

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**TESTOVÁNÍ VLIVU TĚŽKÝCH KOVŮ
NA BUNĚČNOU RESPIRACI**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

AUTOR PRÁCE: Bc. Petra Blažková
VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**STUDYING THE EFFECT OF HEAVY METALS
ON CELL RESPIRATION**

MASTER THESIS

2019

AUTHOR: Bc. Petra Blažková

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

PHYSICS 571

PHYSICS 571 is a course in quantum field theory. It is designed for students who have completed a course in quantum mechanics and a course in classical field theory. The course covers the quantization of fields, the path integral formalism, and the renormalization of quantum field theories. It also discusses the applications of quantum field theory to particle physics and cosmology.

PHYSICS 571 is a course in quantum field theory. It is designed for students who have completed a course in quantum mechanics and a course in classical field theory. The course covers the quantization of fields, the path integral formalism, and the renormalization of quantum field theories. It also discusses the applications of quantum field theory to particle physics and cosmology.

PHYSICS 571 is a course in quantum field theory. It is designed for students who have completed a course in quantum mechanics and a course in classical field theory. The course covers the quantization of fields, the path integral formalism, and the renormalization of quantum field theories. It also discusses the applications of quantum field theory to particle physics and cosmology.

PHYSICS 571 is a course in quantum field theory. It is designed for students who have completed a course in quantum mechanics and a course in classical field theory. The course covers the quantization of fields, the path integral formalism, and the renormalization of quantum field theories. It also discusses the applications of quantum field theory to particle physics and cosmology.

PHYSICS 571 is a course in quantum field theory. It is designed for students who have completed a course in quantum mechanics and a course in classical field theory. The course covers the quantization of fields, the path integral formalism, and the renormalization of quantum field theories. It also discusses the applications of quantum field theory to particle physics and cosmology.

PHYSICS 571 is a course in quantum field theory. It is designed for students who have completed a course in quantum mechanics and a course in classical field theory. The course covers the quantization of fields, the path integral formalism, and the renormalization of quantum field theories. It also discusses the applications of quantum field theory to particle physics and cosmology.

PHYSICS 571 is a course in quantum field theory. It is designed for students who have completed a course in quantum mechanics and a course in classical field theory. The course covers the quantization of fields, the path integral formalism, and the renormalization of quantum field theories. It also discusses the applications of quantum field theory to particle physics and cosmology.



Prohlašuji:

Tuto diplomovou práci na téma „testování vlivu těžkých kovů na buněčnou respiraci“ 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. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 3. 5. 2019

Petra Blažková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky a účinnou podporu. Také bych mu chtěla poděkovat za zprostředkování odborné stáže na Univerzitě Komenského v Bratislavě. Děkuji i RNDr. Zuzaně Sumbalové, Ph.D. z Lékařské fakulty Univerzity Komenského za milé přijetí na jejich pracovišti a za informace, kterých se mně od ní dostalo.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá vlivem toxicity kadmia na buněčnou respiraci *in vitro*. V teoretické části je stručně popsána mitochondrie, mitochondriální komplexy a jejich inhibitory. Také je zde popsána funkce rozpojovacích proteinů. Následně jsou v kapitolách popsány možnosti měření buněčné respirace, druhy biologických materiálů a přehled buněčných linií, které byly v posledních letech nejčastěji využívány ve vysokoučinné respirometrii. V druhé polovině teoretické části je obsah zaměřen na těžké kovy, specificky na kadmium a na jeho působení na úrovni organismu, buňky a mitochondrií.

Experimentální část práce se zabývá přípravou biologických materiálů pro měření respirace. Mezi použitými biologickými materiály jsou PBMC, buněčné linie Jurkat, A549, HK-2 a izolované mitochondrie. Pro použití PBMC bylo nejprve potřeba zavést metodu izolace buněk z periferní krve. A optimalizovat parametry metody tak, aby bylo získáno maximální množství PBMC v co největší čistotě.

Pro studium vlivu CdCl_2 na respiraci bylo také potřeba optimalizovat koncentraci digitoninu potřebnou pro permeabilizaci cytoplazmatické membrány jednotlivých druhů buněk. Permeabilizované buňky a izolované mitochondrie byly poté využity k testování respirace po přímém přidavku CdCl_2 do komor respirometru.

Intaktní buňky byly inkubovány s $100 \mu\text{mol/l}$ CdCl_2 po dobu 2 a 4 hodin. Z výsledků získaných při měření na respirometru Oroboros vyplývá, že toxicita CdCl_2 stoupá s dobou inkubace buněk s CdCl_2 .

KLÍČOVÁ SLOVA

Mitochondrie, respirační komplexy, buněčná respirace, buněčné linie, CdCl_2 .

ABSTRACT

The thesis deals with the effects of cadmium toxicity on cellular respiration *in vitro*. The theoretical part briefly describes mitochondria, mitochondrial complexes and their inhibitors. It also describes the function of uncoupling proteins. Other chapters have been focused on the possibilities of cell respiration measurement and the types of biological materials, including an overview of cell lines that have been used in high-resolution respirometry most frequently in recent years. Last part of the Introduction focuses on the heavy metals, especially on cadmium and its effects in organism, cells and mitochondria.

The experimental part of the thesis deals with preparation of biological materials for measurement of cell respiration by high-resolution respirometry. We used a variety of biological material, e.g. PBMCs, Jurkat cells, A549, HK-2 and isolated mitochondria. In order to use PBMC, the method of cell isolation from peripheral blood had to be introduced and then optimized in order to obtain the maximal content of PBMCs of the highest purity.

In order to study the influence of CdCl₂ on respiration, it was also necessary to optimize the concentration of digitonin required for the permeabilization of the cytoplasmic membrane of individual cell types. Afterwards, permeabilized cells and isolated mitochondria were used to evaluate respiration after acute addition of CdCl₂ to the respirometer chambers.

Intact cells were incubated with 100 µmol/l CdCl₂ for 2 and 4 hours. The results obtained from the Oroboros respirometer show that CdCl₂ toxicity is increasing with time of cell incubation with CdCl₂.

KEYWORDS

Mitochondria, respiratory complexes, cell respiration, cell lines, CdCl₂.

OBSAH

1. ÚVOD	12
2. TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 MITOCHONDRIE.....	13
2.2 MITOCHONDRIÁLNÍ KOMPLEXY A JEJICH INHIBITORY	14
2.2.1 Komplex I	15
2.2.2 Komplex II	16
2.2.3 Komplex III.....	17
2.2.4 Komplex IV.....	18
2.2.5 Komplex V	19
2.3 ROZPOJOVACÍ PROTEINY.....	21
2.4 MĚŘENÍ BUNĚČNÉ RESPIRACE	22
2.5 PŘEHLED BUNĚČNÝCH LINIÍ MĚŘENÝCH NA RESPIROMETRU	25
2.5.1 CHO linie	25
2.5.2 HEK 293 linie	26
2.5.3 HeLa linie.....	27
2.5.4 SH-SY5Y neuroblastomová linie.....	29
2.5.5 HUVEC linie.....	30
2.5.6 Makrofágové buněčné linie.....	31
2.5.7 HK-2 linie	32
2.5.8 Jurkat linie.....	33
2.5.9 A549 linie.....	35
2.6 TOXICKÉ PŮSOBENÍ KADMIA NA ÚROVNI BUŇKY	36
2.7 TOXICKÉ PŮSOBENÍ KADMIA NA ÚROVNI MITOCHONDRIE	40
3. CÍL PRÁCE	46
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	47
4.1 POMŮCKY A PŘÍSTROJE	47
4.2 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ.....	48

4.2.1	Chemikálie pro izolaci PBMC	48
4.2.2	Chemikálie pro izolaci mitochondrií.....	48
4.2.3	Chemikálie pro měření buněčné respirace	48
4.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	49
4.4	IZOLACE PBMC Z PERIFERNÍ KRVE	52
4.5	IZOLACE MITOCHONDRÍÍ Z BUNĚČNÝCH KULTUR	53
4.6	MĚŘENÍ BUNĚČNÉ RESPIRACE <i>in vitro</i>	54
4.6.1	Optimalizace dávky digitoninu	55
4.6.2	Protokol měření respirace – mitochondrie a permeabilizované buňky	56
4.6.3	Protokol pro intaktní buňky	57
4.7	MĚŘENÍ RESPIRACE PO OVLIVNĚNÍ KADMIEM	58
4.7.1	Buňky inkubované s CdCl ₂	58
4.7.2	Buňky přímo ovlivněné CdCl ₂ v komoře respirometru.....	58
4.7.3	WST-1 test	59
5.	VÝSLEDKY	60
5.1	PŘÍPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	60
5.1.1	Izolace PBMC	60
5.1.2	Izolace mitochondrií.....	61
5.1.3	Optimalizace permeabilizace buněk Jurkat.....	61
5.2	STUDIUM VLIVU KADMIA NA MITOCHONDRIÁLNÍ RESPIRACI.....	63
5.2.1	Toxicita CdCl ₂ – buňky Jurkat	63
5.2.2	Toxicita CdCl ₂ – PBMC	66
5.2.3	Toxicita CdCl ₂ – testování přímého přídávku CdCl ₂ k buňkám	67
5.2.4	WST-1 test buněk Jurkat.....	69
6.	DISKUZE.....	71
7.	ZÁVĚR	74
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	75

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AMA	antimycin A
BB	buňky
CCCP	karbonylkyanid-3-chlorofenylhydrazon
Cyt	cytochrom c
Dig	digitonin
DNP	dinitrofenol
FAD	flavinadenindinukleotid
FCCP	karbonylkyanid-4-(trifluorometoxy)fenylhydrazon
G	glutamát
M	malát
MCU	<i>mitochondrial calcium uniporter</i> – mitochondriální Ca ²⁺ uniporter
MPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i> – mitochondriální pór přechodné permeability
MT	metalothionein
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> – mononukleární buňky periferní krve
PLT	<i>platelets</i> – trombocyty
Q	ubichinon
QH ₂	ubichinol
ROS	<i>reactive oxygen species</i> – reaktivní formy kyslíku
ROT	rotenon
ROX	<i>residual oxygen consumption</i> – zbytková spotřeba kyslíku
RT	<i>room temperature</i> – laboratorní teplota
S	sukcinát
TRPV	<i>transient receptor potential channels of the vanilloid</i> – kanál přechodného receptorového potenciálu
UCP	<i>uncoupling protein</i> – rozpojovací protein

1. ÚVOD

Těžké kovy, hlavně rtuť, kadmium a měď, patří mezi významné průmyslové odpadní produkty. Tyto prvky v organismu jasně vykazují toxické účinky na organismus.

