

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

Katedra biologických a biochemických věd

Mitochondriální cílení sloučenin

Bakalářská práce

Autor práce: Bc. Simona Málková

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

Konzultant: Mgr. Jan Čapek

2021

UNIVERSITY OF PARDUBICE

Faculty of Chemical Technology

Department of Biological and Biochemical Sciences

Mitochondrial targeting of compounds

Bachelor thesis

Author thesis: Bc. Simona Málková

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

Consultant: Mgr. Jan Čapek

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Simona Málková**
Osobní číslo: **C17107**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Mitochondriální cílení sloučenin**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis mitochondrií. V rámci tohoto tématu se nejprve zaměřte na popis struktury mitochondrií, jejich funkce a významu pro buňky. Následně popište typy transportu látek do buněk, vč. proteinů. Nakonec se zaměřte na popis aktuální problematiky „mitochondrial targeting“ u léčiv.
- 2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jan Čapek**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Práci s názvem Mitochondriální cílení sloučenin 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. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 13. 7. 2021

Bc. Simona Málková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D., vedoucímu bakalářské práce, za odborné vedení, poskytnuté konzultace, trpělivost, vstřícný přístup, vysvětlení dané problematiky, a především za cenné rady a připomínky při zpracování této bakalářské práce.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na popis struktury a funkce mitochondrií. Dále jsou popsány typy transportu látek do buněk a je zmíněno několik strategií mitochondriálního cílení. V hlavní části jsou charakterizována léčiva pro cílení na mitochondrie, konkrétně jejich kategorie podle účelu použití a mechanismu účinku v mitochondriích. Nakonec jsou uvedena různá mitochondriální onemocnění a jejich terapie s konkrétními příklady používaných léčiv.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mitochondrie, vnější a vnitřní mitochondriální membrána, sloučeniny a léčiva cílící na mitochondrie, mitochondriální onemocnění

TITTLE

Mitochondrial targeting of compounds

ANNOTATION

The bachelor thesis is focused on the description of the structure and functions of mitochondria. Next, the types of transport of substances into cells are described and several mitochondrial targeting strategies are mentioned. The main part characterizes drugs for mitochondrial targeting, specifically their categories according to the purpose of use and mechanism of an effect in mitochondria. Finally, various mitochondrial diseases and their therapies are given with specific examples of drugs used.

KEYWORDS

Mitochondria, outer and inner mitochondrial membrane, mitochondria-targeting compounds and drugs, mitochondrial diseases

Obsah

Seznam obrázků	10
Seznam použitých zkratk	11
Úvod.....	13
1. Mitochondrie	14
1.1 Struktura mitochondrií	15
1.2 Dynamická rovnováha	17
1.3 Funkce mitochondrií	17
1.3.1 Produkce buněčné energie	18
1.3.2 Apoptóza	20
1.3.3 Nekroptóza.....	21
1.3.4 Homeostáza iontů vápníku.....	22
1.3.5 Reaktivní formy kyslíku	22
2. Transport látek přes biologické membrány	23
2.1 Pasivní transport.....	23
2.2 Aktivní transport	25
3. Strategie působení sloučenin cílících na mitochondrie	27
3.1 Trifenylfosfoniové soli.....	28
3.2 Peptidy pronikající do mitochondrií.....	29
3.3 D-(KLA KLAK) ₂	30
3.4 Guanidin a biguanid	30
3.5 Rhodamin	30
3.6 Lipozomy	31
3.7 Polymerní nanočástice	32
3.8 Anorganické nanočástice	32
4. Mitochondriální onemocnění.....	33
4.1 Onkologická onemocnění.....	33
4.1.1 Změny v nádorových buňkách.....	33
4.1.2 Energetický metabolismus	34
4.1.3 Warburgův efekt	35
4.1.4 Role ROS u nádorových buněk	37
4.2 Diabetes mellitus	38
4.3 Alzheimerova, Parkinsonova choroba a Friedreichova ataxie.....	38
4.4 Barthův a Wolf-Hirschhornův syndrom, Wilsonova choroba	39
5. Léčba mitochondriálních onemocnění	40

5.1	Léčiva cílící na mitochondrie.....	41
5.1.1	Mechanismy působení léčiv.....	42
5.1.2	Účinky léčiv.....	43
5.1.3	Používaná léčiva.....	44
	Závěr.....	46
	Seznam použité literatury.....	47

Seznam obrázků

Obrázek 1: Modely topologie vnitřní mitochondriální membrány	16
Obrázek 2: Schematické znázornění rozdílů mezi oxidativní fosforylací a anaerobní glykolýzou.....	19
Obrázek 3: Struktura mitochondrie a dýchací řetězec	20
Obrázek 4: Usnadněná difuze rozpuštěné látky (solutu) zprostředkovaná přenašečovým proteinem	24
Obrázek 5: Schematické znázornění struktury mitochondrie a strategie působení sloučenin cílících na mitochondrie	28
Obrázek 6: Chemická struktura skupiny trifenylfosfonia.....	29
Obrázek 7: Chemická struktura SS-01 peptidu.....	29
Obrázek 8: Chemická struktura guanidinu	30
Obrázek 9: Chemická struktura rhodaminu 19 a 123	31
Obrázek 10: Chemická struktura DQA.....	31
Obrázek 11: Schéma DQAsomes	31
Obrázek 12: Schematické znázornění aerobní glykolýzy (Warburgův efekt).....	36
Obrázek 13: Chemická struktura SkQ1	44

Seznam použitých zkratek

ABC	ATP-vázající kazetový (ATP-binding cassette)
acetyl-CoA	acetylkoenzym A (acetyl coenzyme A)
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ADP	adenosindifosfát (adenosine diphosphate)
ALDH	aldehyddehydrogenáza (aldehyde dehydrogenase)
AMPK	AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMP-activated protein kinase)
atd.	a tak dále
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
CL	kardiolipin (cardiolipin)
CoQ	koenzym Q (coenzyme Q)
cyt c	cytochrom c (cytochrome c)
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DQA	dequalinium
Drp	protein příbuzný dynaminu (dynamin related protein)
ETC	elektronový transportní řetězec (electron transport chain)
FADH ₂	flavinadenindinukleotid (flavinadenindinucleotide)
GDH	glutamátdehydrogenáza (glutamate dehydrogenase)
GLS	glutamináza (glutaminase)
GS	gramicidin S
GSH	redukováná forma glutathionu
GTP	guanosintrifosfát (guanosine triphosphate)
HIF	hypoxií indukovaný faktor (hypoxia inducible factor)
HK	hexokináza (hexokinase)
HTRA2	protein A2 s vysokoteplotním požadavkem (high temperature requirement protein A2)
IDH	isocitrátdehydrogenáza (isocitrate dehydrogenase)
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (inner mitochondrial membrane)
IMS	mezimembránový prostor (intermembrane space)

MMP	mitochondriální membránový potenciál (mitochondrial membrane potential)
MPC	mitochondriální pyruvátový nosič (mitochondrial pyruvate carrier)
mPTP	mitochondriální pór přechodné permeability (mitochondrial permeability transition pore)
mtDNA	mitochondriální DNA (mitochondrial DNA)
mTOR	savčí cíl rapamycinu (mammalian target of rapamycin)
mTORC	savčí cíl rapamycinu komplex (mammalian target of rapamycin complex)
NADH	nikotinamidadenin dinukleotid (nicotinamidadenin dinucleotide)
např.	například
OMM	vnější mitochondriální membrána (outer mitochondrial membrane)
OPA	optická atrofie (optic atrophy)
OXPHOS	oxidativní fosforylace (oxidative phosphorylation)
PD	Parkinsonova choroba (Parkinson's disease)
PFK	fosfofruktokináza (phosphofructokinase)
PGC	koaktivátor receptoru γ aktivovaného peroxisomovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator)
PI3K/Akt	fosfatidylinositol-3-kináza/proteinkináza B (phosphatidylinositol 3-kinase/ protein kinase B)
PK	pyruvátkináza (pyruvate kinase)
PTEN	homolog fosfatázy a tenzinu (phosphatase and tensin homolog)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SHMT	serinhydroxymethyltransferáza (serine hydroxymethyltransferase)
SOD	superoxiddismutáza (superoxid dismutase)
SS peptidy	Szeto-Schiller peptidy (Szeto-Schiller peptides)
TNF	tumor nekrotický faktor (tumor necrosis factor)
TPP	trifenylfosfonium (triphenylphosphonium)

Úvod

Název „mitochondrie“ pochází z řeckého mitos – nit', vlákno a chondrion – granule, zrno. První snímky vnitřní struktury těchto organel byly pořízeny pomocí transmisního elektronového mikroskopu. Elektronová tomografie, využívající elektronové mikroskopy s urychlovacím napětím a algoritmy pro rekonstrukci obrazu, poskytla trojrozměrné obrazy mitochondrií. Mitochondrie jsou klíčové organely, které plní základní funkce v buňkách a hrají důležitou roli v signalizaci vedoucí k buněčné smrti a v signalizaci pro přežití.

Hodně strategií pro mitochondriální cílení využívá silně lipofilní vlastnosti a vysoký negativní potenciál vnitřní mitochondriální membrány. Vědci vyvinuli řadu přípravků cílící na mitochondrie, jako jsou trifenylfosfoniové soli, peptidy pronikající do mitochondrií, lipozomy, polymerní a anorganické nanočástice.

Změny struktury mitochondrií, často doprovázené inkluzemi nebo agregáty v mitochondriální matrix, jsou příčinou celé řady závažných onemocnění a jsou spojovány se stárnutím organismu. Mitochondrie tedy představují atraktivní cíl léčby mnoho mitochondriálních metabolických chorob, jako jsou neurodegenerativní a onkologická onemocnění. Pro zlepšení terapeutických vlivů a snížení nežádoucích účinků léčiv se mnoho vědců začalo zajímat o cílení na subcelulární organely, zejména na mitochondrie. V roce 1900 začal zájem o látky cílené do mitochondrií a v roce 1960 se studie rychle rozvíjely díky vývoji elektronové mikroskopie a sond.

1. Mitochondrie

Přibližně před 2 miliardami let se vyvinula mitochondrie z α -proteobakterie, která byla pohlcena předchůdcem eukaryotické buňky (*Friedman and Nunnari, 2014*) a vznikl u nich endosymbiotický vztah (*Navdeep, 2015*). Na objevu mitochondrií se podíleli Rudolf Albert von Kölliker, Richard Altmann a Carl Benda (*Hand, 2019*). V roce 1857 Kölliker popsal mitochondrie ve svalových buňkách jako nápadná granula nacházející se mezi myofibrilami (*VanMeter and Hubert, 2016*). V roce 1898 Benda pro tyto struktury zavedl termín mitochondrie (*Hand, 2019*).

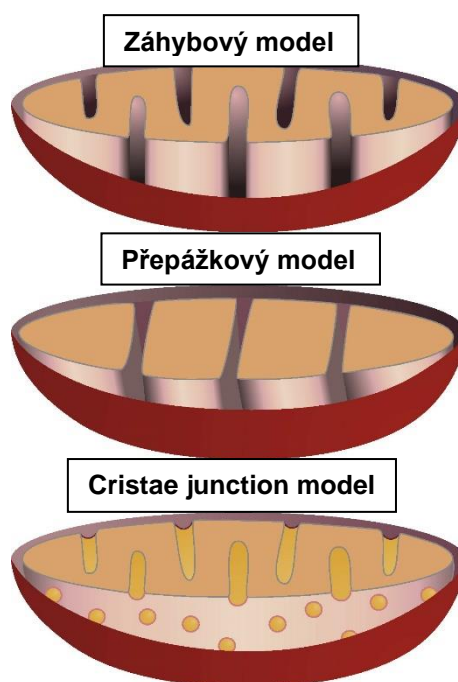
Mitochondrie jsou cytoplazmatické organely zděděné po matce (*Zong et al., 2016*). Patří mezi semiautonomní organely obsahující svou vlastní kruhovou mitochondriální deoxyribonukleovou kyselinu (mtDNA) (*Xu et al., 2013*), která se může replikovat nezávisle na jaderné DNA (*Battogtokh et al., 2018*). mtDNA obsahuje 2 geny pro ribozomální ribonukleovou kyselinu (RNA), 22 genů pro transferovou RNA a 13 genů pro mediátorovou RNA, která kóduje mitochondriální proteiny (*Xu et al., 2013*). Proto jsou mitochondrie částečně nezávislé na buňce (*Bourne, 1970*), i když nejsou schopny syntetizovat většinu zbylých mitochondriálních proteinů, které jsou kódovány geny v jádře (*Zong et al., 2016*). Komunikace mezi mitochondriemi a jádrem je označována jako retrogradní signalizace (*Xu et al., 2013*).

