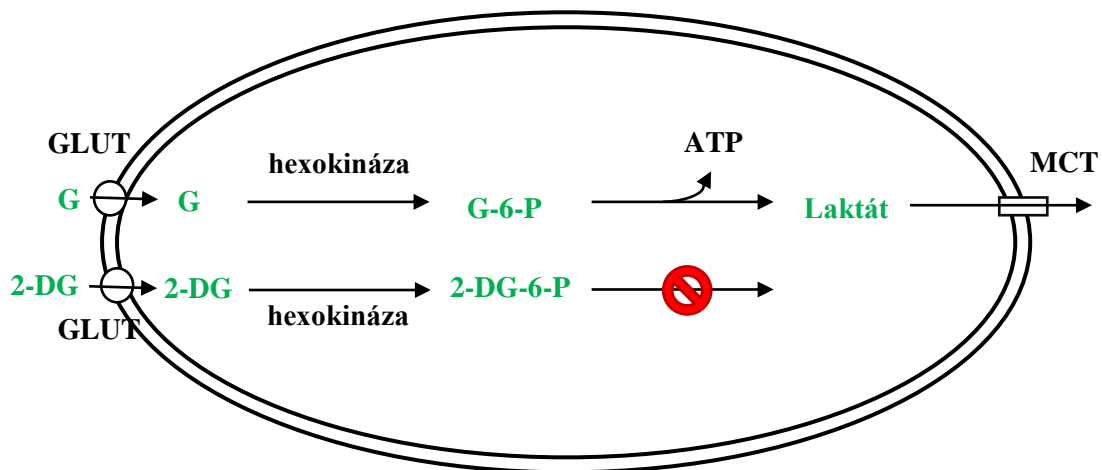
Sloučenina	Mechanismus účinku
2-deoxyglukóza	Inhibuje fosforylaci glukózy hexokinázou
Lonidamin	Inhibuje glykolýzu a mitochondriální respiraci
	Inhibuje HK; odloučí HK z mitochondrie
3-bromopyruvát	Inhibuje HK; působí jako alkylační činidlo
Imatinib	Inhibuje BCR-ABL tyrozinkinázu; snížení činnosti HK a G6PD
Oxythiamin	Potlačuje PPP inhibicí transketolázy; inhibuje pyruvátdehydrogenasu

Pozn.: HK = hexokináza; G6PD = glukóza-6-fosfátdehydrogenáza; PPP = pentózový cyklus (pentose phosphate pathway)

2.1.1 2-deoxyglukóza

Tato sloučenina je analog glukózy a již dlouho je známo, že působí jako kompetitivní inhibitor metabolismu glukózy ⁽²⁶⁾. HK fosforyluje 2-deoxyglukózu na 2-deoxyglukóza-6-fosfát. Nicméně na rozdíl od G-6-P, 2-deoxyglukóza-6-fosfát není dále zpracováván glukóza-6-fosfát-izomerázou, která převádí G-6-P na fruktóza-6-fosfát (*obr. 6*). Fosforylovaná 2-deoxyglukóza se hromadí v buňce a pomocí negativní zpětné vazby inhibuje hexokinázu. Jedná se tedy o kompetitivní inhibitor hexokináz. Snížení množství hexokinázy spojené s mitochondrií potvrzuje, že tato sloučenina má vliv na mitochondriální metabolismus glukózy ^(27; 28).

Ukázalo se, že buňky odolné na taxol či melphalan (tj. látky používané při léčbě karcinomů) nahromadí 2-deoxyglukózu-6-fosfát ve větší míře než buňky citlivé, z čehož vyplývá i vzrůst inhibice glykolýzy těchto buněk ⁽²⁷⁾.



Obr. 6: Vzhledem ke strukturální podobnosti s glukózou 2-deoxyglukóza vstupuje do buňky, což vede k přerušení glykolýzy a snížení produkce ATP a laktátu. (upraveno dle ⁽²⁹⁾)

G = glukóza; 2-DG = 2-deoxyglukóza; GLUT = glukózové transportéry;

MCT = monokarboxylové transportéry

2.1.2 Dichloracetát

Je mimetikum pyruvátu, které alostericky inhibuje pyruvátkinázu, a tím umožní průnik acetylkoenzymu A do Krebsova cyklu ⁽³⁰⁾. Terč inhibice dichloracetátu, pyruvátkináza (PDK), působí tak, že snižuje využití pyruvátu v mitochondriích prostřednictvím fosforylace E1 α podjednotky pyruvátdehydrogenázy (PDH). Inhibicí PDK se PDH udržuje v katalyticky aktivním stavu, mitochondriální spotřeba pyruvátu se zvyšuje, dostupná rezerva substrátu pro glykolýzu se sníží, a také produkce kyseliny mléčné je inhibována ⁽³¹⁾. Studie dále uvádějí, že dichloracetát (DCA) by mohl být schopen indukovat apoptózu v rakovinných, ale ne v normálních buňkách ⁽³²⁾. Výsledky však ukázaly, že DCA je relativně neaktivní, indukuje apoptózu pouze při vysokých koncentracích, a není karcinomselektivní ⁽³³⁾. Nicméně, u DCA bylo potvrzeno, že má zajímavé biologické vlastnosti, včetně možnosti způsobit kolaps mitochondriálního membránového potenciálu. Dále bylo potvrzeno zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku při léčbě dichloracetátem ⁽³²⁾. Byla také popsána korelace mezi zvýšenou synergií DCA a 2-DG a snížením hladiny buněk HCT116 komplexu IV elektronového transportního kanálu. 2-deoxyglukóza se účinně spojuje s DCA v protein p53 (-/-) suprimovaných buňkách HCT116, zatímco účinek je výrazně snížen u p21 (-/-), či v parentálních buňkách ⁽³³⁾.

2.1.3 Lonidamin

Lonidamin byl poprvé představen v roce 1979 jako antispermatogenní činidlo ⁽³⁴⁾. Tato sloučenina je derivát indazol-3-karboxylové kyseliny a je známo již dlouhou dobu, že inhibuje aerobní glykolýzu v nádorových buňkách. Lonidamin posiluje aerobní glykolýzu v normálních buňkách a potlačuje glykolýzu v rakovinných buňkách, pravděpodobně v důsledku inhibice mitochondriálně vázané hexokinázy ⁽³⁵⁾. Má omezený protinádorový účinek, ale má mimořádný potenciál při modulaci aktivity běžných chemoterapeutických činidel ⁽³⁶⁾. Důležitou vlastností LND je jeho selektivní aktivita proti širokému spektru nádorů a malý nebo žádný účinek na zdravé tkáně za předpokladu, že dávka je pod prahovou úrovní $\sim 400 \text{ mg/m}^2$ ⁽³⁷⁾. Účinnost lonidaminu je závislá na pH. Při normálním pH 7,4 byla inhibice spotřeby kyslíku 11-16 %, zatímco při snížené hodnotě pH 6,64 se inhibiční efekt lonidaminu dramaticky zvýšil na 60 % ⁽³⁸⁾. LND způsobuje podstatné zvýšení celkových hladin kyseliny mléčné v nádorových buňkách a většinu laktátu uvězní v cytosolu. To má za následek výrazný pokles intracelulárního pH, dochází zde také k mírnému poklesu extracelulárního pH, které je způsobeno únikem laktátu v malé míře přes monokarboxylové transportéry ⁽³⁹⁾.

Monokarboxyláty, jako je laktát, pyruvát a ketokyseliny hrají hlavní roli v metabolismu a musí být přenášeny přes membránu cytoplazmatickou a vnitřní a vnější mitochondriální membránu. K tomu slouží MCT a MPC. Z anglického „mitochondrial pyruvate carrier“ (MPC), neboli mitochondriální přenašeč pyruvátu, jsou proteiny, které transportují pyruvát do mitochondrie. MCT, monokarboxylové transportéry, jsou skupina proteinů podílejících se na transportu monokarboxylových kyselin, jako kyseliny mléčné a kyseliny pyrohroznové, přes buněčné membrány. Bylo prokázáno, že lonidamin inhibuje MCT a zároveň může inhibovat MPC. Tím blokuje oxidaci pyruvátu. MCT jsou slibné cíle léků pro chemoterapii. Mohou se také podílet na příjmu léků ze střeva a následné přepravě přes hematoencefalickou bariéru ^(40; 41).

2.2 Inhibice oxidativní fosforylace

Oxidativní fosforylaci je možné inhibovat řadou látek, které zasahují do různých kroků celého procesu (*tab.3*). Tyto inhibitory významně pomohly při studiu dýchacího řetězce. Rotenon a amytal blokují přenos elektronů na komplexu I, kde inhibují oxidaci NADH. Antimycin A inhibuje funkci komplexu III. Dalším příkladem je toxický oxid uhelnatý. Jeho toxicita spočívá v tom, že se váže na dvojmocné železo v hemu a₃. Dále kyanidy a azid jsou prudce jedovaté, protože se vážou v cytochromoxidáze (komplexu IV) na hemové trojmocné železo. Všechny tyto látky inhibují tvorbu protonového gradientu a tedy zastavují syntézu ATP nepřímo. Ale ATP-syntázu lze inhibovat i přímo. Příkladem mohou být látky oligomycin a dicyklohexylkarbodiimid (DCCD), které brání v průchodu protonů komplexem V, tím zastavují syntézu ATP a také přenos elektronů v dýchacím řetězci.

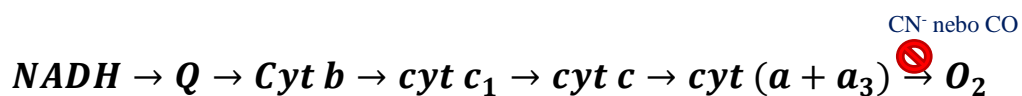
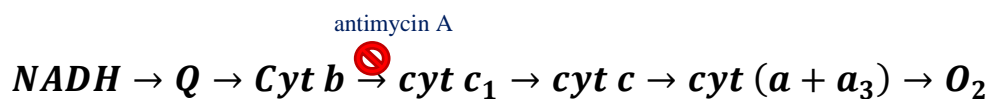
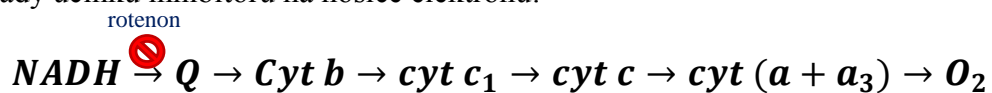
Mezi další inhibitory je možné zařadit tzv. rozpojovače neboli ionofory. Svůj název – rozpojovače získaly proto, že vzhledem ke své hydrofobní povaze zprostředkují prostup protonů z mezimembránového prostoru do matrix. Tímto dojde ke zkratu mitochondriální protonové baterie a mitochondrie ztrácí energii pro syntézu ATP v komplexu V. Je zrušen protonový gradient, avšak přenos elektronů v dýchacím řetězci běží neporušen. Vzhledem k těmto faktorům se energie z oxidoredukčních reakcí mění především na teplo. Příkladem syntetických odpojovačů je dinitrofenol, který prochází lipidovou dvojrstvou v neutrálním i disociovaném stavu. Přirozené rozpojovače (UCP = UnCoupling Proteins) nalézáme ve vnitřní mitochondriální membráně. Příkladem je takzvaný termogenin. Tento proteinový kanál pro protony je aktivován mastnými kyselinami uvolněnými z TAG následkem hormonálního signálu. Popsané odpojení dýchacího řetězce od syntézy ATP se využívá ve tkáních, které jsou zdrojem tepla u zvířat adaptovaných na chlad, a při zimním spánku. Analogem u lidských novorozenců je podkožní hnědá tuková tkáň na zádech mezi lopatkami. Buňky těchto tkání, hnědé adipocyty, obsahují velký počet mitochondrií ⁽³⁾.

Tabulka 3: Látky zasahující do oxidativní fosforylace (upraveno dle ⁽¹¹⁾)

Typ zásahu	Sloučenina	Zacílení/způsob působení
Inhibice přenosu elektronu	Kyanid	inhibuje cytochromoxidázu
	Oxid uhelnatý	
	Antimycin A	blokuje přenos elektronu z cytochromu b k cytochromu c ₁
	Myxothiazol	
	Rotenon	zabraňuje přenosu elektronu ze Fe-S centra na ubichinon
	Amytal (amobarbital)	
Piericidin A		
Inhibice syntézy ATP	Aurovertin	inhibuje F ₁
	Oligomycin	inhibuje F ₀
	Venturicidin	
	DCCD	blokuje tok protonů přes F ₀
Rozpojovací proteiny	FCCP	hydrofobní protonové nosiče
	DNP	
	Valinomycin	draselný ionofor
	Termogenin	v hnědé tukové tkáni vytváří póry vedoucí protony do vnitřní mitochondriální membrány
	Atraktylosid	
Inhibice přeměny ATP na ADP	Atraktylosid	inhibuje adenin nukleotid translokázu

Pozn.: DCCD = dicyklohexylkarbodiimid; FCCP = sukcinát sodný; DNP = 2,4 dinitrofenol

Příklady účinku inhibitorů na nosiče elektronů:



2.2.1 Inhibitory komplexu I

V podstatě lze říci, že struktura účinných (i přirozených) inhibitorů komplexu I má modulární podobnost s ubiquinonem - cyklická "hlava", která odpovídá ubiquinonovému kroužku a hydrofobní "ocas". Vzhledem k výše uvedenému navrhl Mauro Degli Esposti ⁽⁴²⁾ funkční klasifikaci inhibitorů komplexu I do tří základních typů, které zasahují do základních kroků redukce koenzymu Q (*tab.4*). S těmito třemi typy inhibitorů jsou spojeny různé chemické determinanty.