Kadmium se do těla dostává po požití kontaminovaných potravin nebo vody, kouřením cigaret, nebo inhalací při průmyslové výrobě. Jeho hromadění v organismu má však zdravotní důsledky. Toxicita kadmia byla prokázána v několika orgánech a jeho toxické působení je velmi široké. Kadmium indukuje také poškození mitochondriální funkce. Dochází k tvorbě ROS a následně k apoptóze buňky.

Vysokoučinná respirometrie se využívá pro výzkum mitochondrií a buněčné respirace. K analýze respirace se používá mnoho biologických materiálů, například tkáňové homogenáty, izolované buňky, mitochondrie. Buněčné linie různého druhu slouží jako vhodný model pro studium funkce jednotlivých orgánů. Proto i tyto modely ve spojení s vysokoučinnou respirometrií jsou těmi vhodnými pro studium toxicity kadmia.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MITOCHONDRIE

Ve čtyřicátých letech 19. století probíhalo mezi vědci první pozorování intracelulárních struktur, které měly pravděpodobně představovat mitochondrie. O padesát let později, v roce 1890, Richard Altman, tyto intracelulární struktury zařadil mezi buněčné organely a pojmenoval je „bioblasty“ [1]. Termín „mitochondrie“, který je odvozen z řeckého „*mitos*“ (= vlákno) a „*chondros*“ (= granule), poprvé použil a zavedl Carl Benda v roce 1898 [2].

Podle endosymbiotické teorie mají mitochondrie evoluční prapůvod v bakteriích. Aerofilní heterotrofní prokaryota byla pohlcena buňkou procesem endocytózy, přežila obranný mechanismus buňky a postupně se stala její součástí. Toto soužití se nakonec stalo vzájemně prospěšné. Důkazů pro endosymbiotickou teorii je několik. Například fakt, že mitochondrie mají vlastní genom a tato DNA je cirkulární stejně jako bakteriální nukleoid. Mitochondriální DNA se nerekombinuje, ale mění se pouze procesem mutace. Vlastní dělení mitochondrií připomíná dělení bakterií a není závislé na dělení buňky. Dalším důkazem je dvojitá membrána mitochondrií. Vnější membrána mitochondrie má pravděpodobně původ v buněčné membráně hostitelské buňky. A vznikla tedy v důsledku fagocytózy. Na vnitřní membráně, která vytváří kristy, se nacházejí respirační komplexy a probíhá zde buněčné dýchání. Na buněčné membráně prokaryot také probíhá buněčné dýchání [3].

Mitochondrie jsou tedy organely, které se nacházejí v eukaryotických buňkách. Podobnou historii mají chloroplasty a obecně plastidy, které také vznikly procesem endosymbiózy z cyanobakterií [4].

Uvnitř mitochondrie, v mitochondriální matrix, probíhá řada zásadních metabolických procesů, počínaje β -oxidací mastných kyselin, dekarboxylací pyruvátu, skladováním vápenatých iontů. Dále zde probíhá Krebsův cyklus, některé reakce Ornithinového cyklu, oxidativní fosforylace a také například netřesová termoregulace. Mitochondrie se také účastní při buněčné apoptóze a při udržování membránového potenciálu.

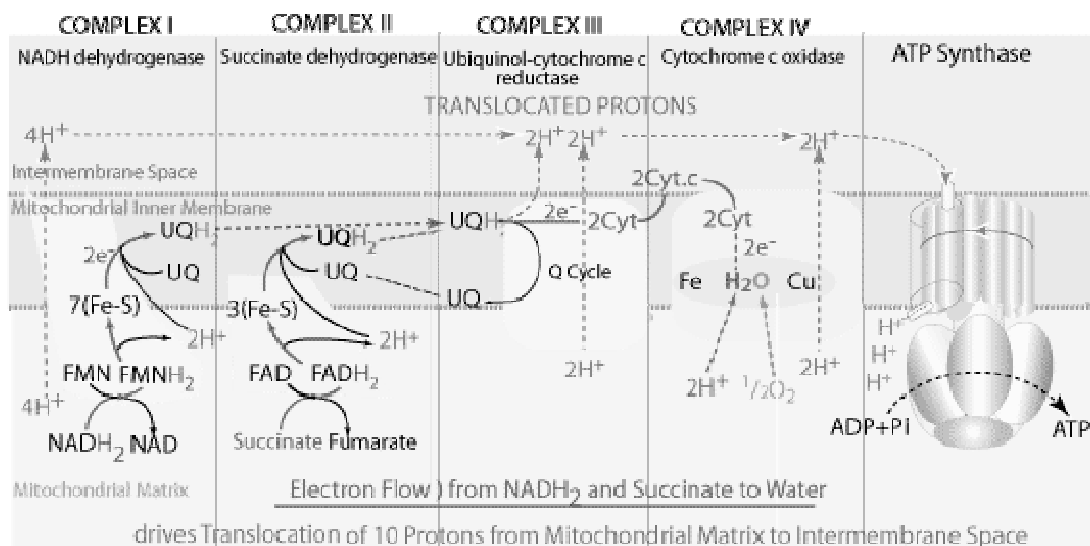
2.2 MITOCHONDRIÁLNÍ KOMPLEXY A JEJICH INHIBITORY

Na vnitřní mitochondriální membráně se nachází 5 komplexů, které jsou kódovány mitochondriální a jadernou DNA. Jedná se o NADH-dehydrogenázu (komplex I), sukcinát-dehydrogenázu (komplex II), cytochrom c oxidoreduktázu (komplex III), cytochrom c oxidázu (komplex IV) a ATP-syntázu (komplex V).

Konečným produktem glykolýzy je pyruvát, který je přenesen do mitochondrie, dekarboxylován na acetylkoenzym A a ten je oxidován v citrátovém cyklu. Elektrony odebrané při těchto reakcích jsou odevzdány do série oxidoredukčních soustav ve vnitřní mitochondriální membráně (= mitochondriální komplexy I-IV) (*tab.1*). Přenosem elektronů je poháněn transport protonů z matrix na vnější stranu vnitřní membrány, čímž se na této membráně vytvoří elektrochemický protonový gradient. Jeho energie je pak využita v komplexu V na syntézu a uvolnění ATP (*obr.1*) [5].

Tabulka 1: Respirační komplexy a jejich prostetické skupiny (upraveno dle [6])

Respirační komplex	Hmotnost (kDa)	Počet podjednotek	Prostetická skupina
I NADH-dehydrogenáza	850	43	FMN, Fe-S
II Sukcinátdehydrogenáza	140	4	FAD, Fe-S
III Ubichinon cytochrom c oxidoreduktáza	250	11	Hemy, Fe-S
IV Cytochrom oxidáza	160	13	Hemy, CuA, CuB



Obr.1: Elektronový transportní řetězec [7]

2.2.1 Komplex I

NADH-dehydrogenáza, či NADH-ubichinon-oxidoreduktáza je velký komplex, který se skládá ze 43 podjednotek a obsahuje Fe-S centra (2Fe-2S, 4Fe-4S) a flavinmononukleotid. Komplex I zajišťuje přenos 4 protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Komplex I také katalyzuje přenos 2 elektronů z NADH+H⁺ na koenzym Q. Koenzym Q, též nazývaný ubichinon, se po přijetí 2 elektronů redukuje na ubichinol (QH₂) a přenáší elektrony ke komplexu III. V komplexu III je zpět oxidován na ubichinon [6].

Účinné i přirozené inhibitory NADH-dehydrogenázy jsou strukturně podobné ubichinonu. Inhibice tohoto komplexu je tedy zacílená na místo redukce ubichinonu na ubichinol (*obr.2*). Mezi inhibitory komplexu I řadíme např: rotenon, piericidin A a amytal.

Rotenon je jedním z nejsilnějších inhibitorů NADH-dehydrogenázy. Jedná se o organickou sloučeninu hojně využívanou jako insekticid a pesticid. Zabraňuje přenosu elektronů z Fe-S center v komplexu I na ubichinon prostřednictvím vazby na vazebné místo ubichinonu [6,8]. Piericidin A je antibiotikum izolované ze *Streptomyces mobaraensis* vykazující podobnost s ubichinonovou strukturou a má silný kompetitivní inhibiční účinek na komplex I. Látkou piericidin A je možné inhibovat oxidaci jak NADH, tak i sukcinátu na komplexu II [8]. Amytal (amobarbital) je barbiturát tlumící

centrální nervový systém a inhibitor komplexu I [8]. Inhibice amytalem je na rozdíl od inhibice rotenonem vratná [9].



