

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

PRODUKCE VOLNÝCH RADIKÁLŮ
V MITOCHONDRIÍCH
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Kateřina Zvoníčková

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

2012

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

PRODUCTION OF FREE RADICALS
IN MITOCHONDRIA
BACHELOR WORK

AUTHOR: Kateřina Zvoníčková

SUPERVISOR: RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Zvoníčková**
Osobní číslo: **C09323**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Produkce volných radikálů v mitochondriích**
Zadávající 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 :

- 1) Zpracujte literární přehled týkající se obecných funkcí mitochondrií s hlavním zaměřením na produkci energie. V souvislosti s tímto tématem také v rešerši popište možnosti intramitochondriální produkce volných radikálů či reaktivních forem kyslíku a dusíku. Ke zpracování využijte elektronické databáze (ScienceDirect, HighWire, NCBI Pubmed, aj.)
- 2) Kromě výše uvedených témat také stručně popište antioxidační ochranu mitochondrií.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **ca 30 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

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

Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

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. 121/2000 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne: 22.6.2012

Kateřina Zvoníčková

podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení vypracování bakalářské práce a za velké úsilí věnované zpracování této práce.

Souhrn

Mitochondrie jsou buněčné struktury, oválného tvaru obsažené v eukaryotických buňkách. Jsou složeny z vnější pórovité membrány, vnitřní membrány vybíhající v kristy, jež zasahují do matrix. Jejich úloha v organismu je nezastupitelná, protože pomocí procesů v nich probíhajících jsou mitochondrie schopné produkovat energeticky bohatý adenosintrifosfát, který je nezbytný jako energie pro celý organismus. Dalšími funkcemi, kterými mitochondrie disponují, jsou například udržování redoxního potenciálu, regulace teploty, buněčné dýchání, Krebsův cyklus, β -oxidace mastných kyselin, oxidační fosforylace a mnoho dalších.

β -oxidace je proces, při kterém dochází k oxidaci mastných kyselin a vzniku acetyl-CoA, který se účastní Krebsova cyklu. Tento cyklus je sled reakcí, které tvoří společnou metabolickou dráhu navazující také na glykolýzu probíhající v cytoplazmě buňky. Látky vytvořené v Krebsově cyklu fungují jako substráty pro následující pochody. Jedním z těchto pochodů je dýchací řetězec, který k tvorbě ATP využívá soustavu čtyř komplexů umístěných v mezimembránovém prostoru. Procesem, který navazuje na dýchací řetězec a zároveň ukončuje produkci ATP, je oxidační fosforylace nacházející se opět v prostoru mezi membránami.

Jednou ze zvláštností mitochondrií je, že obsahují svoji vlastní mitochondriální DNA, která ovšem může podléhat i mutacím, což může být příčina i následek tvorby volných radikálů. Tyto volné radikály ale i reaktivní formy kyslíku a dusíku vznikají i v metabolických drahách při tvorbě energie, například v průběhu buněčného dýchání na komplexech I a III. Mitochondrie na druhou stranu disponují mechanismy, kterými se volným radikálům brání. Těmto látkám říkáme antioxidanty. Antioxidanty mohou být rozděleny na enzymatické, mezi které patří například superoxidodismutáza, glutathionperoxidáza, a neenzymatické, kterými jsou například glutathion nebo vitamíny A, E.

Klíčová slova

mitochondrie, volné radikály, antioxidanty, komplexy, dýchací řetězec, Krebsův cyklus

Summary

Mitochondria are oval cellular structures in eukaryotic cells. They compose of a porous outer membrane, inner membrane-cristae and matrix. Their role in the body is of crucial importance because mitochondria are able to produce energy-rich adenosine triphosphate that functions as a source of energy in the cell. Other functions of mitochondria are, for example, maintenance of redox potential, temperature, cell respiration, Krebs cycle, β -oxidation of fatty acids, etc.

β -oxidation is a process that accounts for oxidation of fatty acids and production of acetyl-CoA, which participates in the Krebs cycle. This cycle is a sequence of reactions that form a metabolic pathway related to glycolysis ongoing in the cytoplasm. Substances produced in the Krebs cycle serves as intermediates for following processes. Respiratory chain is one of these processes. It consists of four complexes located in space between membranes. Process that follows the respiratory chain is oxidative phosphorylation. This process is located in the space between the membranes and it produces adenosine triphosphate, ATP.

Mitochondria are unique because they contain own DNA. Its mutations may be, however, both a subject or a cause of oxidative stress and free radical production. Free radicals are formed in the metabolic pathways during energy production, main production occurs in cellular respiration at complexes I and III.

Mitochondria, on the other hand, include substances which prevent free radical toxic effects; these substances have been named antioxidants. They can be divided into two groups - enzymatic, which include superoxide dismutase and glutathione peroxidase, and non-enzymatic, which are glutathione and vitamins A and E.

Keywords

mitochondria, free radicals, antioxidants, complexes, respiratory chain, Krebs cycle

Obsah

1. ÚVOD.....	11
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
2.1 Struktura mitochondrií.....	12
2.1.1 Membrána mitochondrií.....	13
2.1.1.1 Vnější membrána.....	13
2.1.1.2 Vnitřní membrána.....	14
2.1.2 Lokalizace mitochondrií v buňce.....	16
2.2 Mitochondriální DNA.....	17
2.2.1 Genetický systém mitochondrií.....	17
2.2.2 Biogeneze mitochondrií.....	18
2.3 Funkce mitochondrií.....	19
2.3.1 Funkce makroergních fosfátů.....	21
2.3.2 Redoxní potenciál.....	22
2.3.3 Krebsův (citrátový) cyklus.....	22
2.3.4 Dýchací řetězec.....	23
2.3.4.1 Komplex I.....	24
2.3.4.2 Komplex II.....	25
2.3.4.3 Komplex III.....	26
2.3.4.4 Komplex IV.....	27
2.3.5 Oxidační fosforylace.....	27
2.3.6 Termogeneze.....	29
2.4 Mutace mitochondriální DNA.....	29
2.5 Produkce volných radikálů v mitochondriích.....	30
2.5.1 Volné radikály.....	30
2.5.1.1 Reaktivní formy kyslíku, ROS.....	31
2.5.1.2 Reaktivní formy dusíku, RNS.....	32
2.5.2 Intramitochondriální produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku.....	32
2.6 Antioxidační ochrana mitochondrií.....	33
3. ZÁVĚR.....	35
4. SEZNAM LITERATURY.....	36

Seznam zkratek

acetyl-CoA – acetyl koenzym A

ADP - adenosindifosfát

ANT – aniontový transporter

ATP - adenosintrifosfát

CAT – kataláza

CoA – koenzym A

CTP - cytosintrifosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ER – endoplasmatické retikulum

FAD – flavinadenindinukleotid

FNM – flavinmomonukleotid

GPx – glutathionperoxidáza

GSH – glutathion

GTP - guanosintrifosfát

MK – mastná kyselina

mRNA – mediátorová RNA

mtDNA – mitochondriální DNA

NAD – nikotinamidadenindinukleotid

NADPH – redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát

RNA – ribonukleotidová kyselina

RON – reaktivní formy dusíku

RONS – reaktivní formy kyslíku a dusíku

ROS – reaktivní formy kyslíku

rRNA – ribozomální RNA

SOD – superoxiddismutáza

tRNA – transportní RNA

UCP – uncoupling protein

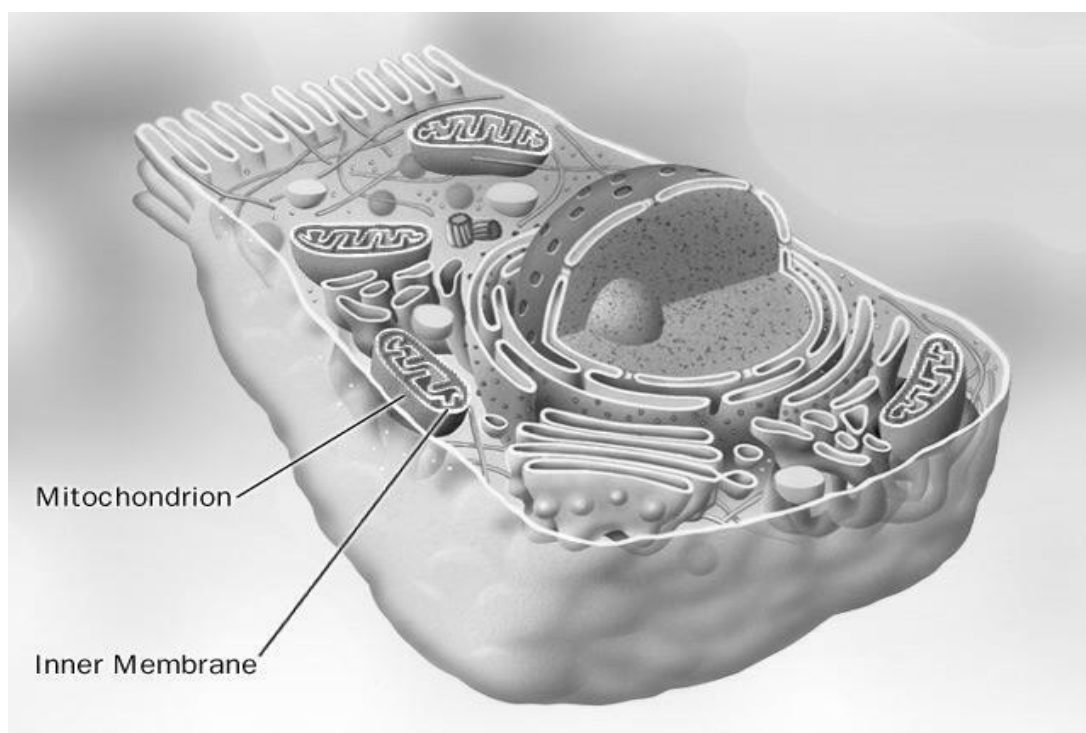
UTP – uridintrifosfát

1. Úvod

Téměř všechny eukaryotní buňky obsahují mitochondrie, které zauímají mezi membránovými organelami zvláštní postavení. Tyto útvary se mohou lišit velikostí i tvarem, v živých buňkách se pohybují, mění tvar a mohou se i dělit. U mitochondrií se předpokládá, že vznikly endosymbiózou aerobních alfa-proteobakterií nebo archebakterií s jednoduchou anaerobní eukaryotní buňkou. Mitochondrie se přizpůsobily životu v buňce, ale i přes to mají svoji vlastní genetickou DNA, tj. mitochondriální chromosom.

Mitochondrie dále obsahuje vlastní proteosyntetický aparát, který produkuje část bílkovin, jež jsou většinou kódovány jadernými geny. Tyto subcelulární organely jsou také obaleny dvěma samostatnými biomembránami, které vytvářejí vnější a vnitřní kompartmenty. Mitochondrie se vyznačují svojí složitou stavbou vnitřní části.

Tyto buněčné organely prošly během vývoje několika funkčními i stavebními změnami od ztráty nepotřebných genů, redukci genomu, po složení proteinů nacházejících se uvnitř. Dalo by se říct, že je to samostatně fungující jednotka v buňce, kde probíhá buněčné dýchání. Tato organela se podílí na mnoha činnostech od syntézy ATP, Krebsova cyklu, přes udržování redox-potenciálu, až po regulaci buněčné smrti.