Tvar, velikost a počet mitochondrií v buňce se velmi liší (*Battogtokh et al., 2018*). Mitochondrie jsou vysoce dynamické organely a rovnováha mezi dělením a fúzí určuje jejich tvar. Mitochondrie se vyskytují buď jako síť tubulů nebo jako jednotlivá granula v závislosti na stavu buňky, mitochondriálním metabolismu, fázi respirace a mechanismu dělení/fúze. Mitochondriální morfologie ovlivňuje vnímavost k mitofagii a apoptóze vyvolané oxidačním stresem. (*Vyas et al., 2016*). Mitochondrie mají šířku 0,5-1 μm a mohou dosahovat délky až 10 μm (*Vajner et al., 2014*). Nacházejí se téměř ve všech eukaryotických buňkách, ale počet mitochondrií v buňce závisí na jejich specifických energetických požadavcích, které se mohou lišit v závislosti na typu buňky, fázi buněčného cyklu, stavu proliferace a dysfunkčním onemocnění. Různé metabolicky aktivní orgány, jako jsou játra, mozek, myokard a kosterní svalovina, obsahují v buňkách až několik tisíc mitochondrií, zatímco tkáň s nízkými energetickými nároky obsahuje jen několik desítek mitochondrií. Mitochondrie mohou zaujímat až 40 % objemu buňky (*Battogtokh et al., 2018*) a jsou často v těsné blízkosti endoplazmatického retikula (*Bottje, 2019*).

1.1 Struktura mitochondrií

Mitochondrie mají typickou strukturu, která se skládá ze 4 částí vykonávající specifické funkce: vnější mitochondriální membrána (OMM), mezimembránový prostor (IMS), vnitřní mitochondriální membrána (IMM) a mitochondriální matrix (obrázek 3) (*Frantz and Wipf, 2010*). OMM je tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou, zatímco IMM má velmi složitý tvar a vytváří záhyby, označované jako krysty, které značně zvětšují její povrch (*Bottje, 2019*). IMS je oblast mezi OMM a IMM (*Ghochani et al., 2010*). Mitochondriální matrix je prostor uzavřený IMM a je tvořen hustou hmotou obsahující většinu mitochondriálních proteinů (*Mannella, 2006*).

Existuje několik modelů uspořádání IMM (obrázek 1), z nichž nejstarší je „baffle“ (Paladeho, záhybový) model, podle kterého invaginace IMM tvoří krysty. Dalším typem je „septa“ (přepážkový) model, ve kterém jsou krysty rozprostřeny napříč mitochondriální matrix jako septa, která ji rozdělují na několik oddílů, díky čemuž je zvětšený povrch IMM a tím zvýšená kapacita oxidativní fosforylace (OXPHOS) (*Zick et al., 2009*). Současný pohled na strukturu mitochondrií zásluhou elektronové tomografie představuje cristae junction model, ve kterém se IMM skládá ze dvou funkčně odlišných komponent. Jedna kopíruje OMM a lze ji označit jako vnitřní hraniční membránu. Zbývající část tvoří krysty a mezi těmito dvěma membránovými doménami se nacházejí úzké tubulární spoje tzv. „cristae junctions“ (*Ghochani et al., 2010*) o průměru 12-40 nm (*Zick et al., 2009*). Vnější a vnitřní faktory ovlivňující topologii IMM zahrnují spontánní zakřivení membrány, mitochondriální dynamiku, vazbu na jiné složky membrány, jako jsou membránové proteiny se schopností se ohýbat a cytoskeletální vlákna, dokonce i další membrány. Na tvar IMM má hlavní vliv interakce s OMM (*Mannella, 2006*), ale také se na něm podílí kardiolipin (CL), což je kyselý fosfolipid nacházející se výhradně v IMM (*Zick et al., 2009*).



Obrázek 1: Modely topologie vnitřní mitochondriální membrány (upraveno dle Zick et al., 2009).

Kristy nejsou jen tak náhodné záhyby, ale jsou to spíše důležité kompartmenty mitochondrií (Mannella, 2006). Existují značné rozdíly v počtu a tvaru krist. Orgány s vysokými požadavky na energii obsahují mitochondrie s vyšším počtem krist (John et al, 2005). Kristy mohou mít lamelární, tubulární nebo trojúhelníkový tvar (Zick et al., 2009), který v závislosti na regulaci zúčastněných proteinů ovlivňuje míru produkce adenosintrifosfátu (ATP), která souvisí s plochou IMM (Ghochani et al., 2010). Co se týče morfologie mitochondrií, existují 2 stavy – ortodoxní a kondenzovaný. U ortodoxního stavu se vyskytuje zvětšený prostor mitochondriální matrix a malý počet krist. Pro kondenzovaný stav je charakteristické zhutnění mitochondriální matrix a zvětšená vnitřní plocha krist. Vzájemné přeměny těchto dvou stavů lze dosáhnout pouze díky IMM, u které dochází k fúzi a štěpení. U mitochondriální matrix je komprese doprovázena fúzí jednotlivých krist do větších celků, zatímco expanze vyžaduje štěpení velkých cisteren na jednotlivé tubuly nebo lamely a během bobtnání dochází k postupnému vymizení krist, prasknutí OMM, a posléze vylití vnitřního obsahu do okolí (Mannella, 2006). Mezi faktory ovlivňující strukturu krist patří mitofilin (John et al, 2005), což je integrální protein IMM, a ATP-syntáza (Zick et al., 2009).

1.2 Dynamická rovnováha

Buňky moduluji mitochondriální funkce pomocí biogeneze a degradace, fúzních a štěpných událostí tak, aby se splnily požadavky různých typů buněk a tkání (Xu *et al.*, 2013). Biogeneze mitochondrií je regulována transkripčními programy koordinujícími expresi mitochondriálních a jaderných genů, které kódují mitochondriální proteiny (Vyas *et al.*, 2016). Transkripční regulátory mitochondriální biogeneze zahrnují jaderné transkripční faktory, kam patří jaderný respirační faktor 1 a 2, estrogenový receptor 1; dále kofaktory, kam náleží koaktivátor $1\alpha/\beta$ receptoru γ aktivovaného peroxisomovými proliferátory (PGC- $1\alpha/\beta$), související protein s PGC-1; jakož i jaderně kódované asemblační faktory uplatňující se v sestavování komplexů dýchacího řetězce (Xu *et al.*, 2013). PGC- 1α je hlavním regulátorem, který je charakteristický svou schopností interagovat s transkripčními faktory (Vyas *et al.*, 2016). Nejdůležitějšími regulátory replikace mtDNA jsou jaderně kódovaná DNA polymeráza (katalytická podjednotka polymerázy γ nebo pomocná podjednotka polymerázy γ) a mitochondriální transkripční faktor A (Xu *et al.*, 2013). Poškozené či nadbytečné mitochondrie jsou eliminovány selektivní autofagickou degradací zvanou mitofagie (Zong *et al.*, 2016). Kromě toho mitochondrie neustále podstupují dělení a fúzi (Xu *et al.*, 2013). Kritickými momenty při zaškrcování mitochondriální membrány jsou lokalizace proteinu příbuzného dynaminu 1 (Drp1), který je poháněn guanosintrifosfátem (GTP), do mitochondrie a interakce s receptory OMM, což vede k zúžení mitochondrie. Mitochondriální translokace a aktivita Drp1 je regulována fosforylací zprostředkovanou několika různými kinázami, které reagují na odlišné podmínky buněčného cyklu a stresu. Mitofusiny 1 a 2 spolu s genem optická atrofie 1 (OPA1) řídí fúzi mitochondrií (Vyas *et al.*, 2016). Regulátory dynamiky mitochondrií jsou spojené s transdukcí signálu, která spadá do buněčné signalizace (Navdeep, 2015). Mitochondriální dynamika má zásadní úlohu při zachování funkce a kontrole kvality mitochondrií (Xu *et al.*, 2013).

1.3 Funkce mitochondrií

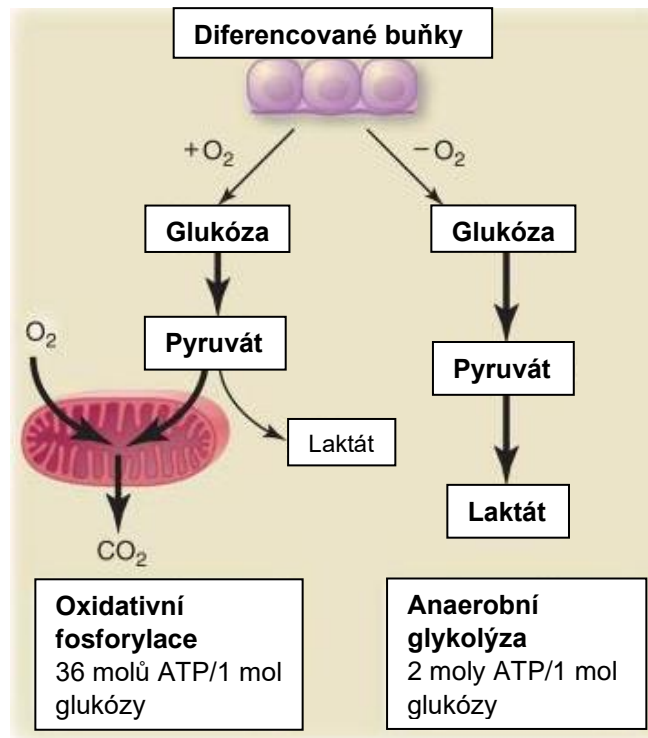
Mitochondrie hrají významnou úlohu v energetickém metabolismu a programované buněčné smrti. Mezi dobře charakterizované funkce patří homeostáza vápníku, redoxní rovnováha (Battogtokh *et al.*, 2018) a tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) (Vyas *et al.*, 2016). Mitochondrie jsou také místem hlavních metabolických drah intermediárního metabolismu, jako je β -oxidace mastných kyselin, dále biosyntéza steroidů (Xu *et al.*, 2013), železo-sírných center a hemu (Navdeep, 2015). Specifické role

jednotlivých částí mitochondrie jsou propojeny (*Battogtokh et al., 2018*), dělají z ní důležitý senzor buněčné smrti a umožňují adaptaci buněk na prostředí (*Vyas et al., 2016*).

OMM tvoří „lešení“, které má význam při signalizaci vedoucí zejména k imunitní odpovědi a buněčné smrti. Prostor mezi OMM a endoplazmatickým retikulem se označuje jako membrány asociované s mitochondriemi účastníci se buněčné signalizace (*Navdeep, 2015*).

1.3.1 Produkce buněčné energie

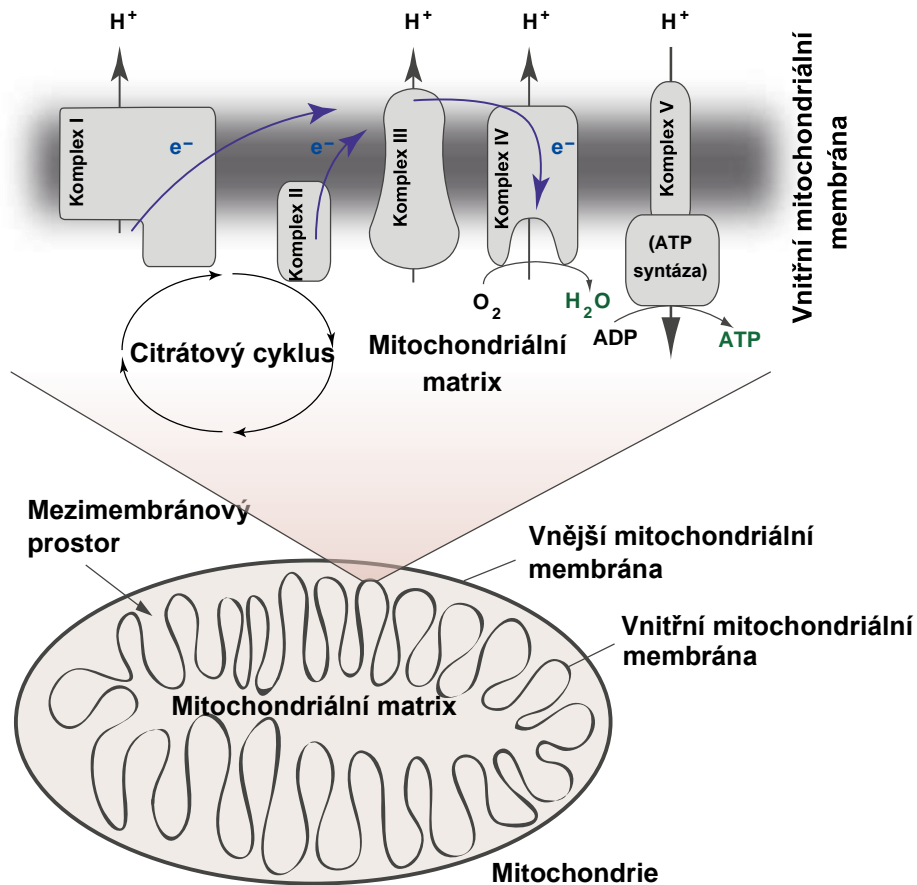
Mitochondrie využívají glukózu, mastné kyseliny, aminokyseliny a další buněčné materiály k syntéze ATP, který je zdrojem energie pro buňky (*Battogtokh et al., 2018*) a pokrývá zhruba 90 % energetických potřeb (*Bottje, 2019*). ATP se získává prostřednictvím biochemických procesů, jako je glykolýza, β -oxidace, citrátový (Krebsův) cyklus a dýchací řetězec (*Battogtokh et al., 2018*). Za přítomnosti kyslíku, finálního akceptoru elektronů, diferencované buňky přednostně metabolizují glukózu na pyruvát, což je meziprodukt glykolýzy (*Heiden et al., 2010*). Pyruvát je importován do mitochondrií (*Navdeep, 2015*) a následně oxidativně dekarboxylován na acetylkoenzym A (acetyl-CoA) (*Krejčíř et al., 2018*). Vzniklý acetyl-CoA vstupuje do citrátového cyklu (*Zong et al., 2016*), kde je přeměněn na oxid uhličitý (*Heiden et al., 2010*), přičemž se produkují redukované koenzymy, nikotinamidadeninukleotid (NADH) a flavinadeninukleotid (FADH₂), které přenáší redukční ekvivalenty do dýchacího řetězce (*Zong et al., 2016*). Tyto přenašeče zvyšují výrobu ATP v procesu OXPHOS, což je spojeno s nízkou tvorbou laktátu. Během anaerobní glykolýzy diferencované buňky tvoří malý podíl ATP a velké množství laktátu. OXPHOS poskytuje až 36 molekul ATP po úplné oxidaci jedné molekuly glukózy, zatímco při anaerobní glykolýze vznikají pouze 2 molekuly ATP z jedné molekuly glukózy (obrázek 2) (*Heiden et al., 2010*).