Obr.2: Vazebné místo na ubichinon (ubiquinone reduction) [10]

2.2.2 Komplex II

Sukcinátdehydrogenáza, či sukcinát-ubichinon-oxidoreduktáza je komplex enzymů lokalizovaný ve vnitřní membráně mitochondrií. Je menší a jednodušší než komplex I a skládá se ze 4 různých podjednotek, které obsahují hemové skupiny, Fe-S centra, flavinadenindinukleotid a vazebné místo pro ubichinon a sukcinát. Enzym přenáší dva elektrony od sukcinátu na koenzym Q cestou od vazebného místa pro sukcinát na FAD. Z FAD potom přes železosírná centra na ubichinonové vazebné místo [6].

Kompetitivním inhibitorem sukcinátdehydrogenázy je malonát (kyselina malonová). Malonát je substrát malonyl-CoA-syntázy [8].

2.2.3 Komplex III

Cytochrom c oxidoreduktáza, nebo také cytochrom bc₁ komplex čerpá čtyři protony z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru a také přenáší dva elektrony z ubichinolu (QH₂) na cytochrom c [6].

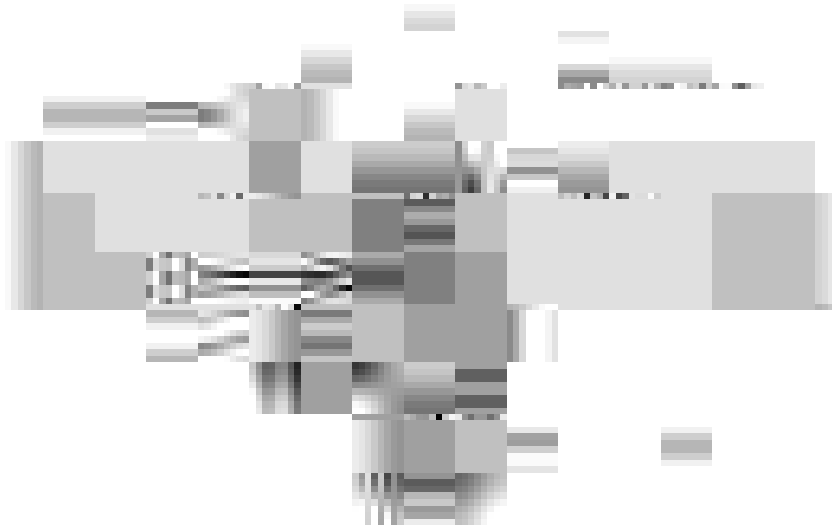
Cytochrom c je malý protein, který obsahuje hemovou skupinu, a pohybuje se volně v mezimembránovém prostoru. Po přijetí jednoho elektronu (elektron je navázán na hem) se cytochrom c přesouvá ke komplexu IV, kde předá elektron binukleárnímu centru s atomy Cu [6].

Na komplexu III existují dvě centra (*obr.3*): Q_i (= *inner*) centrum, umístěné ve vnitřní membráně a orientované směrem do mitochondriální matrix, a Q_o (= *outer*) centrum orientované do mezimembránového prostoru. V Q_i centru probíhá redukce ubichinonu na ubichinol, naopak v Q_o centru probíhá oxidace ubichinolu na ubichinon [11].

Inhibitory komplexu III můžeme rozčlenit do tří skupin. První skupinou jsou inhibitory, které se váží na centrum Q_o a zabraňují tím vazbě ubichinolu a jeho oxidaci na ubichinon. Do druhé skupiny patří inhibitory centra Q_i, které zabraňují přenosu elektronů na Fe-S centra a tím znemožňují redukci ubichinonu na ubichinol. Třetí skupinou jsou inhibitory, které mají afinitu k oběma místům [12].

Myxothiazol je inhibitor komplexu III, který se váže na Q_o centrum blízko k cytochromu b_L a inhibuje přenos elektronů z QH₂ na Fe-S Rieskeho protein [8]. Obstrukce centra Q_o vede k tvorbě superoxidů [13]. Superoxid může být dále převeden na jiné reaktivní formy kyslíku, například peroxid vodíku, hydroxylové radikály a podobně [13]. Myxothiazol je antimykotikum produkované bakterií *Myxobacterium fulvus*.

Antimycin A se váže na Q_i centrum komplexu III a inhibuje přenos elektronů z hemu b_H na oxidovaný ubichinon. Patří tedy do třídy inhibitorů centra Q_i [8]. Vazbou na Q_i centrum spustí kaskádu reakcí, která vede k depolarizaci mitochondriální membrány a způsobuje únik radikálů superoxidu z mitochondrií [14]. Antimycin A je toxická látka produkovaná *Streptomyces griseus* a *Streptomyces kitasawensis*. Používá se jako antimykotikum [15].



Obr.3: Q_i a Q_o vazebné místo komplexu III a jeho inhibitory [16]

2.2.4 Komplex IV

Cytochrom c oxidáza katalyzuje přenos elektronu z cytochromu c na molekulární kyslík a tím oxidaci cytochromu c. Molekulární kyslík je následně redukován na dvě molekuly H_2O . Skrz cytochrom c oxidázu jsou čerpány další dva protony z matrix do mezimembránového prostoru.

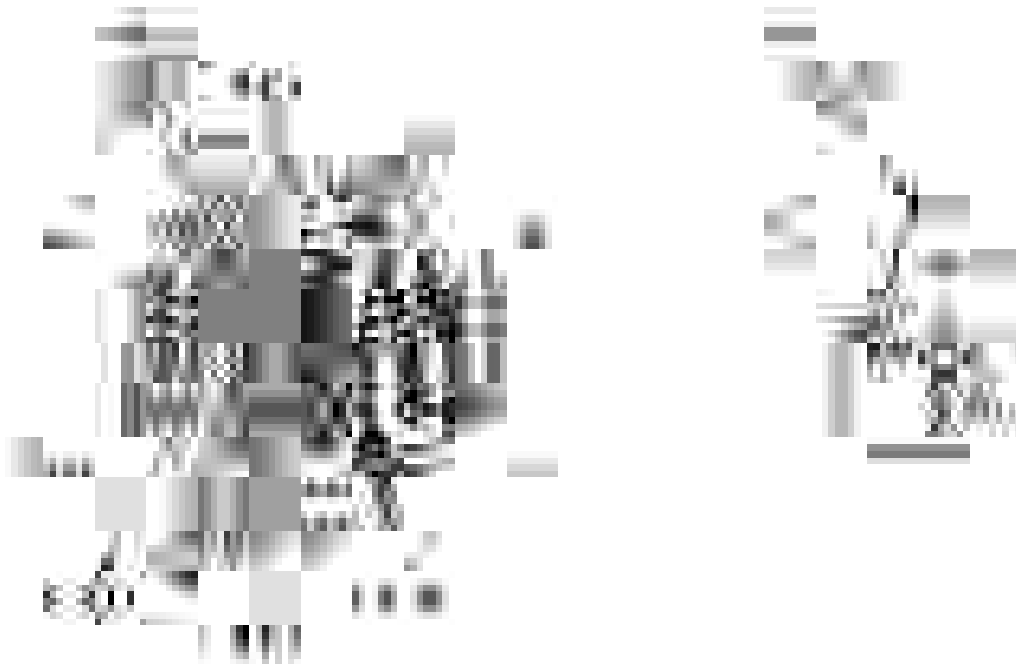
Komplex IV obsahuje několik binukleárních center (*obr.4*), které jsou tvořeny měďnými ionty (Cu_A) v komplexu s $-SH$ skupinami cysteinů, dále hemovými skupinami, a ještě jedním binukleárním centrem tvořeným hemem α_3 a Cu_B [6].

Přenos elektronu napříč komplexem IV je veden z cytochromu c na Cu_A binukleární centrum. Z něj na hemovou jednotku α , dále pak na centrum α_3-Cu_B . Z tohoto binukleárního centra přechází elektron na kyslík [17].

Funkce cytochrom c oxidázy může být ovlivněna mnoha sloučeninami z prostředí, jako jsou kyanid, azid sodný a oxid uhelnatý. Všechny tyto toxické látky reagují přímo s komplexem IV různými mechanismy [18].

Kyanid ve formě KCN, či NaCN, je kompetitivní inhibitor cytochrom c oxidázy. Inhibice může zvrácena pyruvátem a vysokými hladinami kyslíku [8]. Kyanid se váže na binukleární centrum α_3-Cu_B a inhibuje využití buněčného kyslíku a produkci ATP. Kaskádou reakcí, pokud není použito antidotum, dochází k dysfunkcím srdečního svalu a nervové soustavy [19].

Oxid uhelnatý se váže na hemovou složku cytochrom c oxidázy a také na flavohemoglobin, který se nachází v buněčném cytosolu, mezimembránovém prostoru i v mitochondriální matrix [20].