Obrázek 1: Lokalizace mitochondrií v eukaryotní buňce (www.gymkh.cz, 5.6.2012, 15:40)

2. Teoretická část

2.1 Struktura mitochondrií

Mitochondrie jsou nejčastěji objemově nejrozsáhlejší kompartmenty většiny eukaryotních buněk, které se nacházejí v cytoplasmě. Například u jaderných buněk tvoří přibližně jednu pětinu objemu buňky, a jejich počet je 1 až 2 tisíce. Tyto organely jsou často popisovány jako oválné struktury o průměru 0,5-1 μm , avšak jejich délka se liší (Gabaldón T et al., 2004; Gray MW et al, 1999; Křiváková P et al., 2005; Nečas O, 1989; Scheffler IE, 2001).

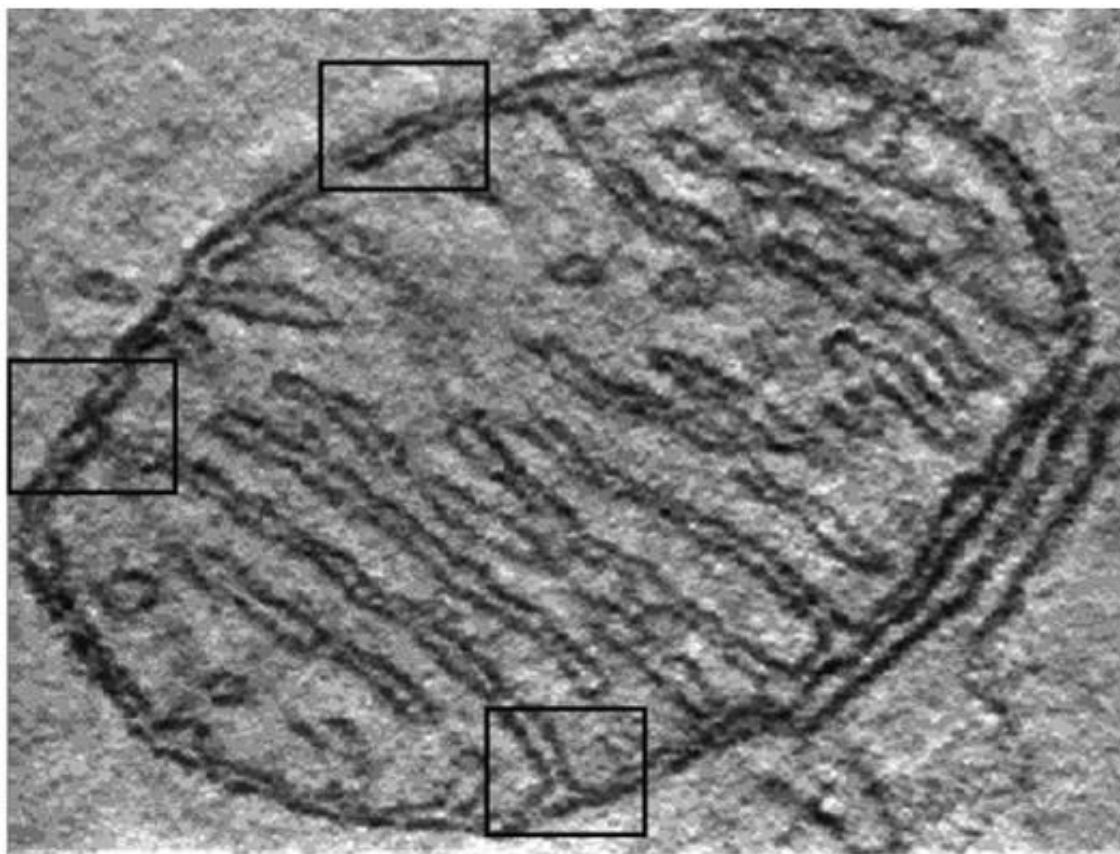
Mitochondrie jsou v buňce v těsném kontaktu s buněčnými organelami, hlavně s endoplazmatickým retikulem a cytoskeletem, ke kterým jsou připojeny pomocí stavebních jednotek tzv. mikrotubulů. Ty je fixují na určitém místě buňky, obzvláště tam, kde je vysoká spotřeba energie, jako např. u mikrofibrilů srdečního svalu, nebo bičíků spermii. Tyto stavební jednotky mohou také regulovat jejich pravidelné přemísťování v buňce. (Frey TG et al., 2000; Nečas O, 1989; Perkins GA et al., 2000; Scheffler IE, 2001).



Obrázek 2: Mitochondrie v těsném kontaktu s endoplazmatickým retikulem (<http://users.rcn.com>, 5.6.2012, 15:55)

2.1.1 Membrána mitochondrií

Mitochondrie jsou obaleny dvojitou membránou, která se rozděluje na vnější a vnitřní. Tato struktura membrány odráží jejich endosymbiotický původ. Obě membrány se liší strukturou, svými vlastnostmi a chemickou strukturou (Gabaldón T et al., 2004; Kriváková P, 2005; Nečas O, 1989).



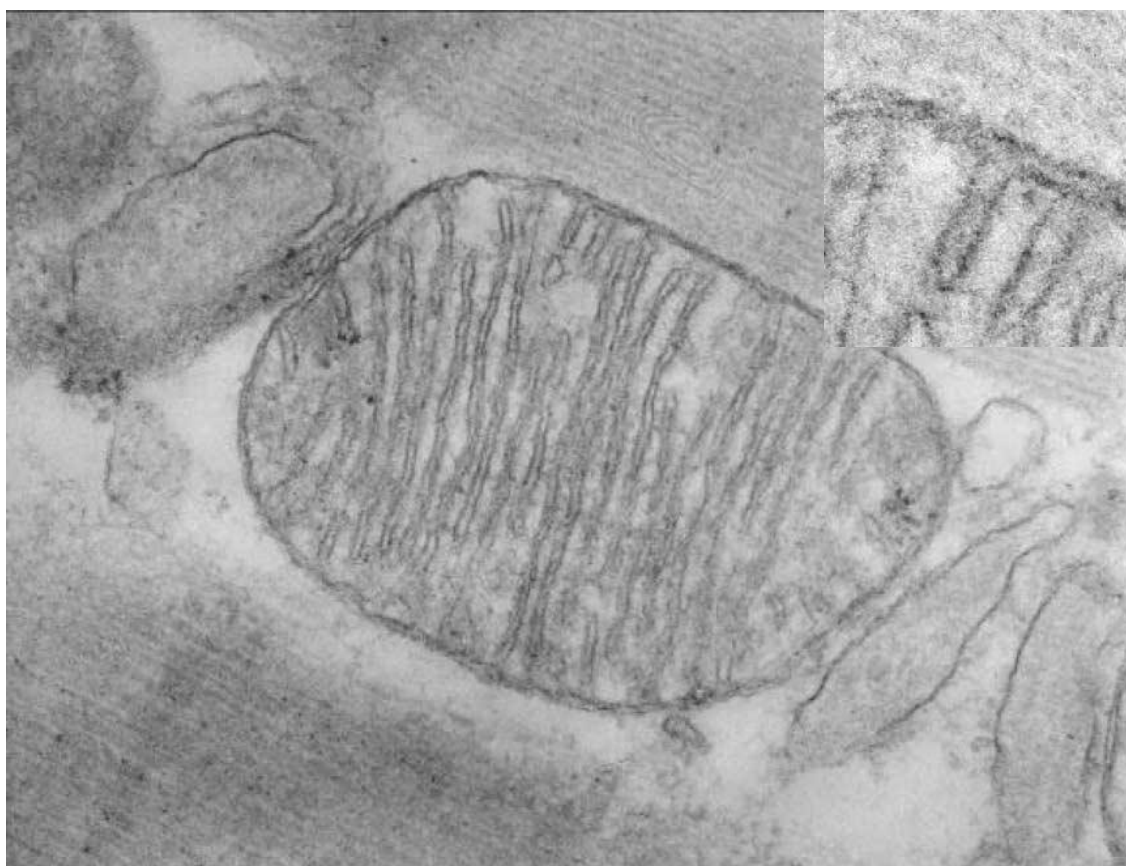
Obrázek 3: Struktura mitochondriální membrány (převzato z Frey TG et al., 2000)

2.1.1.1 Vnější membrána

Vnější membrána je hladká a uzavírá intermembránový prostor vůči cytoplazmě buňky a svým složením se velmi liší od membrány vnitřní. Obsahuje membránové kanálky, jež jsou tvořeny velkým množstvím transportních proteinů, kterými mohou procházet látky o molekulové hmotnosti do 10 000 daltonů. Těmito látkami mohou být ionty a menší molekuly. Avšak bílkoviny jsou už příliš velké a membránou neprojdou. Vzhledem k této relativně velké propustnosti se složení intermembránového prostoru velice blíží složení cytoplazmy (Kriváková P, 2005; Nečas O, 1989).

2.1.1.2 Vnitřní membrána

Vnitřní membrána je daleko složitější, než membrána vnější, ať ve svém uspořádání, svých funkcích nebo vlastnostech. Vychlipuje se do vnitřního prostoru mitochondrie a tvoří výběžky, jež Palade nazval jako kristy (Palade GE, 1952). Kristy se otvírají do mezimembránového prostoru a tvoří neúplné přepážky, čímž se jejich povrch zvětšuje přibližně pětikrát. Jsou to vlastně váčky, které jsou spojeny tubulárními strukturami s vnitřní membránou. Vzhled a počet krist závisí na stavu a typu mitochondrie. Její dynamická struktura je schopna v závislosti na osmotických nebo metabolických podmínkách měnit svůj tvar. Prostor mezi výběžky je vyplněn hmotou, která se nazývá mitochondriální matrix (Frey TG et al., 2000; Nečas O, 1989; Perkins GA et al., 2000; Scheffler IE, 2001).