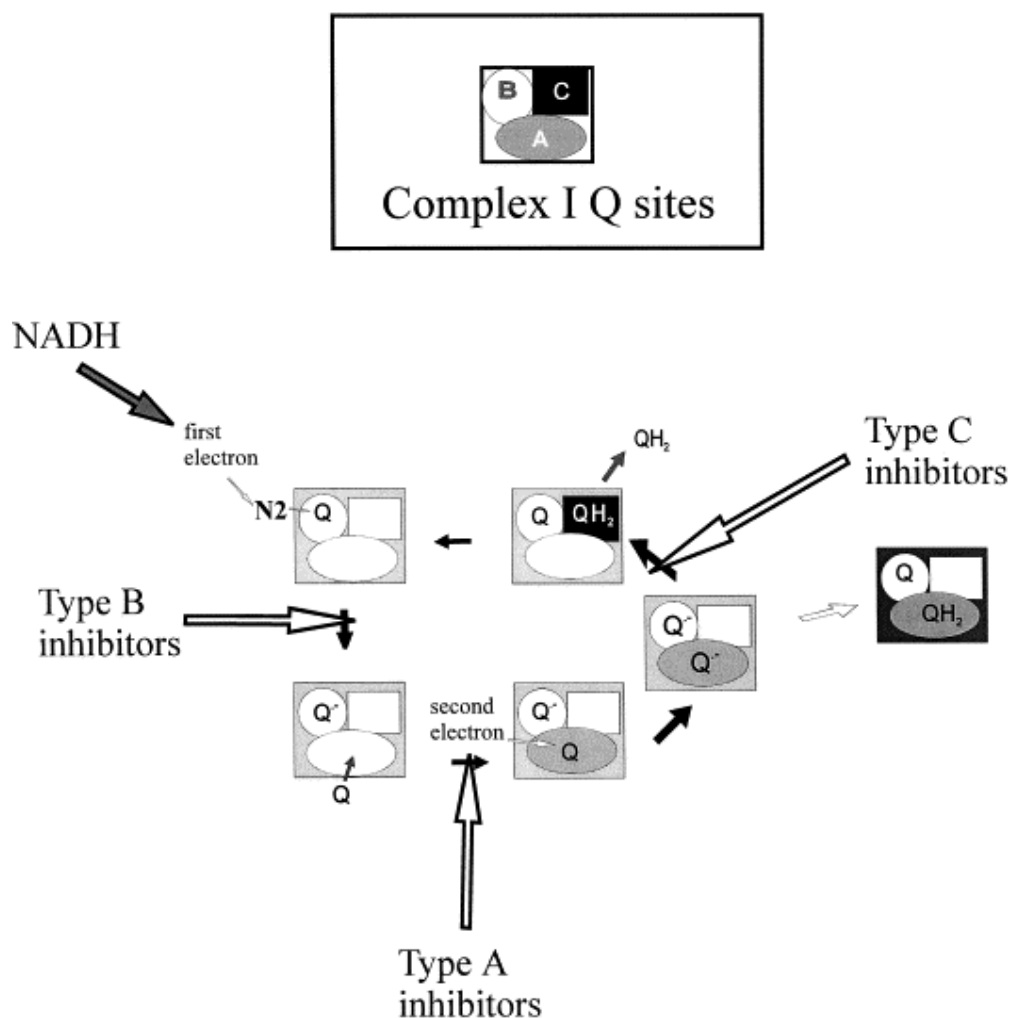
Inhibitory typu A mají hydroxylovou skupinu jak v cyklické hlavě, tak hydrofobním ocasu. Naopak inhibitory typu B mají pouze vodíkovazebné akceptory v hlavě a žádné hydroxylové skupiny v ocasu. Inhibitory typu C mají hydroxyskupinu nebo aminoskupinu v hlavě. Nicméně hydrofilní místo komplexu I, na kterém mají látky interagovat, má poměrně slabou specifitu pro rozpoznávání chemicky odlišné sloučeniny a může tak přijímat látky, které se vážou s větší afinitou k jiným místům v komplexu I ⁽⁴²⁾.

Tabulka 4: Funkční klasifikace inhibitorů komplexu I (upraveno dle ⁽⁴²⁾)

Typ A	Antagonisté chinonu	Piericidin A
Typ B	Antagonisté semichinonu	Rotenon Piericidin A Amytal
Typ C	Antagonisté chinolu	Myxothiazol

Mechanismus účinku jednotlivých typů inhibitorů (A, B a C) je znázorněn na obrázku (*obr. 7*). Inhibitory typu A reagují v místě A znázorněném na obrázku, stejně tak inhibitory typu B reagují v místě B atd. První elektron z NADH redukuje koenzym Q v místě B prostřednictvím oxidoredukční reakce klastru N2, což je Fe-S centrum propojující NADH dehydrogenázové a membránové části komplexu I. Vytvoří se stabilizovaná molekula ubisemichinonu ($\bullet Q^-$), který odpovídá rotenon-senzitivnímu radikálu a způsobuje separaci náboje. Druhý elektron z NADH je přenesen prostřednictvím nízkonapěťových kofaktorů k jiné molekule ubiquinonu (Q), která vstupuje do komplexu na hydrofobním místě A a aktivuje čerpání protonů. Na tomto místě působí proti inhibitory typu A. Druhý semichinon, vytvořený na místě A, pak spolu se stabilnějším semichinonem v místě B vytváří disproportionační reakci ubiquinolový

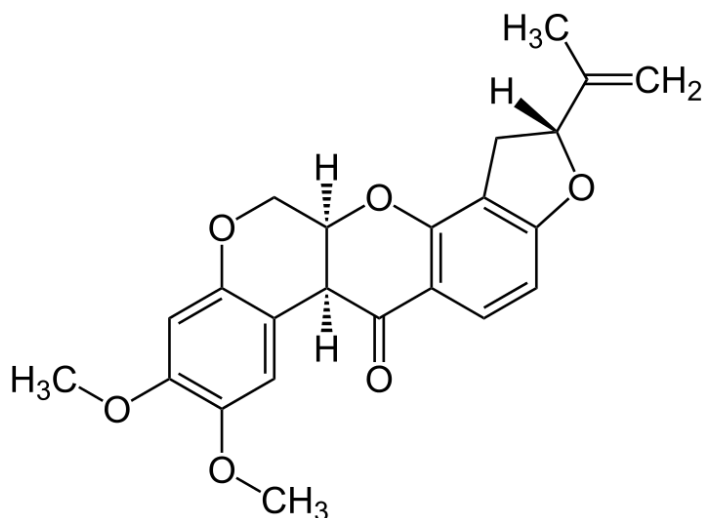
produkt (QH_2), který opouští komplex. Oxidovaný koenzym Q zůstává na místě B, aby po disproporcionaci znovu zahájil katalytický cyklus. Tato disproporcionace obou semichinonů je kritickým krokem pro správnou činnost komplexu I. Jak je znázorněno bílou šipkou vpravo na obr. 7, nestabilní analoga mohou původní reakci odchýlit od normální trasy a produkovat chinolin na „špatném“ místě. Předpokládá se, že inhibitory typu C tuto neproduktivní formu enzymu převedou do stabilního stavu. Aby se tak stalo, mohou buď interagovat přímo s místem uvolňujícím chinol, nebo interferovat s disproporcionací reakcí semichinonů v místech A a B. Předpokládá se, že disproporcionací reakce dvou semichinonů je také spojena se separací náboje přes membránu a její destabilizace může zvýšit produkci kyslíkových radikálů (42; 43).



Obr. 7: Princip působení tří základních typů inhibitorů NADH-Q reduktázy (42)

2.2.1.1 Rotenon

Rotenon je jednou z nejstarších sloučenin u rostlin v přírodě se běžně vyskytujících, jako je například kožnatec (*Derris*), koželusk (*Tephrosia*) či druhy *Mundulea*. Jeho chemická struktura je uvedena na obrázku (*obr. 8*). Rotenon je přítomen ve formě bezbarvých krystalů a snadno se oxiduje světlem na krystaly žluté, oranžové až tmavě červené.



Obr. 8: Strukturní vzorec rotenonu ⁽⁴⁴⁾

Rotenon se používá po celém světě, protože má široké spektrum insekticidních, akaricidních a piscicidních vlastností (další pesticidy jsou uvedené v tabulce 5). Vzhledem k tomu, že je výrazně lipofilní, prochází přes biologické membrány velmi snadno a nezávisle na transportérech. Během posledních desetiletí získal rotenon obrovskou pozornost vědců. Začal být používán jako experimentální látka pro vyvolání mitochondriální dysfunkce a pro navození Parkinsonovy choroby ve zvířecích modelech. ⁽⁴⁵⁾ Rotenon může díky své povaze procházet přes buněčnou membránu a vnější mitochondriální membránu, následně snižuje membránový potenciál mitochondrie a inhibuje aktivitu mitochondriálního komplexu I ⁽⁴⁶⁾. Biochemicky je rotenon jedním z nejsilnějších inhibitorů NADH dehydrogenázy působící na Fe-S proteiny. Inhibuje transport elektronů mezi NADH a ubichinonem a to vede k uvolnění ROS a cytochromu c z mitochondrií do cytoplazmy, kde indukují oxidační stres a apoptické kaskády. Rotenon je tedy schopný vyvolat buněčnou smrt různých buněk ⁽⁴⁷⁾.

Tabulka 5: (upraveno dle ⁽⁴⁸⁾)

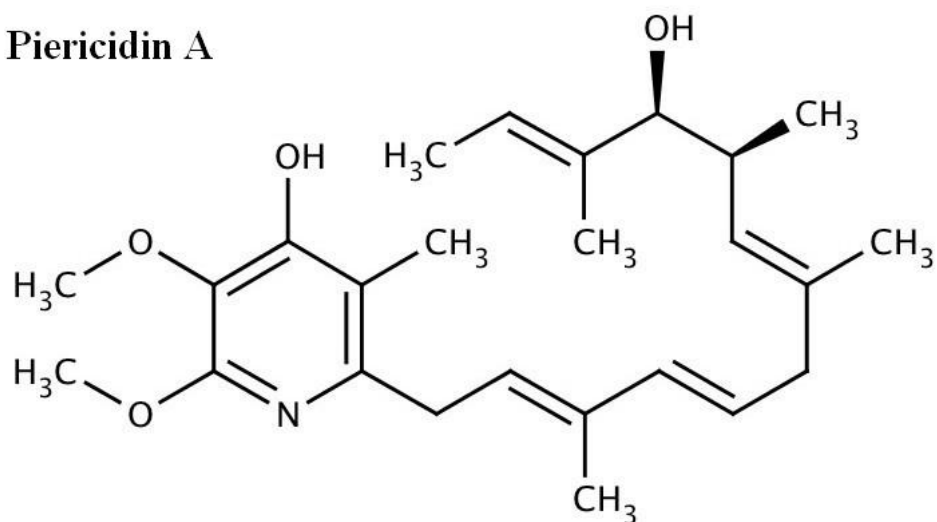
Další pesticidy známé jako inhibitory komplexu I
Benzimidazol
Bullatacin
6-Chlorobenzothiadiazol
Cyhalothrin
Fenazaquin
Fenpyroxymát
Pyridaben
Pyrimidifen
Sandoz 547A
Tebufenpyrad
Thiangazol

2.2.1.2 Piericidin A

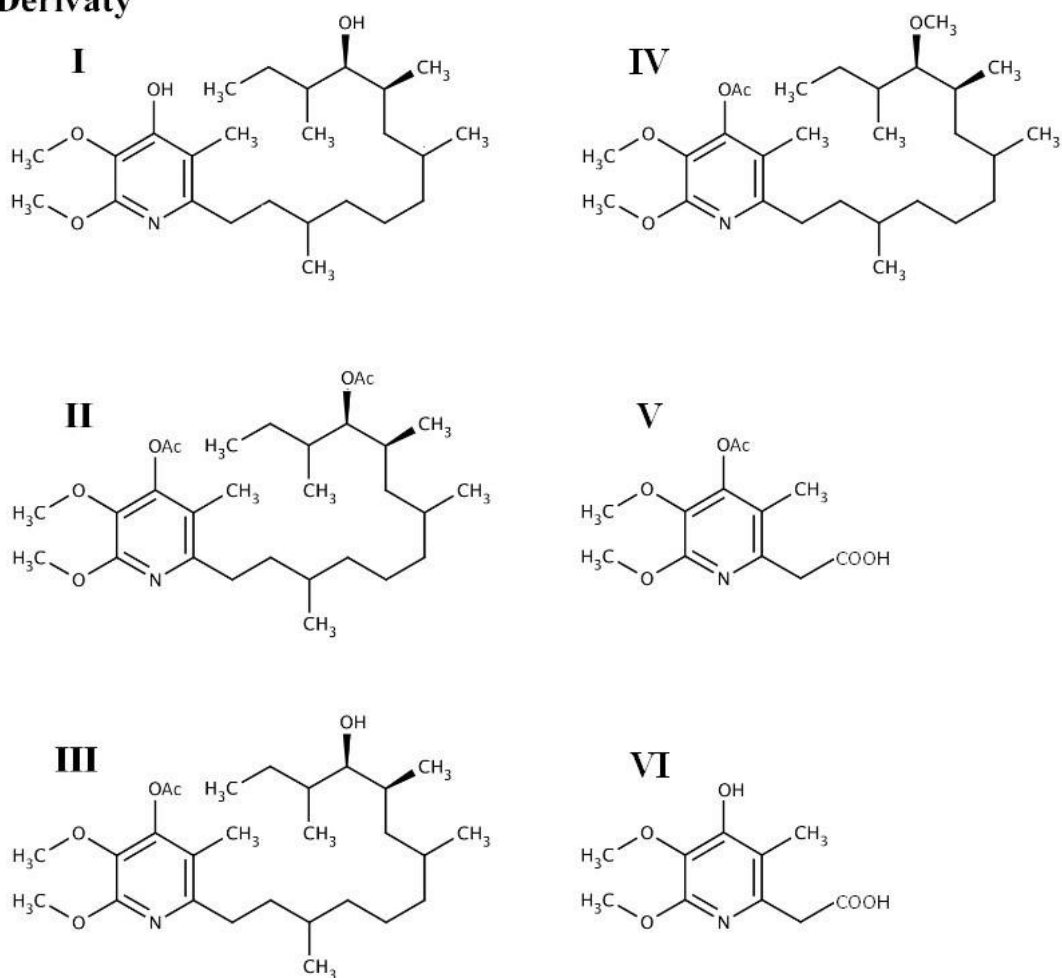
Piericidin A je látka, která byla izolována ze *Streptomyces mobaraensis* a byla prokázána její insekticidní vlastnost. Její insekticidní a jiné smrtící efekty jsou založeny na inhibici funkce mitochondrií. Působí jako inhibitor mitochondriálního elektronového transportu. Organická strukturní podobnost mezi piericidinem A a koenzymem Q původně nasvědčovala, že piericidin by mohl působit jako kompetitivní inhibitor koenzymu Q, což se potvrdilo. Bylo zjištěno, že inhibovat je možné oxidaci jak NADH, tak sukcinátu, avšak NADH systém (komplex I) je mnohem citlivější na inhibici piericidinem, než sukcinátový systém (komplex II) ^(42; 49).