Obrázek 2: Schematické znázornění rozdílů mezi oxidativní fosforylací a anaerobní glykolýzou. ATP – adenosintrifosfát (adenosine triphosphate) (upraveno dle *Heiden et al., 2010*).

Dýchací řetězec se skládá z elektronového transportního řetězce (ETC) a OXPHOS. Probíhá v IMM a sestává ze čtyř enzymových komplexů ETC, což zahrnuje komplex I (NADH:ubichinon-reduktáza), komplex II (sukcinátdehydrogenáza), komplex III (cytochrom c-oxidoreduktáza) a komplex IV (cytochrom c-oxidáza), a z komplexu V (ATP-syntáza) pro OXPHOS (*Wallace, 2007*). ETC také obsahuje dva mobilní přenašeče elektronů, ubichinon (koenzym Q, CoQ) a cytochrom c (cyt c). Proces vzniku ATP začíná vstupem elektronů do ETC (*Bottje, 2019*). Elektrony z NADH jsou přenášeny na komplex I a elektrony ze sukcinátu jsou přiváděny na komplex II, kde dochází k oxidaci sukcinátu na fumarát za vzniku FADH₂ (*Wallace, 2007*), což je součástí citrátového cyklu probíhajícího v mitochondriální matrix (*Friedman and Nunnari, 2014*). CoQ předává elektrony z komplexů I a II na komplex III (*Bottje, 2019*). Předáním prvního elektronu od komplexu vzniká semichinon, ten je po přijetí druhého elektronu redukován až na ubichinol, který přenáší tyto dva elektrony na komplex III. Zatímco redukováný cyt c (*Wallace, 2007*), dokáže transportovat pouze jeden elektron z komplexu III na komplex IV (*Bottje, 2019*), kde čtyři elektrony redukují molekulu kyslíku za vzniku dvou molekul vody. Energie uvolněná při přenosu elektronů na kyslík se využívá k pumpování protonů přes komplexy I, III a IV (*Wallace, 2007*) z mitochondriální matrix do IMS (*Bottje, 2019*),

čímž se vytváří elektrochemický protonový gradient. Potenciální energie uložená v tomto gradientu je následně využita především k pohonu ATP-syntázy, která katalyzuje produkci ATP z adenosindifosfátu a fosfátu (Wallace, 2007), protože protony proudí zpět do mitochondriální matrix skrz tento enzym (obrázek 3) (Bottje, 2019).



Obrázek 3: Struktura mitochondrie a dýchací řetězec. Modré šipky znázorňují pohyb elektronů (e^-) a černé šipky zobrazují transport protonů (H^+) přes vnitřní mitochondriální membránu, zeleně jsou vyznačeny koncové produkty reakcí. ADP – adenosindifosfát (adenosine diphosphate), ATP – adenosintrifosfát (adenosine triphosphate) (upraveno dle Rohlenová *et al.*, 2017).

1.3.2 Apoptóza

Apoptóza je jedna z forem programované buněčné smrti (Zick *et al.*, 2009), která může být indukována dvěma hlavními apoptotickými drahami, vnější (receptorovou) a vnitřní (mitochondriální), které jsou navzájem propojeny a ovlivňují se (Elmore, 2007).

Apoptóza na úrovni mitochondrií může být vyvolána řadou podnětů, jako je kolaps mitochondriálního membránového potenciálu (MMP), otok mitochondrií nebo otevření mitochondriálních pórů přechodné permeability (Battogtokh *et al.*, 2018). Na její regulaci se podílí proteiny Bcl-2 rodiny, které se dělí na proapoptotické a antiapoptotické (Zick

et al., 2009). Například proapoptotická skupina zahrnuje Bax a Bak, do antiapoptotické skupiny se řadí Bcl-2 a Bcl-xL (*Vyas et al.*, 2016). Pokud dojde k dostatečné expresi proapoptotických proteinů označovaných jako BH3-only, antiapoptotické proteiny jsou vyvázány z interakce s proteiny proapoptotickými (*Krejčíř et al.*, 2018), které při vazbě na OMM oligomerizují a způsobují permeabilizaci OMM, což vede ke vzniku pórů v OMM (*Vyas et al.*, 2016) s následným uvolněním cyt c a dalších apoptotických faktorů (*Battogtokh et al.*, 2018) z IMS do cytosolu (*Vyas et al.*, 2016). Tyto uvolněné proteiny aktivují mitochondriální dráhy (*Battogtokh et al.*, 2018) závislé na kaspázách (cyt c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2) i nezávislé na kaspázách (faktor indukující apoptózu, endonukleáza G) (*Zick et al.*, 2009).

Během apoptózy dochází k remodelaci krist, což usnadňuje redistribuci cyt c do IMS. Mezi regulátory remodelace krist patří proteiny OPA1, což je dynaminu podobná GTPáza, dále prohibitin, který tvoří velké oligomerní komplexy podobné kruhu a řídí zpracování OPA1, a mitofilin, který je součástí velkého multipodjednotkového komplexu (*Zick et al.*, 2009).

1.3.3 Nekroptóza

Mitochondrie jsou vyloučeny z buněk podstupujících nekroptózu, což je forma programované nekrózy. Nekroptóza je indukována vazbou ligandů smrti, jako je tumor nekrotický faktor α (TNF α), na receptory smrti, jako je Fas nebo TNF receptor. Je závislá na kinázách receptor interagující protein 1/3. Jedná se o aktivní proces, tedy neporušené mitochondrie mají úlohu v signalizaci mezi buňkami umírajícími a imunitního systému (*Maeda and Fadeel*, 2014), konkrétně vrozené imunity (*Zong et al.*, 2016). Traumata, HIV/AIDS, autoimunitní a onkologická onemocnění (*Ingelsson et al.*, 2018) vedou k uvolnění molekulárních vzorů asociovaných s poškozením mitochondriálního původu, jako je mtDNA a formylované peptidy, do krevního oběhu. Tyto molekuly jsou rozeznávány receptory pro rozpoznávání vzorů, aktivují složky vrozené imunity a iniciují sepsi, tedy systémovou zánětlivou odpověď (*Zhang et al.*, 2010). Dendritické buňky a makrofágy, což jsou antigen prezentující buňky, dokážou pohltit mitochondrie uvolněné z nekrotických buněk. Po rozpoznání signálu nebezpečí dochází k maturaci dendritických buněk a produkci cytokinů makrofágy. Drp1 způsobuje fragmentaci mitochondrií (*Maeda and Fadeel*, 2014).

1.3.4 Homeostáza iontů vápníku

Vápenaté ionty hrají důležitou úlohu v celé řadě buněčných procesů (*Fonteriz et al., 2010*), jako je migrace, transkripce, svalová kontrakce a exocytóza. Na vstupu vápníku do buňky se podílejí kanály, pumpy a přenašeče (*Bootman, 2012*). Většina buněk primárně používá pufrování vápenatých iontů v mitochondriích k regulaci koncentrace intracelulárního vápníku, na které se podílejí různé mechanismy (*Hacker and Medler, 2008*). Existují proteiny, které na sebe přímo vážou vápník nebo jsou ovlivňovány vápenatými ionty nepřímo. Patří sem kinázy, fosfatázy, transkripční faktory, jako je jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů, a kalmodulin, což je protein vázající vápník a vyznačuje se především svou všudypřítomností v buňkách (*Bootman, 2012*).

1.3.5 Reaktivní formy kyslíku

ROS vznikají jako meziprodukty redukce kyslíku na vodu a zahrnují superoxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál (OH^\bullet) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) (*Battogtokh et al., 2018*). Mitochondrie jsou hlavním zdrojem ROS, které jsou generovány jako vedlejší produkty (*Frantz and Wipf, 2010*) aerobního metabolismu (*Bottje, 2019*), a zajišťují ochranu buněk před toxickými účinky ROS (*Vyas et al., 2016*), tím i před oxidačním stresem (*Bottje, 2019*) pomocí antioxidačních systémů (*Vyas et al., 2016*). Díky tvorbě ROS a antioxidantů mitochondrie slouží jako senzor a regulátor redoxního stavu buňky. Nízké hladiny ROS jsou zapojeny do systému signální transdukce, která je životně důležitá pro funkci buněk. Místo produkce ROS může určovat, zda ROS primárně způsobují oxidační poškození nebo aktivaci signální dráhy. Bylo identifikováno alespoň jedenáct míst schopných generovat ROS, mezi nejvýznamnější patří komplexy I a III (*Bottje, 2019*). Mitochondrie v srdeční svalovině a v plicích vytvářejí superoxidy především na komplexu III, zatímco mitochondrie v mozkové tkáni produkují superoxidy hlavně na komplexu I (*Wang et al., 2017*). Nadměrná produkce ROS může vést k buněčné smrti (*Zong et al., 2016*). Pozoruhodným zjištěním je, že krátkodobý oxidační stres iniciuje mitochondriální signalizaci, která spustí adaptivní reakci vyvolávající následný proces nazývaný jako mitohormesis (*Navdeep, 2015*).

2. Transport látek přes biologické membrány

Cytoplazmatická membrána představuje selektivní bariéru mezi extracelulárním a intracelulárním prostředím. Permeabilita membrány zajišťuje, že živiny, jako jsou sacharidy, proteiny a lipidy, snadno vstupují do buňky, metabolické meziproducty zůstávají v buňce a odpadní látky jsou vylučovány z buňky. Selektivní propustnost membrány umožňuje zachovat stálost vnitřního prostředí čili homeostázu. Fosfolipidová dvojvrstva, základní stavební kámen biomembrán (*Lodish et al., 2000*), má tloušťku několik nanometrů (*Ghochani et al., 2010*) a je téměř nepropustná pro většinu ve vodě rozpustných látek, jako je glukóza a aminokyseliny, a nepropustná pro ionty. Přenos těchto látek a iontů skrz buněčnou membránu je zprostředkovaný transportními proteiny, které jsou specifické pro určitý typ molekul nebo iontů.

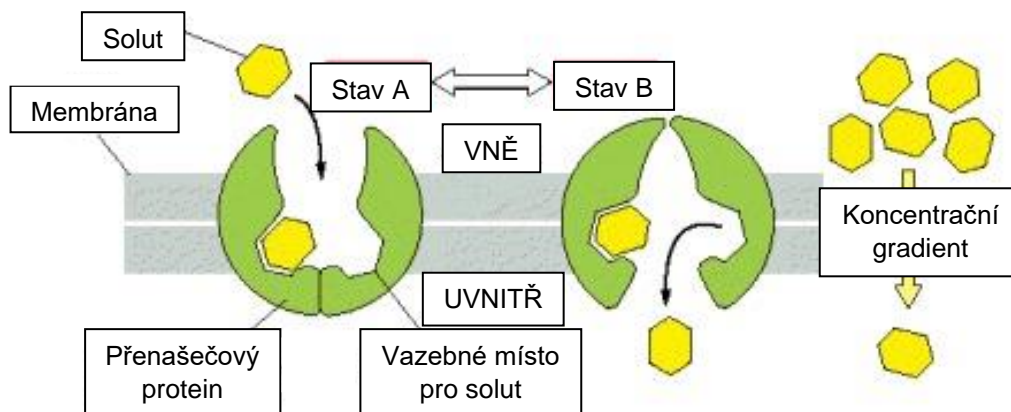
Buněčné orgány jsou rovněž ohraničeny membránou, která odděluje jejich vnitřní prostředí od cytosolu a jsou v ní zanořeny unikátní transportní proteiny (*Lodish et al., 2000*).

2.1 Pasivní transport

Prostá difuze je nejjednodušší způsob transportu látek přes biologickou membránu. Během tohoto samovolného procesu jakákoliv látka, která se snadno rozpouští ve fosfolipidové dvojvrstvě, prochází na druhou stranu membrány. Při průchodu nefigurují žádné transportní proteiny a směr do buňky nebo z buňky závisí na koncentraci látky vně a uvnitř buňky. Transportované látky se pohybují ve směru koncentračního gradientu, z místa s vyšší do místa s nižší koncentrací dané látky. Plyny (O_2 , CO_2), nepolární látky (benzen) a malé nenabitě polární molekuly (voda, ethanol) se snadno rozpouštějí ve fosfolipidové dvojvrstvě, a proto rychle difundují. Naopak větší nenabitě polární molekuly (glukóza), ionty (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Cl^-) a nabitě molekuly (aminokyseliny) bez ohledu na jejich velikost nemohou volně procházet přes membránu prostou difuzí (*Cooper, 2000*).