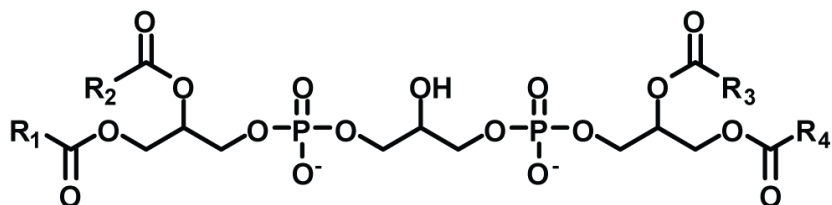


Obrázek 4: Struktura mitochondriálních krist (převzato z Gilkerson RW et al., 2003)

Hlavní součástí vnitřní membrány jsou enzymy respiračního řetězce a enzymový komplex ATP-syntetázy, kterého se zde nachází asi 94 % (Gilkerson RW et al., 2003). Dále obsahuje množství transportních proteinů, které selektivně vyměňují metabolity pro

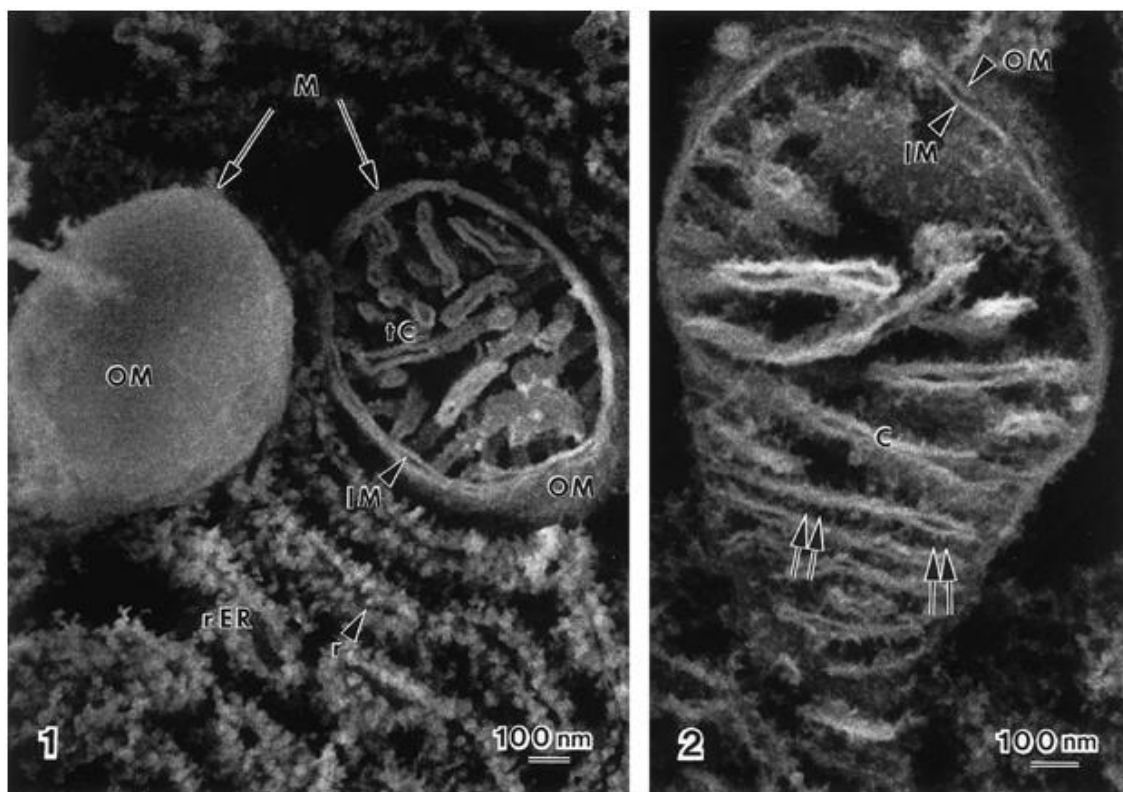
enzymy v matrix. Mitochondriální hmota dále také obsahuje mitochondriální DNA, malé ribozomy obsahující proteosyntetické enzymy a tRNA (Křiváková P, 2005). V matrix jsou uloženy i stovky enzymů, které metabolizují pyruvát, mastné kyseliny, enzymy cyklu kyseliny citronové a Krebsova cyklu, které oxidují vzniklý acetyl-CoA (Nečas O, 1989).

Vnitřní membránou procházejí mimo prostřednictví nosičů jen kyslík, oxid uhličitý a lipofilní látky (Scheffler IE, 2001). Jednou z lipofilních látek je kardiolipin, kterého membrána obsahuje poměrně vysokou koncentraci a je určen ke generování elektrochemických potenciálů pro dopravu substrátů a syntézu ATP. Nejvyšší koncentrace kardiolipinu se nachází v savčích srdcích, ale i v ostatních tkáních eukaryotických buněk se běžně vyskytuje (Schlame M et al., 2000). Kardiolipin je unikátní fosfolipid s dimerickou strukturou, skládající se z dvou molekul fosfatidátů, napojených kovalentně na molekulu glycerolu. Zvláštností tohoto fosfolipidu je, že je to jediný lipid syntetizován přímo v mitochondriích a nemusí tedy přecházet do vnitřního prostoru mitochondrie, zároveň je pro její funkci nepostradatelný. Ostatní lipidy mitochondriálních membrán jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu (ER) buňky, a jsou přenášeny pomocí specifických transportních proteinů (Gohil VM et al., 2004; Křiváková P, 2005; Nečas O, 1989).



Obrázek 5: Vzorec kardiolipinu, (<http://en.wikipedia.org>, 5.6.2012, 16:40)

Mezi vnitřní a vnější membránou se nacházejí místa, která membrány spojují. Tyto kontakty jsou tvořeny ze složek zodpovědných za transport proteinů tvořených pomocí interakcí vnější a vnitřní membrány. Počet kontaktních míst ovlivňuje energii mitochondrie a stupeň syntézy ATP. V obou membránách se též nachází celá řada enzymových komplexů (Gilkerson RW et al., 2003; Nečas O, 1989; Perkins GA et al., 2000; Skulachev VP, 2001).



Obrázek 6: Vnitřní stavba mitochondrie; mitochondrie (M), vnější membrána (OM), vnitřní membrána (IM), intracelulární prostor (IC), kristy (C), drsné endoplasmatické retikulum (rER), ribozómy (r); (převzato z Perkins GA et al., 2000)

2.1.2 Lokalizace mitochondrií v buňce

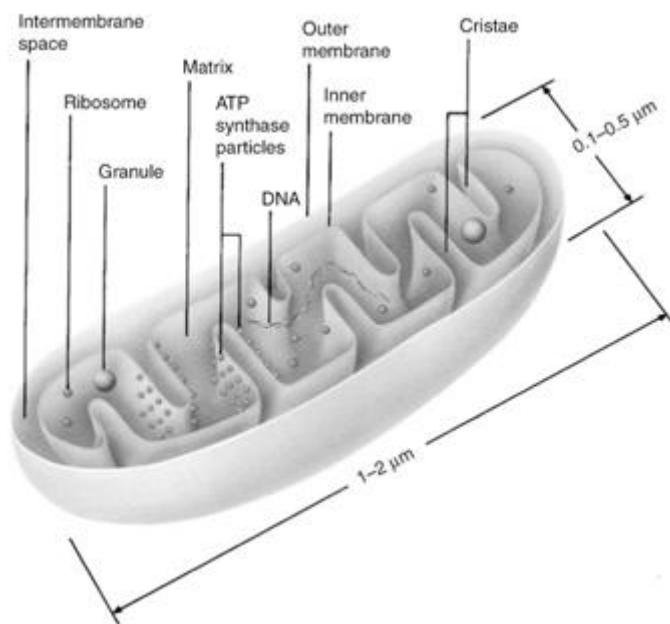
Mitochondrie jsou v buňkách drženy na určitých místech, avšak v případě potřeby je buňka schopna přemístit je na jiné místo pomocí molekulárních motorů. Tyto subcelulární útvary se pohybují podél mikrotubulů či podél svazku aktinových vláken na místo, které je pro buňku výhodnější (Dimmer KS et al., 2002; Gilkerson RW et al., 2003; Rube DA et al., 2004; Scheffler IE, 2001; Skulachev VP et al., 2004).

Mitochondrie existují v buňce buď jako izolované a samostatně organizované částice nebo mnohem častěji v podobě mitochondriální sítě. Tato síť je velice citlivá na energetický potenciál a podílí se na sloučení, dělení a tedy i množení organely. Mitochondrie v mitochondriální síti mohou přenášet energii a tak se v buňce nacházejí kdekoli, to znamená i na periferii nebo poblíž jádra (Dimmer KS, 2002; Nečas O, 1989; Scheffler IE, 2001; Skulachev VP, 2001; Westermann B, 2002).

Mitochondrie a současně tedy mitochondriální síť jsou v úzkém kontaktu se všemi buněčnými organelami, nejvíce však s endoplazmatickým retikulem a cytoskeletem (Frey TG et al., 2000; Perkins GA et al., 2000; Scheffler IE, 2001).

2.2 Mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) je uložena v matrix, která je ohraničena vnitřní membránou. S dělením mitochondrií se současně dělí i mitochondriální DNA. Nejčastěji se DNA dědí po matce, jen zřídka se nachází biparentální DNA od obou rodičů (Dimmer KS et al., 2002; Chen H et al., 2012).



Obrázek 7: Mitochondriální DNA uvnitř matrix (převzato z Frey TG et al., 2000)

2.2.1 Genetický systém mitochondrií

Mitochondrie obsahují kruhové molekuly DNA, tzv. mitochondriální DNA, které nejsou spojeny histony, a podobají se tedy chromozómu prokaryotního typu. Mitochondriální chromozómy jsou uloženy v matrix a připojeny na vnitřní membránu mitochondrie. Mitochondrie v buňkách obsahují chromozómy ve více exemplářích, u člověka mezi 5-10. Molekulová hmotnost mtDNA se liší, u člověka $9-12 \times 10^6$ daltonů a jiných organismů. Liší se i množství mtDNA z celkového množství DNA buňky, u savců je to asi 1 % (Nečas O, 1989).

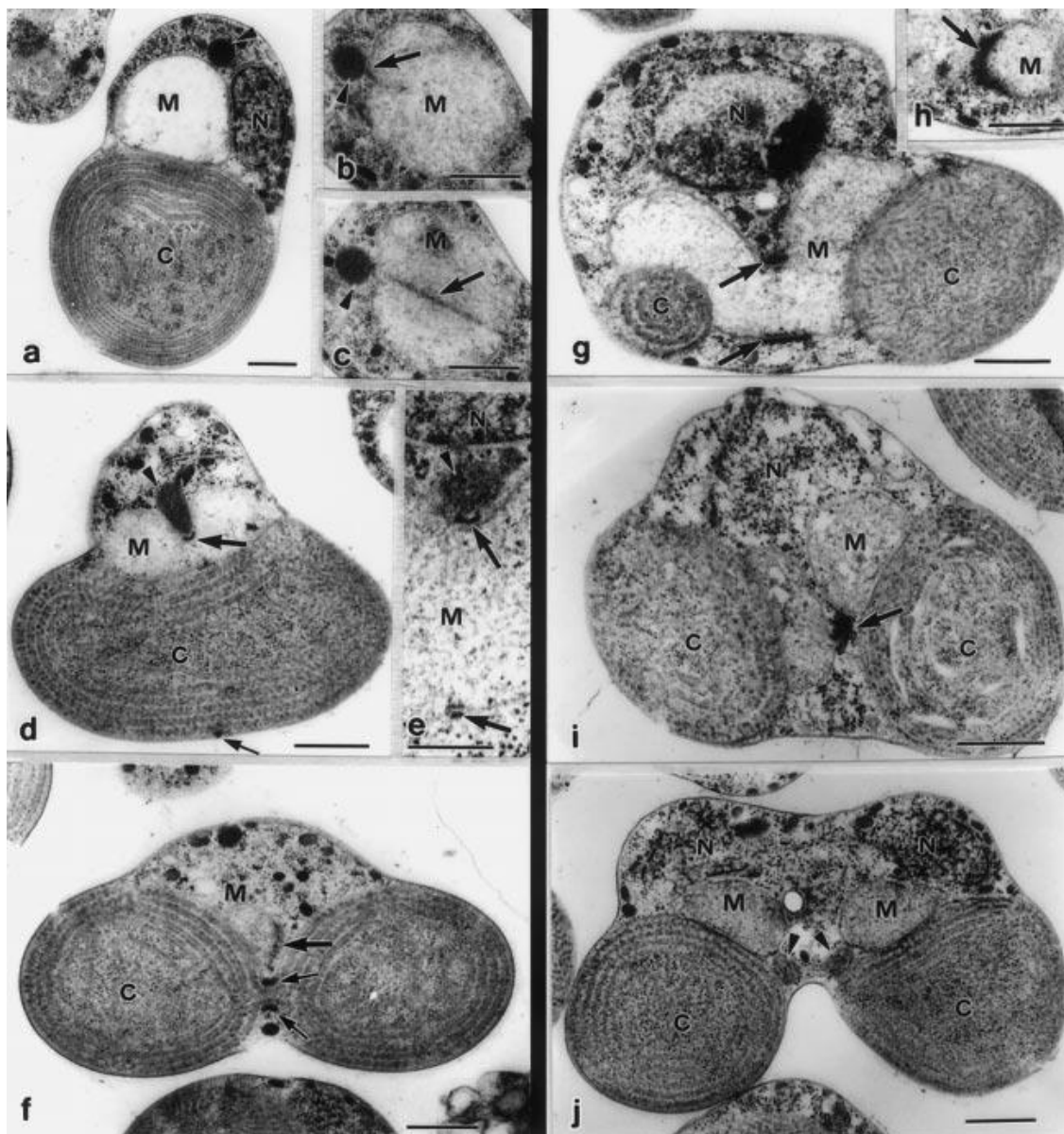
Mitochondriální chromozóm se nezávisle na jaderných chromozómech replikuje v buněčném cyklu. Proteosyntetický systém se podobá prokaryotnímu, rovněž se liší i genetický kód od eukaryotního. Transferové RNA mitochondriálního proteosyntetického aparátu jsou kódovány mitochondriální DNA (Kasiviswanathan R et al, 2011).