Jak bylo řečeno, Piericidin A je účinným inhibitorem NADH dehydrogenázy. K úplné inhibici dochází při koncentraci 0,036 $\mu\text{mol/mg}$ mitochondriálního proteinu a aktivitu inhibovaného systému se nepodařilo obnovit žádnými koenzymy Q_2 a Q_{10} , vitamíny $\text{K}_{2(10)}$, ani fosfolipidy jednotlivě, či v kombinaci. Pro zjištění významu strukturálních aspektů podstatných pro schopnost inhibice byly následně také zkoumány sloučeniny příbuzné piericidinu. Z derivátů prokazovala nejlepší inhibici sloučenina I (obr. 9), která se nejvíce podobá piericidinu A, zatímco ostatní sloučeniny na obr. 9 vykazovaly malou nebo žádnou inhibici i při velmi vysokých koncentracích ⁽⁴⁹⁾. Dokonce se hydrogenovaná sloučenina I zdá být lepším inhibitorem než je samotný piericidin. K inhibici totiž dochází ještě při nižší koncentraci.

Piericidin A



Deriváty



Obr. 9: Strukturní vzorec piericidinu A a jeho derivátů (upraveno dle ⁽⁵⁰⁾)

Specifičnost inhibice piericidinem A je zcela jasná. Inhibiční účinek se odstraní acetylací hydroxylové skupiny na kruhu nebo nahrazením mastné kyseliny karboxylovou skupinou ⁽⁴⁹⁾.

2.2.1.3 Amytal

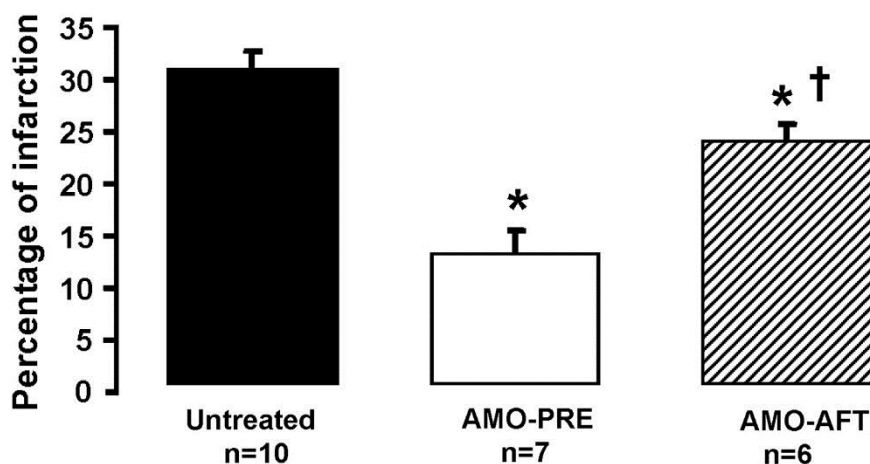
Amobarbital (Amytal) je krátkodobě působící anestetikum čili barbiturát tlumící centrální nervový systém. Amobarbital se váže na albumin. Inhibuje komplex I mezi flavoproteinem a ubichinonem podobně jako rotenon, avšak inhibice amytalem je vratná ⁽⁴²⁾. Komplexy I a III v mitochondrii jsou hlavním místem generace $O_2^{\cdot-}$ při oxidaci substrátů komplexu I. Blokování komplexu I během ischemie snižuje proud elektronů do komplexu III a následně snižuje množství vznikajících $O_2^{\cdot-}$ a chrání mitochondrie před ischemickým poškozením ⁽⁵¹⁾. Ischemické poškození určuje úroveň poškození myokardu během obnovení perfuze krví, tedy při tzv. reperfuzi. Studie zjistily, že reverzibilní inhibice transportu elektronů v průběhu ischemie chrání mitochondrie a snižuje poškození myokardu v průběhu reperfuze ⁽⁵²⁾.

Studie Sarah Stewartové z roku 2009 ⁽⁵³⁾ zaměřená na ochranu mitochondrií během ischemie nebo reperfuze prokazovala význam podání amobarbitalu v závislosti na čase, tedy před nebo po ischemii. Sledovány byly celkem tři skupiny zvířat (*tab.6*). První s neošetřeným srdcem, druhá při podání amobarbitalu během časné reperfuze a třetí při podání amobarbitalu před ischemií. V prvním případě po 25 minutách globální ischemie následovalo 120 minut reperfuze. Podruhé při podání amobarbitalu (2,5 mmol/l) po dobu jedné minuty před globální ischemií trvající 25 minut, dále následovalo 120 minut neošetřené reperfuze. V třetím případě byl amobarbital (2,5 mmol/l) podáván po dobu 5 minut ihned po 25 minutách globální ischemie a následovalo 115 minut neošetřené reperfuze. V neošetřeném srdci potkana vedlo 25 minut ischemie a 120 minut reperfuze k infarktu přibližně na 30 % levé komory. Amobarbital podaný během časné reperfuze v porovnání s neošetřeným srdcem infarkt zmírnil. Avšak rozsah snížení infarktu v srdcích léčených amobarbitalem během reperfuze byl nižší, než v případě ošetření amobarbitalem před ischemií (*obr. 10*).

Tabulka 6: Časový průběh ischemie a reperfuze (upraveno dle ⁽⁵³⁾)

Neléčené srdce:	<i>ekvilibrace</i> (15 min) → <i>ischémie</i> (25 min) → <i>reperfuze</i> (120 min)
AMO před isch:	<i>ekvilibrace</i> (15 min) → AMO (1 min) → <i>ischémie</i> (25 min) → <i>reperfuze</i> (120 min)
AMO po isch:	<i>ekvilibrace</i> (15 min) → <i>ischémie</i> (25 min) → AMO (5 min) → <i>reperfuze</i> (115 min)

Pozn.: AMO = amobarbital



Obr. 10: Měření velikosti infarktu následkem ischemie a reperfuze. Amobarbital podán před ischemií (AMO-PRE) výrazně snížil rozsah infarktu myokardu. Amobarbital podáván během časně reperfuze (AMO-AFT) také snížil rozsah infarktu myokardu v porovnání s variantou neléčeného srdce ⁽⁵³⁾.

Zjištění naznačuje, že včasný zásah je klíčovým faktorem pro snížení poškození myokardu během reperfuze. Reverzibilní blokáda transportu elektronů před ischemií zlepšila funkci srdce v průběhu reperfuze. Diastolický tlak levé komory na konci ekvilibrace, tedy stavu rovnováhy, byl ve všech 3 variantách (neošetřené srdce, AMO-PRE a AMO-AFT) podobný. Během reperfuze se hodnota diastolického tlaku levé komory v neošetřených srdcích výrazně snížila. Podání amobarbitalu před ischemií výrazně zlepšilo klesající hodnotu tlaku, na rozdíl od podání pouze během časně reperfuze, kdy hodnota byla téměř identická hodnotě neošetřeného.

Ošetření amobarbitalem jako prevence poškození mitochondrie je optimálním ale zatím pouze teoretickým způsobem k záchraně myokardu ⁽⁵³⁾.

2.2.2 Inhibitory komplexu III

Mitochondriální komplex III se skládá z 11 podjednotek přítomných v dimerové formě, ve kterých tvoří podjednotky železo-sírných proteinů katalytické centrum. Komplex III má centrální úlohu v přenosu elektronů dýchacího řetězce z ubichinolu na cytochrom b, následovaný přenosem z koenzymu Q na cytochrom c. Elektrony jsou pak přeneseny do mitochondriálního komplexu IV a na molekulární kyslík. Komplex III má dvě centra: Q_i centrum redukující chinon, umístěné ve vnitřní membráně obrácené k mitochondriální matrix, a Q_o centrum pro oxidaci chinolu orientované k mezimembránovému prostoru ⁽⁵⁴⁾. Byly charakterizovány tři typy inhibitorů komplexu III (tab.7). 1) ty, které se zaměřují na místo oxidace ubichinolu v Q_o , nazývané inhibitory třídy P, 2) ty, které se váží na místo Q_i , tedy inhibitory třídy N, a 3) inhibitory třídy PN s afinitou k oběma místům. Třída P obsahuje dvě podskupiny, P_m (m jako „mobile“) a P_f (f jako „fixed“), které se odlišují jejich schopností vyvolat pohyblivou nebo pevnou konformaci železo-sírné bílkoviny. Příkladem inhibitorů první třídy je například myxothiazol nebo stigmatellin. Do druhé třídy patří například antimycin A ⁽⁵⁵⁾. Jinými slovy: první elektron v místě Q_i generuje relativně stabilní semichinon, který se redukuje na chinol druhým elektronem. Antimycin A přerušuje přenos druhého elektronu na místo Q_i , stigmatellin zabraňuje přenosu prvního elektronu na železo-sírný protein a myxothiazol zabraňuje vazbě chinolu na místo Q_o ⁽⁵⁶⁾.

Myxothiazol a stigmatellin jsou specifické zejména pro cytochrom bc_1 komplex, ale inhibují i komplex I kde oba inhibitory soutěží o společné místo v komplexu I, které interferuje s ubiquinolovým produktem ⁽⁴²⁾.

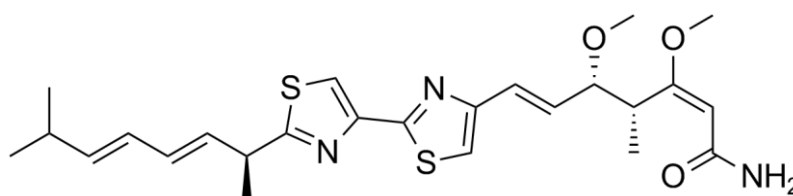
Tabulka 7: Funkční klasifikace inhibitorů komplexu III (upraveno dle ⁽⁵⁵⁾)

Třída P_m	Vazebné místo: Q_o	Myxothiazol
Třída P_f	Vazebné místo: Q_o	Stigmatellin
Třída N	Vazebné místo: Q_i	Antimycin A
Třída PN	Vazebné místo: Q_i i Q_o	NQNO

Pozn. *NQNO* = 2-n-nonyl-4-hydroxyquinoline N-oxide

2.2.2.1 Myxothiazol

Zdrojem silných mitochondriálních inhibitorů jsou myxobakterie. Konkrétně myxothiazol je antimykotikum produkované *Myxobacterium M. fulvus* a sestává z aktivní methoxyakrylamidové skupiny a charakteristické dithiazolové skupiny. Na rozdíl od jiných inhibitorů podobného typu je myxothiazol rozvětvený a toxofor nese amidovou funkční skupinu místo methylesterové skupiny (obr. 11).

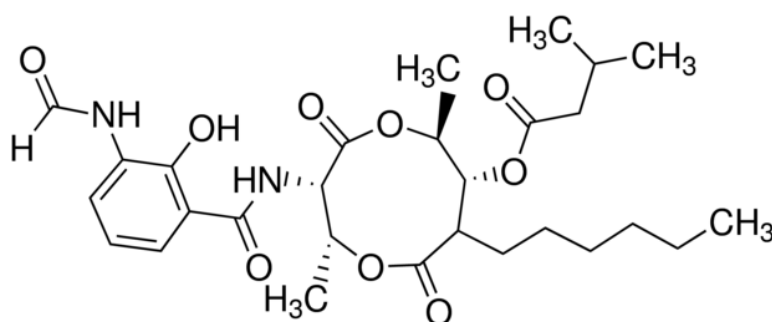


Obr. 11: Strukturální vzorec myxothiazolu ⁽⁵⁷⁾

Je známo, že původní vazebné místo myxothiazolu je v místě Q_o komplexu III ⁽⁵⁸⁾. Účinek myxothiazolu v místě Q_o způsobuje obstrukci místa Q_o, která vede k abnormálně zvýšené hladině tvorby superoxidů v komplexu III. Superoxid je první reaktivní forma kyslíku (ROS), která vzniká po inhibici místa Q_o mitochondriálního komplexu III s myxothiazolem. Superoxid může být převeden na jiné ROS, jako je peroxid vodíku, hydroxylové radikály a další ⁽⁵⁹⁾. Inhibiční účinek myxothiazolu byl zkoumán pomocí měření aktivity komplexu III u mitochondrií izolovaných z jater myši. U myši po expozici myxothiazolu se aktivita jaterního komplexu III snížila na 50 %. Zbývajících 50 % aktivity komplexu III po podání látky se však zdá být dostatečné pro udržení funkce respiračního řetězce. Podáním myxothiazolu u myši bylo dosaženo akutní a reverzibilní inhibice komplexu III, která po čtyřech dnech nezpůsobila žádné zjevné nežádoucí účinky. Tento biochemický *in vivo* model akutní inhibice respiračního řetězce by mohl být využit v budoucích studiích nových terapií zaměřených na mitochondrie ⁽⁶⁰⁾.

2.2.2.2 Antimycin A

Je toxická látka produkovaná několika druhy *Streptomyces*, zejména *S. griseus* a *S. Kitasawensis*. Používá se proti rané plísni rajčete, mykóze rýže způsobené *Magnaporthe grisea* a plísni sazenic ovsu. Antimyciny byly poprvé izolovány z bakterií rodu *Streptomyces* v roce 1949. Poté byla popsána izolace příbuzných antimycinů (směsi dvou úzce příbuzných isomerů). Třída je charakterizována přítomností karboxyfenolové amidové jednotky, devítičlenného cyklického bis-laktonu a dvou alkylových bočních řetězců s různou délkou uhlíku (obr. 12) ⁽⁶¹⁾.