Usnadněná (facilitovaná) difuze nevyžaduje přísun energie. Látky se pohybují přes membránu ve směru koncentračního spádu (gradientu). U iontů je však tento pohyb ještě ovlivněn jejich nábojem a membránovým potenciálem, což je rozdíl mezi elektrickým potenciálem jedné a druhé strany membrány, transport tedy probíhá ve směru elektrochemického gradientu. Usnadněná difuze se uplatňuje u velkých polárních molekul, jako jsou sacharidy, aminokyseliny, nukleotidy, či nabitých iontů. Na rozdíl od prosté difuze jsou využívány specifické proteiny, které umožňují průchod

látek membránou bez nutnosti přímého kontaktu s hydrofobní částí fosfolipidové dvojvrstvy. Obecně membránové transportní proteiny se dělí na dva typy, přenašečové a kanálové. Přenašeče transportují látky z jedné strany membrány na druhou tak, že je na sebe navážou (Cooper, 2000). Tyto proteiny obsahují jedno nebo více vazebných míst pro přenášenou látku (Alberts et al., 2002). Po vazbě látky na přenašeč dochází k reverzibilní konformační změně proteinu, což umožňuje přenos látky na druhou stranu membrány, kde je uvolněna (obrázek 4) (Cooper, 2000).



Obrázek 4: Usnadněná difuze rozpuštěné látky (solutu) zprostředkovaná přenašečovým proteinem. Přenašeč se vyskytuje ve dvou konformacích: stav A – vazebné místo pro solut je na vnější straně membrány, stav B – vazebné místo pro solut je na vnitřní straně membrány (upraveno dle Alberts et al., 2002).

Naproti tomu kanálové proteiny vytvářejí v membráně úzké hydrofilní póry, kterými mohou difundovat rozpuštěné látky, především anorganické ionty, proto nesou též označení iontové kanály. Póry v membráně musí být dostatečně úzké, aby kanálem prošly pouze ionty vybrané velikosti a náboje, jako jsou Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Cl^- . Transport je velmi rychlý a selektivní. Jedním otevřeným iontovým kanálem proteče více než milion iontů za sekundu, rychlost transportu přes kanálové proteiny je až tisíckrát vyšší než pomocí přenašečových proteinů. Většina iontových kanálů není stále otevřená, ale je uzavíratelná. Jejich otevírání a zavírání je regulováno specifickými receptory, které mohou být aktivovány několika různými podněty. Ligandem řízené kanály se otevírají nebo zavírají po navázání neurotransmiteru nebo jiné signální molekuly (ligandu) na receptor, napětově řízené kanály se otevírají nebo zavírají změnou membránového potenciálu (Cooper, 2000).

Osmóza je specifická forma difuze. Osmotický gradient zajišťuje pohyb molekul vody z místa s nižší koncentrací rozpuštěných látek (vysoká koncentrace vody,

hypotonické prostředí) do místa s vyšší koncentrací (nízká koncentrace vody, hypertonické prostředí) přes semipermeabilní membránu, která je propustná pro vodu ale ne pro rozpuštěné látky (*Chen and Lui, 2020*). Pokud je buňka umístěna do hypotonického roztoku, dochází k přesunu vody z okolního prostředí do buňky, což způsobuje její bobtnání a může dojít až k prasknutí (lýze). Naopak v hypertonickém roztoku buňka ztrácí vodu do vnějšího prostředí, její objem se zmenšuje a dochází k jejímu smrštění. Většina buněk obsahuje v cytoplazmatické membráně specializované proteinové vodní kanály, které usnadňují transport vody, zvané aquaporiny (*Alberts et al., 2002*).

2.2 Aktivní transport

Určité molekuly se pohybují skrz membránu proti jejich koncentračnímu gradientu (*Cooper, 2000*), tedy z místa nižší koncentrace do místa vyšší koncentrace solutů, což vyžaduje dodání energie. Aktivní transport se dělí na primární a sekundární (*Chen and Lui, 2020*). Uniport je přenos pouze jednoho typu částic, molekul či iontů. Kdežto kotransport je sprážený transport dvou a více částic, který se podle vzájemného směru transportovaných látek dělí na symport, kdy jsou látky přenášeny stejným směrem, a antiport, jestliže probíhá směrem opačným (*Cooper, 2000*).

Primární aktivní transport přímo využívá energii ve formě ATP (*Chen and Lui, 2020*). Membrána je prostoupena iontovými pumpami, které jsou poháněny energií získanou hydrolýzou ATP (*Cooper, 2000*). Tento typ transportu se podílí především na přenosu iontů kovů, jako je Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} (*Chen and Lui, 2020*). Příkladem protonové pumpy je ATP-syntáza, která umožňuje přesun protonů přes IMM (*Cooper, 2000*) ve směru jejich gradientu, který se využívá k syntéze ATP (*Alberts et al., 2002*). ATP-vázající kazetové (ABC) transportéry představují největší rodinu membránových proteinů a skládají se ze čtyř podjednotek. Dvou transmembránových domén (*Cooper, 2000*), z nichž každá je tvořena šesti α -šroubovicemi (*Alberts et al., 2002*), lokalizovaných v membráně a dvou nukleotid vázajících domén nacházejících se v cytoplazmě. Například ABC transportéry spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí obsahují dvanáct transmembránových segmentů (α helixů) a dva helixy, které nesou vazebná místa pro ATP (*Cooper, 2000*). ABC transportéry vytvářejí dimery v oblasti nukleotid vázajících domén, na kterých dochází k hydrolýze ATP za uvolnění energie využívané k transportu substrátů, mezi které patří anorganické ionty, sacharidy, aminokyseliny, peptidy a dokonce proteiny. K přenosu lipidů nebo obecně hydrofobních

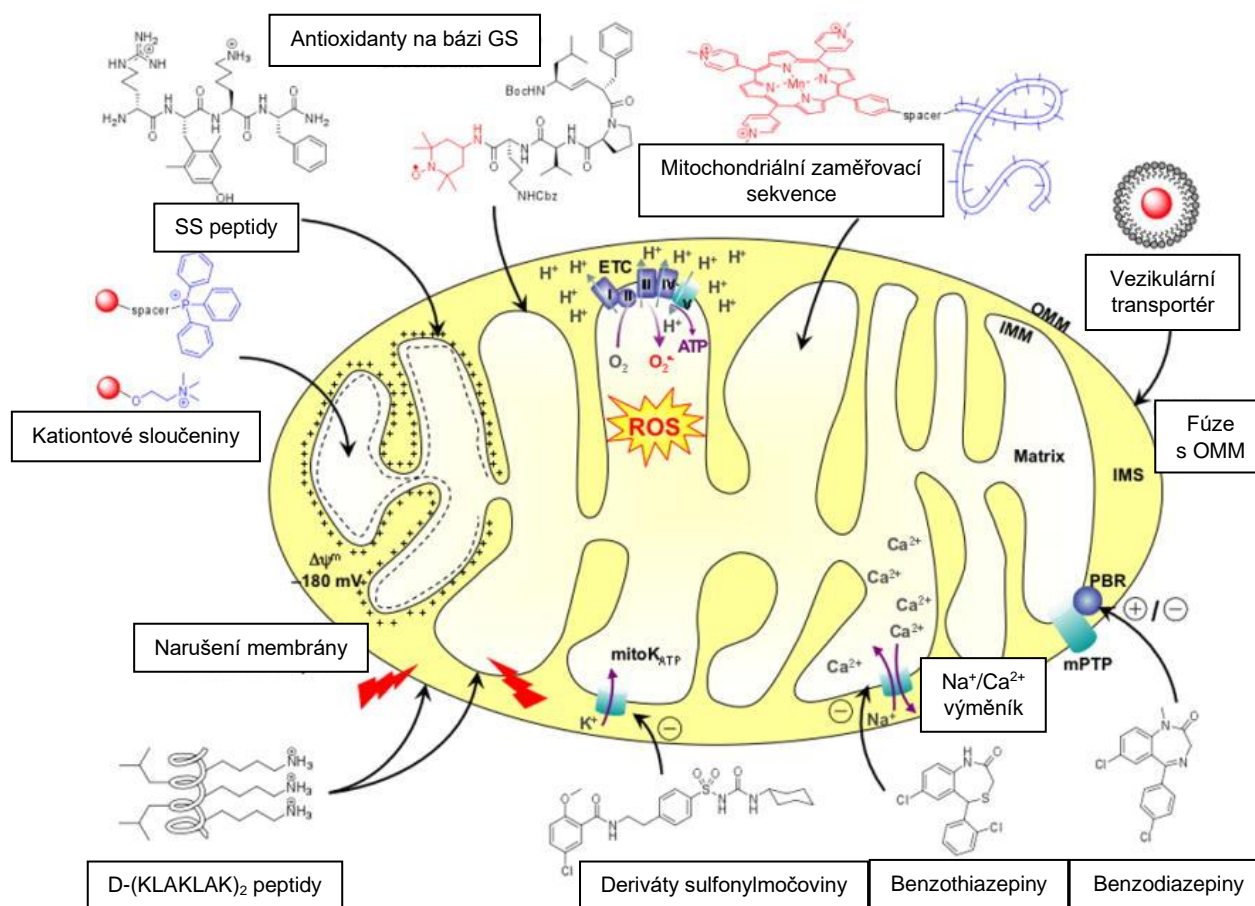
molekul vazebná místa ABC transportérů se musí nacházet na vnějším povrchu, který je v kontaktu s hydrofobním vnitřkem fosfolipidové dvojvrstvy (*Alberts et al., 2002*).

Sekundární aktivní transport nepřímo spotřebovává energii uloženou v elektrochemickém gradientu, který je vytvořený transportem (*Chen and Lui, 2020*) obvykle iontů (*Alberts et al., 2002*) po směru koncentračního spádu (*Cooper, 2000*).

3. Strategie působení sloučenin cílících na mitochondrie

Zatímco OMM je poměrně dobře propustná díky velkému množství proteinů aniontových kanálů závislých na napětí (poriny), naopak IMM je vysoce selektivní a funguje jako hlavní bariéra pro malé molekuly. IMM obsahuje CL a udržuje uvnitř mitochondrie negativní potenciál (*Frantz and Wipf, 2010*). Existují dva základní typy strategií pro mitochondriální cílení, a to přímá konjugace funkční skupiny s léčivem a nanonosiče, na jejichž povrchu je funkční skupina pro navázání léčiva. Výhodou přímé konjugace je velmi specifická lokalizace terapeutické sloučeniny do mitochondrií, což způsobí rychlou reakci při podání určitých skupin léků (*Battogtokh et al., 2018*). Cílení může být založeno na afinitě látek ke komponentám mitochondriálních membrán, zejména k CL. K dosažení cíleného obohacení mitochondriálních kompartmentů o látku je nutná také dostatečná lipofilita (*Frantz and Wipf, 2010*).

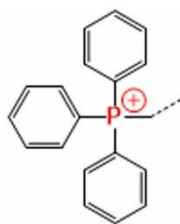
Kationtové sloučeniny (látky s připojením skupiny trifenylofosfonia (TPP), estery cholinu, Szeto-Schiller (SS) peptidy) jsou přitahovány elektronegativním prostředím mitochondrií způsobeným membránovým potenciálem na IMM a hromadí se v mitochondriální matrix. Mitochondriální zaměřovací sekvence lze použít jako vehikula pro dodávání látek do mitochondriální matrix. Případně látku je možno zapouzdřit do vezikul, které podléhají fúzi s OMM. Mohou mít antioxidační nebo prooxidační účinky. Dále mohou být zaměřené na specifické mitochondriální proteiny. Například deriváty sulfonylmočoviny blokují mitochondriální ATP senzitivní draslíkové kanály (mitoK_{ATP}), benzothiazepiny jsou inhibitory sodno-vápenatých výměníků a benzodiazepiny působí jako agonisté nebo antagonisté periferních benzodiazepinových receptorů (obrázek 5) (*Frantz and Wipf, 2010*). Nanočástice umožňují dodání látky do mitochondrií, k čemuž dochází na základě strategií zahrnujících delokalizované lipofilní kationty, peptidy pronikající do mitochondrií a „stroje“ pro import mitochondriálních proteinů (*Wang et al., 2017*).



Obrázek 5: Schematické znázornění struktury mitochondrie a strategie působení sloučenin cílících na mitochondrie. ETC – elektronový transportní řetězec (electron transport chain), ATP – adenosintrifosfát (adenosine triphosphate), ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species), OMM – vnější mitochondriální membrána (outer mitochondrial membrane), IMM – vnitřní mitochondriální membrána (inner mitochondrial membrane), IMS – mezimembránový prostor (intermembrane space), PBR – periferní benzodiazepinový receptor (peripheral benzodiazepine receptor), mPTP – mitochondriální pór přechodné permeability (mitochondrial permeability transition pore), mitoK_{ATP} – mitochondriální ATP senzitivní draslíkový kanál (mitochondrial ATP-regulated K⁺ channel), SS peptidy – Szeto-Schiller peptidy (Szeto-Schiller peptides), antioxidanty na bázi GS – antioxidanty na bázi gramicidinu S (gramicidin S-based antioxidants) (Frantz and Wipf, 2010).

3.1 Trifenylofosfoniové soli

TPP je kladně nabitý iont fosforu obklopený třemi hydrofobními fenylovými skupinami (obrázek 6) (Battogtokh et al., 2018). U trifenylofosfoniových solí se využívá vysoce lipofilní charakter a delokalizovaná kationtová struktura. Delokalizovaný kationt zajišťuje snížení změny Gibbsovy energie, která je spojena s jeho přechodem přes IMM. Koncentrace delokalizovaných kationtů v mitochondriální matrix je tisíckrát vyšší než v cytosolu (Wang et al., 2017).