Obr.4: Cytochrom c oxidáza, její podjednotky a transfer elektronu [21]

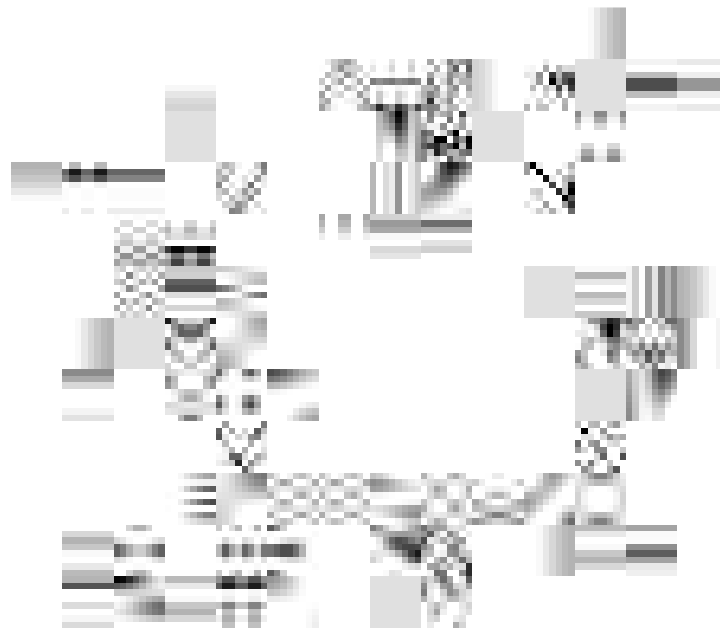
2.2.5 Komplex V

Jako komplex V se označuje ATP-syntáza, která katalyzuje proces oxidativní fosforylace. Využitím protonového gradientu umožňuje produkci ATP. Jedná se o komplex proteinů, který je složený z několika podjednotek. Ve vnitřní membráně mitochondrie se nachází F_0 část pumpy mající funkci rotoru. Druhá část, nazývaná F_1 , odpovídá funkci statoru, protože vyčnívá do matrix a je složena ze tří dimerů $\alpha\beta$ [22].

Protonové kationty prochází vnitřkem ATP-syntázy z mezimembránového prostoru do matrix. Pro vznik jedné molekuly ATP je potřeba průchodu tří protonů skrz části F_1 a F_0 [22].

Celá syntéza ATP probíhá ve třech krocích značených O, L, T. O znamená *open*. Konformace L, *loose*, váže fosfát a ADP a konformace T, *tight*, váže ATP. Jednotkou F_0

prochází po spádu protonového gradientu protony, jejich energie je zachycena a využita v komplexu F_1 . Dochází k roztočení rotoru, který hýbe státorem. Postupným otáčením statoru se mění konformace (*obr.5*). Vazbou ADP a fosfátu se mění konformace z O na L, zatímco sousední dimer plynule přejde z konformace L do T. Uvolněním molekuly ATP do matrix přechází podjednotka opět do konformace O [22].



Obr.5: O, L, T konformace ATP-syntázy [23]

Mezi inhibitory komplexu V patří antibiotikum oligomycin, které specificky blokuje přenos protonů přes F_0 . Tím znemožňuje produkci energie, a následkem toho i respiraci. Podobně inhibuje F_0 dicyklohexylkarbodiimid, který reaguje s karboxylovými skupinami ATP-syntázy. Oligomycin se používá v analýze oxidativní fosforylace k vyvolání respiračního stavu LEAK [8,24].

Inhibitor citreoviridin se váže na podjednotku F_1 ATP-syntázy. Na stejném principu funguje také inhibitor triethyltin-bromid [8].

2.3 ROZPOJOVACÍ PROTEINY

Hnědé adipocyty jsou menší než bílé adipocyty, obsahují méně lipidů a jsou bohaté na mitochondrie [25]. Vnitřní membrány mitochondrií hnědých adipocytů obsahují proteiny, které zajišťují přestup protonů zpět do mitochondriální matrix, aniž by protony musely projít ATP-syntázou. Při tomto přestupu není spotřeba energie, a proto je přebytečná energie přeměněna na teplo. Za takové situace jsou mitochondrie považovány za rozpřážené, či rozpojené [26].

Nejznámějším rozpojovacím proteinem je termogenin. Uvolněné teplo udržuje tělesnou teplotu a chrání před chladem. Tento proces se označuje termínem netřesová termogeneze [26]. Jedná se o stav fyziologický a nedochází při něm k produkci reaktivních forem kyslíku, ani k metabolické a energetické dysbalanci. Mezi funkce rozpojovacích proteinů řadíme také adaptaci na hladovění [27].

Existují umělé rozpojovače, uncouplery, které jsou protonofory a difundují přes membránu pasivní difúzí a současně usnadňují transport protonů (*obr.6*). Mezi tyto látky patří FCCP, CCCP a DNP. U vyšších koncentrací uncouplerů pozorujeme inhibici respirace indukovanou rozpojením [28].



Obr.6: Možnosti transportu iontů přes membránu [29]

2.4 MĚŘENÍ BUNĚČNÉ RESPIRACE

K analýze buněčné respirace se může použít mnoho biologických materiálů (tab.2). Jedná se například o tkáň, svalová vlákna, tkáň jater, nebo izolované buňky, jako jsou například trombocyty nebo PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) izolované z periferní krve. Mezi buňky také můžeme počítat celou škálu využívaných buněčných linií [30].

Mononukleární buňky z periferní krve, neboli PBMC, představují smíšenou populaci imunitních buněk. Patří sem lymfocyty (T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK buňky) a monocyty. Izolace PBMC je prováděna z nesrážlivé krve pomocí separačního média. Principem metody je centrifugace v hustotním gradientu. Velkou výhodou použití krevních buněk je jejich snadné získání. Navíc postup odběru vzorků není tolik invazivní jako například odběr tkáňových biopsií. Při a po izolaci je důležité udržovat buňky ve sterilních podmínkách a při konstantní teplotě, aby se zabránilo aktivaci buněk a změnám jejich fenotypu. Proto je třeba všechna izolační média temperovat na laboratorní teplotu a všechny postupy provádět při laboratorní teplotě [31].

Další biologické materiály používané pro měření buněčné respirace jsou izolované orgány, speciálně mitochondrie izolované z buněk, nebo buňky permeabilizované. Tento druh biologických materiálů naopak požaduje intracelulární prostředí, a proto se používají média bohatá na draselné ionty [30].

K permeabilizaci, tedy rozrušení, membrán se používají saponiny. Saponin je mírný detergent, který selektivně permeabilizuje plazmatické membrány s vysokým obsahem cholesterolu, zatímco mitochondriální membrány s nižším obsahem cholesterolu jsou ovlivňovány pouze při vyšších koncentracích detergentu. Nejvíce používaným saponinem je digitonin. Digitonin (*obr.7*) je přírodní produkt, a proto musí být účinná koncentrace stanovena postupnou titrací pro každou sérii zvlášť [32]. Digitonin se získává z rostliny náprstník červený, latinsky *Digitalis purpurea*. Mimo permeabilizaci buněčných membrán se také digitonin v biochemii používá pro solubilizaci membránových proteinů nebo srážení cholesterolu [33].



Obr.7: Strukturální vzorec digitoninu [33]

Mezi další biomateriály používané při respirometrii patří tkáňové homogenáty a submitochondriální částice. Submitochondriální částice jsou membránové fragmenty, které si uchovaly většinu enzymatického aparátu potřebného pro přenos elektronů a oxidativní fosforylaci. Po narušení struktury mitochondrií dispergujícími činidly (digitoninem), ultrazvukem nebo mechanicky se fragmenty mitochondriální membrány uzavřou do váčků [34].

Tkáňový homogenát se získá mechanickým rozrušením čerstvé tkáně a buněčné membrány se mechanicky permeabilizují. Použití homogenizované tkáně přináší různé výhody jako je například snadná a rychlá příprava vzorku. Také nejsou potřeba žádné detergenty. Další výhodou je, že zatímco celistvá tkáň je velmi heterogenní, v případě homogenizace je tato heterogenita snížena. A také v porovnání s izolovanými mitochondriemi je pro respirometrii zapotřebí menšího množství tkáně [35].

Pro měření buněčné respirace existují analyzátory Seahorse a Oroboros. Analyzátor Seahorse (Seahorse XF Analyzer; Agilent Technologies) měří míru spotřeby kyslíku a extracelulární acidifikaci v živých buňkách v 96jamkových destičkách. Tyto hodnoty jsou klíčovými ukazateli mitochondriální respirace a glykolýzy a tato měření poskytují systémový pohled na buněčnou metabolickou funkci v kultivovaných buňkách a *ex vivo* vzorcích [36].

Přístroj značky Oroboros (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko) je základním přístrojem pro respirometrii. Kromě respirometrie umožňuje také fluorometrická a spektrofotometrická měření a je vhodný pro analýzu různých diagnosticky významných buněčných funkcí současně s měřením mitochondriální respirace. Analyzátor je schopný fluorometrické detekce reaktivních forem kyslíku a mitochondriálního membránového potenciálu pomocí zavedených fluorescenčních barviv [37].

Tabulka 2: Přehled tkání, buněk a buněčných linií měřených na vysokoúčinném respirometru. Převzato z [38]

Tkáně	
Jaterní tkáň	Plicní tkáň
Srdeční tkáň	Svalová tkáň
Tkáň genitálu	Tuková tkáň (bílá, hnědá i šedá tuková tkáň)
Tkáň nervového systému	
Druhy buněk	
Lymfocyty	Buňky epitelu, endotelu a mezotelu
Trombocyty	Buňky pankreatu a thymu
Kmenové buňky	Fibroblasty
Buněčné linie	
CHO (<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary)	HEK (<u>H</u> uman <u>E</u> mbryonic <u>K</u> idney)
HeLa (<u>H</u> enrietta <u>L</u> acks)	SH-SY5Y neuroblastomová linie
Makrofágové buněčné linie	HUVEC (<u>H</u> uman <u>U</u> mbilical <u>Y</u> ein <u>E</u> ndothelial Cells)
HK-2 (<u>H</u> uman <u>K</u> idney <u>2</u>)	Jurkat linie
A549 (<u>A</u> lveolar epithelial cells)	Ostatní buňky a buněčné linie

2.5 PŘEHLED BUNĚČNÝCH LINÍ MĚŘENÝCH NA RESPIROMETRU

2.5.1 CHO linie

Buněčná linie CHO původně pochází z vaječníků čínského křečka (*Cricetus griseus*). Tento typ buněk byl poprvé izolován v roce 1958 v rámci studie zabývající se stanovení počtu a morfologie chromozomů. Autoři toto zvíře vybrali z důvodu nízkého množství chromozomů, tj. dvacet dva, s nadějí, že bude výhodné použití takových buněčných linií jako modelových systémů v kvantitativní analýze účinku různých činidel na buňky kultivované *in vitro* a jejich genom [39].