Obr. 12: Strukturální vzorec antimycinu A ⁽⁶²⁾

Generace ROS hraje důležitou roli v mitochondriální dysfunkci a představuje předpokládané cíle pro tvorbu strategií proti stárnutí ⁽⁶³⁾. Antimycin A poškozuje mitochondrie v mnoha typech buněk tím, že brání transportu mitochondriálních elektronů ⁽⁶⁴⁾. V mitochondriích se antimycin A váže na místo Q_i, depolarizuje mitochondriální membránu a způsobuje únik superoxidových radikálů z mitochondrií. Produkce mitochondriálního ROS je úzce spojena s potenciálem mitochondriální membrány, takže hyperpolarizace zvyšuje a podporuje produkci ROS ⁽⁶⁵⁾. Analýza buněčného cyklu ukázala, že léčba antimycinem A významně indukovala blokování S fáze buněčného cyklu po dobu 72 hodin. Avšak v juxtaglomerulárních buňkách antimycin A nevyvolá žádné specifické zastavení buněčného cyklu. V buňkách rakoviny plic antimycin A blokuje G1 fázi buněčného cyklu a vyvolá apoptózu.

Také rozdílné úrovně odpovědi ROS na antimycin A v různých buněčných liniích naznačují, že specifita zastavení buněčného cyklu pomocí antimycinu A a kolísání hladin

ROS závisí na rozdílných typech buněk. Ačkoliv nelze jasně vysvětlit mechanismus těchto různých odpovědí u různých typů buněk, rozdíl v citlivosti u různých rakovinných buněčných linií je pravděpodobně způsoben různou bazální aktivitou mitochondrií v každé buněčné linii. Vzhledem ke svým účinkům na buňky rakoviny plic má antimycin A potenciál jako lék pro pacienty s karcinomem plic ⁽⁶⁴⁾.

Buňky léčené flavonoidy zabraňovaly produkci ROS vyvolané antimycinem A ⁽⁶⁶⁾. Sušený kořen *S. baicalensis* je bohatý na flavonoidy obsahující více než 30 různých druhů flavonoidů, například baicalein, baicalin a wogonin ⁽⁶⁷⁾.

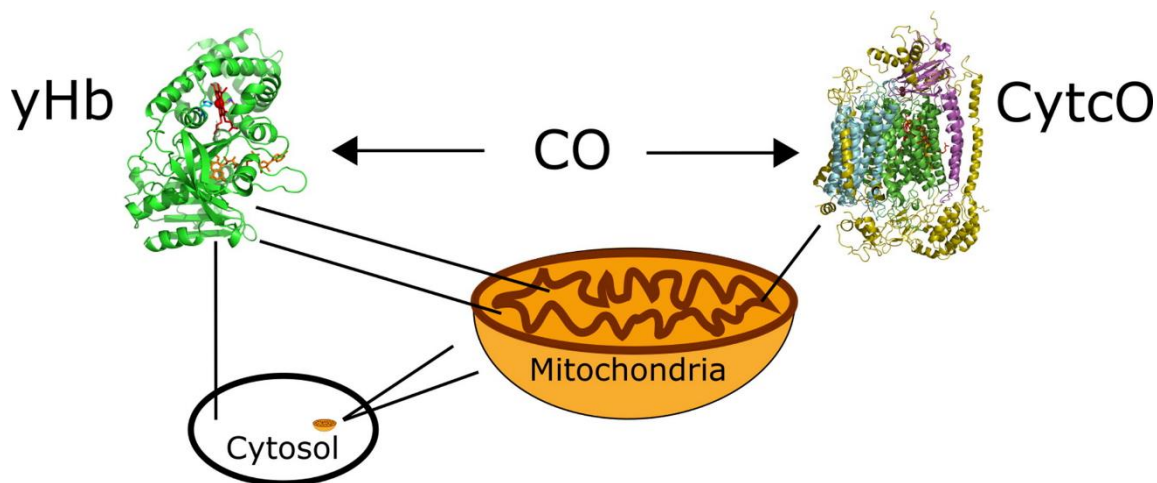
2.2.3 Inhibitory komplexu IV

2.2.3.1 Oxid uhelnatý

Oxid uhelnatý (CO) je bezbarvý, nedráždivý, ale vysoce toxický plyn bez chuti a bez zápachu a je vedlejším produktem neúplného spalování organických materiálů, hoření uhlí, produktem spotřebičů a systémů pro vytápění domácností a výfuku automobilů. Akutní otrava CO je nejčastějším typem otravy po celém světě a způsobuje mnoho úmrtí náhodou, sebevraždou nebo jinak ⁽⁶⁸⁾. Inhalovaný CO se váže hlavně na hemoglobin obsahující Fe²⁺, za vzniku karboxyhemoglobinu. CO má 200krát vyšší afinitu k hemoglobinu než kyslík, což způsobuje narušení dodávání kyslíku vedoucí k hypoxii tkání, oxidačnímu stresu a zánětu v krátkém období (hodiny nebo dny) po otravě CO ⁽⁶⁹⁾. Tak může CO způsobovat neurologické, cerebrovaskulární nebo kardiovaskulární poruchy, jako je ischemie, encefalopatie nebo poškození periferního nervu. Většina pacientů, kteří přežili, se může zcela zotavit, ale v některých případech se mohou vyskytnout dva neurologické syndromy: trvalé neurologické následky a zpožděné neurologické následky ⁽⁷⁰⁾. Zpožděné neurologické následky zahrnují zhoršený úsudek, špatnou koncentraci a paměť, kognitivní poruchy, změny osobnosti, psychózy, a dokonce i příznaky parkinsonismu. Bohužel mechanismy těchto následků u lidí a experimentálních zvířat zůstávají nejasné ⁽⁷¹⁾. Některé studie naznačují, že zpožděné neurologické následky mohou být výsledkem akutní cerebrální buněčné hypoxie indukované otravou CO, postischemickým reperfučním poškozením, poškozením volnými radikály, poškozením imunity a apoptózou ⁽⁷⁰⁾. Poškození volnými radikály má významnou roli při postischemickém reperfučním poškození

mozkových buněk po akutní otravě CO, protože vysoká koncentrace CO může být kombinována s mitochondriálním enzymovým komplexem IV, který způsobuje urychlení úniku elektronů mitochondriálního respiračního řetězce, což vede k nadměrné produkci ROS ⁽⁷²⁾.

Protonová pumpa komplexu IV řízená redox potenciálem je enzymatické zařízení respiračního řetězce, které přenáší elektrony z cytochromu c na molekulární kyslík a tím redukuje molekulární kyslík na vodu. Redukce kyslíku na vodu zahrnuje přenos čtyř protonů z matrix do mezimembránového prostoru mitochondrií ⁽⁷³⁾. Kinetické metody, které se používají ke zkoumání přenosu elektronů a protonů v komplexu IV, jsou často založeny na použití světla k disociaci malých ligandů jako je CO, čímž se iniciuje reakce. Data ukazují, že CO se váže na dva proteiny: komplex IV a flavohemoglobin (*obr. 13*). Ten byl již dříve prokázán, že se nachází jak v buněčném cytosolu, tak v mitochondriální matrix. Bylo zjištěno, že flavohemoglobin se nachází také v mezimembránovém prostoru a váže CO. Flavohemoglobin v mitochondriální matrix také váže CO, ale pouze po odstranění vnitřní membrány. V komplexu IV se neutrální CO silně váže pouze na hem ⁽⁷⁴⁾.



Obr. 13: Vazba CO v mitochondrii ⁽⁷⁴⁾
Cyt cO = cytochrom c oxidáza (komplex IV); yHb = flavohemoglobin

Studie Xiaodan Xua ⁽⁷⁵⁾ z roku 2017 se zabývala apoptózou indukovanou oxidem uhelnatým u krysích astrocytů a účinností ochranného přípravku Edaravone.

Astrocyty jsou nejrozšířenější typy gliových buněk v mozku a hrají zásadní roli v mechanismech obrany antioxidantů mozkové tkáně. Astrocyty také mohou poskytnout nutriční a metabolickou podporu neuronům a regulovat synaptickou aktivitu ⁽⁷⁶⁾. Vysoké množství exogenního CO způsobuje oxidační stres a mitochondriální dysfunkci, což vede k astrocytární apoptóze a poškození funkce astrocytu ⁽⁷⁷⁾. Proto inhibice astrocytární apoptózy může poskytnout ochranné účinky před neurodegenerativními poruchami po akutní otravě CO.

Edaravone je nový syntetický nízkomolekulární lék na zachytávání volných radikálů. Může chránit mozkovou tkáň před poškozením a zvýšit schopnost duševní práce díky své vysoké liposolubilitě a propustnosti skrz hematoencefalickou bariéru ⁽⁷⁸⁾.

Pro vlastní experiment byly kultivované astrocyty potkanů náhodně rozděleny do několika skupin – kontrolní skupiny, skupiny vystavené CO a Edaravonem léčené skupiny rozdělené podle koncentrací léku. Cytotoxicita CO byla stanovena za použití redukčního testu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazoliumbromidu (MTT). Hladiny apoptózy buněk, hladina ROS a mitochondriální membránový potenciál byly detekovány průtokovou cytometrií. Výsledky studie potvrdily, že cytotoxicita CO v Edaravonem léčených skupinách je nižší než u skupiny CO a klesá s koncentrací léčiva. Také hladiny apoptózy buněk těchto skupin byly všechny významně nižší než u skupiny CO. Mitochondriální membránový potenciál skupiny CO byl podstatně nižší než u kontrolní skupiny, což naznačuje, že depolarizace mitochondriální membrány se vyskytla u astrocytů ošetřených CO. V porovnání se skupinou CO byl mitochondriální membránový potenciál léčených skupin významně zvýšen a potenciál mitochondriální membrány se zvyšoval s koncentrací léku. Také hladina ROS v astrocytech po expozici CO byla výrazně vyšší než kontrolované astrocyty a prodloužená expozice CO indukovala velkou produkci ROS. Avšak po preinkubaci s různými koncentracemi Edaravonu byly hladiny ROS v astrocytech ošetřených CO po dobu 24 hodin sníženy.

V této studii výsledky testu MTT ukázaly, že cytotoxicita CO indukuje smrt astrocytů. CO může potlačit aktivitu sukcinátdehydrogenázy, která v kombinaci s vnitřní mitochondriální membránou ovlivňuje výsledky MTT testu. Studie také nepřímo ukazuje, že CO může poškodit funkce mitochondriálního respiračního řetězce inaktivací sukcinátdehydrogenázy a nakonec vést k smrti astrocytů. CO může indukovat poškození

mitochondriální membrány tím, že způsobí kolaps potenciálu mitochondriální membrány a generaci ROS. Předkládaná studie dokazuje, že Edaravone může účinně snížit poškození buněk způsobené dlouhodobou expozicí CO a má ochranný účinek na astrocyty. Tato látka se zdá být účinná při léčbě pacientů s akutní otravou CO a může být užitečná při prevenci a léčbě zpožděných neurologických následků ⁽⁷⁵⁾.

2.2.3.2 Kyanidy

Funkce cytochrom c oxidázy může být ovlivněna mnoha toxickými látkami z prostředí, jako jsou kyanid, azid, sulfid a CO ⁽⁷⁹⁾. Všechny tyto sloučeniny reagují přímo s komplexem IV, avšak různými mechanismy. Nejdůkladněji studovaným inhibitorem komplexu IV je kyanid (NaCN, KCN), který představuje největší potenciální riziko pro člověka v důsledku masivních aplikací v průmyslových technologiích ⁽⁸⁰⁾. Kyanid je jednoduchá toxická látka, která má mnohočetné účinky v intaktních biologických systémech, včetně inhibice oxidace, metabolismu (inhibice cytochrom c oxidázy), antioxidační obrany a změně kritické buněčné iontové homeostázy ⁽⁸¹⁾.

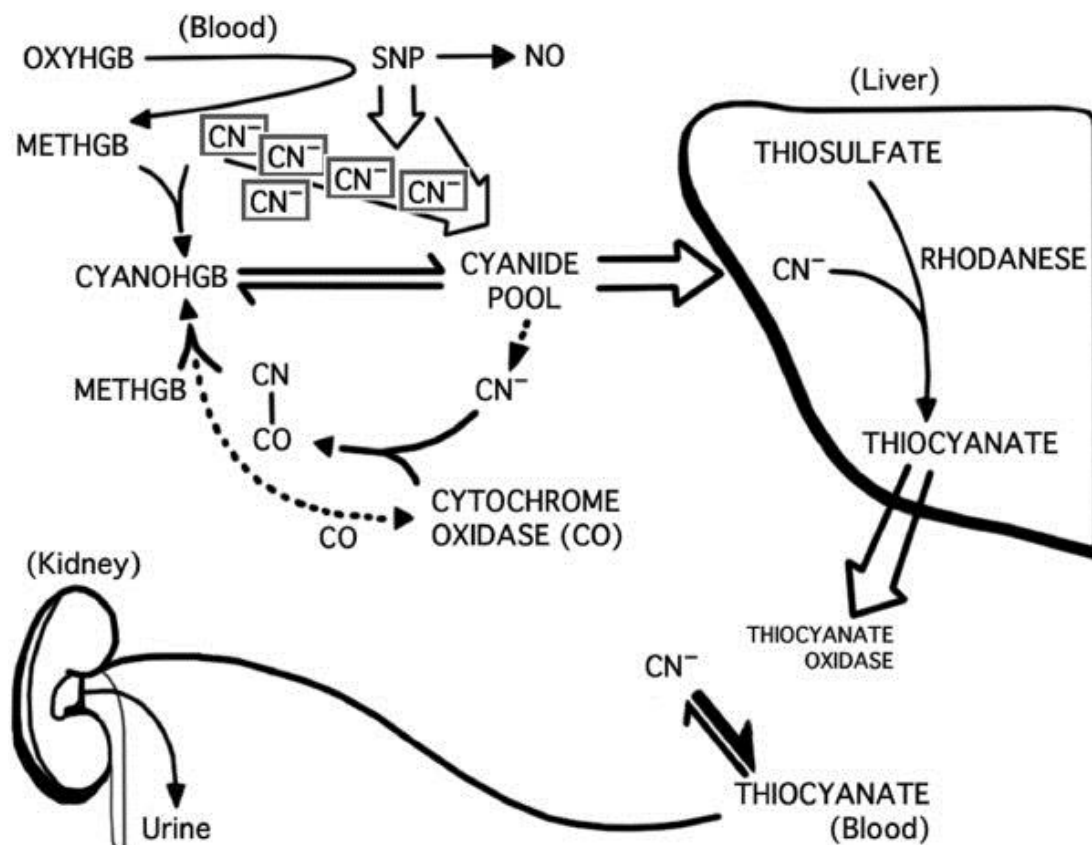
V dnešní době se lze otrávit kyanidem v plynné formě, která se uvolňuje při hoření některých plastů a polymerů užívaných ve stavebnictví a v průmyslu. Historicky byl kyanid součástí sloučeniny Cyklon B, který byl využíván při masovém vraždění Židů v plynových komorách. Kyanidové kapsle s tekutým kyanidem byly také využívány nacisty při sebevraždách na samém konci druhé světové války. Čistý kyanid bez dalších příměsí voní po hořkých mandlích ⁽⁸²⁾.