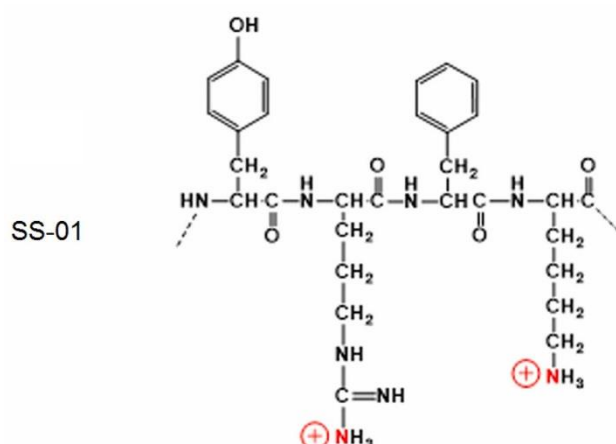


Obrázek 6: Chemická struktura skupiny trifenylyfosfonia. Červenou barvou je označen kationt a tečkovaná čára značí část molekuly konjugovanou s léčivem (upraveno dle *Battogtokh et al., 2018*).

3.2 Peptidy pronikající do mitochondrií

Do této skupiny peptidů patří krátké peptidy, které mají lipofilní charakter a nesou kladný náboj. Tyto peptidy se akumulují v mitochondriích (*Battogtokh et al., 2018*). Krátké sekvence peptidů jako nosiče mají specifické fyzikálně-chemické vlastnosti (*Frantz and Wipf, 2010*).

Szeto-Schiller peptidy jsou malé, ve vodě rozpustné tetrapeptidy složené ze zbytků tyrosinu nebo dimethyltyrosinu, argininu, fenylalaninu a lysinu, které se hromadí v IMM. Pomocí těchto aminokyselin byly připraveny různé SS peptidy, SS-01 až SS-31 (*Battogtokh et al., 2018*). Střídavě spojené zbytky aromatických a bazických aminokyselin jsou klíčové pro cílení na mitochondrie. SS peptidy představují skupinu nových chemických entit, které se selektivně vážou na mitochondriální CL, což pomáhá zlepšit plasticitu mitochondrií a obnovit optimální bioenergetickou rovnováhu (*Wang et al., 2017*). SS-01, SS-02 a SS-31 peptidy mají antioxidační účinky díky přítomnosti aromatických aminokyselin, jako je tyrosin a dimethyltyrosin (obrázek 7) (*Battogtokh et al., 2018*).



Obrázek 7: Chemická struktura SS-01 peptidu. Červenou barvou jsou označeny kationty a tečkované čáry značí části molekuly konjugované s léčivem. SS peptidy – Szeto-Schiller peptidy (Szeto-Schiller peptides) (upraveno dle *Battogtokh et al., 2018*).

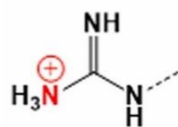
Vzhledem ke strukturální podobnosti mitochondrií s bakteriemi byla vyvinuta celá řada analogů gramicidinu S (GS), což je antibiotikum narušující membránu bakterií (Wang *et al.*, 2017). Díky své vysoké afinitě k fosfolipidům IMM působí jako vychytávače nitroxidových radikálů v mitochondriální matrix, tedy jsou to antioxidanty na bázi GS (Frantz and Wipf, 2010).

3.3 D-(KLAKLAK)₂

D-(KLAKLAK)₂ a jeho analogy jsou kationické peptidy s amfipatickou α -helikální strukturou, které jsou schopné narušit integritu mitochondriálních membrán, a tím vyvolat apoptózu (Frantz and Wipf, 2010). Amfipatická α -helikální struktura by mohla mít vliv na účinnost mitochondriálního cílení, protože je stěžejní pro import peptidů do mitochondrií (Wang *et al.*, 2017).

3.4 Guanidin a biguanid

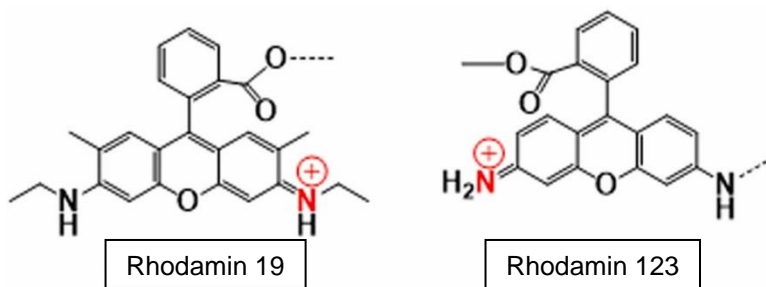
Guanidin (obrázek 8) a biguanid jsou delokalizované kationty obzvlášť zajímavé vzhledem ke své vysoké lipofilitě v porovnání s molekulami mající lokalizované náboje. Pro jejich konjugáty s léčivem je typická vysoká akumulace v mitochondriích (Battogtokh *et al.*, 2018).



Obrázek 8: Chemická struktura guanidinu. Červenou barvou je označen kationt a tečkovaná čára značí část molekuly konjugovanou s léčivem (upraveno dle Battogtokh *et al.*, 2018).

3.5 Rhodamin

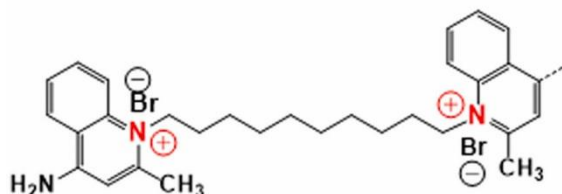
Deriváty rhodaminu, jako jsou rhodamin 19 a 123 (obrázek 9), patří do skupiny cílené na mitochondrie díky jejich vazebné afinitě k mitochondriálním membránám, následně narušují ETC a OXPHOS. Akumulace rhodaminu v mitochondriích je způsobena kationtovým a lipofilním charakterem, které napomáhají této sloučenině procházet přes OMM, IMM a zůstat v negativně nabitě mitochondriální matrix. Především rhodamin 19 je známý jako tzv. rozpojovač dýchacího řetězce vzhledem k jeho protonoforové aktivitě (Battogtokh *et al.*, 2018).



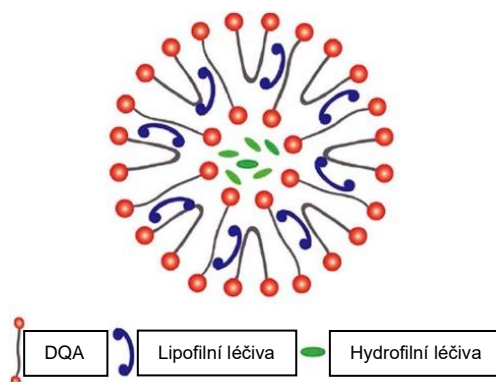
Obrázek 9: Chemická struktura rhodaminu 19 a 123. Červenou barvou jsou označeny kationty a tečkované čáry značí části molekuly konjugované s léčivem (upraveno dle *Battogtokh et al., 2018*).

3.6 Lipozomy

Pro import velkých nebo membránou nepropustných molekul přes membránu je vhodný endomembránový systém zabezpečovaný pomocí transportních vezikul. Biologicky aktivní látky jsou zapouzdřeny do kationtových lipozomů, u kterých dochází k buněčné internalizaci založené na fúzi s OMM (*Frantz and Wipf, 2010*). K zapouzdření protinádorových léčiv lze použít vezikuly označované jako DQAsomes (obrázek 11) (*Wang et al., 2017*). Dequalinium (DQA) (obrázek 10) je lipofilní sloučenina složená ze dvou chinolinových derivátů navzájem spojených prostřednictvím alkylového řetězce, obsahujícího deset atomů uhlíku (*Battogtokh et al., 2018*), do amfipatické molekuly enkapsulované do kationtového lipozomu (*Wang et al., 2017*).



Obrázek 10: Chemická struktura DQA. Červenou barvou jsou označeny kationty a tečkovaná čára značí část molekuly konjugovanou s léčivem (upraveno dle *Battogtokh et al., 2018*).



Obrázek 11: Schéma DQAsomes. Lipofilní léčiva jsou zapouzdřena mezi dvěma hydrofobními řetězci, zatímco hydrofilní léčiva jsou ve střední části DQAsomes (upraveno dle *Wang et al., 2017*).

3.7 Polymerní nanočástice

Dalšími ideálními nosiči bioaktivních látek jsou polymerní nanočástice. Biokompatibilní a biologicky rozložitelné polymery kyseliny mléčné a glykolové, kopolymery kyseliny mléčné a glykolové, polykaprolaktony jsou nejslibnější materiálové systémy pro cílené dodávání léčiv. Pomocí metody emulgace s odpařením rozpouštědla nebo nanoprecipitace jsou z těchto látek připraveny nanočástice, které jsou schopny zapouzdřit jak hydrofilní, ve vodě rozpustná, tak hydrofobní, ve vodě nerozpustná, léčiva. Molekuly léčiva, obvykle jako hydrofobní bloky, jsou konjugovány s hydrofilními syntetickými bloky (např. polyethylenglykol), které jsou seskupené do nanočástic. Hydrofobicita všeobecně zvyšuje stabilitu léčiva. Polyethylenglykol prodlužuje dobu setrvání v těle (Wang *et al.*, 2017).

3.8 Anorganické nanočástice

Tyto nanočástice mají oproti organickým nanočásticím výhody, jako je malá a jednotná velikost částic. Mnoho anorganických materiálů se používá k přípravě nanočástic působících na mitochondrie. Hydroxyapatit je hlavní anorganickou složkou tvrdých tkání zubu, který vykazuje vynikající biologickou kompatibilitu. Používá se jako nosič léčiv. Ještě důležitější však je, že nanočástice hydroxyapatitu mohou vstoupit také do mitochondrií nádorových buněk a poté indukovat apoptózu prostřednictvím změny MMP s následným únikem cyt c z mitochondrií. Podobně jako u organických nanočástic i zde existuje modifikace skupinou TPP (Wang *et al.*, 2017).

4. Mitochondriální onemocnění

Na mitochondrie mohou působit různé negativní faktory (Wang *et al.*, 2017), jako jsou mutace, mtDNA nebo jaderné DNA (Xu *et al.*, 2013), a oxidační stres. Podle podílu mutované a nemutované mtDNA se určuje tzv. hladina heteroplazmie (Friedman and Nunnari, 2014). Dále vlivem těchto faktorů dochází k mitochondriální dysfunkci, která spouští signální kaskádu vedoucí k apoptóze, následnému selhání orgánů a vzniku onemocnění (Wang *et al.*, 2017). Mnoho lidských chorob, včetně ischemických chorob srdečních, je spojeno s poruchou mitochondrií (Wang *et al.*, 2017). Bylo identifikováno několik mitochondriálních onemocnění (Zick *et al.*, 2009), které postihují tkáň a orgány, jako jsou srdce, svaly a nervový systém (Zong *et al.*, 2016). Mitochondrie ovlivňují také procesy stárnutí (Xu *et al.*, 2013). Existuje velká heterogenita klinických projevů mitochondriálních chorob (Friedman and Nunnari, 2014).

4.1 Onkologická onemocnění

Mezi základní vlastnosti nádorových buněk patří zvýšená proliferace, neomezený replikační potenciál, nezávislost na růstových faktorech, necitlivost na protirůstové signály, narušená apoptóza a snížená aktivita autofagie (Battogtokh *et al.*, 2018).