U řady chromozómů je již dnes kompletně známa genetická mapa mitochondriální DNA. U buněk člověka je mtDNA tvořena 16 569 nukleotidy. Je složena ze dvou rRNA genů, 22 tRNA genů a 13 cistronických genů (Larsson NG, 2010; Nečas O, 1989).

U člověka jsou obě vlákna DNA transkripována z jednoho promotoru jako obrovská souvislá molekula RNA. Oba transkripty jsou tedy zcela symetrické. Posttranskripční modifikací obou transkriptů vznikají jednotlivé rRNA, tRNA a mRNA. Z transkriptu lehkého vlákna je asi 90 % sekvencí ztraceno, a tudíž nemají informační funkci (Stumpf JD et al., 2011).

2.2.2 Biogeneze mitochondrií

Nové mitochondrie vznikají autoreprodukcí, tj. dělením již existujících mitochondrií. Tento proces je možný, protože mitochondrie obsahují svoji vlastní mtDNA, díky které je zajištěna spojitost s replikovaným chromozomem. Dělení mitochondrií závisí na schopnosti membrán se zaškrcovat. Vnitřní membrána svým zaškrcením vytváří dva vnitřní oddělené prostory. Současně dochází k zaškrcení i vnější membrány. Molekuly mtDNA jsou připojeny na vnitřní stranu membrány a jsou tedy zcela účelně separovány do dceřiných buněk. Rozdělení mitochondriálních organel předchází jejich růst, prodlužování a replikace mtDNA. Existují zde přesné mechanismy, které jsou schopny dopravovat potřebné proteiny do vnější, vnitřní membrány a matrix mitochondrií. Uplatňují se zde DNA- a RNA- polymerázy, i enzymy Krebsova cyklu. Místa styku vnitřní a vnější membrány mohou napomáhat k přechodu proteinů dovnitř mitochondrie (Bogehagen DF et al, 2003; Dimmer KS et al., 2002; Kasiviswanathan R et al, 2011).



Obrázek 8: Biogeneze mitochondrií (převzato z Perkins GA et al, 2000)

2.3 Funkce mitochondrií

Funkce mitochondrií se odvíjí od jejich struktury, ovlivňuje ji ale i aktuální stav a typ buňky, ve které se vyskytují. Většina procesů probíhajících uvnitř organely je již dobře popsána. Základní funkcí těchto útvarů je přeměna energie ve formě ATP, ale zároveň představují i transportní formu energie. Mitochondrie vytvářejí ATP, který je přímým a hlavním zdrojem energie pro všechny energetické potřeby buňky. Těmto procesům říkáme, že to jsou procesy endergonické (Ledvina M et al., 2004; Nečas O, 1989).

Zdrojem energie pro syntézu ATP z ADP je protonmotorická síla, která je podmíněna rozdílným pH neboli odlišnou koncentrací protonů na obou stranách vnitřní mitochondriální membrány. Tento gradient protonů podmiňující tvorbu ATP vzniká transportem protonů z vnitřního mitochondriálního prostoru do prostoru mezi vnitřní a vnější membránou mitochondrie komplexu I, III a IV, komplex II se této tvorbě neúčastní. Protonový gradient se mění společně s odlišným umístěním mitochondrií v buňce. Tento proces se nazývá též chemiosmóza (Křiváková P, 2005; Taylor SW, 2003).

Dalšími funkcemi, kterými mitochondrie disponují, jsou uvedeny v následující tabulce 1.

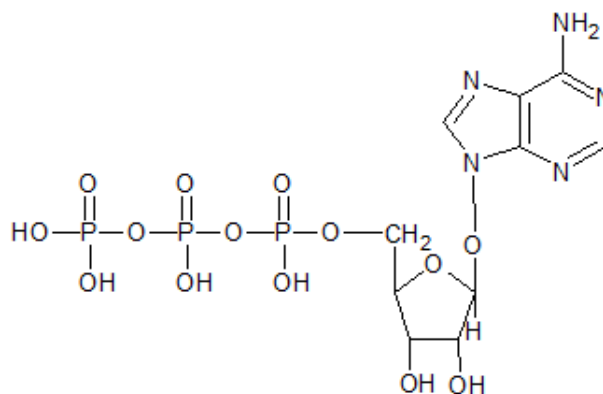
Tabulka 1: Rozdělení mitochondriálních funkcí

Metabolická	Udržování redoxního potenciálu Buněčná respirace Regulace teploty Krebsův cyklus β -oxidace mastných kyselin Dekarboxylace pyruvátu
Syntetická	Zdroj a produkce ROS Produkce hemu
Signální	Řízení (formování) Ca^{2+} signálu Buněčná signalizace
Ochranná	Produkce antioxidantů
Apoptóza	Spouštění a regulace buněčné smrti

Ve vnitřní mitochondriální membráně se nachází komplexy dýchacího řetězce a oxidační fosforylace. Oxidační fosforylací mitochondrie produkují téměř 100 % energie ve formě ATP. Funkce dýchacího řetězce a oxidační fosforylace jsou těsně spojeny syntézou ATP. Z mitochondrie se ATP přenáší pomocí adeninnukleotidového translokátu. Pro funkci enzymatických komplexů je potřeba mnoha proteinů (Křiváková P, 2005; Nečas O, 1989).

2.3.1 Funkce makroergních fosfátů

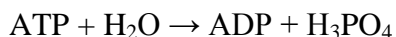
Makroergní fosfátové vazby v energetickém metabolismu buňky mají mimořádný význam pro energetické přenosy a rovněž schopnost syntetizovat ATP. Jsou to kovalentní vazby s vysokým obsahem energie, a proto jsou snadno štěpitelné. Makroergní vazby označujeme obecně symbolem „~“, makroergní vazby fosfátové pak „~P“ nebo „Ⓟ“. Rozštěpením jedné makroergní vazby se uvolní energie kolem 30 kJ. Nejčastějšími organickými fosfáty s makroergickými vazbami jsou nukleosidtrifosfáty. Z nich je nejdůležitější adenosintrifosfát (ATP). Je to nukleosid složený s adeninu, ribózy a tří zbytků kyseliny fosforečné. Makroergní vazby jsou mezi 1. a 2. a mezi 2. a 3. zbytkem fosforečné kyseliny:



Obrázek 9: Adenosintrifosfát (www.wikipedia.com, 14.6.2012, 14:00)

Analogickou strukturou mají pak i ostatní nukleosidtrifosfáty, tj. guanosintrifosfát (GTP), cytosintrifosfát (CTP) a uridintrifosfát (UTP).

Pro energetické přenosy v buňce je nejdůležitější hydrolyza trifosfátů na difosfáty, tj. odštěpení nebo naopak vazba posledních zbytků kyseliny fosforečné (reakce 1), změna volné energie ($-\Delta F$) je přibližně 30 kJ/mol (Nečas O, 1989).



Reakce 1

Při fosforylaci ADP na ATP je tedy energie vázána, při defosforylaci ATP na ADP je energie uvolňována. ATP a ostatní nukleosidtrifosfáty tak fungují jednak jako akceptory energie, a jednak jako donory energie. Štěpení ATP na ADP je v buňce katalyzováno různými enzymy s ATPázovou aktivitou, obecně je označujeme jako ATPázy.

2.3.2 Redoxní potenciál

Buněčné neboli vnitřní dýchání představuje oxidačně redukční procesy v mitochondriích, které vedou k přeměně energie. Ukazatelem metabolické aktivity je spotřeba kyslíku ve tkáních. Buněčné dýchání se skládá z několika samostatných dějů, které na sebe těsně navazují a využívají postupně své meziprodukty (Hyun Ju Lee et al., 2011).

2.3.3 Krebsův (citrátový) cyklus

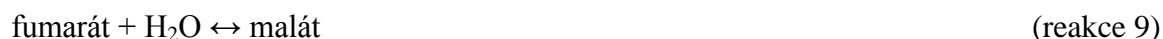
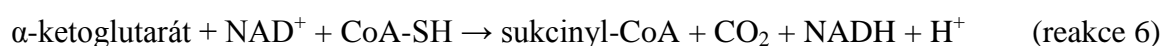
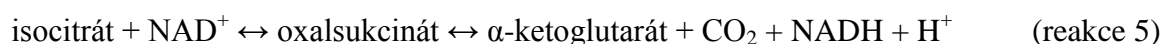
Krebsův cyklus je sled reakcí, které tvoří společnou metabolickou dráhu navazující na glykolýzu probíhající v cytoplasmě buňky, při aerobní oxidaci sacharidů, lipidů i proteinů. Proces glykolýzy se skládá z několika kroků katalyzovaných různými enzymy, ve kterém se NAD^+ regeneruje přenosem vodíku z NADPH na kyslík. Dále probíhá dekarboxylace pyruvátu, který katalyzuje komplex tří enzymů tzv. pyruvátdehydrogenázový komplex lokalizovaný v mitochondriích. Produktem reakce je acetyl-koenzym A podle reakce 2, který je dále spotřebován v tomto citrátovém cyklu za velkého zisku ATP (David L et al., 2006).