Pěstují se jako monovrstva a obvyklé kultivační médium – RPMI 1640 vyžaduje suplementaci prolinem. Buněčná linie CHO se stala základním zdrojem buněk pro laboratoře díky jejich robustnímu růstu na plotnách i v suspenzích. Jsou vhodné pro studium genetických modifikací a exprese rekombinantních proteinů. CHO buňky je možné také posttranslačně modifikovat, což je ideální pro terapeutické a farmaceutické aplikace jako je výroba proteinů [40]. V posledních letech se hojně využívají pro studium imunoglobulinu IgG a v moderních metodách molekulární biologie jako například CRISPR/Cas9 nebo sekvenování nové generace [41,42].

V souvislosti s mitochondriemi byly CHO buňky použity například ve studii z roku 2006, která se zabývala rolemi rozpojovacího proteinu UCP3 (což je homolog thermogeninu) [43]. Při použití buněk CHO, které stabilně exprimovaly UCP3 nebo UCP1, nebyly nalezeny žádné důkazy o rozpojení dýchání. Vysvětlení spočívá v absenci vhodného aktivátoru protonoforní funkce UCP. Studie potvrzuje, že UCP3 sám o sobě není schopen způsobit rozpojení, ale nevylučuje možnost, že se UCP3 může chovat jako rozpojovač, pokud jsou poskytovány vhodné aktivátory. Když nejsou přítomny vhodné aktivátory protonového transportu, UCP nepřenášejí protony, nýbrž jiné ionty fyziologického významu, které kontrolují mitochondriální aktivitu [43].

Jiná studie z roku 2015 se zabývala oxidací sulfanu v savčích buňkách a mitochondriích [44]. Oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sulfan (H₂S) jsou malé molekuly schopné prostupovat volně membránou. Souhrnně jsou označovány jako gasotransmitery, tedy plynné látky, které mají v organismu signální funkce. Když koncentrace těchto tří plynů stoupne nad určitou úroveň, dochází k toxickému

účinku založenému na inhibici mitochondriálního dýchání. Na rozdíl od NO nebo CO vykazuje H₂S specifickou vlastnost, díky které působí jako donor vodíku pro mitochondriální respirační řetězec. Vodíkové atomy se extrahují specifickým enzymem, sulfid-chinonreduktázou. Pokud je tedy přítomna sulfidchinonreduktáza, může být sulfan zařazen mezi substráty. V experimentu bylo využito několik buněčných linií, buněk i izolovaných mitochondrií. Kromě CHO také HeLa buňky, HEK buňky, T-lymfocyty, myší makrofágy a jiné. Jako měřicí systémy byly použity přístroje Oroboros a Seahorse [44].

2.5.2 HEK 293 linie

Nápad, že by transformace buněk mohla být indukována fragmentovanou virovou DNA, byl poprvé zrealizován v roce 1970 Dr. F. Grahamem [45]. Většina dosavadních transformačních studií využila buňky jiného než lidského původu. Nejčastěji používané byly buňky hlodavců. Použitím tohoto přístupu byla indukována transformace lidských buněk fragmentovanou DNA adenoviru 5 a byla vytvořena transformovaná lidská buněčná linie HEK 293 [45].

HEK 293 je buněčná linie odvozená od ledvinné tkáně lidských embryí. Později bylo dokázáno, že HEK mají neurální původ, ačkoli se původně myslelo, že se jedná o buňky epitelu ledvinné tkáně. To vysvětluje jejich snadnou kultivaci a růst. Číslo 293 uvádí číslo úspěšného pokusu transfekce DNA adenoviru do buňky [46].

HEK buňky jsou běžně využívány při studiích expresních proteinů díky jejich snadnému růstu a transfekci [47]. V posledních letech se hojně využívají při studování nanočástic. Příkladem může být studie o buněčné interakci nanočástic oxidu železnatého s buňkami HEK [48]. Pozoruje se totiž, že nanotoxikologické studie nevěnují dostatečnou pozornost toxickému účinku nanočástic oxidu zinečnatého v ledvinách. Proto byla v této studii vybrána buněčná linie HEK 293 jako *in vitro* model pro analýzu cytotoxicity a také toxicity na úrovni celého orgánu. Výsledky z této studie prokázaly, že interakce nanočástic s buňkami HEK způsobila produkci ROS, která působila jak na mitochondriální, tak na lysosomální aktivitu, a vedla k programované smrti buňky. Také bylo ovlivněno uspořádání cytoskeletu a nejmenší částice dokonce difundovaly do buněčného jádra [48].

Největší uplatnění našla buněčná linie HEK při výrobě virových vakcín. Ve studii z roku 2016 [49] byly navrženy buňky HEK-293 pěstované na bezsérovém médiu

pro produkci velkého množství „virus-like particles“, tedy částic podobných viru. Virus-like particles představují slibnou alternativu jako vakcína proti chřipce. Jsou to nereplikativní částice, které napodobují morfologii nativních virů, a to je činí imunogennějšími než klasické vakcíny. Za tímto účelem byla vyvinuta stabilní buněčná linie 293HA-NA exprimující hemagglutinin a neuraminidázu (subtyp H1N1). Po přechodné inserci plasmidu obsahujícího gag do buněk 293HA-NA se zvýšilo uvolňování hemagglutininu a neuraminidázy sedmkrát. Virus-like particles vylučované dokultivačního média byly získány ultracentrifugací. Tento postup má potenciál a mohl by podpořit masovou výrobu bezpečnějších a lépe kontrolovaných vakcín proti chřipce [49].

Měřicí přístroj Oroboros v souvislosti s buněčnou linií HEK byl použit ve studii z roku 2015, ve které se měřila inhibice mitochondriálního komplexu I syntetickými isoflavonoidy [50]. K definování mechanismu působení syntetických isoflavonoidů byly použity různé typy buněk, včetně buněk HEK. Po kultivaci *in vitro* s každým léčivem byla měřena spotřeba kyslíku a aktivita respiračního řetězce. Analýza mitochondriální respirace identifikovala komplex I jako přímý molekulární cíl těchto léčiv. Léčiva (isoflavonoidy) komplex inhibují, přičemž dochází k okamžité redukci spotřeby kyslíku a disipaci mitochondriálního membránového potenciálu a v jeho důsledku také k buněčné apoptóze. Tudíž inhibicí komplexu I tato léčiva znemožňují proliferaci nádorových buněk i vznik metastáz [50]. Tento mechanismus je v posledních letech široce studován pro svůj významný potenciál v léčbě i prevenci rakoviny. Principem je spuštění apoptické kaskády pouze u nádorových buněk, zatímco zdravé buňky zůstanou nedotčeny [50].

2.5.3 HeLa linie

4. října 1951 třicetiletá žena Henrietta Lacks, hospitalizovaná na klinice John Hopkins v Baltimore v Marylandu, podlela následkům velmi agresivního karcinomu děložního čípku. Ještě před smrtí byla pacientka testována na sexuálně přenosné nemoci (výsledky byly negativní) a byla u ní provedena biopsie děložního čípku. Čtyři kusy tkáně z biopsie byly odeslány do oddělení patologie. Tkáň z cervikální biopsie byla také poskytnuta pro výzkumné účely laboratoři pro tkáňovou kulturu v oddělení chirurgie v nemocnici Johns Hopkins [51]. Buňky získané z bioptického vzorku Henrietty Lack byly umístěny do kultury, kde rostly a staly se tak první lidskou

nádorovou buněčnou linií imortalizovanou v tkáňové kultuře. Buňky byly pojmenovány "HeLa" po počátečních 2 písmenech jména a příjmení Henrietty Lacks [52].

HeLa buňky se od té doby staly nejrozšířenější lidskou buněčnou linií ve výzkumu a byly zásadní pro mnoho biomedicínských průlomů posledních padesát let. HeLa buňky byly použity při vývoji vakcíny proti obrně, nebo také k identifikaci a izolaci viru HIV. V uplynulých letech byly buňky HeLa uplatňovány při genomické i proteomické revoluci [53]. V roce 2008 byla udělena polovina Nobelovy ceny v oblasti medicíny a lékařské fyziologie Haraldovi zur Hausenovi za objev lidských papilomavirů způsobujících rakovinu děložního čípku, jehož výzkum zahrnoval buňky HeLa. O rok později získalo studium na HeLa buňkách další Nobelovu cenu. Tentokrát ji získala vědecká skupina Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider a Jack W. Szostak za práci „jak jsou chromozomy chráněny telomery a enzymem telomerázou" [54,55]. HeLa buňky jsou pro svou vysokou trvanlivost a všestrannost ve výzkumu dodnes používány pro aplikace, jako je objevování léků, studie virů a výzkum rakoviny [56].

V souvislosti s měřením respirace v mitochondriích buněk HeLa se studie z roku 2013 zabývala vlivem úbytku Lon proteázy na funkci mitochondrií v HeLa buňkách. Lon proteáza je rozpustná ATP-dependentní proteáza, která se nachází v matrix savčích mitochondrií [57]. Lon proteáza je obzvláště účinná při rozpoznávání a proteolýze chybně složených a poškozených proteinových struktur [58]. Snížená aktivita Lon proteázy bývá spojena s nedostatečnou degradací a akumulací oxidovaných proteinů, zhoršenými mitochondriálními funkcemi a smrtí buněk [59]. Bylo prokázáno, že proteáza Lon může být poškozena při postižení jater, srdce a kosterního svalu v důsledku stáří. V závislosti na nefunkčnosti a poškození Lon proteázy dochází ke vzniku oxidačně modifikovaného proteinu [60]. Kromě její proteolytické aktivity bylo také prokázáno, že savčí Lon proteáza vykazuje vlastnosti chaperonu a specificky váže sekvence mitochondriální DNA [61].