4.1.1 Změny v nádorových buňkách

Struktura a funkce nádorových buněk se odlišuje od normálních buněk (Battogtokh *et al.*, 2018). Funkce mitochondrií se liší v závislosti na genetickém vybavení jedince, environmentálních faktorech a původu nádorových buněk. U nádorových buněk dochází k adaptaci mitochondriálních funkcí, aby přežily metabolický stres. Mitochondrie představují poměrně komplexní orgány, které ovlivňují iniciaci, růst, přežití a metastazování nádorových buněk (Vyas *et al.*, 2016). Nádor vzniká z onkocytů, což jsou buňky velmi bohaté na mitochondrie (Zong *et al.*, 2016). Nádorově specifické mutované enzymy produkují tzv. onkometabolity, které vedou k iniciaci nádoru, protože díky produkci onkometabolitů mají mitochondrie značný vliv na strukturu chromatinu. Hlavní princip působení těchto látek je dán jejich strukturální podobností s α -ketoglutarátem, což jim umožňuje působit jako kompetitivní inhibitory enzymů z rodiny 10-11-translokačních methylcytosin dioxygenáz a histonových demethyláz obsahujících Jumonji-C doménu, které modifikují chromatin, a prolylhydroxyláz. Oxidační stres a mitochondriální signalizace mohou také podporovat iniciaci, kromě toho ještě růst a přežití nádorových buněk, na čemž se podílí i preprogramování energetického metabolismu, k čemuž

přispívá více různých mechanismů v mitochondriích. Mitochondriální biogeneze regulovaná pomocí PGC-1 α může přispět k metastatickému potenciálu nádorových buněk. Jeden z nejdůležitějších regulátorů mitochondriální biogeneze u onkologických onemocnění je transkripční faktor c-Myc, který reguluje buněčnou proliferaci, progresi buněčného cyklu, energetický metabolismus a apoptózu. Nárůst mitochondriální biogeneze se projevuje zvýšenou biosyntetickou a respirační kapacitou nádorových buněk. Metabolické adaptace, na kterých se podílí onkogen c-Myc, u proliferujících nádorových buněk vedou k progresi těchto buněk a indukují změnu v glykolýze pro stimulaci jejich růstu. Hlavním downstreamovým efektem pro aktivaci signální dráhy fosfatidylinositol-3-kinázy/proteinkinázy B (PI3K/Akt) je savčí cíl rapamycinu (mTOR) (Vyas *et al.*, 2016), který je součástí dvou odlišných proteinových komplexů, mTOR komplexu 1 a 2 (mTORC1 a mTORC2) (Sabatini, 2017). mTOR ovlivňuje buněčný růst a pomáhá udržovat energetickou homeostázu (Vyas *et al.*, 2016) změnou glukózového metabolismu (Heiden *et al.*, 2010). Deregulovaná signální dráha PI3K/Akt/mTOR je zodpovědná za vznik různých chorob, včetně onkologických onemocnění. mTORC1 reguluje mitochondriální biogenezi jak na úrovni transkripce prostřednictvím aktivace signalizace Yin Yang 1/PGC-1 α , což vede k expresi mitochondriálních genů, tak na úrovni translace skrze inhibici pomocí proteinu vázajícího eukaryotický translační iniciační faktor 4E, což snižuje syntézu jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů. Změny v mitochondriální dynamice jsou typické pro nádorové transformace buněk, přičemž onkogen K-Ras stimuluje mitochondriální fragmentaci prostřednictvím fosforylace Drp1 zajišťované extracelulárními signálem regulovanými kinázami 1/2. Mutace onkogenu K-Ras mají za následek koordinovanou regulaci mitochondriální biogeneze, přeprogramování energetického metabolismu a podporu mitochondriálního dělení a mitofagie (Vyas *et al.*, 2016).

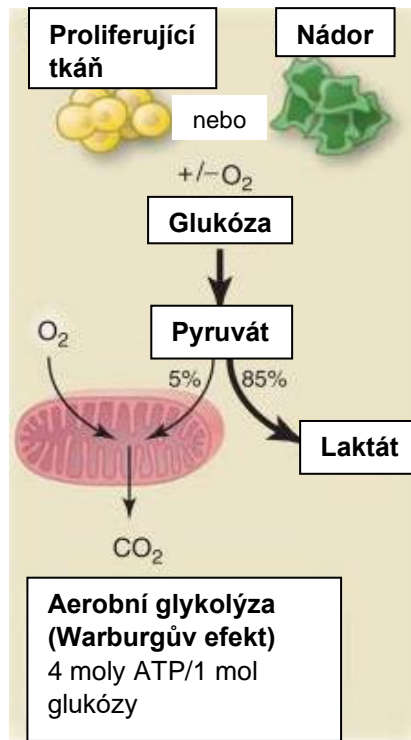
4.1.2 Energetický metabolismus

Rychle rostoucí nádorové buňky potřebují obrovské množství energie, které umožňuje nepřetržitý růst (Battogtokh *et al.*, 2018). Nádorové buňky překonávají závislost na růstových faktorech díky mutacím, které postihují geny signálních drah. Onkogenní mutace mohou vést k příjmu živin, zejména glukózy, které splňují nebo překračují bioenergetické požadavky proliferujících buněk (Heiden *et al.*, 2010). Mikroprostředí nádorů je charakterizováno nízkým obsahem kyslíku tzv. hypoxií (Vaupel, 2004). Aby nádorové buňky přežily hypoxické podmínky, tak v nich dochází

k metabolickým změnám směrem k energeticky méně výhodné anaerobní glykolýze. Za tohoto stavu hypoxie dochází v nádorových buňkách k indukci hypoxií indukovaného faktoru 1 (HIF-1). Buněčné dýchání, které je pro normální buňky hlavním zdrojem ATP, je v nádorových buňkách méně využívané. Hromadění metabolitů citrátového cyklu, jako jsou sukcinát či fumarát, v cytosolu vede k inhibici aktivity prolylhydroxylázy a tím ke stabilizaci HIF-1 α (Wang *et al.*, 2017). Tyto metabolity mohou sloužit jako signál ke stimulaci glykolýzy (Gottlieb and Tomlinson, 2005). Adaptace nádorových buněk zahrnuje inhibici apoptózy prostřednictvím mutace p53, což je tumor supresorový protein (Wang *et al.*, 2017). Exprese genu TP53-regulátor indukované glykolýzy a apoptózy, kterou reguluje p53 (Bensaad *et al.*, 2006), vede ke snížení aktivity fosfofruktokinázy (PFK), potlačení glykolýzy a aktivaci pentózového cyklu, alternativní cesty štěpení glukózy, která poskytuje NADPH. Je to adaptivní mechanismus, který chrání nádorové buňky před oxidačním stresem vznikajícím nadměrnou produkcí ROS, protože za přítomnosti NADPH je oxidovaná forma glutathionu převedena na redukovanou formu glutathionu (GSH) (Heiden *et al.*, 2010), což pomáhá nádorovým buňkám přežít (Wang *et al.*, 2017). Nádorové buňky unikají apoptóze také downregulací proapoptotických a/nebo upregulací antiapoptotických proteinů Bcl-2 rodiny (Vyas *et al.*, 2016), které chrání před permeabilizací OMM, což je důležitým krokem v aktivaci vnitřní apoptotické signální dráhy (Wang *et al.*, 2017).

4.1.3 Warburgův efekt

Pozorování Otta Warburga (Zong *et al.*, 2016), že na rozdíl od normálních buněk dochází v proliferujících nebo nádorových buňkách k aerobní glykolýze, tzv. Warburgovu efektu (obrázek 12), poukázala na roli mitochondrií v tumorigenezi (Vyas *et al.*, 2016). Při aerobní glykolýze se většina glukózy převádí na laktát bez ohledu na to, zda je přítomen kyslík (Heiden *et al.*, 2010). Warburgův efekt je charakteristickou vlastností téměř všech nádorových buněk. I když poškozené mitochondrie v některých nádorových buňkách změní aktivitu, tak většina nádorových buněk, ve kterých probíhá Warburgův efekt, má neporušenou mitochondriální respiraci, u jistých podtypů nádorů je dokonce důležitá pro jejich tvorbu (Vyas *et al.*, 2016).



Obrázek 12: Schematické znázornění aerobní glykolýzy (Warburgův efekt). ATP – adenosintrifosfát (adenosine triphosphate) (upraveno dle *Heiden et al., 2010*).

Přeměna veškeré glukózy až na oxid uhličitý prostřednictvím OXPHOS za účelem maximalizace produkce ATP je v rozporu s potřebami proliferující buňky. Část glukózy slouží jako zdroj prekurzorů, například acetyl-CoA a NADPH pro syntézu mastných kyselin k podpoře buněčné proliferace. Aerobní glykolýza je pro tvorbu ATP méně účinná než OXPHOS, ale přesto poskytuje dostatečné množství energie pro rychlou proliferaci. Jedním z možných vysvětlení přechodu z OXPHOS na aerobní glykolýzu je, že méně efektivní způsob syntézy ATP je problémem jen v případě nedostatku energetických zdrojů. To ovšem neplatí pro proliferující buňky, které mají zajištěný neustálý přísun glukózy a dalších živin cirkulujících v krvi. Druhým možným vysvětlením je, že proliferující buňky mají vyšší energetické požadavky přesahující možnosti OXPHOS. Hypoxické prostředí nádoru se objevuje až později, nemusí být hlavní příčinou tohoto přechodu (*Heiden et al., 2010*).

Glykolytický enzym (*Heiden et al., 2010*) pyruvátkináza (PK) katalyzuje třetí ireverzibilní krok glykolýzy za tvorby pyruvátu, který je přenesen do mitochondrií, kde podléhá oxidační dekarboxylaci (*Vyas et al., 2016*). Nádorové buňky ve srovnání s diferencovanými buňkami exprimují převážně M2 izoformu tohoto enzymu (PKM2) (*Heiden et al., 2010*). Izoforma PKM2 je na rozdíl od PKM1 regulována vazbou

fosforylovaných tyrosinových peptidů, která inhibuje enzymatickou aktivitu PK (David *et al.*, 2010), což podporuje proliferaci nádorových buněk (Heiden *et al.*, 2010). Je spojená s regulací metabolismu glukózy, který ovlivňuje růst nádorových buněk (Mazurek *et al.*, 2005). Při procesu aerobní glykolýzy (Heiden *et al.*, 2010) vznikají meziproducty, které jsou využívány v pentózovém cyklu, pro syntézu serinu a lipidů (Vyas *et al.*, 2016). Kromě toho mitochondriální pyruvátový nosič 1 a 2 (MPC1 a 2), důležitý růstový faktor, je buď ztracen, nebo downregulován u řady nádorů. Ztráta MPC navíc stimuluje kompenzační dráhy, kdy současně probíhá oxidace glukózy v citrátovém cyklu, včetně glutaminolýzy (Vyas *et al.*, 2016). Tento proces zahrnuje dva deaminační kroky. Prvním krokem je přeměna glutaminu na glutamát za katalýzy glutaminázy (GLS), v druhém kroku katalyzovaném glutamátdehydrogenázou (GDH) se glutamát převádí na α -ketoglutarát. GLS je regulována expresí onkogenu c-Myc a aktivita GLS souvisí s růstem nádorových buněk (Durán *et al.*, 2012). Nejen glutaminolýza, ale také metabolismus mastných kyselin a aminokyselin s rozvětveným řetězcem svědčí o metabolické flexibilitě nádorových buněk. Z tohoto důvodu při aerobní glykolýze mitochondrie zůstávají funkční a přeprogramování energetického metabolismu umožňuje udržet buněčnou homeostázu během Warburgova efektu. Kromě oxidace glukózy mitochondrie přispívají k nádorové progresi syntézou nukleotidů prostřednictvím metabolismu jednoho uhlíku (Vyas *et al.*, 2016).

4.1.4 Role ROS u nádorových buněk

Vysoké hladiny ROS přispívají k nestabilitě genomu, která podporuje nádorovou transformaci. Nicméně mírně zvýšená hladina ROS reguluje buněčnou signalizaci. Peroxid vodíku a další ROS totiž inhibují (Vyas *et al.*, 2016) homologa fosfatázy a tenzinu (PTEN), což je tumor supresorový gen (Yang *et al.*, 2010), oxidací cysteinových zbytků v aktivním místě fosfatázy (Tonks, 2006). Inaktivace PTEN vede k aktivaci signální dráhy PI3K/Akt, která stimuluje buněčný růst. Regulace buněčné signalizace zprostředkovaná ROS také ovlivňuje metastázování nádorových buněk. Při zvýšené produkci ROS dochází k jejich eliminaci pomocí antioxidantních ochranných systémů. Například onkogeny K-Ras, B-Raf nebo c-Myc aktivují jaderný faktor (odvozený od erytroidu 2) 2, což je transkripční regulátor antioxidantních reakcí, a tím se snižuje tvorba ROS. Rovnováha mezi produkcí ROS a antioxidantní ochranou je důležitá pro udržování hladiny ROS, která podporuje tumorigenezi (Vyas *et al.*, 2016).

4.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je chronické onemocnění, které se dělí na dva hlavní typy. DM 1. typu vzniká, když slinivka břišní nevytváří dostatek inzulínu. U DM 2. typu, celosvětově nejčastější formy, tělo nedokáže účinně využít produkovaný inzulín. Mitochondriální dysfunkce se podílí na vzniku DM 2. typu. Acetyl-CoA, produkt β -oxidace a ze kterého je syntetizován citrát, inhibuje aktivitu některých enzymů, jako je PFK a pyruvátdehydrogenáza. Tím je potlačena glykolýza, dochází ke zvýšení hladiny glukózy v krvi a snížení produkce inzulínu (Wang *et al.*, 2017). U pacientů s DM 2. typu je nižší počet mitochondrií, které jsou menší a mají redukovanou energetickou kapacitu (Kelley *et al.*, 2002) v porovnání se zdravými lidmi. Zhoršení mitochondriální funkce významně souvisí se snížením (přibližně čtyřikrát) aktivity jednotlivých komplexů ETC a poklesem (přibližně dvakrát) syntézy mitochondriálních proteinů. Pacienti s DM 2. typu mají defekty mtDNA (Wang *et al.*, 2017).

4.3 Alzheimerova, Parkinsonova choroba a Friedreichova ataxie

Alzheimerova choroba (AD) je chronické neurodegenerativní onemocnění, které obvykle začíná pomalu a postupně se zhoršuje. Amyloidní hypotéza považuje akumulaci amyloidů β v mitochondriích mozku za hlavní příčinu vzniku AD. Shlukování těchto peptidů, toxických pro mozkové buňky, do amyloidních plaků vyvolá smrt neuronů. Mimoto se na rozvoji AD podílí snížená oxidace glukózy (Battogtokh *et al.*, 2018).

Parkinsonova choroba (PD) je chronické progresivní neurodegenerativní onemocnění centrálního nervového systému. Postihuje především motorické funkce (Battogtokh *et al.*, 2018), což souvisí se ztrátou dopaminergních neuronů. Mitochondriální dysfunkce a oxidační stres mají význam v patogenezi PD (Zick *et al.*, 2009). Vzácné dědičné mutace genů kódujících proteiny Parkin, α -synuklein, PTEN indukovanou kinázu 1, DJ-1, opakovanou kinázu 2 bohatou na leucin a protein A2 s vysokoteplotním požadavkem (HTRA2) mohou vést ke vzniku PD. Všechny tyto proteinové produkty genů asociovaných s PD jsou lokalizovány v mitochondriích (Henchcliffe *et al.*, 2008).