V eukaryotních buňkách jsou enzymy Krebsova cyklu uloženy v mitochondriální matrix volně, nebo zakotvené ve vnitřním povrchu vnitřní mitochondriální membrány. Acetyl-CoA je acetylový zbytek navázaný na koenzym A a vstupuje do cyklu, kde kondenzuje s oxalacetátem, za katalýzy enzymem citrát-syntázou a vedlejší produkt sukcinyl-CoA. Hydrolýza vazby mezi koenzymem A a citrátem uvolní značné množství energie jako teplo (reakce 3). Citrát je dále dehydratován na cis-akonitát a pak rehydratován na isocitrát za katalýzy enzymem akonitázou (reakce 4). Isocitrát se dehydrogenuje pomocí koenzymu NAD^+ přes oxalsukcinát na α -ketoglutarát a vedlejší produkty $\text{NADH} + \text{H}^+$ a oxid uhličitý. Protony nesené koenzymem jsou v dýchacím řetězci použity k syntéze 3 molekul ATP (reakce 5). V dalším kroku se α -ketoglutarát dekarboxyluje na sukcinyl-CoA za přítomnosti enzymů a kofaktorů (reakce 6). Sukcinyl-CoA se pomocí enzymu sukcinátthiokinasy katalyzuje na sukcinin. Uvolněná energie je použita k vytvoření makroergní vazby mezi fosfátem a GDP, ze kterého nakonec vzniká

ATP (reakce 7). Sukcinát je dehydrogenován na fumarát za katalýzy enzymem sukcinát-dehydrogenáza. Tento enzym vázán na vnitřní povrch mitochondriální membrány je jediný, který přenáší protony na flavoprotein bez účasti NAD^+ . Redukovaný koenzym FADH_2 přenáší redukční ekvivalenty do dýchacího řetězce, ale na rozdíl od NADH vytvoří pouze dvě molekuly ATP (reakce 8). Další reakcí, adicí vody na fumarát vznikne malát, kterou katalyzuje enzym fumaráza (reakce 9). V posledním kroku je malát dehydrogenován enzymem malát-dehydrogenázou zpět na oxalacetát podle reakce 10 (Gohil VM, 2004; Murray RK et al., 2003; Voet D et al., 2011).

Během jednoho Krebsova cyklu při oxidaci jedné molekuly acetyl-CoA vzniká 12 molekul ATP (David L et al., 2006).

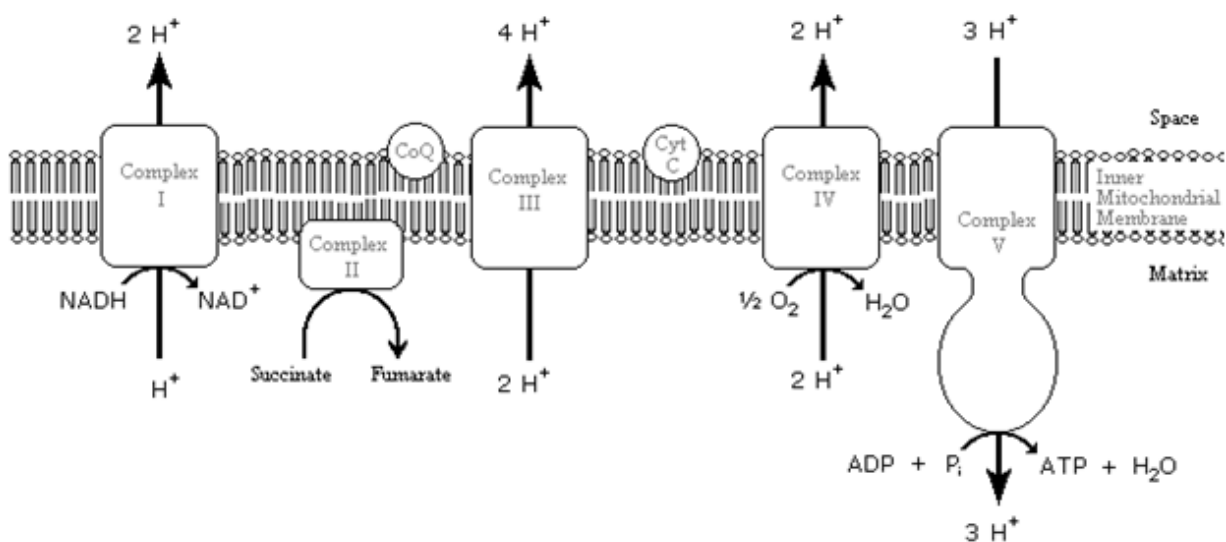


2.3.4 Dýchací řetězec

Dýchací řetězec je umístěn na vnitřní mitochondriální membráně, kde je uložen přímo v lipidové dvojvrstvě společně s komplexem pro oxidační fosforylaci. Tvoří závěrečnou fázi aerobního katabolického procesu známého jako buněčné dýchání. Jedná se o endergonické procesy představují ve svém celku procesy, při kterých je metabolitům odnímán vodík dehydrogenačními enzymy. Tyto dehydrogenační enzymy rozkládají různé substráty, uložené v mitochondriální matrix, v průběhu Krebsova cyklu a oxidace mastných kyselin. Redukované metabolity z předchozích procesů jsou dále postupně oxidovány systémem oxidoredukčních enzymů, kterými jsou pyridinové a flavinové dehydrogenázy, cytochromy a další přenašeče elektronů. Konečným enzymem tohoto procesu, který se účastní dýchacího řetězce mitochondrie, je enzym cytochromoxidáza, který oxiduje vodík molekulárním kyslíkem na vodu (Gohil VM, 2004).

Dýchací řetězec se skládá z multienzymové jednotky, která obsahuje čtyři enzymové lipoproteinové komplexy, které obsahují 4-46 peptidových podjednotek. Podjednotky kromě komplexu II, který je kódovaný pouze jadernou DNA, jsou kódovány jak mitochondriální tak jadernou DNA. Sestavení podjednotek do komplexu je složitý děj regulovaný a zprostředkovaný řadou genů. Komplexy tvoří soustavu oxidoredukčních článků s postupně zvyšujícím redoxním potenciálem (Gohil VM, 2004).

Význam dýchacího řetězce tedy spočívá v zisku energie. Společně s již zmíněným Krebsovým cyklem a β -oxidací mastných kyselin vzniká v mitochondriích převážná většina ATP. Za účasti tohoto cyklu se z každé molekuly $\text{NADH} + \text{H}^+$ vyrobí 3 ATP a z každé molekuly FADH_2 vzniknou 2 molekuly ATP. Dýchací řetězec je dále spojen s enzymy komplexu ATPázy, které syntetizují ATP (Gohil VM, 2004; Nečas O, 1989).



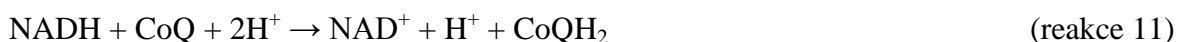
Obrázek 10: Elektronový transportní řetězec ve vnitřní mitochondriální membráně (www.nspka.cz, 30.4.2010, 10:45)

2.3.4.1 Komplex I

Komplex I, přesněji NADH koenzym Q oxidoreduktáza, (popř. NADH dehydrogenáza) je velký enzymatický komplex, který je prvním článkem v elektronovém transportním řetězci. Jedná se pravděpodobně o největší membránový proteinový komplex ve vnitřní mitochondriální membráně, jelikož dosahuje velikost okolo 650 kDa. Jeho umístění napříč vnitřní membrány zásadně ovlivňuje protonový gradient, což dále umožňuje syntézu ATP (Voet D, 1995).

Komplex I je tvořen z několika různých bílkovinných podjednotek, které jak již bylo řečeno, jsou kódovány mtDNA nebo nDNA. V tomto případě mitochondriální DNA kóduje sedm podjednotek a více než 30 zbylých je kódováno jadernou DNA (Cammack R, 2006). Kromě bílkovinných podjednotek obsahuje komplex I i část nebílkovinnou, jakou je např. molekula flavinmononukleotidu (FNM), skupina FeS metaloproteinů nebo flavinový koenzym (Cammack R et al., 2006).

Reakci probíhající v komplexu I katalyzovanou enzymem NADH koenzym Q oxidoreduktáza, lze zapsat schématem uvedeným v reakci 11. S NADH reduktázou se asociuje redukovaný koenzym NADH a předává své elektrony celému multiproteinovému komplexu. Z NADH přechází na komplex I dva elektrony, které se předávají na flavinmononukleotid, pokračují na FeS metaloproteiny a končí na koenzymu Q. Výhodou přenašečů flavinmononukleotidu a ubichinonu jsou jejich oxidační stavy, protože mohou přijmout od NADH oba elektrony, které dále odevzdají na přenašeče elektronů v komplexu III (VoetD, 1995).



Průchod elektronů komplexem NADH koenzym Q oxidoreduktázy způsobuje pokles potenciálu. Většina této energie z průchodu dvou elektronů se využije na vlastní pumpování čtyř protonů do mezimembránového prostoru. Takto se komplex I spolupodílí na tvorbě protonového gradientu (Murray RK et al., 2003).

2.3.4.2 Komplex II

Komplex II, též také sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza je enzymatický komplex, který katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát a současně redukuje ubichinon na ubichinol (Cammack R et al., 2006). Celý komplex II je vázán na vnitřní straně vnitřní mitochondriální membrány, kde na sobě má kovalentně navázaný koenzym FAD. Podle (reakce 12) FAD redukovaný na FADH následně vstupuje do dýchacího řetězce.



Sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza je tedy jedním z enzymů Krebsova cyklu, ale zároveň má i přímé spojení s dalšími fázemi buněčného dýchání. Z tohoto důvodu je to jediný enzym Krebsova cyklu, který není volně v mitochondriální matrix, ale je zakotven na vnitřní mitochondriální membráně (Voet D, 1995).

Sukcinát-koenzym Q oxidoreduktáza se kromě jiných podjednotek skládá hlavně z flavoproteinu, který obsahuje FAD a FADH. Další podjednotkou je FeS protein, který obsahuje komplex železa a síry. A v neposlední řadě jsou důležité i hydrofobní proteiny kotvící komplex k membráně (Cammack R, 2006).

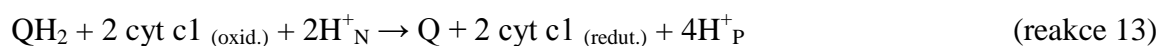
Činnost enzymu je inhibována malonátem, který se svojí stavbou velice podobá stavbě sukcinátu a působí tak kompetitivně inhibičně (Voet D, 1995). Další inhibiční účinek má také oxalacetát (Murray RK et al., 2003).

2.3.4.3 Komplex III

Komplex III neboli cytochrom bc1 komplex je velký enzymatický komplex v řadě článků dýchacího řetězce, který se podílí na vytváření protonového gradientu napříč membránou, jenž ve výsledku umožňuje syntézu ATP. Pracuje přitom jako oxidoredukční enzym, který oxiduje koenzym Q a redukuje cytochrom c (Trumpower BL, 1990).

Cytochrom bc1 je multiproteinový komplex opět uložený ve vnitřní mitochondriální membráně. U člověka obsahuje 11 různých polypeptidů, z nich jen cytochrom b je vyráběn přímo v mitochondriích a kódován mitochondriální DNA. V komplexu se nachází 4 redoxní centra, několik typů cytochromu a Rieskeho protein, který obsahuje FeS centrum (Cammack R. et al., 2006). Z krystalografické analýzy je známé složení komplexu III, který se skládá z dvou totožných oligomerických podjednotek. Tyto podjednotky je skládají v symetrický dimer a každá z nich má ještě dalších jedenáct různých podjednotek. Cytochrom bc1 komplex opět obsahuje Rieskeho protein, který je umístěn mezi cytochromem c1 a cytochromem b (Trumpower BL, 1990).