Mechanismus interakce KCN s cytochrom c oxidázou není jednoduchý a dodnes není zcela jasný. Katalytická aktivita cytochrom c oxidázy je kyanidem silně inhibována ⁽⁸³⁾. Tato inhibice byla označována jako reverzibilní, ačkoli existují některé sporné otázky a protiargumenty ⁽⁷⁹⁾. Avšak reverzibilita byla potvrzena v roce 2010 českými vědci, kteří zkoumali reverzibilitu kyanidové inhibice cytochrom c oxidázy promýváním mitochondrií. Čerstvě izolované neporušené mitochondrie byly inkubovány s 250 μ M KCN po dobu 10 minut a potom byly promyty dvakrát inkubačním médiem. Po promytí se rychlost buněčného dýchání vrátila do kontrolních hodnot. Další přidání KCN během měření bylo opět zcela inhibiční ⁽⁸⁰⁾.

Kyanid vyvolává rychlý nástup anoxie tím, že se váže na binukleární centrum hemu $a_3\text{-Cu}_B$ a inhibuje využití buněčného kyslíku a produkci ATP. Kvůli inhibici komplexu iniciuje kyanid kaskádu reakcí vedoucích k neurologickým a myokardiálním dysfunkcím až smrti, pokud není inhibice okamžitě zvrácena ⁽⁸⁴⁾. Kyanid se váže k plně oxidovanému binukleárnímu centru za podmínky, že do komplexu IV vstoupil nejméně jeden elektron. Proto je kyanid vůči kyslíku nekompetitivním inhibitorem cytochrom c oxidázy ⁽⁸⁵⁾. Afinita kyslíku ke cytochrom c oxidáze je drasticky snížena již při mikromolárních koncentracích KCN a to znamená, že otravy KCN jsou velmi nebezpečné již při velmi nízkých koncentracích ⁽⁸⁰⁾.

Kyanidové intoxikaci v živém organismu lze do jisté míry zabránit několika chemickými reakcemi, jako jsou interakce s methemoglobinem, thiokyanátem, dusitanem, nebo ketokyselinami ⁽⁸⁶⁾.

Různé látky indukující tvorbu methemoglobinu byly testovány jako antidota, protože bylo pozorováno, že kyanid přednostně interaguje s methemoglobinem (*obr. 14*). Při přeměně oxyhemoglobinu na methemoglobin jsou atomy železa v hemových skupinách oxidovány ze železnatého (2^+) oxidačního stavu na železitý (3^+) stav, kdy je využívána vysoká afinita mezi kyanidem a trojmocným železem. Tvorba methemoglobinu poskytuje velký cirkulující zdroj železitých iontů, který působí proti kritické reakci kyanidu s železitým iontem cytochrom oxidázy a_3 . Navzdory tomu, že vazebná afinita kyanidu k methemoglobinu je menší než u cytochrom c oxidázy, produkce velkého množství alternativního substrátu může tuto situaci do jisté míry neutralizovat, přičemž se významná část kyanidu spojuje za vzniku kyanmethemoglobinu. Tato sloučenina pomalu uvolňuje kyanid, který se postupně rozptýlí z červených krvinek do plazmy, kde jej lze lépe odbourat jaterním rhodanem a jinými enzymatickými systémy pro detoxikaci síry ⁽⁸⁶⁾.



Obr. 14: Odbourávání kyanidu ⁽⁸⁷⁾

SNP = nitroprusid sodný; CN⁻ = kyanid; NO = oxid dusnatý; METHHGB = methemoglobin; CYANOHGB = kyanohemoglobin; OXYHGB = oxyhemoglobin.

2.2.4 Inhibitory komplexu V

2.2.4.1 Oligomycin

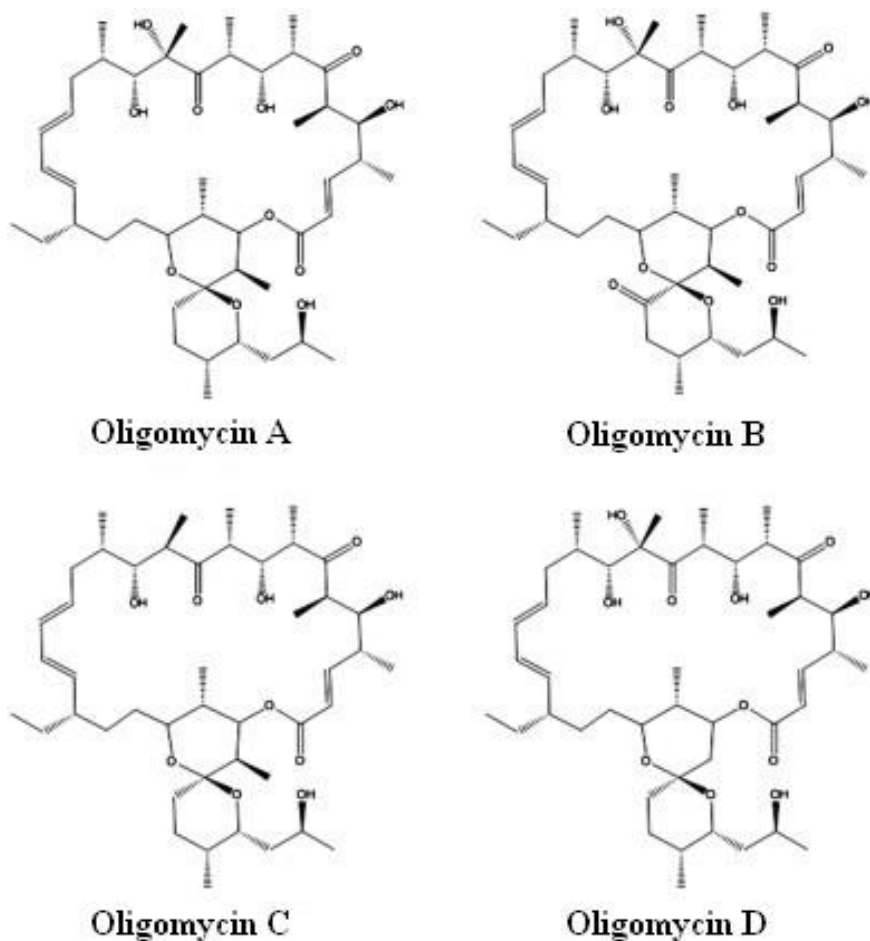
Antibiotikum oligomycin bylo poprvé identifikováno v roce 1953 v grampozitivní bakterii *Streptomyces diastatochromogenes* ⁽⁸⁸⁾. V následujících letech byly nalezeny oligomyciny v mnoha dalších streptomycetách. V současné době se termín oligomycin odvolává na skupinu blízké příbuzných molekulových druhů, jejichž základní struktura se skládá z makrocyclického laktonového kruhu ketidových jednotek. Nejčastější oligomycinové formy A, B a C se liší v některých vedlejších substituentech a všechny jsou inhibitory ATPáz ^(89; 90).

ATPáza může být zobrazena jako dvě shodné molekulární turbíny, které se mohou otáčet obousměrně v závislosti na podmínkách buňky. Otočení ve směru hodinových ručiček, při pohledu z membránové oblasti směrem k matrix, využívá transmembránový protonový gradient pro vytvoření ATP z ADP a fosfátu. Naopak otáčením proti směru hodinových ručiček se energie z hydrolýzy ATP používá k pumpování protonů přes membránu proti elektrochemickému gradientu. Dva rotory mají doplňkové úkoly: do membrány vložený komplex F_0 obsahuje protonový kanál a vyčnívající a hydrofilní F_1 hostí katalytickou funkci ⁽⁹¹⁾.

Vazebná místa pro oligomycin se nacházejí v intramembránové části F_0 . Oligomyciny specificky blokují protonovou vodivost přes F_0 , čímž inhibují jak syntézu ATP, tak hydrolýzu. Na druhou stranu, i když se F_1 oddělí od F_0 , tak v přítomnosti oligomycinu svou katalytickou funkci udržuje ^(90; 91). Brzy se oligomyciny ukázaly jako silné nástroje pro zkoumání struktury a funkce enzymového komplexu. Je zřejmé, že citlivost na oligomycin předpokládá správnou funkčnost F_1 a F_0 a ztráta citlivosti oligomycinu často zrcadlí oddělení F_1 od F_0 ⁽⁹²⁾.

Bylo zjištěno, že oligomycin se váže na F_0 v stechiometrii 1:1. Oligomycinová vazba závisí primárně na aminokyselinové sekvenci jednotlivých podjednotek ATPázy, které interagují s antibiotikem. Substituce v klíčových aminokyselinách, zejména v transmembránových doménách protonového kanálu F_0 , vedou ke změně citlivosti na oligomycin ⁽⁹³⁾. Navíc je třeba vzít v úvahu celou řadu faktorů, například modulátory citlivosti na oligomycin.

Oligomyciny obsahují 26členný kruh a mohou existovat v různých konformačních stavech a zahrnují tak různé možné interakce s proteiny. Účinnost inhibitoru je úzce spojena se strukturou (*obr. 15*), která řídí chemickou reaktivitu vzhledem k potenciálním skupinám ligandu v rámci F_0 . Ze strukturálních důvodů má oligomycin A méně stabilní interakce s enzymovou strukturou, zatímco oligomycin B je potenciálně nejvhodnější molekulou pro interakce s vazbami F_0 ⁽⁸⁹⁾. Bohužel většina oligomycinů je komerčně dostupná jako směs z důvodů vysokých nákladů na separaci těsně příbuzných sloučenin. Směs oligomerů A:B:C v poměru cca 75:10:8 tvoří takzvaný makrolidový antibiotický komplex ⁽⁹⁴⁾. Proto mohou být ve většině případů popsané účinky stěží přičítány jednotlivým molekulárním druhům. Při hledání části molekuly inhibitoru, která je nezbytná k blokování toku protonů přes F_0 , se zdá, že hlavní roli při interakcích s F_0 hraje makrocyclický laktonový kruh ⁽⁸⁹⁾. Oligomycin D je příbuzné antibiotikum známé také pod názvem Rutamycin.



Obr. 15: Strukturní vzorce oligomycinů⁽⁹⁵⁾

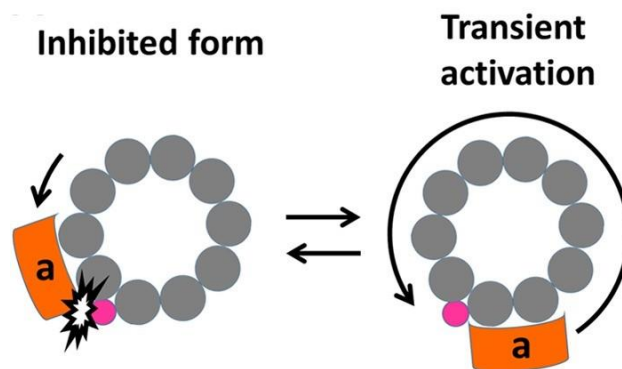
Oligomycin se jeví jako nástroj ke zkoumání nadměrné produkce superoxidů spojených s deficitem respiračního řetězce, který se navíc vztahuje k řadě onemocnění. Blokování ATP syntázy oligomycinem chrání proti ischemii a inhibuje růst nádoru⁽⁹⁶⁾. Oligomycin A a další inhibitory komplexu V, jako je například apoptolidin a ossamycin, jsou vysoce cytotoxické pro různé rakovinné buněčné linie. Jak ischemie, tak rakovina jsou spojeny s oxidačním poškozením. Na těchto základech je možné použití oligomycinu a příbuzných sloučenin k léčbě neinfekčních onemocnění nyní více než zajímavou perspektivou⁽⁹⁵⁾.

2.2.4.2 Dicyklohexylkarbodiimid

Jak bylo již uvedeno, tak hlavice F_0 a F_1 působí jako rotační molekulární motory. Za fyziologických podmínek je F_0 poháněn protonovou hybnou silou a otáčí komplex rotoru, což vede k syntéze ATP z ADP a fosfátu. Naopak, když síla motoru protonů klesá, F_1 hydrolyzuje ATP, což vede k obrácené rotaci komplexu rotoru a způsobuje, že F_0 pumpuje protony v opačném směru ⁽⁹⁷⁾.