Friedreichova ataxie je neurodegenerativní onemocnění, jehož příčinou je expanze opakování tripletu guanin-adenin-adenin v genu kódujícím frataxin, mitochondriální protein podílející se na metabolismu železa (Xu *et al.*, 2013).

4.4 Barthův a Wolf-Hirschhornův syndrom, Wilsonova choroba

Barthův syndrom je porucha vyvolaná mutacemi v genu kódující tafazzin, což je protein účastnící se biosyntézy CL. Lidé s Barthovým syndromem mají mitochondrie s nižším obsahem CL, přesněji o 80 %, což je spjato se závažnými změnami topologie IMM. (*Zick et al., 2009*).

Wolf-Hirschhornův syndrom je způsoben delecí genů, zahrnující LETM1, WHSC1 a FGFR3, v oblasti distální části krátkého raménka 4. chromozomu (*Yang et al., 2016*). LETM1 je vysoce konzervovaný protein IMM (*Zick et al., 2009*).

Wilsonova choroba je autozomálně recesivně dědičné onemocnění zapříčiněné mutacemi v genu ATP7B kódujícím měď transportující ATPázu. Akumulace mědi v hepatocytech vede k mitochondriální dysfunkci, poškození hepatocytů, dokonce až k selhání jater (*Zischka et al., 2018*).

5. Léčba mitochondriálních onemocnění

Obohacení mitochondriálních kompartmentů o antioxidanty a prooxidanty se může využít pro cílení do mitochondrií v terapii. Antioxidanty se uplatňují pro své protistárnoucí účinky, přičemž aplikace jsou zaměřené hlavně na kardiovaskulární a neurodegenerativní choroby, například CoQ10 má silné antioxidační vlastnosti. Zatímco prooxidační a cytotoxické látky jsou používány k léčbě onkologických onemocnění (*Frantz and Wipf, 2010*).

Cílení na lapače ROS v mitochondriích je účinnou léčebnou strategií hemoragického šoku a souvisejících stavů, jako je cévní mozková příhoda nebo infarkt myokardu (*Frantz and Wipf, 2010*).

Při terapii onkologických onemocnění by se mohlo využít cílení na mitochondriální enzymy metabolismu jednovuhlíkatých zbytků, jako jsou serinhydroxymethyltransferáza 2 (SHMT2), methylenetetrahydrofolátdehydrogenáza 2 a aldehyddehydrogenáza 1, člen rodiny L2 (ALDH1L2). SHMT2 je lokalizován v nádorově transformovaných buňkách při hypoxii. SHMT2 je u glioblastomů exprimován zejména v buňkách ischemické tkáně sousedících s nekrotickými oblastmi nádorů. Aktivita ALDH1L2 podporuje buněčnou redoxní homeostázu, a tím přispívá ke vzniku metastáz melanomu (*Zong et al., 2016*). Dále se nabízí cílení na enzymy GLS, GDH a transportéry glutaminu. Léčení by mělo být účinné pro nádory s vysokou spotřebou glutaminu a vhodným markerem by mohla být míra exprese c-Myc (*Krejčíř et al., 2018*). Pro vývoj cílené protinádorové terapie mohou být významné specifické inhibitory antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2, které jsou známé jako BH3 mimetika, protože napodobují úlohu proapoptotických BH3-only proteinů (*Krejčíř et al., 2018*). Mimo jiné v nádorových buňkách s mutacemi enzymů citrátového cyklu probíhá reduktivní karboxylace, což je dráha podílející se na tvorbě meziproductů tohoto cyklu. Tedy nádorové buňky mají odlišný metabolismus oproti normálním buňkám a identifikují se metabolické zranitelnosti. Nejslibnější cílení je na neomorfní aktivitu mutantního enzymu isocitrátdehydrogenázy (IDH) (*Zong et al., 2016*), který je jedním z enzymů citrátového cyklu a existuje ve dvou variantách, cytoplazmatický IDH1 a mitochondriální izoenzym IDH2 (*Krejčíř et al., 2018*). Nádorové buňky s poruchami mitochondriální funkce vyžadují upregulovanou glykolýzu kvůli zvýšeným nárokům na energii, tudíž mohou být citlivější na inhibici absorpce glukózy nebo na zablokování glykolýzy (*Zong et al., 2016*). Glykolýza sice neprobíhá v mitochondriích, je však součástí energetického metabolismu buněk a s procesy

probíhajícími v mitochondriích je úzce spjatá. Jednou z nejvíce studovaných možností, jak potlačit glykolýzu, je inhibice hexokinázy (HK), prvního enzymu glykolytické kaskády, která fosforyluje glukózu za vzniku glukóza-6-fosfátu a patří mezi několik enzymů, jejichž aktivita je regulovaná a rozhoduje o celkovém výkonu glykolýzy. Inhibicí HK je možné zastavit celý proces a zabránit buňkám v produkci ATP. HK bývá v nádorech přítomná ve zvýšené míře, a to zejména v podobě izoenzymu HKII. Vyšší exprese HK a dalších limitujících enzymů umožňuje nádorovým buňkám navýšit kapacitu glykolytické kaskády a v případě dostatečného množství glukózy získávat z glykolýzy více ATP. Dalšími vhodnými cíli pro inhibici glykolýzy jsou PKM a PFK. Cílení na antioxidační mechanismy nádorových buněk představuje další strategii pro vývoj protinádorové léčby. Uplatňují se při ní dva odlišné přístupy, přičemž tím více využívaným je snaha o poškození nádorových buněk navýšením hladiny ROS. Méně studovanou možností je naopak inhibice produkce ROS, která by bránila nádorovým buňkám využívat jejich stabilně zvýšenou hladinu ve svůj prospěch. Objevuje se také snaha o využití železa a tzv. Fentonovy reakce, jejíž podstatou je katalytická přeměna peroxidu vodíku na hydroxylový radikál zprostředkovaná ionty železa. Díky produkci ROS je Fentonova reakce významným procesem, který hraje roli při některých patologických stavech, včetně kancerogeneze. Využití Fentonovy reakce by mohlo najít uplatnění v terapii nádorů, které mají nízkou úroveň exprese katalázy, která rozkládá molekuly peroxidu vodíku na vodu a kyslík (*Krejčíř et al., 2018*). Kromě toho cílem mnoha protinádorových léčebných přístupů je využití zvýšeného oxidačního stresu u nádorových buněk k jejich selektivnímu zabíjení prostřednictvím prooxidantů indukujících apoptózu (*Frantz and Wipf, 2010*).

5.1 Léčiva cílicí na mitochondrie

Léčiva pro mitochondriální cílení mohou být zařazena do kategorií podle mechanismu působení v mitochondriích a účelu použití. Co se týče mechanismů účinku, léčiva mohou vykazovat biologickou aktivitu v mitochondriích nebo působit přímo na mitochondriální membrány a/nebo na póry přechodné permeability. Pokud jde o účinky léčiv, používají se cytotoxické léky, antioxidanty pro ochranu buněk nebo molekuly pro detekční/zobrazovací metody, pomocí kterých jsou snímány mitochondrie v buňkách (*Battogtokh et al., 2018*).

5.1.1 Mechanismy působení léčiv

Malé molekuly léků mohou působit na mitochondrie různými mechanismy. Mezi současné přístupy patří inhibice ETC a OXPHOS, dále modulace homeostázy vápníku a regulace oxidačního stresu sníženou nebo zvýšenou produkcí ROS v mitochondriích. K inhibici ETC může dojít přímou inhibicí podjednotky jednoho nebo více enzymových komplexů nebo přijetím elektronů protékajících ETC namísto akceptorů CoQ nebo cyt c. V případě inhibice OXPHOS se protony přesouvají z mitochondriální matrix přímo přes IMM do IMS, aniž by přecházely přes ATPázu, což má za následek zvýšení produkce tepla a snížení tvorby ATP. Typickými příklady činidel, která podporují inhibici OXPHOS, jsou slabé kyseliny a zásady, které se mohou protonovat v IMS a přenášejí protony přes IMM. Prevence oxidačního poškození buněk snížením produkce ROS v mitochondriích lze dosáhnout dodáním antioxidantů, které působí jako lapače volných radikálů a/nebo elektronů (*Frantz and Wipf, 2010*).

Důležitou událostí spouštějící apoptotickou kaskádu je permeabilizace OMM, která iniciuje kolaps MMP, uvolnění cyt c a dalších aktivátorů proteáz a nukleáz z mitochondrií. Apoptóza může být blokována inhibitory mitochondriálního póru přechodné propustnosti, otvírači mitoK_{ATP} nebo vápníkem aktivovaných draslíkových kanálů, nebo inhibitory mitochondriálních sodno-vápenatých výměníků (*Frantz and Wipf, 2010*).

Mezi další mechanismy účinku léčiv patří inhibice peroxidázové aktivity komplexu cyt c-CL a cílení dalších specifických mitochondriálních proteinů prostřednictvím inhibice kináz, ATPáz, enzymů citrátového cyklu nebo antiapoptotických proteinů Bcl-2 rodiny. Některá léčiva jsou schopná inhibovat β -oxidaci, což vede k akumulaci lipidů v buňkách (*Frantz and Wipf, 2010*).

Mimo jiné existují mechanismy působení léčiv jako vazba na mtDNA, inhibice syntézy mtDNA nebo modulace mitochondriálního dělení/fúze. Látky, které se vážou na mtDNA, často způsobují inhibici syntézy DNA. Tento mechanismus účinku může představovat strategii blokování exprese mutované mtDNA, která je zodpovědná za vznik některých dědičných mitochondriálních chorob. Sloučeniny, které modulují mitochondriální dělení/fúzi, byly navrženy pro léčbu neurodegenerativních onemocnění (*Frantz and Wipf, 2010*).

5.1.2 Účinky léčiv

Cytotoxické léky by měly specificky interagovat s mitochondriálními proteiny a hromadit se v mitochondriální matrix v závislosti na membránovém potenciálu, aby se usmrtily buňky nádorové nebo podílející se na vzniku jiného chronického onemocnění (*Battogtokh et al., 2018*).

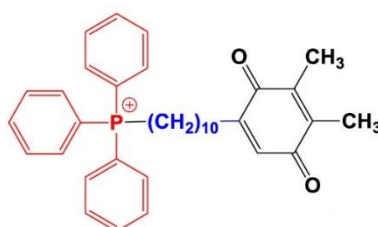
Antioxidanty jsou látky, které neutralizují volné radikály, obsahující nepárový elektron a mající vysokou reaktivitu, přijetím či odevzdáním elektronu. Obecně platí, že antioxidační aktivitu mají aromatické sloučeniny. Darováním atomu vodíku nebo elektronu se antioxidant stane radikálem, který je méně reaktivní a nebezpečný než původní volný radikál. Antioxidanty působí několika mechanismy: zabraňují peroxidaci lipidů, zhasí singletový kyslík, chelatují ionty kovů, přerušují řetězové reakce volných radikálů a redukují superoxidy. Další důležitou funkcí antioxidantů je regulace aktivity enzymů související s množstvím ROS. Antioxidanty snižují v buňkách hladinu volných radikálů buď inhibicí aktivity či exprese enzymů tvořících ROS, jako jsou NADPH-oxidáza a xanthinoxidáza, nebo zvýšením aktivity či exprese antioxidačních enzymů, jako jsou superoxidodismutáza (SOD), kataláza, glutathionperoxidáza (*Battogtokh et al., 2018*), glutathionreduktáza, thioredoxinreduktáza, thioredoxin, peroxiredoxin a glutaredoxin (*Bottje, 2019*). Antioxidanty mohou rovněž snižovat množství ROS v nádorových buňkách inhibicí jejich proliferace. Mezi významné antioxidanty patří vitamín C a E, karotenoidy, glutathion, kyselina močová, jednoduché fenoly, flavonoidy a thioly (*Battogtokh et al., 2018*). Dále CoQ10 je přenašeč elektronů v ETC přirozeně se vyskytující v mitochondriích (*Frantz and Wipf, 2010*).

Vznik mnoha chronických onemocnění je způsoben tvorbou ROS a reaktivních forem dusíku (RNS) v mitochondriích. Pro zjišťování a pochopení vlastností (např. koncentrace, biologický poločas, typ atd.) ROS a RNS je zapotřebí vývoj mitochondriálně cílených látek. Detekce těchto reaktivních forem jsou založené na fluorescenčních metodách díky charakteristikám látek, které jsou vysoce citlivé a prakticky nezničitelné. V mitochondriích se detekuje přítomnost peroxynitritu (ONOO^-) a oxidu dusičitého (NO_2), což je radikálový meziprodukt vznikající rozkladem peroxynitritu. V živých buňkách se provádí detekce exogenních a endogenních forem oxidu siřičitého, které způsobují pokles hladiny mediátorové RNA a tím vznik různých chorob, jako jsou onkologická onemocnění plic a neurologické poruchy. Detekce

chlornanových aniontů v mitochondriích má velký význam pro pochopení vztahů mezi těmito anionty a s nimi souvisejícími chorobami. Nadměrná koncentrace chlornanových aniontů v těle zapříčiňuje vznik kardiovaskulárního onemocnění, aterosklerózy, osteoartritidy, revmatoidní artritidy, poškození plic, a dokonce onkologického onemocnění (*Battogtokh et al., 2018*).