I komplex III je důležitou a nepostradatelnou součástí dýchacího řetězce, kde probíhá elektronový transport. Právě sem směřují elektrony z komplexu I a II. Zároveň je to jediné místo v dýchacím řetězci, kde se koenzym Q může oxidovat. Reakci probíhající na komplexu III můžeme zapsat podle následující reakce 13 (Miller FS et al., 2012).

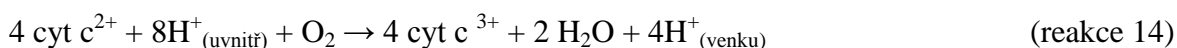


2.3.4.4 Komplex IV

Komplex IV, též cytochrom c oxidáza (COX) je poslední úsek dýchacího řetězce. Tento enzymatický komplex vsazený do vnitřní strany mitochondriální membrány dokáže oxidovat cytochrom c a energii využít k tvorbě již zmíněného protonového gradientu. V průběhu reakce dochází k redukci molekulárního kyslíku na vodu, z tohoto důvodu musí většina organismů neustále přijímat dýcháním kyslík (CammackR, 2006). Cytochrom c oxidázy se řadí do „terminálních oxidáz“, obsahujících měďnaté ionty a hem jako prostetické skupiny.

Komplex IV je strukturou opět multipodjednotkový, skládající se ze 8-13 podjednotek. Mitochondriální DNA kódují tři největší a nejhydrofóbnější podjednotky, zbytek proteinů je kódován jadernou DNA a transportován z cytosolu. Důležitou složkou komplexu jsou isoprostetické skupiny, které v dýchacím řetězci slouží jako redoxní centra, která se skládají z dvou hemů a dvou měďnatých center (Voet D et al., 2011).

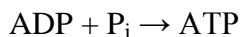
Při katalýze cytochromu c oxidázou dochází k zabudování jednoho protonu do molekuly vody a k přečerpání jednoho protonu z matrix do intermembránového prostoru podle reakce 14, čímž vzniká opět protonový gradient (Voet D et al., 2011). Dále dochází k transportu elektronů, pomocí různých proteinových a prostetických skupin až na konečný akceptor, kterým je kyslík (Hartmut M, 1999).



V komplexu IV se najednou musí shromáždit 4 elektrony, které doputovaly skrz prostetické skupiny, aby reakce mohla proběhnout. Zde existují malé molekuly, jako je např. kyanid, sirovodík nebo oxid uhelnatý, které mohou působit jako kompetitivní inhibitory (Gohil VM, 2004; Murray RK et al., 2003; Voet D et al., 2011).

2.3.5 Oxidační fosforylace

Též aerobní fosforylace je hlavním zdrojem energie aerobních organismů. Děj, při kterém se tvoří ATP při přenosu elektronů z NADH a FADH₂ na kyslík, probíhá v mitochondriích v návaznosti na děje v dýchacím řetězci. Jde o fosforylaci ADP na ATP, podle reakce 15, za katalýzy enzymu ATP-syntázou (Frey TG et al., 2002; Saraste M, 1999).



(reakce 15)

ATP syntáza je složitý transmembránový komplex umístěný na vnitřní mitochondriální membráně poblíž komplexů dýchacího řetězce (Jonckheere AI et al., 2012).

Zdrojem energie pro tento transport je energie postupně uvolňovaná při přesunu elektronů komplexy transelektronáz z vyšší energetické vrstvy na nižší. Tato energie se postupně shromažďuje do protonového gradientu. Současně se vytváří elektrický gradient neboli membránový potenciál vnitřní membrány mitochondrie. Pozitivní membránový potenciál na vnější straně a negativní na straně vnitřní. Vodíkové kationty mají tendenci se vracet, aby tento gradient vyrovnaly. Jediným místem, kde je zpětný průchod možný, jsou kanálky ATP syntézy (Campbell NA et al., 2006). Právě proud vodíkových kationtů skrz kanálek ATP-syntázy umožňuje výrobu ATP. Při vyrovnávání koncentrace protonů přes vnitřní membránu mitochondrií se osmotická energie přeměňuje na chemickou energii makroergních vazeb ATP. Konkrétně lze říci, že jedna molekula ATP vzniká při průchodu tří protonů skrz komplex ATP-syntázy (Rosypal S, 2003).

Přesný mechanismus není zcela objasněn, ale je známo, že rozhodující roli má enzymový komplex, tzv. F₁ + F₀ komplex lokalizovaný ve vnitřní mitochondriální membráně. Tento komplex je tvořen dvěma částmi (Jonckheere AI, 2012).

2.3.5.1 F₁ komplex

Část označující se jako F₁ komplex nebo stator, tvořený pěti typy subjednotek, z nichž se některé mohou opakovat. F₁ komplexy jsou umístěny na periferní části, vyčnívají jako velká granula z membrány připomínající „hlavy“ a mají reverzibilní ATP-ázovou aktivitu (Jonckheere AI, 2012).

2.3.5.2 F₀ komplex

Druhá část se označuje jako F₀ komplex, říká se mu též rotor a je tvořen integrálními membránovými proteiny. V mitochondriální membráně má tvar stopky (Jonckheere AI, 2012).

Vodíkové kationty způsobují při průchodu komplexem roztočení rotoru, který se otáčí současně se statorem. Točení statoru vyvolává změny v prostorovém uspořádání ATP

syntázy. Díky těmto periodickým změnám jsou odhalována aktivní místa, na kterých probíhá samotná syntéza ATP.

2.3.6 Termogeneze

Termogeneze znamená zvyšování tepla v těle teplokrevných živočichů vystavených chladu. Kromě třesové termogeneze se podílejí na udržování tělesné teploty i jiné mechanismy. Jedním z nich je možnost zvýšení propustnosti vnitřní membrány mitochondrií pro specifické vodíkové kationty. Zvýšení propustnosti pro protony je zprostředkováváno aniontovými transportéry (ANT), mastnými kyselinami (MK), glutamát antiportem a uncoupling proteiny (UCP). Energie uvolněná během buněčného dýchání se přímo přemění na teplo (Křiváková P et al., 2005).

Aniontový transportér usnadňuje přenos aniontu MK z matrixové strany do mezimembránového prostoru. Na vnější straně vnitřní membrány aniont mastné kyseliny naváže proton a membránou difunduje zpět do matrix, kde dochází k deprotonaci (Kadenbach B, 2003; Kowaltowski AJ, 2000; Ricquier D et al., 2000).

Mitochondrie v hnědé tukové tkáni mají omezenější tvorbu ATP, nižší elektrochemický potenciál a velice aktivní respiraci. Ve vnitřní mitochondriální membráně se nachází velké množství aniontového transportéru UCP-1, který byl dlouho považován za unikátní protein pro hnědou tukovou tkáň. V poslední době byly však objeveny i další, např: UCP-2, UCP-3, UCP-4 až UCP-5. Každý z nich se vyskytuje v jiné tkáni a jiné koncentraci, a jejich funkce doposud nejsou zcela objasněny (Gohil VM et al., 2004; Ježek P, 2002; Kowaltowski AJ, 2000).

2.4 Mutace mitochondriální DNA

Lidská mitochondriální DNA je složená ze dvou kruhově uspořádaných řetězců složených z 16569 párů bází. Tato mtDNA je extrémě kompaktní, neobsahuje žádné introny a má prokaryontní charakter. V somatické buňce vybavené množstvím mitochondrií, z nich každá obsahuje několik molekul mtDNA, je tak přítomno až několik tisíc kopií mtDNA (Nečas O, 1989).

Mitochondriální geny i chromozómy mohou stejně jako jaderné geny podléhat mutacím. Je pravděpodobné, že v důsledku delecí dochází u mutovaných buněk k chybám mitochondriální proteosyntézy, které mohou vést k poruchám funkce organismu.

Mitochondriální genom utváří určitou část vnitřní genetické paměti buňky. Replikace mitochondriální DNA při mitóze není vůbec spojena s dělením buňky a rovněž s buněčným cyklem. Mitochondrie jsou tedy do dceřiných buněk nerovnoměrně vyplavovány, ale nesou stejné informace. Při sexuálním rozmnožování vajíčka obsahují velké množství cytoplazmy a tudíž i mitochondrií. Naopak hlavička spermie obsahuje jen malý nebo nulový počet (Wei YH, 1998).

Několikanásobně zvýšenou příležitost k mutacím způsobuje např. přítomnost reparačních systémů, delece histonů a existence reaktivních forem kyslíku. Mutace mitochondriální DNA převažují nad mutacemi jaderné DNA. Zmutovaná buňka může obsahovat jak mutovanou mitochondriální mtDNA, tak i směs mutované a původní mtDNA (Nečas O, 1989; Thompson LV, 2006).

2.5 Produkce volných radikálů v mitochondriích

2.5.1 Volné radikály

Volné radikály jsou vysoce reaktivní sloučeniny, molekuly či ionty, které mají nepárový elektron, jsou schopné samostatné existence a snižují hladinu antioxidantů vnitřního prostředí organismu (Racek J, 1999). Volné radikály mohou v těle vznikat a podílet se jak na fyziologických, tak i na patologických reakcích. Za normálních okolností a poměrů jsou třeba pro fungování našeho organismu a uplatňují se např. na jeho obranyschopnosti. Ve vysokých koncentracích činí volné radikály velké nebezpečí pro všechny živé struktury a za určitých okolností je mohou i poškodit (Holeček V, 2010; Jurašková B, 2006; Pláteník J, 2009).

Volné radikály také vznikají jako vedlejší produkt činnosti enzymů dýchacího řetězce v mitochondriích. Tyto radikály vzniklé v energetickém procesu jsou rychle odstraňovány, ale za patologických stavů mohou hrát významnou roli při vzniku a rozvoji několika desítek onemocnění, jako ateroskleróza, *diabetes mellitus*, zhoubné nádory, záněty, mutace DNA a další (Holeček V, 2010; Sies J et al., 1993).

Pro organismus jsou nejdůležitější volné radikály kyslíku a dusíku, ze kterých dalšími přeměnami vzniknou i jiné reaktivní látky s již párovými elektrony. Tyto látky, jako jsou např. peroxid vodíku nebo kyselina chlorná, se spolu s volnými radikály označují názvem reaktivní formy kyslíku či dusíku, které se souhrnně označují jako RONS (Hřebíčková Š, 2009).

2.5.1.1 *Reaktivní formy kyslíku, ROS*

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou produkty neustále tvořené společně s buněčným metabolismem například při oxidační fosforylaci. Vzhledem ke své extrémní reaktivitě mohou způsobovat poškození DNA, bílkovin a tuků, oxidační poškození buněčných složek a podporovat celou řadu degenerativních onemocnění a stárnutí (Oyagbemi AA et al., 2009; Pláteník J, 2009; Salganik RI, 2001).

ROS jsou zároveň i nezbytné pro celou řadu ochranných reakcí probíhajících v buňce. Těmito reakcemi jsou např. fagocytóza, detoxikační reakce a apoptóza. Volné radikály způsobují zvýšenou aktivaci intracelulárních proteinů – tzv. kaspáz, účastnících se rozkladných fází apoptózy. Naopak nadměrné množství antioxidantů může také nebezpečně zasahovat do těchto ochranných funkcí (Jurašková B, 2006; Salganik RI, 2001).