HeLa buňky ochuzené o proteázu Lon byly analyzovány respirometrem a nevykazovaly významné změny mitochondriální aktivity. Ovšem tytéž buňky vykazovaly zvýšenou produkci mitochondriálních ROS. Produkce superoxidu v mitochondriích byla vizualizována metodou fluorescenční mikroskopie pomocí MitoSOXred sondy [62]. MitoSOXred sonda proniká do živých buněk, kde selektivně cílí do mitochondrií. Rychle se oxiduje superoxidem a oxidovaný produkt vykazuje silnou fluorescenci [63].

Výsledky studie uvádí, že nedostatek Lon proteázy vede ke zvýšené produkci ROS a akumulaci oxidací modifikovaného proteinu. A také, že vyčerpání mitochondriální proteázy Lon v HeLa buňkách může být alespoň částečně kompenzováno jinými ATP-dependentními mitochondriálními proteázami [62].

Jiná studie z roku 2011 se věnuje studiu narušení karcinogeneze zvýšením mitochondriální biogeneze [64]. Už desítky let je známo, že nádorové buňky výrazně regulují svoji oxidativní fosforylaci a energii produkují převážně z glykolýzy, přičemž je následně akumulována kyselina mléčná v cytosolu [65]. Závislost na glykolýze a neúčinné oxidativní fosforylaci umožňuje produkci velkých množství metabolických meziproductů, které slouží jako prekurzory biosyntézy tří hlavních tříd makromolekul (nukleových kyselin, lipidů a proteinů) v rychle proliferujících nádorových buňkách [66]. Buněčná respirace použitých nádorových buněčných linií, mezi nimiž byla i linie HeLa buněk, byla měřena analyzátory Seahorse a Oroboros [64].

2.5.4 SH-SY5Y neuroblastomová linie

Neuroblastomové buněčné linie jsou transformované buňky neurální lišty schopné neomezené proliferace *in vitro*. Tyto buněčné linie si zachovávají schopnost diferenciaci na různé typy neurálních buněk. Diferenciace je zahájena kultivací s různými činidly. Tato schopnost buněk neuroblastomu proliferovat a diferencovat se je výborným *in vitro* systémem pro různé studie [67].

SH-SY5Y neuroblastomová linie je lidská buněčná linie subklonovaná původně z buněčné linie nazvané SK-N-SH, která byla izolována z biopsie kostní dřeně odebrané čtyřleté dívce s neuroblastomem [67]. Mít vhodné systémy *in vivo* a *in vitro*, které poskytují dobré modely lidského onemocnění, je nedílnou součástí výzkumu neurobiologie a neurověd. Buňky SH-SY5Y mají stabilní karyotyp sestávající ze čtyřiceti sedmi chromozomů a mohou být diferencovány prostřednictvím různých mechanismů od stádia neuroblastu do stádia zralých lidských neuronů [68], či dokonce specifických neuronových podtypů, jako jsou adrenergní, cholinergní a dopaminergní neurony [69].

Studie z roku 2009 se zabývala vznikem β -amyloidů a jejich vlivem na buněčnou respiraci, produkci energie a aktivitu mitochondriálního respiračního řetězce v buňkách lidského neuroblastomu [70]. Mitochondriální respirační funkce a energetický metabolismus byly analyzovány v kontrolních lidských neuroblastomových

buňkách (SH-SY5Y) a buněčné linii získané transfekcí SH-SY5Y s vektorem obsahujícím celou kódující oblast lidského amyloidního prekurzorového proteinu. Respirační kapacita mitochondriálního elektronového transportního řetězce byla měřena respirometrem Oroboros. Dále byly určeny aktivity jednotlivých mitochondriálních komplexů [70].

Komplexy I a II pracovaly stejně u obou typů buněk, zatímco aktivita komplexu IV byla výrazně snížena v buňkách s amyloidním prekurzorem. Naproti tomu aktivita komplexu III byla u týchž buněk signifikantně zvýšena z důvodu kompenzace nefunkčnosti komplexu IV. Tento kompenzační mechanismus však nemohl zabránit silnému narušení celkového dýchání. Výsledek měření prokázal, že respirace spolu s produkcí ATP byla v buňkách s amyloidním prekurzorem snížena v porovnání s kontrolními buňkami [70].

2.5.5 HUVEC linie

Lidské endotelové buňky pupečnickové žíly (HUVEC, z anglického Human Umbilical Vein Endothelial Cells) jsou izolovány ze zdravé lidské umbilické žíly. Používají se hlavně ke studiu funkce a patologie endotelových buněk [71]. Monovrstva endotelových buněk tvoří vnitřní buněčnou výstelku krevních cév (tepny, žíly a kapiláry) a lymfatického systému a je tedy v přímém kontaktu s krví, lymfou a cirkulujícími buňkami. Endotel má hlavní roli v kontrole fluidity krve a v dodání impulsu pro agregaci trombocytů. Vrstva endotelu je také důležitým endokrinním orgánem. Ovlivňuje průtok krve syntézou a uvolňováním relaxačních a kontrakčních faktorů. Endoteliální dysfunkce iniciuje kardiovaskulární onemocnění jako jsou hypertenze nebo ateroskleróza [72]. K dispozici jsou i buňky HUVEC, které jsou předběžně testovány na vaskulární endoteliální růstový faktor, což je důležitý signalizační protein, který stimuluje angiogenezi a cévní permeabilitu. *In vitro* bylo prokázáno, že vaskulární endoteliální růstový faktor stimuluje endoteliální buněčnou mitogenezi [73].

Buněčná linie HUVEC byla použita v roce 2016 pro studium účinné látky karvedilol na biogenezi mitochondrií [74]. Několik předchozích studií prokázalo, že karvedilol vykazuje mnohé farmakologické vlastnosti, včetně antioxidačních, protizánětlivých, antiapoptotických a antifibrotických [75]. Také se prokázalo na *in*

vitro, *ex vivo* a *in vivo* modelech, že karvedilol chrání mitochondrie před různými stresy a má pozitivní vliv na srdeční mitochondrie i u srdečních dysfunkcí [76].

Aby bylo možné zjistit, zda karvedilol obnovuje mitochondriální funkci, byl použit se pro měření spotřeby O₂ respirometr Oroboros [74]. Karvedilol inhibuje mitochondriální komplex I, ale také inhibuje produkci ROS při poškození komplexu I v mitochondriích [77]. Spotřeba kyslíku byla u karvedilolem léčených buněk HUVEC zvýšena, z čehož vyplývá i zvýšená mitochondriální respirační rychlost [74].

2.5.6 Makrofágové buněčné linie

Makrofágová buněčná linie RAW 264.7 odvozená od myších monocytů je již více než 40 let jednou z nejčastěji používaných myeloidních buněčných linií. Tyto buňky jsou popsány jako vhodný model makrofágů, protože jsou schopné provádět pinocytózu a fagocytózu a také jsou schopné zabít cílové buňky cytotoxickými mechanismy závislými na protilátkách. Byla u nich navíc prokázána schopnost diferencovat se na osteoklasty [78]. Makrofágy jsou klíčové v imunitní odpovědi pro svoji úlohu produkovat regulační cytokiny, proteázy a koagulační faktory. Navíc zajišťují trávení patogenů, nekrotických buněčných úlomků a dalších cizích objektů, které se vyskytují v hostiteli [79]. Dnes již víme, že makrofágy vykazují rozdílné metabolické fenotypy a zprostředkovávají celou řadu alternativních funkcí, včetně imunosuprese a opravy tkáně [80]. Buněčná řada makrofágů RAW 264.7 je vhodným *in vitro* modelem funkcí makrofágů a monocytů *in vivo*. Z těchto důvodů buněčná linie RAW slouží jako modelový organismus při expozici endotoxinům a cytokinům i při přímých parazitárních infekcích a stavech zánětlivé reakce [79]. Jinými slovy je tato buněčná linie běžně používána pro studium buněčných reakcí na mikroby a jejich produkty [81].

AMJ2-C11 také patří mezi makrofágové buněčné linie. Jedná se o alveolární makrofágy, které hrají ústřední roli v obraně plic. Při sepsi a jiných patologických stavech může bakteriální lipopolysacharidový endotoxin indukovat uvolnění cytokinů z alveolárních makrofágů. Mezi cytokiny podporující zánět patří tumor-nekrotický faktor alfa, interleukin-1 a interleukin-6. AMJ2-C11 linie je myší alveolární makrofágová buněčná linie produkující interleukin-6 [82].

Studie z roku 2014 [83] se zaměřila na schopnost imortalizované buněčné linie (AMJ2-C11) udržet aerobní buněčné dýchání při snižující se koncentrací kyslíku během

kontinuální expozice sulfidem. Předpokládalo se, že metabolismus (a eliminace) sulfidu by se měl snížit při omezené koncentraci kyslíku, právě proto, že je spojen s mitochondriálním respiračním řetězcem a probíhá za aerobních podmínek. Pokusy se prováděly na přístroji Oroboros. Buňky byly studovány ve dvou různých metabolických stavech, a to za normálního fyziologického dýchání a po rozpojení mitochondriální dýchání. Výsledky studie naznačují, že aerobní dýchání při snížené koncentraci kyslíku je rychleji inhibováno kontinuálním přídatkem sulfidu. Také ukazují, že tento účinek nastává ještě před tím, než se aerobní metabolismus sníží nedostatkem kyslíku. Tato vlastnost teoreticky předpokládá schopnost sulfidu předpovědět hypoxii, neboť reaguje na pokles koncentrace kyslíku ještě před tím, než se hypoxie stane omezujícím faktorem pro buněčný metabolismus [83].