5.1.3 Používaná léčiva

SkQ1 (obrázek 13) je derivát látky plastochinonu spojený s TPP. Plastochinon má antioxidační aktivitu. V názvu SkQ1 - Sk znamená „iont Skulačeva“ a Q je chinon. Sloučenina SkQ1 byla schválena v Rusku, kde jsou v současné době dostupné oční kapky zvané Visomitin® (*Battogtokh et al., 2018*).



Obrázek 13: Chemická struktura SkQ1. Červenou barvou je označeno trifenylyfosfonium, modrou spojovací řetězec a černou plastochinon (upraveno dle *Battogtokh et al., 2018*).

Venetoklax patří mezi BH3 mimetika a je to nízkomolekulární látka cílící na apoptotickou dráhu. Byl navržen jako monoselektivní s afinitou pouze k antiapoptotickému proteinu Bcl-2, jehož aktivitu blokuje v nádorových buňkách. Tím vzniklo dostatečně široké terapeutické okno pro léčbu onkologických onemocnění s typicky zvýšenou expresí tohoto proteinu. Normální zdravé buňky, u kterých jsou antiapoptotické proteiny zastoupeny rovnoměrně, jsou vůči inhibitoru méně citlivé než buňky závislé zejména na proteinu Bcl-2. V roce 2016 venetoklax prošel úspěšně klinickým testováním a byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv. Lék je určen pacientům s chronickou lymfocytární leukémií a delecí krátkého raménka chromozomu 17, na kterém se nachází gen TP53 kódující nádorový supresor p53. A v červnu roku 2018 byl schválen v kombinaci s rituximabem i pro pacienty bez této delece (*Krejčíř et al., 2018*).

Metformin patří do skupiny léků označovaných jako biguanidy (*Zong et al., 2016*). Je to látka, která ovlivňuje fungování ETC. Doposud není jasné, jaký je mechanismus protektivního účinku této látky. Obecně je metformin považován za inhibitor komplexu I

ETC, který narušuje proces OXPHOS. Jeho účinek na organismus je však komplexní a látka působí na několika úrovních (Krejčíř *et al.*, 2018). Metformin a chemicky velmi podobná látka fenformin v buňkách aktivují AMP-aktivovanou proteinovou kinázu (AMPK) (Heiden *et al.*, 2010), která je důležitým regulátorem buněčného metabolismu a k její aktivaci dochází při snížení hladiny ATP. AMPK navozuje v buňkách klidový stav, kdy buňky šetří energetické zdroje, dochází k inhibici mTOR, tedy potlačení růstu, a indukci autofagie. Metformin se používá v léčbě diabetu mellitu 2. typu a vykazuje protinádorový efekt zřejmě díky útlumu metabolismu nádorových buněk. Na úrovni celého organismu metformin potlačuje glukoneogenezi v játrech, snižuje koncentraci glukózy a hladinu inzulínu v krvi. Tyto účinky mohou vést k energetickému stresu nádorových buněk a také k omezení prorůstové signalizace u nádorů využívajících inzulín a inzulínu podobné růstové faktory (Krejčíř *et al.*, 2018).

Enasidenib je látka, která cílí na metabolické procesy. Je to specifický inhibitor mitochondriální varianty mutovaného enzymu citrátového cyklu IDH2 a brání tak hromadění onkometabolitu 2-hydroxyglutarátu v nádorových buňkách. V roce 2017 byl schválen pro klinické použití Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Krejčíř *et al.*, 2018).

Pemetrexed se používá v první linii léčby pacientů s karcinomem plic (Zong *et al.*, 2016).

Trisenox obsahující léčivou látku oxid arsenitý se používá u pacientů s akutní promyelocytární leukémií. Mechanismus účinku není zcela znám, dochází k interakci s thiolovými skupinami enzymových komplexů, což vede k produkci ROS a následně k apoptóze (Frantz and Wipf, 2010).

Motexafin Gadolinium zvyšuje citlivost nádorových buněk mozku na radiační terapii, které selektivně zabíjí tím, že u nich indukuje apoptózu (Frantz and Wipf, 2010).

2-methoxyestradiol, který se dostal do fáze klinických studií pro léčbu solidních a metastatických onkologických onemocnění pod názvem Panzem, inhibuje SOD, což vede k akumulaci ROS v nádorových buňkách (Frantz and Wipf, 2010).

Imexon je malá molekula, která se váže na thioly, jako je GSH a cystein, což způsobuje hromadění ROS vedoucí k mitochondriální dysfunkci a apoptóze (Frantz and Wipf, 2010).

Závěr

Rostoucí zájem o cílení na mitochondrie odhaluje nová léčiva. Současné chápání základního vztahu mezi funkcemi mitochondrií a vznikem onemocnění je nedostačující. Stále je třeba lépe porozumět mitochondriální biologii, aby bylo možné navrhnout nejlepší terapeutickou strategii. Nanotechnologie, kam patří lipozomy, polymerní a anorganické nanočástice, nabízí slibný způsob efektivního dodání do mitochondrií na základě strategií, které zahrnují delokalizované lipofilní kationty, peptidy pronikající do mitochondrií a „stroje“ pro import mitochondriálních proteinů. V současné době aplikované látky působící na mitochondrie mají určité nevýhody. Například delokalizované lipofilní kationty jsou cytotoxické, což má za následek jejich omezené klinické využití. Některé další cílicí ligandy, jako jsou peptidy, mají nevýhodu ve větší struktuře, rozpustnosti a menší propustnosti vnitřní mitochondriální membrány.

Pochopení role mitochondrií v nádorovém bujení odhaluje nové přístupy k cílené terapii onkologických onemocnění. Jedná se zejména o cílení na mitochondriální metabolické procesy, jako je glykolýza a glutaminolýza, dále na apoptotickou kaskádu a hromadění onkogenních metabolitů. Podpora tvorby reaktivních forem kyslíku v mitochondriích, která indukuje smrt nádorových buněk, může zvýšit účinky chemoterapie.

Seznam použité literatury

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M. et al.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, fourth edition, 2002, s. 387-424.
2. Battogtokh G., Choi Y. S., Kang D. S., Park S. J. et al.: *Mitochondria-targeting drug conjugates for cytotoxic, anti-oxidizing and sensing purposes: current strategies and future perspectives*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2018, vol. 8, s. 862-880.
3. Bensaad K., Tsuruta A., Selak A. M., Vidal C. N. M. et al.: *TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis*. Cell, 2006, vol. 126 (1), s. 107-120.
4. Bootman M. D.: *Calcium Signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, vol. 4 (7).
5. Bottje W. G.: *Oxidative metabolism and efficiency: the delicate balancing act of mitochondria*. Poultry Science, 2019, vol. 98, s. 4223-4230.
6. Bourne H. G.: *Division of Labor in Cells*. Academic Press, second edition, 1970, s. 65-139.
7. Cooper G. M.: *The Cell. A Molecular Approach*, sixth edition, 2018, s. 526-543.
8. David J. C., Chen M., Assanah M., Canoll P. et al.: *HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer*. Nature, 2010, vol. 463 (7279), s. 364-368.
9. Durán V. R., Oppliger W., Robitaille M. A., Heiserich L. et al.: *Glutaminolysis Activates Rag-mTORC1 Signaling*. Molecular Cell, 2012, vol. 47 (3), s. 349-358.
10. Elmore S.: *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicol Pathol, 2007, vol. 35 (4), s. 495-516.
11. Fonteriz R. I., Fuente S. de la, Moreno A., Lobatón C. D. et al.: *Monitoring mitochondrial [Ca²⁺] dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin*. Cell Calcium, 2010, vol. 48 (1), s. 61-69.
12. Frantz M. C., Wipf P.: *Mitochondria as a target in treatment*. Environ Mol Mutagen, 2010, vol. 51 (5), s. 462-475.
13. Friedman J. R., Nunnari J.: *Mitochondrial form and function*. Nature, 2014, vol. 505 (7483), s. 335-343.

14. Ghochani M., Nulton J. D., Salamon P., Frey T. G. et al.: *Tensile Forces and Shape Entropy Explain Observed Crista Structure in Mitochondria*. Biophysical Journal, 2010, vol. 99, s. 3244-3254.
15. Gottlieb E., Tomlinson M. P.: *Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update*. Nature Reviews Cancer, 2005, vol: 5 (11), s. 857-866.
16. Hacker K., Medler K. F.: *Mitochondrial Calcium Buffering Contributes to the Maintenance of Basal Calcium Levels in Mouse Taste Cells*. J Neurophysiol, 2008, vol. 100 (4), s. 2177-2191.
17. Hand C.: *Cell theory: the structure and function of cells*. Cavendish square publishing, LLC, 2019, s. 71.
18. Heiden M. G. V., Cantley L. C., Thompson C. B.: *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. Science, 2010, vol. 324 (5930), s. 1029-1033.
19. Henchcliffe C., Beal F. M.: *Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis*. Nature Clinical Practice Neurology, 2008, vol. 4 (11), s. 600-609.
20. Chen I., Lui F.: *Physiology, Active Transport*. StatPearls Publishing, 2020.
21. Ingelsson B., Söderberg D., Strid T., Söderberg A. et al.: *Lymphocytes eject interferogenic mitochondrial DNA webs in response to CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides of class C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, vol. 115 (3), s. 478-487.
22. John G. B., Shang Y., Li L., Renken Ch. et al.: *The Mitochondrial Inner Membrane Protein Mitofilin Controls Cristae Morphology*. Mol Biol Cell, 2005, vol. 16 (3), s. 1543-1554.
23. Kelley E. D., He J., Menshikova V. E., Ritov B. V.: *Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes*. Diabetes, 2002, vol. 51 (10), s. 2944-2950.
24. Krejčíř R., Valík D., Vojtěšek B.: *Využití mitochondriálních procesů v cílené terapii nádorových onemocnění*. Klin Onkol, 2018, vol. 2, s. 2S14-2S20.

25. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P. et al.: *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman, fourth edition, 2000, s. 1184.
26. Maeda A., Fadeel B.: *Mitochondria released by cells undergoing TNF- α -induced necroptosis act as danger signals*. *Cell Death Dis*, 2014, vol. 5 (7), s. 1312.
27. Mannella C. A.: *Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2006, vol. 1763, s. 542-548.
28. Mazurek S., Boschek B. C., Hugo F., Eigenbrodt E.: *Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading*. *Seminars in Cancer Biology*, 2005, vol. 15 (4), s. 300-308.
29. Navdeep S. Ch.: *Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles*. *Cell Metabolism*, 2015, vol. 22, s. 204-206.
30. Rohlenová K., Rohlena J., Neužil J.: *Mitochondrie, nový cíl protirakovinné terapie*. *Vesmír*, 2017, vol. 96, s. 644-645.
31. Sabatini M. D.: *Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, vol. 114 (45), s. 11818-11825.
32. Tonks K. N.: *Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, vol. 7 (11), s. 833-846.
33. Vajner L., Uhlík J., Konrádová V.: *Lékařská histologie I: Cytologie a obecná histologie*. Karolinum, 2014, s. 13.
34. VanMeter C. K., Hubert J. R.: *Microbiology for the Healthcare Professional*. Elsevier, second edition, 2016, s. 43.
35. Vaupel P.: *Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology*. *Seminars in Radiation Oncology*, 2004, vol. 14 (3), s. 198-206.
36. Vyas S., Zaganjor E., Haigis C. M.: *Mitochondria and Cancer*. *Cell*, 2016, vol. 166, s. 555-566.
37. Wallace D. C.: *Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine*. *Annual Review of Biochemistry*, 2007, vol. 76, s. 781-821.

38. Wang Z., Guo W., Kuang X., Hou S. et al.: *Nanopreparations for mitochondria targeting drug delivery system: Current strategies and future prospective*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, vol. 12, s. 498-508.
39. Xu X., Duan S., Yi F., Ocampo A. et al.: *Mitochondrial Regulation in Pluripotent Stem Cells*. Cell Metabolism, 2013, vol. 18, s. 325-332.
40. Yang X. W., Pan H., Li L., Wu R. H. et al.: *Analyses of Genotypes and Phenotypes of Ten Chinese Patients with Wolf-Hirschhorn Syndrome by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification and Array Comparative Genomic Hybridization*. Chinese Medical Journal, 2016, vol. 129 (6), s. 672-678.
41. Yang Y., Shao N., Luo G., Li L. et al.: *Mutations of PTEN Gene in Gliomas Correlate to Tumor Differentiation and Short-term Survival Rate*. Anticancer Research, 2010, vol. 30 (3), s. 981-985.
42. Zhang Q., Raouf M., Chen Y., Sumi Y. et al.: *Circulating Mitochondrial DAMPs Cause Inflammatory Responses to Injury*. Nature, 2010, vol. 464 (7285), s. 104-107.
43. Zick M., Rabl R., Reichert S. A.: *Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria*. Molecular Cell Research, 2009, vol. 1793, s. 5-19.
44. Zischka H., Einer C.: *Mitochondrial copper homeostasis and its derailment in Wilson disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2018, vol. 102, s. 71-75.
45. Zong W., Rabinowitz D. J., White E.: *Mitochondria and Cancer*. Molecular Cell, 2016, vol. 61, s. 667-676.