N,N-dicyklohexylkarbodiimid (DCCD) specificky inhibuje aktivitu ATPázy a protonovou translokaci reakcí se zachovanými zbytky rotorového kruhu kyseliny glutamové nebo aspartátu ⁽⁹⁸⁾. Přesný mechanismus, jakým DCCD reaguje s karboxylovými skupinami kyselých zbytků, je nejasný, ale obecně se předpokládá, že reakce probíhá s protonovanou formou karboxylové skupiny. Reakce probíhá ve dvou krocích: nejprve karboxylová kyselina tvoří vodíkovou vazbu k jednomu z atomů dusíku v DCCD. Přesun elektronů v DCCD vede k tvorbě nestabilního dicyklohexyl-O-acylmočovinného meziproductu. Následně další přeskupení molekuly vede k tvorbě stabilní dicyklohexyl-N-acylmočoviny ⁽⁹⁹⁾.

Při pozorování mechanismu účinku byla rychlost inhibice DCCD lineárně úměrná koncentraci DCCD, což naznačuje, že inhibice je reakcí prvního řádu, a že jediná modifikace DCCD je dostatečná pro inhibici reakce. Je zajímavé, že i po inhibici DCCD ukázal komplex F_0F_1 přechodnou aktivaci nejvýše třemi otáčkami celkem a úhlová poloha po přechodné aktivaci byla vždy stejná jako původní koncová poloha. Bylo zjištěno, že inhibice komplexu F_0F_1 pomocí DCCD vykazuje přechodnou aktivaci, která může být zvýšena, pokud molekuly inhibované DCCD jsou nuceně otáčeny v dopředném směru, ale ne zpět. Tento asymetrický efekt je vysvětlitelný při zvažování struktury F_0 . Při sprážené rotaci je H^+ přenášen mezi částmi *a* a *c* podjednotky F_0 . Proto podjednotka *c* podílející se na translokaci H^+ by měla úzce interagovat s podjednotkou *a*, zatímco jiné *c* podjednotky jsou vystaveny lipidové dvojvrstvě. Kovalentně vázaný DCCD (N-acylmočovina) vyčnívá ven z karboxylátu vázajícího H^+ . Jakmile je *c*-kroužek modifikován pomocí DCCD, jeho rotace je blokována kvůli stérické překážce vystupujícího DCCD a podjednotky (*obr. 16*). Přechodná aktivace pak může být způsobena tepelně indukovaným rozvolněním na rozhraní *a-c*. Nucené otáčení ve směru dopředu zvyšuje volnost, zatímco zpětné otáčení způsobuje, že se F_0 otáčí, dokud se DCCD opět nestřetne s *a* podjednotkou ^(97; 100).



Obr. 16: Model přechodné aktivace F_0 inhibovaného pomocí DCCD. Otáčení periferní stopky F_0F_1 se po jednom otočení přechodně aktivuje a znovu zablokuje ve stejném úhlu ⁽⁹⁷⁾.

2.2.5 Rozpojovací proteiny

Konečným krokem při oxidaci substrátu mitochondriemi je přenos elektronů na kyslík a vytvoření vody. Uvolněná energie je využívána respiračním řetězcem pro pumpování protonů z mitochondrií. Ve většině mitochondrií přechází převážné množství těchto protonů přes ATPázu a energie se používá k syntéze ATP. Pokud se však protony vrátí jiným způsobem, mitochondrie jsou považovány za rozpojené. Do jisté míry k tomu dochází ve všech mitochondriích za patologických podmínek. Existuje také protein, jehož funkcí je dovolit protonům znovu vstoupit do mitochondrie bez použití energie. Za těchto podmínek se energie přeměňuje na teplo. Tím proteinem je rozpojovací protein termogenin, neboli UCP1 (z anglického „UnCoupling Protein 1“) a provádí tento úkol v hnědé tukové tkáni. Savci, včetně novorozenců, používají uvolněné teplo k ochraně před chladem. Tento proces je označován jako netřesová termogeneze ⁽¹⁰¹⁾. UCP1 byl objeven před 40 lety a byl dlouho považován za výsledek jedinečné adaptace savčí tkáně na netřesovou termogenezi ⁽¹⁰²⁾.

UCP se vyskytují nejen u zvířat a rostlin (*tab.8*), ale také u hub, a dokonce i protozoí. Toto zjištění podpořilo návrh, že rozpojovací proteiny nejsou pouze termogenní, ale mohou mít další důležité funkce v různých tkáních ⁽¹⁰³⁾. Byly popsány proteiny homologní s UCP1 nejen v jiných savčích tkáních, ale také v jiných organismech, včetně rostlin. Čtyři nové skupiny rozpojovacích proteinů byly

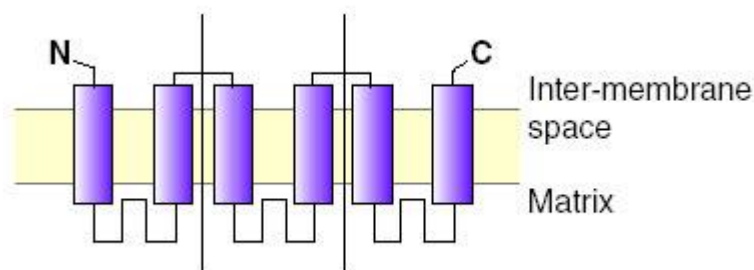
popsány u savců. UCP2 je exprimován v mnoha tkáních. UCP3 je exprimován pouze v hnědé tukové tkáni a kosterním svalu a UCP4 a BMCP1 jsou přítomny pouze v mozku ⁽¹⁰⁴⁾. Předpokládané funkce UCP zahrnují chladovou termogenezi a termogenezi vyvolanou dietou, snížení produkce reaktivních forem kyslíku, metabolickou a energetickou rovnováhu a regulaci, snímání glukózy a adaptaci na hladovění ⁽¹⁰⁵⁾.

Tabulka 8: Seznam známých rozpojovacích proteinů (upraveno dle ⁽¹⁰⁴⁾)

Třída	Protein	Druh			
UCP1	<i>BtUCP1</i>	<i>Bos taurus</i> (kráva)	UCP4	<i>HsUCP4</i>	<i>Homo sapiens</i> (člověk)
	<i>CfUCP1</i>	<i>Canis familiaris</i> (pes)		<i>RnUCP4</i>	<i>Rattus norvegicus</i> (krysa)
	<i>HsUCP1</i>	<i>Homo sapiens</i> (člověk)			
	<i>RmUCP1</i>	<i>Macaca mulatta</i> (makak)			
	<i>MaUCP1</i>	<i>Mesocricetus auratus</i> (křeček)			
	<i>MmUCP1</i>	<i>Mus musculus</i> (myš)			
	<i>OeUCP1</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (králik)			
	<i>PsUCP1</i>	<i>Phodopus sungorus</i> (křeček)			
	<i>RnUCP1</i>	<i>Rattus norvegicus</i> (krysa)			
UCP2	<i>BtUCP2</i>	<i>Bos taurus</i> (kráva)	BMCP1	<i>HsBMCP1</i>	<i>Homo sapiens</i> (člověk)
	<i>BrUCP2</i>	<i>Brachydanio</i> (ryba Danio)		<i>MmBMCP1</i>	<i>Mus musculus</i> (myš)
	<i>CfUCP2</i>	<i>Canis familiaris</i> (pes)		<i>RnBMCP1</i>	<i>Rattus norvegicus</i> (krysa)
	<i>CcUCP2</i>	<i>Cyprinus carpio</i> (kapr)			
	<i>HsUCP2</i>	<i>Homo sapiens</i> (člověk)			
	<i>RmUCP2</i>	<i>Macaca mulatta</i> (makak)			
	<i>MmUCP2</i>	<i>Mus musculus</i> (myš)			
	<i>PsUCP2</i>	<i>Phodopus sungorus</i> (křeček)			
	<i>RnUCP2</i>	<i>Rattus norvegicus</i> (krysa)			
<i>SsUCP2</i>	<i>Sus scrofa</i> (prase)				
UCP3	<i>BtUCP3</i>	<i>Bos taurus</i> (kráva)	Rostlinné UCP	<i>AtUCP1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (huseníček)
	<i>CfUCP3</i>	<i>Canis familiaris</i> (pes)		<i>AtUCP2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (huseníček)
	<i>EmUCP3</i>	<i>Eupetomena macroura</i> (kolibřík)		<i>LeUCP</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> (rajče)
	<i>GgUCP3</i>	<i>Gallus gallus</i> (kur)		<i>OsUCP1</i>	<i>Oryza sativa</i> (rýže)
	<i>HsUCP3</i>	<i>Homo sapiens</i> (člověk)		<i>OsUCP2</i>	<i>Oryza sativa</i> (rýže)
	<i>MmUCP3</i>	<i>Macaca mulatta</i> (makak)		<i>StUCP</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (brambroa)
	<i>MgUCP3</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan)		<i>SrUCP</i>	<i>Symplocarpus renifolius</i> (zelí)
	<i>MmUCP3</i>	<i>Mus musculus</i> (myš)		<i>TaUCP</i>	<i>Triticum aestivum</i> (pšenice)
	<i>PsUCP3</i>	<i>Phodopus sungorus</i> (křeček)		<i>ZmUCP</i>	<i>Zea mays</i> (kukuřice)
	<i>RnUCP3</i>	<i>Rattus norvegicus</i> (krysa)		UCP?	<i>PmUCP?</i>
<i>SsUCP3</i>	<i>Sus scrofa</i> (prase)				

Rozpojovací proteiny patří do nadřazené skupiny nosičů metabolitů mitochondriální vnitřní membrány, jejíž členové sdílejí strukturální i funkční podobnosti. Členové skupiny intramitochondriálních transportérů se pravděpodobně vyvinuli z primordiálního proteinu obsahujícího dva transmembránové helixy, které se pak triplikují ^(104; 106).

UCP jsou integrální membránové proteiny, které mají molekulovou hmotnost mezi 31 kDa a 34 kDa, mozkové homology (BMCP1 a UCP4) jsou větší proteiny s hmotností 36-38 kDa. Pravděpodobně jedním z nejcharakterističtějších rysů je jejich tripartitní struktura se třemi opakováními asi 100 aminokyselin, z nichž každá obsahuje dva hydrofobní úseky spojené dlouhou hydrofilní smyčkou ^(104; 106). Polypeptidový řetězec překříží lipidovou dvojvrstvu šestkrát a aminokyselinové a karboxylové konce vyčnívají do mitochondriálního mezimembránového prostoru (*obr. 17*) ⁽¹⁰⁷⁾.

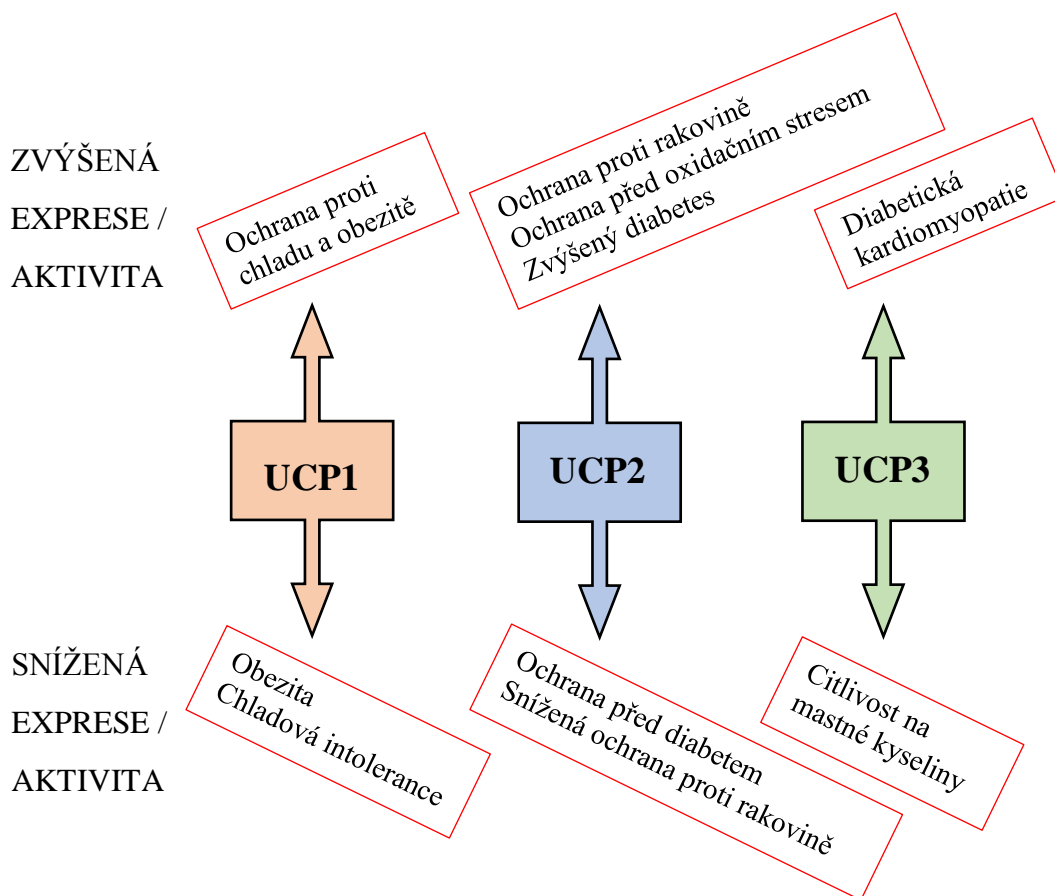


Obr. 17: Transmembránové uspořádání UCP ⁽¹⁰⁴⁾.

Šest helixových oblastí pokrývá lipidovou dvojvrstvu, přičemž aminové a karboxylové konce jsou orientovány na cytosolovou stranu membrány a dlouhé hydrofilní smyčky na matricové straně. Svislé čáry oddělují tři části tripartitní struktury.

Fyziologická funkce a terapeutický potenciál UCP jsou shrnuty na obr. 18. Bylo prokázáno, že UCP1 je rozhodující pro udržení tělesné teploty. Jelikož energie v tomto procesu je přenášena na teplo a není uložena jako tuk v těle, aktivita rozpojovacího proteinu (proteinů) může být považována za mechanismus proti obezitě, což je příležitost, která přitáhla velkou pozornost, jak farmaceutické společnosti, tak i široké veřejnosti, která hledá jednoduché způsoby "hubnutí" ⁽¹⁰¹⁾.