2.5.7 HK-2 linie

Studie hodnotící mechanismy fyziologie a patofyziologie buněk proximálního tubulu začaly stále více využívat systémy buněčných kultur. Z tohoto důvodu vznikla buněčná linie HK-2, imortalizovaná epiteliální buněčná linie izolovaná z ledvin dospělého člověka. Primární kultura buněk proximálního tubulu z dospělé lidské ledviny byla vystavena působení rekombinantního retroviru s geny lidského papilomaviru, což vedlo ke vzniku buněčné linie HK-2, která rostla kontinuálně v médiu bez séra a zachovávala si fenotyp i funkční charakteristiky proximálního tubulárního epitelu [84].

Je důležité si uvědomit, že ledviny jsou hlavní cílové orgány pro toxicitu vyvolanou léčivými a nové biomarkery jsou potřebné k citlivějšímu a spolehlivějšímu vyhodnocení nefrotoxicity v *in vitro* modelu. S tímto záměrem byl vyvinut *in vitro* model založený na HK-2 buňkách pro hodnocení nefrotoxicity a umožnil tak předpovědět nefrotoxicitu i v raných preklinických stádiích výzkumu léčiv [85].

Ledviny, tj. orgán, který například odstraňuje odpad z krve a reguluje rovnováhu tekutin a elektrolytů, vyžaduje velké množství mitochondrií, protože mitochondrie poskytují energii k řízení těchto důležitých funkcí. Ledvina má hned po srdci druhý nejvyšší obsah mitochondrií a tím pádem i druhou nejvyšší spotřebu kyslíku. Případná mitochondriální dysfunkce je častá a objevuje se při akutním poškození ledvin a diabetické nefropatii. Při neobnovení funkce mitochondrií může vést až

k chronickému onemocnění ledvin. Obnovení funkce mitochondrií může vést ke zvratu buněčného poškození a obnovení renálních funkcí [86].

Ledviny a ledvinné buňky jsou také významným zdrojem izolovaných mitochondrií. Výťažnost izolace je značná, vzhledem k počtu mitochondrií a „měkkosti“ tkáně, kterou ledvina představuje (oproti vláknité tkáni, jako je sval) [87].

Skupina vědců v roce 2012 v Belgii [88] zkoumala účinky bakteriálního endotoxinu na bazální respiraci buněk HK-2. Simulovali tak mechanismus regulace kyslíku při akutním poškození ledvin indukovaném zánětem. Respirace byla měřena přístrojem Oroboros a spotřeba kyslíku patnácti milionů buněk HK-2 ošetřených endotoxinem. Tyto buňky vykazovaly sníženou spotřebu kyslíku. Reverzibilita této snížené spotřeby kyslíku byla testována několikanásobným promytím buněk inkubovaných s endotoxinem a jejich následnou inkubací (po dobu 24 hodin) v médiu bez endotoxinu. Stejná buněčná respirace přetrvávala i po odstranění stresového faktoru, a tedy snížení spotřeby kyslíku u buněk je nevratné. Endotoxinem ovlivněné buňky HK-2 již nebyly schopny používat dostupný kyslík k udržení svých metabolických funkcí. Tato studie podporuje hypotézu, že septický šok musí být považován za přímý mechanismus akutního poškození ledvin [88].

2.5.8 Jurkat linie

Buněčná linie Jurkat, byla poprvé izolovaná z periferní krve 14letého chlapce s akutní lymfoblastickou leukémií při prvním relapsu v roce 1976. Často se tato buněčná linie nazývá "JM" ačkoli se spíše jedná o sesterský klon (Jurkat a JM jsou odvozeny od stejného pacienta). JM linie může ale mít poněkud odlišné vlastnosti [89,90].

Transformované T-buněčné linie (nejznámější z těchto modelových systémů je leukemická linie T-buněk Jurkat) se používaly ke studiu signalizačních receptorů T-lymfocytů (TCR). Buněčná linie Jurkat byla jednou z několika leukemických buněčných linií, která spontánně nebo indukovatelně uvolňovala velké množství interleukinu-2. Jurkat buňky byly zvláště silnými producenty interleukinu-2 po stimulaci fytohemaglutininem. Ve stejném období bylo také díky buňkám Jurkat objeveno, že ligace TCR spouští intracelulární uvolňování vápenatých iontů [91].

Jurkat linie se v dnešní době nejvíce používá v oborech imunologie, imunofarmakologie a podobných oborech a navazuje na již zmíněné poznatky.

Například studium imunostimulancí uvolňujících vápenaté ionty [92], studium sekrece interleukinu-2 a inhibitorů sekrece [93] nebo další signální dráhy. Také se Jurkat buňky začaly používat v technologii editace genomu CRISPR-Cas9 [94].

2.5.9 A549 linie

Buněčná linie A549 byla izolována v roce 1973 z plicního adenokarcinomu [95] a postupně se stala základním pilířem pro výzkum funkce plic, přestože byla původně vyvinuta pro výzkum rakoviny. Vysoký počet multilamelárních tělísek indikuje, že buňka může být schopna produkce povrchově aktivních látek, což je klíčový znak fyziologických pneumocytů II. typu. Toto je důkaz o schopnosti této linie vykazovat vlastnosti fenotypu plicních epitelálních buněk [96]. Také má tato linie uplatnění v oboru virologie, protože buněčná linie A549 je vhodným hostitelem pro mnoho lidských respiračních virů včetně adenovirů [97] a například studie z roku 2016 se zabývala otázkou, jak léčba přímým elektrickým proudem modifikuje mitochondriální funkci a obsah lipidů v buněčné linii A549 [98].

Elektrochemická terapie zahrnuje léčbu pevných nádorů přímým elektrickým proudem. Tato studie hodnotila specifické účinky elektrického proudu na biochemické a metabolické vlastnosti lidské buněčné linie karcinomu plic A549. Apoptóza byla hodnocena na základě aktivity kaspázy-3 a na základě disipace mitochondriálního transmembránového potenciálu. Morfologie buněk byla analyzována pomocí transmisní elektronové mikroskopie a lipidové kapičky byly studovány rentgenovou mikroanalýzou. Pro stanovení parametrů mitochondriální respirace byla použita respirometrie s vysokým rozlišením [98].

Respirace A549 byla hodnocena okamžitě po ošetření elektrickým proudem a 24 hodin po ošetření. K měření respirace byl použit přístroj Oroboros. Ke studiu specifických změn v oxidativní fosforylaci byl přidán oligomycin, inhibitor ATP-syntázy. Následně byla stanovena maximální respirace postupnou titrací rozpojovače. Maximální spotřeby kyslíku bylo dosaženo s koncentracemi v rozmezí 0,2-0,4 $\mu\text{mol/l}$ FCCP. Nakonec byla mitochondriální respirace inhibována přidáním KCN. Některé funkční změny v respiraci byly pozorovány po 24 hodinách léčby elektrickým proudem s významným zvýšením přibližně o 35 %. Tyto biochemické změny mohou být vysvětleny zvýšením aktivity elektronového transportního systému nebo dokonce zvýšením mitochondriální biogeneze [98].

2.6 TOXICKÉ PŮSOBENÍ KADMIA NA ÚROVNI BUŇKY

Kadmium (Cd) je přirozeně se vyskytující kov nacházející se v periodické tabulce prvků mezi zinkem a rtutí. Svou chemickou povahou se velmi podobá zinku. Nejčastěji se vyskytuje ve formě dvojmocného kationtu, například chlorid kademnatý. Jeho zastoupení v zemské kůře není četné, asi 1:10 milionům a obvykle jako nečistota v usazeninách zinku nebo olova [99].

Komerčně se kadmium používá v televizních obrazovkách, laserech, bateriích, nátěrových barvách a kosmetických výrobcích. V šedesátých letech dvacátého století se kadmium ve směsi se zinkem používalo pro svařování těsnění v olověných vodovodních potrubích [100].

Kadmium se do organismu dostává hlavně vdechováním nebo požitím. Absorpce kontaktem s pokožkou je zanedbatelná. 5 až 10 % požitého Cd je vstřebáno ve střevech a absorpce stoupá při nedostatku železa, vápníku nebo zinku v organismu. Expozice kadmia nastává při požití kontaminovaných potravin nebo vody a může způsobit dlouhodobé zdravotní efekty. Významným zdrojem Cd je kouření cigaret. Hladiny Cd v krvi a ledvinách jsou u kuřáků významně vyšší než u nekuřáků. Dalším důležitým faktorem pro expozici Cd jsou pracovní podmínky v průmyslové výrobě (například svařování nebo pájení), které mohou způsobit těžkou pneumonitidu [100,101].

Toxicita kadmia byla prokázána v několika orgánech, (tab.3). Kadmium indukuje poškození tkáně epigenetickými změnami exprese DNA, indukci oxidativního stresu, porušením transportních mechanismů a dalšími patologickými mechanismy jako je například kompetitivní inhibice enzymů nebo poškození mitochondriální funkce [100].

Biologický poločas kadmia v krvi se odhaduje na 75 až 128 dní, biologický poločas eliminace prvků z orgánů a tkání až 25 let [102].