Reaktivní formy kyslíku jsou skupinou tvořenou sloučeninami kyslíku, které mohou, ale nemusejí mít charakter volných radikálů. ROS mohou poškozovat všechny buněčné struktury nebo molekuly. Jejich reakcí s nenasyčenými mastnými kyselinami dochází k peroxidaci lipidů. Peroxidy dále vstupují do reakcí s látkami o nízké molekulové hmotnosti, nukleovými kyselinami a bílkoviny. Dále jsou ROS například i jednou z příčin nádorového bujení a zkříženého spojení DNA (Davies MJ, 1997; Pláteník J, 2009; Štípek S et al, 2000).

Jednou z nejznámějších reaktivních forem kyslíku je superoxid. Superoxid je nejvíce produkován v respiračním řetězci mitochondrií, ale i enzymem NADPH-oxidázou obsaženým v cytoplazmatické membráně buněk (Svend J et al., 2003). Dvě molekuly superoxidu spolu, díky svým redoxním vlastnostem, mohou za katalýzy enzymem superoxidodismutázou (SOD), reagovat a tvoří peroxid vodíku (Štípek S et al., 2000).

Peroxid vodíku je další molekulou, která sice není volným radikálem, ale je důležitým mezikrokem při jejich vzniku. V reakci s železnatou solí se rozkládá na hydroxylový radikál a hydroxid (Zeman M et al., 2009; Svend J et al., 2003). Tento hydroxylový radikál patří do skupiny ROS také, je jedním z nejreaktivnějších, a proto reaguje téměř okamžitě (Svend J et al., 2003; Valko M et al., 2006).

Dalšími molekulami nacházejícími se ve skupině ROS jsou singletový kyslík, ozón, kyselina chlorná.

2.5.1.2 Reaktivní formy dusíku, RNS

Reaktivní formy dusíku (RNS) jsou sloučeniny primárně odvozené od oxidu dusnatého (Kupková Z, 2004; Patel RP et al., 1999).

Nejznámějším radikálem podílejícím se na patofyziologických regulacích je oxid dusnatý (NO), který cíleně vzniká z aminokyseliny L-argininu. Nejznámější funkce oxidu dusnatého je jeho vasodilatační účinek na cévy a hladkou svalovinu. Působí také jako mediátor v imunitních dějích a při neurotransmisi (Butler AR et al., 1993; Kupková Z et al., 2004; Moncada S et al., 1991; Sedláček J, 1993). Nejvýznamnější odlišností NO od jiných mediátorů je jeho schopnost volně a rychle přestupovat přes membrány a působit na okolní buněčné elementy (Kupková Z et al., 2004).

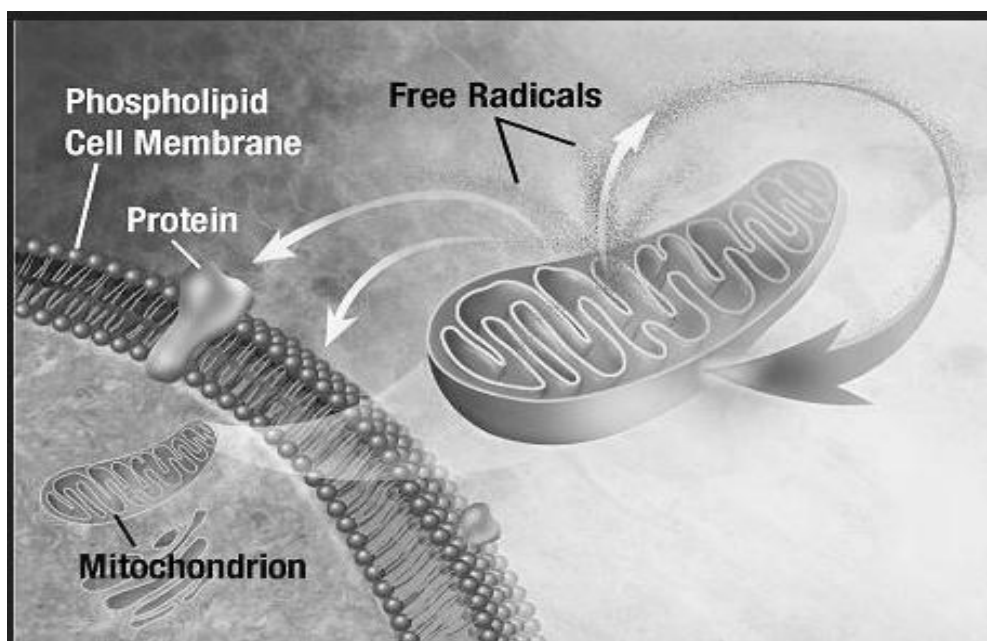
2.5.2 Intramitochondriální produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku

Na vzniku ROS se účastní jak vnitřní, tak vnější vlivy, kterými mohou být elektromagnetické záření, xenobiotika, toxiny či léky. Oblast produkce reaktivních forem kyslíku je spojena místy nejaktivnější respirace a je tedy lokalizována na vnější mitochondriální membráně, v matrix a na obou stranách vnitřní membrány mitochondrií. Pokud některá z mitochondrií začne ve zvýšené míře produkovat ROS, může dojít k rozložení mitochondriální sítě a odstranění poškozených mitochondrií procesem tzv. mitoptózy (Murphy MP, 2009; Skulachev VP, 2004; Zeman M et al., 2009).

Volné radikály *in vivo* vznikají jak enzymatickou, tak neenzymatickou cestou. Enzymatické zdroje zahrnují NADPH oxidázy umístěné na buněčné membráně a cytochrom P-oxygenázy. Neenzymatická produkce superoxidu nastane, jestliže je i jediný elektron přenesen přímo na kyslík než je tento prvek spotřebován některým z enzymů. Mitochondriální elektronový transportní řetězec obsahuje několik redoxních center, jako jsou například flavoproteiny, FeS-centra a ubichinon, kterými mohou elektrony pronikat. Po průniku se naváží na kyslík a tvoří tak primární zdroj superoxidu ve většině tkání. Většina kroků v dýchacím řetězci tak umožňuje jednoelektronovou redukci kyslíku (Murphy MP, 2009; Nichlis DG et al., 2000; Turrens JF, 2003).

Za posledních 35 let několik laboratoří identifikovalo řadu zdrojů tvorby superoxidu včetně respiračních komplexů a jejich enzymů. Superoxidy mohou být v mitochondriích produkovány na různých místech. V produkci ROS je zejména jejich

hlavním zdrojem komplex I, u kterého vznik může probíhat dvěma způsoby. První způsob nastává, jestliže je vysoký poměr NADH/NAD^+ v matrix. Druhým způsobem je snížená koncentrace CoQ na minimum. Komplex III je druhým komplexem zodpovědným za tvorbu většiny superoxidu vyrobeného v mitochondriích (Murphy MP, 2009). Superoxid tvořený v matrix je zde i detoxikován, zatímco superoxid produkovaný v intermembránovém prostoru může být transportován do cytoplazmy přes aniontové kanály (Murphy MP, 2009; Turrens JF, 2003).



Obrázek 11: Produkce RONS v mitochondriích (<http://healthywealth.files.wordpress.com>, 14.6.2012, 12:15)

2.6 Antioxidační ochrana mitochondrií

V lidském těle se nachází několik systémů a látek podílejících se na ochraně organismu před oxidačním poškozením. Je to děj, při kterém za určitých okolností dochází k poškození různých struktur vlivem volných radikálů a RONS. Důležitý je i vliv vnějších a vnitřních faktorů ovlivňujících aktivitu antioxidantů. V důsledku porušení této rovnováhy a zvýšení počtu volných radikálů nastává v organismu stav zvaný „oxidační stres“, který je spojován s různými chorobnými stavy a poškozením organismu. Mezi onemocnění vyvolaná oxidačním stresem mohou mimo jiné patřit nádorová onemocnění, nemoci srdce a cév, poruchy obranyschopnosti (Štípek Set al., 2000; Réblová Z, 2011).

Antioxidanty mají v organismu hned několik funkcí. Snižují, eliminují nebo blokuji činnost volných radikálů v těle, jsou schopné opravy již poškozených molekul a tvoří celý

system ochrany proti jejich působení. Podmínkou této antioxidační ochrany je, že musí být komplexní, protože ne každý antioxidant je schopen zneškodnit jakýkoliv volný radikál. Celková síla antioxidantů v organismu, která účinkuje proti volným radikálům a jejich negativním účinkům, se nazývá antioxidační kapacita (De La Fuente M, 2002; Holeček V, 2010; Jurašková B, 2006; Salganik RI, 2001).

Z hlediska chemické struktury jsou antioxidanty různorodou skupinou látek, které vytvářejí všechny živé buňky. Jedním z nich je koenzym Q, který chrání buněčné membrány před volnými radikály, zlepšuje činnost srdce, působí proti ateroskleróze, ischemické chorobě srdeční, nádorovým onemocněním atd. Další látkou působící antioxidačně je melatonin, jenž snižuje vedlejší účinky radioterapie a podle studií byly prokázány i protirakovinné účinky (Holeček V, 2006).

Koncentrace superoxidu v ustáleném stavu je v intermembránovém prostoru mitochondrií ovlivňována třemi různými mechanismy. Tento prostor obsahuje specifickou formu SOD s manganem v aktivním místě, který eliminuje superoxid. Tvorba MnSOD je také vyvolána látkami, které způsobují v organismu oxidační stres. Druhým mechanismem je obsah cytochromu c, který může snižovat koncentraci superoxidu také. Nakonec je v intermembránovém prostoru obsažena spontánní dismutáza superoxidu, která usnadňuje snížení pH (Hřebíčková Š, 2009; Murphy MP, 2009).

Tomu, aby se peroxid vodíku přeměnil na hydroxylový radikál, brání dvě reakce. První reakci katalyzuje kataláza (CAT), která štěpí peroxid vodíku na kyslík a vodu. Působí takto při vysokých koncentracích peroxidu a v antioxidační ochraně mitochondrií se mnoho neuplatňuje. Druhou možností je katalýza rozpadu peroxidů v přítomnosti peroxidázy, která rovněž redukuje peroxid vodíku, ale současně je oxidován jiný substrát. Tato peroxidáza-glutathionperoxidáza (GPx), se uplatňuje při nízkých koncentracích peroxidu vodíku a eventuálně i jiných alkylperoxidů, kdy dochází k současné oxidaci glutathionu. Glutathion je nízkomolekulární látkou přítomnou v živočišných buňkách nacházejících se v cytosolu, v mitochondriích i matrix (Lash LH, 2006; Racek J, 1999; Wu G et al, 2004).

Vnitřní mitochondriální membrána obsahuje také několik vitamínů, které se účastní antioxidační ochrany a zasahují do propagace volných radikálů zprostředkovaných v řetězových reakcích. Těmito vitamíny jsou vitamín E, který má silné antioxidační účinky a dále β -karoten, který je provitamínem vitamínu A (Holeček V, 2006).

3. Závěr

Mitochondrie jsou nepostradatelnou součástí všech buněčných struktur. Skládají se z vnější a vnitřní membrány. Mitochondrie v buňce fungují jako samostatně organizované jednotky. Vzhledem k významné roli v buněčném metabolismu je pochopení jejich funkcí velmi důležité. Přesné detaily týkající se funkcí mitochondrií nejsou stále ještě dopodrobna známy, a proto je jejich studiu věnována stále velká pozornost. Nejdůležitější funkcí, kterou mitochondrie zabezpečují, je tvorba energie. Tyto organely ovšem mají i další důležité funkce, jako je Krebsův cyklus, beta-oxidace mastných kyselin, termogeneze.