Byly popsány experimenty, ve kterých byly myši s deficiencí UCP1 použity k vyšetření přítomnosti alternativních termogenních mechanismů, které mohou tyto myši použít k udržení své tělesné teploty. Takové studie jsou zajímavé, protože by mohly vést k identifikaci nových termogenních mechanismů, které jsou důležité pro energetickou rovnováhu i u lidí. Jedna teorie tvrdí, že myš s deficiencí UCP1 používá k udržení teploty těla pouze třesovou termogenezi. Další teorie naznačuje, že aby tyto myši snášely chlad, dochází u nich k indukci mechanismů spojených s koloběhem Ca^{2+} ve svalovině a tukové tkáni. Leptin, hormon produkovaný buňkami tukové tkáně, by se mohl také podílet na tomto procesu, protože stimuluje spotřebu kyslíku v izolovaných svalových vláknech cyklováním lipidických substrátu, což by mohlo být termogenním mechanismem při regulaci tělesné hmotnosti. Zatímco fenotypy myši s inaktivovanými geny UCP2 nebo UCP3 nesouvisejí s vadou tělesné teploty ani s regulací tělesné hmotnosti, zdá se, že snížená exprese UCP2 podporuje zvýšenou sekreci inzulínu v pankreatu a zvýšenou odolnost vůči infekci mikrobiálními patogeny. Názor, že UCP2 chrání proti nádorům, naznačuje, že celkové snížení aktivity UCP2 může mít nežádoucí vedlejší účinky ⁽¹⁰¹⁾. Nadměrná exprese UCP2 a UCP3 v podmínkách lipotoxicity naznačuje, že UCP jsou nutné k ochraně buněk před škodlivými důsledky nadměrného metabolismu nebo skladování mastných kyselin. V kosterním svalu UCP3 podporuje zvýšená oxidace mastných kyselin úlohu UCP3 jako exportéru mastné kyseliny ve formě aniontu z mitochondrií, aby se zabránilo akumulaci mastných kyselin v matrix ⁽¹⁰⁸⁾.



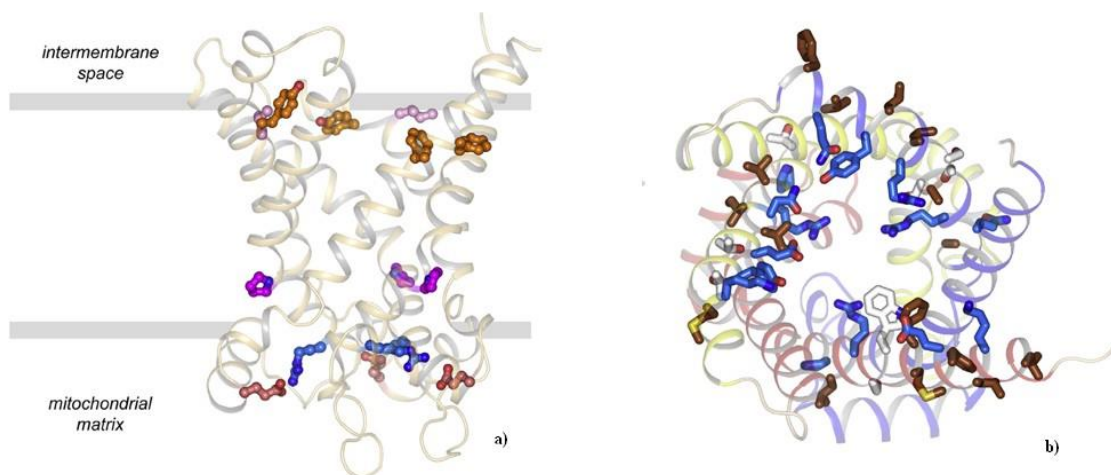
Obr. 18: Patologické následky a terapeutické účinky změněné exprese / aktivity různých odpojovacích proteinů. (upraveno dle ⁽¹⁰¹⁾)

2.2.5.1 Termogenin

Bílá a hnědá tuková tkáň slouží k důležitým opačným funkcím v celkové energetické rovnováze. Zatímco bílá tuková tkáň se specializuje na skladování energie ve formě triacylglycerolů, hnědá tuková tkáň slouží k rozptylu energie ve formě tepla. Konkrétně hnědý tuk usnadňuje netřesovou termogenezi, aby pomohla bránit tělo před chladem. Hnědá tuková tkáň je bohatá u malých savců, ale je přítomna i u novorozenců většiny druhů savců, dokonce i u lidí ^(109; 110). V posledních letech se navíc ukázalo, že je přítomna také u dospělých. Dospělí lidé vykazují jak klasický hnědý tuk podobný hnědé tukové tkáni zkoumané u novorozenců, tak tzv. šedý tuk v podobě drobných kapének uložených uvnitř bílé tukové tkáně. Hlavní depozity se nacházejí v supraklavikulární oblasti a krku ^(111; 112).

Hnědé adipocyty jsou menší než bílé adipocyty, obsahují méně lipidů a jsou bohaté na mitochondrie s jedinečnou vlastností. Tou je přítomnost rozpojovacího proteinu UCP1, termogeninu, ve vnitřní membráně. Termogeneze hnědé tukové tkáně závisí do značné míry na aktivitě tohoto proteinu ⁽¹⁰⁹⁾.

Termogenin (*obr. 19*) je monomer složený ze 306 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 33 kDa. Jeho aminokyselinová sekvence je vysoce homologní mezi druhy, což naznačuje její biologický význam. Je také vysoce homologní s množstvím všudypřítomných mitochondriálních nosičů vnitřní membrány, včetně nosiče ADP/ATP, fosfátového přenašeče a transportéru oxoglutarátu. Protein se skládá ze tří homologních membránových domén, každá z asi 100 aminokyselin, kódovaných dvěma exony oddělenými jedním intronem ⁽¹⁰⁹⁾.



Obr. 19: Termogenin pohled z boku a ze shora ⁽¹¹⁰⁾

Termogenin katalyzuje únik protonů přes vnitřní mitochondriální membránu, čímž se rozptýlí elektrochemický protonový gradient, který by jinak vedl ATPázu k produkci ATP. Výsledkem je, že energie z oxidace respiračních substrátů se uvolňuje jako teplo a souběžně klesá výtěžek ATP oxidační fosforylací ^(109; 110).

Růst hnědé tukové tkáně a termogenní funkce jsou pod regulací sympatického nervového systému, který hustě inervuje tkáň ⁽¹¹³⁾. Signály z mozku stimulují uvolňování katecholaminů, jako je noradrenalin, v inervované hnědé tukové tkáni. Tam aktivují adrenergní receptory, které iniciují intracelulární signalizaci závislou na cAMP. G α s protein, disociovaný ze stimulovaných receptorů, aktivuje adenylátcyklázu, zvyšuje buněčný cAMP, což vede ke změnám aktivity UCP1. Při akutní reakci aktivuje cAMP proteinovou kinázu A, která vyvolá lipolýzu triglyceridových zásob. Do cytosolu uvolněné mastné kyseliny působí jako palivo pro oxidaci mitochondrií a co je důležité, jako přímý aktivátor UCP1 ⁽¹¹⁴⁾. Naopak, aktivita transportu protonů je inhibována vazbou purinových nukleotidů, především ATP, na místo na samotném UCP ⁽¹⁰⁹⁾.

Mírné rozpojení mitochondriální respirace pomocí UCP nebo farmakologickými přípravky se zdá být slibným cílem odstranění rizikového faktoru srdečního selhání vyvolaného obezitou. Kromě toho kombinace bezpečného životního stylu a farmakologických strategií může pomoci omezit pokračující růst epidemie obezity a metabolického syndromu ve světě a zlepšit srdeční dysfunkci při obezitě ⁽¹¹⁵⁾.

ZÁVĚR

Studium principu účinku látek inhibujících mitochondriální metabolismus napomohlo pochopení fyziologických mechanismů probíhajících v mitochondrii. Některé toxiny dokonce našly uplatnění jako slibné terapeutické cíle. V budoucích letech bychom měli zaznamenat velké pokroky v chápání mitochondriálního metabolismu v buňkách pozmeněných nemocemi a znát odpovědi, jak můžeme tento proces selektivně zaměřit na léčbu. Například: i) indukce apoptózy po expozici některému z toxinů by mohla být selektivní pouze pro rakovinové buňky, ii) použití amobarbitalu jako prevence poškození myokardu během reperfúze, iii) použití oligomycinu k inhibici růstu nádoru či iv) uplatnění mechanismu známého u rozpojovacích proteinů k omezení obezity u populace.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Langlopress.net**. [Online] [Citace: 26. 12 2016.]
<http://langlopress.net/homeeducation/resources/science/index.php?op=scienceillustration&src=Cell%20Structures/Mitochondrion.jpg&label=Mitochondrion>.
2. **Cooper GM**. *The Cell, 2nd edition*. Boston University : Sinauer Associates, inc., 2000. ISBN-10: 0-87893-106-6.
3. **Matouš B et al**. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha : Galen, 2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
4. **Ramsay EE, Hogg PJ, Dilda PJ**. Mitochondrial Metabolism Inhibitors for Cancer Therapy. *Springer Science + Business Media*. 2011, 28(11):2731-44.
5. **Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL**. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol*. 2009, 19(1):17-24.
6. **Pastorino JG, Hoek JB**. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Cur Med Chem*. 2003, 10(16):1535-51.
7. **Smith TAD**. Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br J Biomed Sci*. 2000, 57(2):170-8.
8. **Nakashima RA, Mangan PS, Colombini M, Pedersen PL**. Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N, N-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. *Biochemistry*. 1986, 25(5):1015-21.
9. **Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L**. *Biochemistry*. 5th ed. New York Basingstoke: W. H. Freeman and Co. *Palgrave distributor*. 2001.
10. **Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, et al**. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008, 452(7184):230-3.
11. **Nelson DL, Cox MM**. *Lehninger principles of biochemistry*. New York : W.H.Freeman, 2013. 978-1429234146.
12. **Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G**. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2010, 9(6):447-64.
13. **Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Bérout C, Demont J, et al**. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2002, 23(5):759-68.
14. **Commons.wikimedia.org**. [Online] 2007. [Citace: 22. 2 2017.]
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Succinate_Dehydrogenase_1YQ3_and_Membrane.png.
15. **Bonora E, Porcelli AM, Gasparre G, Biondi A, Ghelli A, Carelli V, et al**. Defective oxidative phosphorylation in thyroid oncocyctic carcinoma is associated with pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting complexes I and III. *Cancer Res*. 2006, 66(12):6087-96.
16. **Fukuda R, Zhang H, Kim J-W, Shimoda L, Dang CV, Semenza Gregg L**. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007, 129(1):111-22.
17. **Markoš A**. Akumulátorky života; objasnění mechanismu syntézy ATP. *Vesmír*. 1998.
18. **Barger JF, Plas DR**. Balancing biosynthesis and bioenergetics: metabolic programs in oncogenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2010, 17:R287-R304.

- 19. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB.** Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009, 324:1029–1033.
- 20. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN et al.** Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res*. 2005, 15;65(2):613-21.
- 21. Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS et al.** Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, 324(1):269-75.
- 22. El Mjiyad N, Caro-Maldonado A, Ramirez-Peinado S, Munoz-Pinedo C.** Sugar-free approaches to cancer cell killing. *Oncogene*. 2011, 30:253–264.
- 23. Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P.** Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. 2006, 25:4633–4646.
- 24. Kurtoglu M, Lampidis TJ.** From delocalized lipophilic cations to hypoxia: Blocking tumor cell mitochondrial function leads to therapeutic gain with glycolytic inhibitors. *Mol Nutr Food Res*. 2009, 53:68–75.
- 25. Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, McAllister D, Mackinnon AC.** Mitochondria targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Res*. 2012, 72(10): 2634–2644.
- 26. Brown J.** Effects of 2-deoxyglucose on carbohydrate metabolism: review of the literature and studies in the rat. *Metabolism*. 1962, 11:1098-112.
- 27. Keenan J, Liang Y, Clynes M.** Two-deoxyglucose as an antimetabolite in human carcinoma cell line RPMI-2650 and drugresistant variants. *Anticancer Res*. 2004, 24(2A):433-40.
- 28. Weindruch R, Keenan KP, Carney JM, Fernandes G, Feuers RJ, Floyd RA et al.** Caloric restriction mimetics: metabolic interventions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001, 56:20–33.
- 29. Zhang D, Fei Q, Li J, Zang C, Sun Y, Zhu C, et al.** 2-Deoxyglucose Reverses the Promoting Effect of Insulin on Colorectal Cancer Cells In Vitro. *PLoS ONE*. 2016, 11(3):e0151115.
- 30. Papandreou I, Goliassova T, Denko NC.** Anticancer drugs that target metabolism: is dichloroacetate the new paradigm? *Int J Cancer*. 2011, 128(5):1001-8.
- 31. Stacpoole PW.** The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism*. 1989, 38:1124–44.
- 32. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al.** A mitochondria-K_{ij} channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*. 2007, 11:37–51.
- 33. Stockwin LH, Yu SX, Borgel S, Hancock C, Wolfe TL, Phillips LR, et al.** Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *Int J Cancer*. 2010, 127(11):2510-9.
- 34. Cioli V, Bellocci B, Putzolu S, Malorni W, Demartino C.** Antispermato-genic activity of lonidamine (AF 1890) in rabbit. *Ultramicroscopy*. 1980, 0304-3991.
- 35. Floridi A, Paggi MG, Marcante ML, Silvestrini B, Caputo A, De Martino C.** Lonidamine, a selective inhibitor of aerobic glycolysis of murine tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 1981, 66(3):497-9.
- 36. Nath K, Guo L, Nancolas B, Nelson DS, Shestov AA, Lee SC, et al.** Mechanism of antineoplastic activity of lonidamine. *Biochim Biophys Acta*. 2016, 1866(2):151-162.
- 37. Price GS, Page RL, Riviere JE, Cline JM, Thrall DE.** Pharmacokinetics and toxicity of oral and intravenous lonidamine in dogs. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996, 38(2):129-35.
- 38. Stryker JA, Gerweck LE.** Lonidamine-induced, pH dependent inhibition of cellular oxygen utilization. *Radiat Res*. 1988, 113(2):356-61.