Dýchací řetězec obsažený v mitochondriích představuje hlavní zdroj volných radikálů ve většině tkání. V rovnovážném stavu je koncentrace těchto látek udržována na netoxické hladině pomocí různých antioxidačních mechanismů. Křehká rovnováha mezi antioxidační ochranou a produkcí volných radikálů může být narušena nedostatečnou koncentrací antioxidantů, inhibicí toku elektronů nebo dalšími ději, jako je např. účinek xenobiotik. Tato nerovnováha, neboli oxidační stres, se jeví jako společný jmenovatel různých patologických stavů.

4. Seznam literatury

1. Alberts B, et al; *Essential Cell Biology*; 2. vyd. New York: Garland Science; (2004).
2. Bogenhagen DF, Clayton DA; The mitochondrial DNA replication bubble has not burst; *Elsevier Ltd. All right sreserved*; 4(3):132-134; (2003).
3. Butler AR, Williams DLH; *Nitric oxide Donors: For Pharmaceutical and Biological Applications*; *Chem. Soc. Rev*; (22):233, (1993).
4. Cammack R; Attwood TK, Campbell PN, Parish JH, Smith AD, Stirling JL, Vella F; *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*; Rev. ed. New York: Oxford University Press; ISBN 01-985-2917-1, 720, (2006).
5. Campbell NA; Reece JB; *Biologie*; 173-179, (2006).
6. David L, David LM et al; *Lehning erprinciples of biochemistry*; 3rd ed., 7th printing. New York: Worth, ISBN 15-725-9931-6, (2006).
7. Davies MJ, Dean RT; *Radical mediated protein oxidation*; Oxford University Press, (1997).
8. De La Fuente M; Effects of antioxidants on immune systemageing; *Eur J Clin Nutr*; 56(3):5–8, (2002).
9. Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F et al; Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*; *Mol Biol Cell*; 13(3):847–853, (2006).
10. Frey TG, Mannella CA; The internal structure of mitochondria; *Trends Biochem Sci*; 25(7):319–324, (2000).
11. Frey TG, Renken CW, Perkins GA; Insightin to mitochondrial structure and function from electron tomography; *Biochimica et Biophysica Acta*; (1555):196– 203, (2002).
12. Gabaldón T, Huynen MA; Shaping the mitochondrial proteome; *Biochim Biophys Acta*, 1659(2–3):212–220, (2004).
13. Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA; The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation; *Elsevier Science B. V, FEBS Lett*, 546(2-3):355–358, (2003).
14. Gohil VM, Hayes P, Matsuyama S, Schagger H, Schlame M, Greenberg ML; Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are inter dependent; *J Biol Chem*; 279(41):42612-42618, (2004).
15. Gray MW, Burger G, Lang BF; Mitochondrial evolution; *Science*, 283(5407):1476–1481, (1999).

16. Hartmut M; Respiratory Chain Complex IV. In Lennarz, W.J., Lane, M.D.. Encyclopedia of Biological Chemistry; 4(1-4):1423-1425, (1999).
17. Holeček V; Oxidační stres u nádorových onemocnění; Klin. Biochem., 18(39):225-230, (2010).
18. Holeček V; Volné radikály, antioxidanty a jak dále?; Klin. Biochem. Metab., 14(35):140-145, (2006).
19. Hřebíčková Š; Antioxidanty a volné radikály: rozdělení, jejich kapacita a aktivita; Výživa a potraviny; (2):30-32, (2009).
20. http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:ATP_structure.svg; (12.6.2012, 14:00).
21. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cardiolipin>; (5.6.2012, 16:40).
22. <http://healthywealth.files.wordpress.com/2007/07/freeradicals.jpg>; (14.6.2012, 12:15).
23. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/CellularRespiration.html>; (5.6.2012, 15:55).
24. <http://www.gymkh.cz/student/Biologie/nemecek/Bu%C5%8ka/organely/mitochondrie3.bmp>; (5.6.2012, 15:40).
25. http://www.nspka.cz/NSPKA_prirucky/2012/laboratorni_prirucka_OKBH_orlova/KP_AFM.htm; (30.4.2010, 10:45).
26. Hyun Ju Lee, Joachim Reimann, Yafei Huang, Pia Adelroth; Functional proton transfer pathways in the heme-copper oxidase superfamily; Biochimica et Biophysica Acta; (1817):537-544, (2011).
27. Chem H, Guan M; Mitochondrial genetics and human essential hypertension; Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi; 29(3):293-295, (2012).
28. Ježek P; Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins—UCPn; Int J Biochem Cell Biol, 34(10):1190–206, (2002).
29. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT; Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology; Journal of Inherited Metabolic Disease; 35(2):211-225, (2012).
30. Jurašková B, Solichová D, Bláha V, Klejna M, Hyšpler R, Ďánský P, Zadák Z; Význam monitorování antioxidační kapacity a metabolismu lipidů v procesu stárnutí; 4(2), (2006).
31. Kadenbach B; Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation; Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics; 1604(2):77-94, (2003).

32. Kasiviswanathan R, Collins TR, Copeland WC; The interface of transcription and DNA replication in the mitochondria; *Biochim Biophys Acta*; PMID: 22207204, (2011).
33. Kowaltowski AJ; Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production; *Braz J Med Biol Res*; 33(2):241–50, (2000).
34. Křiváková P, Červinková Z, Lotková H, Kučera O, Roušar T; Mitochondria and their role in cell metabolism; *Acta Medica (Hradec Králové)*; Review. Czech. PubMed PMID: 16922158; 48(2):57-67, (2005).
35. Kupková Z, Beneš L; Chemické vlastnost, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého; *Chem.Listy*; (98):116-122, (2004).
36. Larsson NG; Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging; *Annu Rev Biochem*; (79):683-706, (2010).
37. Lash LH; Mitochondrial Glutathione Transport: Physiological, Pathological and Toxicological Implications; *Chem Biol Interact.*; 163(1-2):54–67, (2006).
38. Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J; *Biochemie pro studující medicíny*; Vyd. 1. Praha: Karolinum, ISBN 80-246-0851-0, 274, (2004).
39. Lu B, Xu FY, Jiang YJ, Choy CP, Hatch GM, Grunfeld C, Feingold RK; Cloning and characterization of a cDNA encoding human cardiolipin synthase (hCLS1); *Journal of Lipid Research*; (47):1140-1145, (2006).
40. Miller FS, Hiser C, Liu J; Gating and regulation of the cytochrome c oxidase proton pump; *Biochim Biophys Acta*, 1817(4):489-494, (2012).
41. Murphy MP; How mitochondria produce reactive oxygen species; *Biochem. J.*, doi:10.1042/BJ20081386, (417):1–13, (2009).
42. Murray RK, Granner DK, Mayes AP, Rodwell WV; *Harper's illustrated biochemistry*; 26th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, Langemedicalbook. ISBN 00-713-8901-6, 693, (2003).
43. Nečas P, Bastlová H; *Biologie*; Praha 1, Malostranské náměstí 28: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, ISBN 735 21 - 08/29, 624; (1989).
44. Nicholis DG, Budd SL; Mitochondria an sneuronal survival; *Psychological Reviews*. 80, (2000).
45. Oyagbemi AA, Azeez O, Saba AB; Interactions between reactive oxygen species and cancer: the roles of natural dietary antioxidants and the molecular mechanisms of action., *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 10(4):535–544, (2009).

46. Palade GE; The fine structure of mitochondria; *AnatRec*; 114(3):427-451, (1952).
47. Perkins GA, Frey TG; Recent structural insights into mitochondria gained by microscopy; *Micron*, 31(1):97–111, (2000).
48. Pláteník J; Volné radikály, antioxidanty a stárnutí; *Interní Med.*, 11(1):30-33, (2009).
49. Racek J, Holeček V; Enzymy a volné radikály; *Chem. Listy* 93, 774-780 (1999).
50. Réblová Z; Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů; *Chem. Listy* (105):667-673, (2011).
51. Ricquier I D, Bouillaud F; Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance; *J Physiol*, 529(1):3–10, (2000).
52. Rosypal S; Nový přehled biologie; 797-801, (2003).
53. Rube DA, van der Bliek AM; Mitochondrial morphology is dynamic and varied; *Mol Cell Biochem*; 256–257, (1–2):331–339, (2004).
54. Salganik RI; The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population; *J. Am. Coll. Nutr.*, 20(5):464-472, (2001).
55. Saraste M; Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle; *Science*; (283):1488-1493, (1999).
56. Scheffler IE; Mitochondria make a comeback; *Adv Drug Deliv Rev*; 49(1-2):3-26, (2001).
57. Schlame M, Rua D, Greenberg ML; The biosynthesis and functional role of cardiolipin; *Prog. Lipid Res.*, (39):257-288, (2000).
58. Sies J, *Eur. J; Biochemie*; 213-215, (1993).
59. Skulachev VP, Bakeeva LE, Chernyak BV et al; Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis; *Mol Cell Biochem*, 256–257, (1-2):341–358, (2004).
60. Skulachev VP; Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables; *Trends Biochem Sci*; 9(1):23–29, (2001).
61. Stumpf JD, Copeland WC; Mitochondrial DNA replication and disease: insights from DNA polymerase γ mutations; *Cell Mol LifeSci.*; 68(2):219-233, (2011).
62. Svend J, Knak J; Oxidative stress and free radicals; *Journal of Molecular structure*; (667):387-89, (2003).
63. Štípek S et al; Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci; Praha: Grada Publishing; ISBN 80-7169-704-4, 85–97, (2000).

64. Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S., Murphy AN, Gaucher SP, Capaldi RA, Gibson BW, Ghosh SS; Characterization of the human heart mitochondrial proteome; *Nature Biotechnology*; (21):281-286, (2003).
65. Thompson LV; Oxidative stress, mitochondria and mtDNA-mutator mice; *Exp Gerontol.*; 41(12):1220-1222., (2006).
66. Trumpower LB; Cytochrome bc₁ Complex: Respiratory Chain Complex III; In Lennarz WJ, Lane, MD. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 4(1-4):256-278, (1990).
67. Turrens JF; Mitochondrial formation of reactive oxygen species; *J Physiol*, 552(2):335-344, (2003).
68. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J et al; Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer; *Chemico-Biological Interactions*, (160):1–40, (2006).
69. Voet D, Voet GJ; *Biochemistry*; 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley; ISBN 04-709-1745-8, (53):1428, (2011).
70. Voet D; *Biochemie*; 1. vyd. Praha: Victoria Publishing; ISBN 80-856-0544-9, 1325, (1995).
71. Wei YH; Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine; *Proc Natl Sci Counc Repub China B.*; 22(2):55-67, (1998).
72. Westermann B; Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion; *EMBO Rep*, 3(6):527–531, (2002).
73. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR., Turner ND; Glutathione Metabolism and Its Implications for Health; *J. Nutr.* (134):489–492, (2004).
74. Zeman M, Stopka P, Vecka M, et al; Stanovení hydroxylových a nitroxidových radikálů a deprese a hyperlipidémie elektronovou paramagnetickou rezonancí; *Chem. Listy*; (103):667-671, (2009).