- 39. Nath K, Nelson DS, Heitjan DF, Leeper DB, Zhou R, Glickson JD.** Lonidamine induces intracellular tumor acidification and ATP depletion in breast, prostate and ovarian cancer xenografts and potentiates response to doxorubicin. *NMR Biomed.* 2015, 28(3):281-90.
- 40. Halestrap AP.** Monocarboxylic acid transport. *Compr Physiol.* 2013, 3(4):1611-43.
- 41. Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, Orsak T, Boutron A, Chen YC, Cox JE, et al.** A Mitochondrial Pyruvate Carrier Required for Pyruvate Uptake in Yeast, Drosophila, and Humans. *Science.* 2012, 337(6090):96-100.
- 42. Degli Esposti M.** Inhibitors of NADH–ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta.* 1998, 1364(2):222-35.
- 43. Kotlyar AB, Sled VD, Burbaev DS, Moroz IA, Vinogradov AD.** Coupling site I and the rotenone-sensitive ubiquinone in tightly coupled submitochondrial particles. *FEBS letters.* 1990, 264(1):17-20.
- 44. Commons.wikimedia.org.** [Online] 2013. [Citace: 18. 3 2017.] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rotenone_Structural_Formula_V.1.svg.
- 45. Talpade DJ, Greene JG, Higgins DS Jr., Greenamyre JT.** In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *J Neurochem.* 2000, 75(6):2611-21.
- 46. Yu J, Xu H, Shen X, Jiang H.** Ghrelin protects MES23.5 cells against rotenone via inhibiting mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Neuropeptides.* 2016, 56:69-74.
- 47. Barrientos A, Moraes CT.** Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem.* 1999, 274(23):16188-97.
- 48. Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV.** Complex I and Parkinson's Disease. *IUBMB Life.* 2001, 52:135-141.
- 49. Jeng M, Hall C, Crane FL, Takahashi N, Tamura S, Folkers K.** Inhibition of mitochondrial electron transport by piericidin A and related compounds. *Biochemistry.* 1968, 7(4):1311–1322.
- 50. Hall C, Wu M, Crane FL, Takahashi N, Tamura S, Folkers K.** Piericidin A: A new inhibitor of mitochondrial electron transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 1966, 25,373-377.
- 51. Aldakkak M, Stowe DF, Chen Q, Lesnefsky EJ, Camara AK.** Inhibited mitochondrial respiration by amobarbital during cardiac ischaemia improves redox state and reduces matrix Ca² overload and ROS release. *Cardiovasc Res.* 2008, 77(2):406-15.
- 52. Chen Q, Hoppel CL, Lesnefsky EJ.** Blockade of electron transport before cardiac ischemia with the reversible inhibitor amobarbital protects rat heart mitochondria. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006, 200-207.
- 53. Stewart S, Lesnefsky EJ, Chen Q.** Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. *Transl Res.* 2009, 153(5):224-31.
- 54. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ.** Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 2003, 36027– 36031.
- 55. Esser L, Quinn B, Li YF, Zhang M, Elberry M, Yu L, Yu CA, Xia D.** Crystallographic Studies of Quinol Oxidation Site Inhibitors: A Modified Classification of Inhibitors for the Cytochrome bc₁ Complex. *J. Mol. Biol.* 2004, 281–302.
- 56. Starkov AA, Fiskum G.** Myxothiazol Induces H₂O₂ Production from Mitochondrial Respiratory Chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 281(3):645-50.
- 57. napdos.ucsd.edu. Natural Product Domain Seeker.** [Online] [Citace: 2. 5 2017.] http://napdos.ucsd.edu/pathway_templates/myxothiazol_info.html.

- 58. Kim H, Xia D, Yu CA, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J.** Inhibitor binding changes domain mobility in the iron– sulfur protein of the mitochondrial bc1 complex from bovine heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, 8026– 8033.
- 59. Muller FL, Roberts AG, Bowman MK, Kramer DM.** Architecture of the Qo site of the cytochrome bc1 complex probed by superoxide production. *Biochemistry.* 2003, 6493–6499.
- 60. Davoudi M, Kallijärvi J, Marjavaara S, Kotarsky H, Hansson E, Levéen P, Fellman V.** A mouse model of mitochondrial complex III dysfunction induced by myxothiazol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, 446(4):1079-84.
- 61. Bycroft BW, Payne DJ.** *Dictionary of Antibiotics and Related Substances, second edition.* Londýn : Taylor & Francis, 2013. 9781439839522.
- 62. Sigma Aldrich.** [Online] [Citace: 4. 5 2017.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8674>.
- 63. Mammucari C, Rizzuto R.** Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mechanisms of Ageing and Development.* 2010, 536–543.
- 64. Han YH, Kim SH, Kim SZ, Park WH.** Antimycin A as a mitochondria damage agent induces an S phase arrest of the cell cycle in HeLa cells. *Life Sciences.* 2008, 346–355.
- 65. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2007, 44-84.
- 66. Im AR, Kim YH, Uddin MR, Lee HW, Chae SW, Kim YH, Jung WS, Kang BJ, Mun CS.** Scutellaria baicalensis Extracts and Flavonoids Protect Rat L6 Cells from Antimycin A-Induced Mitochondrial Dysfunction. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2012, 517965.
- 67. Zhang Y, Wang X, Wang X et al.** Protective effect of flavonoids from Scutellaria baicalensis Georgi on cerebral ischemia injury. *Journal of Ethnopharmacology.* 2006, 355–360.
- 68. Iqbal S, Clower JH, Hernandez SA, Damon SA, Yip FY.** A review of disaster-related carbon monoxide poisoning: surveillance, epidemiology, and opportunities for prevention. *American Journal of PublicHealth.* 2012, 1957–1963.
- 69. Bleecker ML.** Carbon monoxide intoxication. *Handbook of Clinical Neurology.* 2015, 191–203.
- 70. Li W, Zhang Y, Gu R et al.** DNA pooling base genomewide association study identifies variants at NRXN3 associated with delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning. *PLoS ONE.* 2013, e79159.
- 71. Chang YC, Lee HY, Huang JL, Chiu CH, Chen CL, Wu CT.** Risk factors and outcome analysis in children with carbon monoxide poisoning. *Pediatrics & Neonatology.* 2016.
- 72. Roberts GP, Youn H, Kerby RL.** CO-sensing mechanisms. *Microbiology andMolecular Biology Reviews.* 2004, 453–473.
- 73. Heitbrink D, Sigurdson H, Bolwien C, Brzezinski P, Heberle J.** Transient Binding of CO to CuB in Cytochrome c Oxidase Is Dynamically Linked to Structural Changes around a Carboxyl Group: A Time-Resolved Step-Scan Fourier Transform Infrared Investigation. *Biophysical Journal.* 2002, 1-10.
- 74. Björck ML, Zhou S, Lundin CR, Ott M, Ädelroth P, Brzezinski P.** Reaction of *S. cerevisiae* mitochondria with ligands: Kinetics of CO and O₂ binding to flavohemoglobin and cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2017, 182-188.
- 75. Xu X, Zhang H, Wang K, Tu T, Jiang Y.** Protective Effect of Edaravone against Carbon Monoxide Induced Apoptosis in Rat Primary Cultured Astrocytes. *Biochem Res Int.* 2017.

- 76. Uno M, Kitazato KT, Suzue A et al.** Inhibition of brain damage by edaravone, a free radical scavenger, can be monitored by plasma biomarkers that detect oxidative and astrocyte damage in patients with acute cerebral infarction. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005, 1109–1116.
- 77. Jurič DM, Šuput D, Brvar M.** Hyperbaric oxygen preserves neurotrophic activity of carbon monoxide-exposed astrocytes. *Toxicology Letters*. 2016, 1-6.
- 78. Zhang P, Li W, Li L et al.** Treatment with edaravone attenuates ischemic brain injury and inhibits neurogenesis in the subventricular zone of adult rats after focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *Neuroscience*. 2012, 297–306.
- 79. Cooper CE, Brown GC.** The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr*. 2008, 40:533–539.
- 80. Nůsková H, Vrbacký M, Drahota Z, Houšťek J.** Cyanide inhibition and pyruvate-induced recovery of cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr*. 2010, 42:395–403.
- 81. Gunasekar PG, Sun PW, Kanthasamy AG, Borowitz JL, Isom GE.** Cyanide-induced neurotoxicity involves nitric oxide and reactive oxygen species generation after N-methyl-D-aspartate receptor activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 150–155.
- 82. Stefajir.cz.** [Online] [Citace: 28. 5 2017.] <http://www.stefajir.cz/otrava-kyanidem>.
- 83. Warburg O, Negelein E, Haas E.** Spectroscopic demonstration of the O-transferring enzyme in the presence of cytochrome. *Biochem Z*. 1933, 266:1–8.
- 84. Way, JL.** Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1984, 451–481.
- 85. Isom GE, Way JL.** Effects of oxygen on the antagonism of cyanide intoxication: cytochrome oxidase, in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984, 74:57–62.
- 86. Beasley DM, Glass WI.** Cyanide poisoning: pathophysiology and treatment recommendations. *Occup Med (Lond)*. 1998, 48:427–431.
- 87. Hammer GB, Conolly SG, Schulman SR, Lewandowski A, et al.** Sodium nitroprusside is not associated with metabolic acidosis during intraoperative infusion in children. *BMC Anesthesiology*. 2013.
- 88. Smith RM, Peterson WH, Mccoy E.** Oligomycin, a new antifungal antibiotic. *Antibiot Chemother*. 1954, 962–970.
- 89. Green RC, Thumser AE, Povey D, Saldanha JW, Potter BS, Palmer RA, Howling BJ.** A comparative study of the single crystal X-ray determination and molecular modelling of the binding of oligomycin to ATP synthase. *Comput Biol Chem*. 2009, 189–195.
- 90. Solaini G, Harris DA, Lenaz G, Sgarbi G, Baracca A.** The study of pathogenic mechanism of mitochondrial diseases provides information on basic bioenergetics. *Biophys Acta*. 2008, 941–945.
- 91. Hong S, Petersen PL.** ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease and other scientific areas. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008, 590–641.
- 92. Tzagoloff A.** Assembly of the mitochondrial membrane system. III. Function and synthesis of the oligomycin sensitivity conferring protein of yeast mitochondria. *J Biol Chem*. 1970, 1545–1551.
- 93. Devenish RJ, Prescott M, Boyle GM, Nagley P.** The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase: OSCP and the proton channel. *J Bioenerg Biomembr*. 2000, 507–514.
- 94. Przybylski P, Brezinski B, Bartls F.** Oligomycin A complex structures with some divalent metal cations studied by ESI, MS and PM5 semiempirical methods. *J Mol Struct*. 2007, 58–71.
- 95. Pagliarani A, Nesci S, Ventrella V.** Modifiers of the oligomycin sensitivity of the mitochondrial F1F0-ATPase. *Mitochondrion*. 2013, 312–319.

- 96. Dorward AM, Singh G.** Energetic characteristic of cisplatin resistant ovarian carcinoma cells. *Anticancer Res.* 1996, 443–447.
- 97. Toei M, Noji H.** Single-molecule Analysis of F₀F₁-ATP Synthase Inhibited by N,N-Dicyclohexylcarbodiimide. *The Journal of Biological Chemistry.* 2013, 25717–25726.
- 98. Kluge C, Dimroth P.** Kinetics of inactivation of the F₁F₀ ATPase of *Propionigenium modestum* by dicyclohexylcarbodiimide in relationship to H_p and Na_p concentration: Probing the binding site for the coupling ions. *Biochemistry.* 1993, 32:10378–10386.
- 99. Azzi A, Casey RP, Nalecz MJ.** The effect of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide on enzymes of bioenergetic relevance. *Biochim Biophys Acta.* 1984, 768:209–226.
- 100. Pogoryelov D, Krah A, Langer JD, Yildiz O, Faraldo-Gómez JD, Meier T.** Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the F₀ complex of ATP synthases. *Nat Chem Biol.* 2010, 891–899.
- 101. Nedergaard J, Ricquier D, Kozak LP.** Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO Rep.* 2005, 917–921.
- 102. Nicholls DG, Ferguson SJ.** *Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory*. London : Academic Press, 2002. 978-0125181204.
- 103. Azzu V, Brand MD.** The on/off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci.* 2010, 35(5):298–307.
- 104. Ledesma A, García de Lacoba M, Rial E.** The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biology.* 2002, 3015.1–3015.9.
- 105. Ricquier D, Bouillaud F.** The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J.* 2000, 345:161–179.
- 106. Saier MH Jr.** Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J Bacteriol.* 2000, 182:5029-5035.
- 107. Miroux B, Frossard V, Raimbault S, Ricquier D, Bouillaud F.** The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. *EMBO J.* 1993, 12:3739-3745.
- 108. Wang S, Subramaniam A, Cawthorne MA, Clapham JC.** Increased fatty acid oxidation in transgenic mice overexpressing UCP3 in skeletal muscle. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2003, 295–301.
- 109. Palou A, Picó C, Bonet ML, Oliver P.** The uncoupling protein, thermogenin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 1998, 7-11.
- 110. Crichton PG, Lee Y, Kunji ERS.** The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. *Biochimie.* 2017, 134:35–50.
- 111. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B.** Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007, 293:E444–E452.
- 112. Lidell ME, Betz MJ, Enerback S.** Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte.* 2014, 3:63–66.
- 113. Himms-Hagen J.** Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J.* 1990, 2890-2898.
- 114. Locke RM, Rial E, Scott ID, Nicholls DG.** Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown-fat mitochondria. *Eur J Biochem.* 1982, 129:373–380.
- 115. Ruiz-Ramírez A, López-Acosta O, Barrios-Maya MA, El-Hafidi M.** Cell Death and Heart Failure in Obesity: Role of Uncoupling Proteins. *Oxid Med Cell Longev.* 2016, 9340654.