Tabulka 3: Přehled orgánů a cílových buněk toxicity kadmia s důsledky. Upraveno dle [100]

Orgán / systém	Typ buněk a mechanismus toxicity Cd	Poškození funkce/Nálezy
ledviny	hromadění Cd v buňkách proximálního tubulu	oxidační poškození transportních proteinů a mitochondrií, apoptóza buněk [103]
	potlačení produkce erythropoetinu v juxtaglomerulárních buňkách	těžké anémie, hemolýza, deficit železa [104]
	narušení metabolismu vitamínu D u buněk ledvin	poškození absorpce vápníku, narušení metabolismu kolagenu, osteomalacie a osteoporóza [105]
kosti	stimulace osteoklastů	osteoporóza [106]
	poškození osteoblastů	pokles osteokalcinu v séru [107]
svál	hromadění Cd v buňkách hladké svaloviny	apoptóza [108]
endotel	dopad na transkripci genu buněk endotelu vaskulárního systému	hypertenze [109], diabetes [110], poškození vazokonstrikce [111]
imunitní systém	indukce diferenciacie monocytů	pěnové buňky [112]
	znemožnění diferenciacie T-lymfocytů	ztráta schopnosti imunizace [113]
	potlačení aktivity NK buněk [114]	
	zastavení buněčného cyklu splenocytů	apoptóza [115]
hormony	tyreotropní buňky	potlačení produkce TSH [116]
	folikulární buňky štítné žlázy	zvýšení sér. hladin T3 a T4 [116]
varlata	poškození schopnosti adheze prekurzorů spermií k Sertoliho buňkám	ztráta zárodečných buněk, snížení počtu spermií, subfertilita/neplodnost [117]
CNS	kortikální buňky	snížení aktivity acetylcholinesterázy, zvýšení oxidačního stresu, vyčerpání glutathionu a dalších antioxidantů, apoptóza [118]
nádor	vznik nádorových buněk	rakovina pankreatu [119], prostaty [120], plic [121], prsu [122], non-Hodgkinův lymfom [121]

Po absorpci je Cd transportováno po celém těle, obvykle navázáno na protein metalothionein (*obr.8*). Metalothioneiny (MT) jsou všudypřítomné proteiny s nízkou molekulovou hmotností bohaté na cystein a kovové ionty. Obsahují kovové klastry tvořené ionty Zn^{2+} , Cd^{2+} a Cu^{2+} . U savců existují čtyři odlišné metalothioneinové izoformy označené MT-1 až MT-4. První objevené MT-1 a MT-2 jsou široce exprimované izoformy, jejichž biosyntéza je indukovatelná širokou škálou podnětů, včetně kovů, léků a zánětlivých mediátorů. Naproti tomu MT-3 a MT-4 jsou neindukovatelné proteiny, jejichž exprese je primárně omezena na centrální nervový systém a některé dlaždicové epitelu [123].

Metalothioneiny mají důležitou ochrannou funkci proti poškození mozku a proti kovem indukovanému neurodegenerativnímu onemocnění. Je stále více zřejmé, že MT plní mnoho funkcí, včetně udržování homeostázy zinku a mědi, ochrany před toxicitou těžkých kovů a ochrany před oxidačním poškozením [123].



Obr.8: Trojrozměrná struktura metalothioneinu se sedmi atomy kadmia (Cd_7MT) [124]

Kationtové kanály přechodného receptorového potenciálu TRPV5 a TRPV6 (z anglického *Transient Receptor Potential channels, of the Vanilloid subtype*) jsou dvě hlavní transportní dráhy, které přenáší vápník v lidském těle a udržují tak homeostázu vápenatých iontů. TRPV5 se vyskytuje hlavně v distálním tubulu a má klíčovou roli v reabsorpci vápníku. TRPV6 slouží pro důležitý transport vápníku do duodena a placenty [125].

Je také známo, že dráha TRPV6 je schopná dopravovat několik těžkých kovů včetně kadmia [126]. Kadmium dokáže substituovat vápník a zinek na mnoha místech nebo inhibovat antioxidační enzymy [127].

Vzhledem k lokalizaci TRPV6 v tenkém střevě může TRPV6 sloužit jako vstupní brána pro kadmium do těla. Podobně je dráha TRPV5 lokalizována v membráně distálního tubulu v ledvinách, kde může zapříčinit reabsorpci kadmia, čímž se násobí renální příznaky toxicity kadmia [125].

Cd indukuje buněčnou smrt různými mechanismy, které závisí na době expozice, dávce a typu buňky. Obecně platí, že vystavení nízkým koncentracím Cd^{2+} a chronické expozici Cd^{2+} vede k apoptóze, zatímco akutní otravy s vysokými koncentracemi Cd^{2+} indukují nekrózu. K apoptóze může dojít několika cestami. První z nich je klasická mitochondriální dráha závislá na cytochromu c. Cd^{2+} může také indukovat apoptózu nezávislou na kaspázách, čímž se zvyšuje produkce ROS v mitochondriích, při čemž se uvolňují zásobní vápenaté ionty a vyčerpává se glutathion jakožto vycytávač ROS [128]. V buňkách HEK293 kadmium indukuje apoptózu prostřednictvím aktivace kaspázy 3 [129].

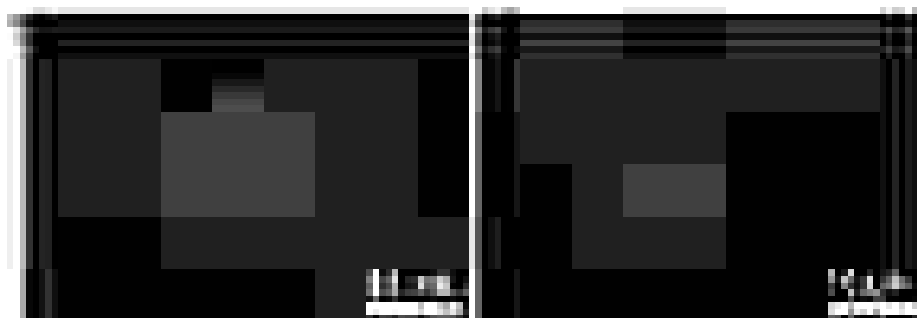
Toxické účinky iontů těžkých kovů jsou také důsledkem jejich interakce s nativními bílkovinami. Ovšem těžké kovy, mezi které patří právě kadmium, velmi účinně inhibují i znovuoobnovení struktury denaturovaných proteinů a to spontánně, pomocí ATP-řízeného chaperonového systému a také chaperonem zprostředkované opětovné složení tepelně denaturovaných proteinů. Kadmium a další těžké kovy vytváří stabilní komplexy s ligandy (thiolovou, imidazolovou a karboxylovou skupinou) v proteinech. Tyto komplexy kov-bílkovina mohou být připojeny dokonce více vazbami k několika vhodně umístěným ligandovým postranním řetězcům denaturovaného proteinu. Vznik komplexu zajišťuje právě inhibici opravy denaturace proteinu [130].

V případě otravy těžkými kovy se interference kadmnatých iontů s přirozenými formami proteinů může projevit jako kvantitativní nedostatek postižených proteinů, nebo jako vznik proteotoxických agregátů [130].

2.7 TOXICKÉ PŮSOBENÍ KADMIA NA ÚROVNI MITOCHONDRIE

Je známo, že ionty kadmia v organismu nezajišťují žádné fyziologické funkce. A současně kadmium jasně vykazuje toxické účinky na organismus.

Poté, co Cd^{2+} vstupuje do cytosolu buněk, vytváří komplexy aminokyselinami, nebo peptidy a proteiny, které obsahují SH skupiny. Příkladem je metalothionein nebo glutathion. Tyto molekuly „neutralizují“ toxické vlastnosti těžkých kovů a chrání tak intracelulární prostředí před oxidačním stresem. Vyčerpání těchto ochranných faktorů vede k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) a následnému poškození organel [131]. Stejně tak dochází k produkci ROS v důsledku vytlačení endogenních redoxních kovů (Fe^{2+} , Cu^{2+}) indukovaného kadmiiem [132]. Pokud nejsou tyto stresové události dostatečně kompenzované opravnými mechanismy, podstoupí buňka programovanou buněčnou smrt nebo nekrózu [131]. Apoptóza nastává aktivací dvou hlavních signalizačních cest: 1) aktivací receptoru smrti (Fas receptor) nebo 2) aktivací mitochondriální dráhy nezávislé na receptoru [133]. Vyslání signálu o buněčné smrti vede k reakci, při které se z mezimembránového prostoru mitochondrie uvolní řada proapoptotických proteinů do cytosolu. Příkladem proteinů, které se normálně sekvestrují v mitochondriích, ale jsou uvolňovány při apoptotických signálech, je cytochrom c (*obr.9*) [134], faktor indukující apoptózu [135] nebo řada prokaspáz [136]. Jakmile se cytochrom c uvolní do cytosolu, vytvoří typický apoptosom s dalšími cytosolovými složkami (komplex cytochrom c/Apaf-1/kaspáza 9) a spustí aktivaci buněčné kaskády proteáz, které nakonec vedou k apoptóze buňky [133,134].



Obr.9: Expozice buněk proximálního tubulu 10 mol/l Cd^{2+} [131]

V kontrolách (vlevo) mají buňky kulaté, světle modré jádro a bodové rozdělení cytochromu (jasnější částice v cytosolu), což naznačuje, že cytochrom c je lokalizován v mitochondrii. Když jsou buňky inkubovány v prostředí s Cd^{2+} po dobu 24 hodin, vykazují apoptotické buňky významnou změnu distribuce cytochromu c (vpravo) ve srovnání s kontrolou. Bodová distribuce cytochromu c se změnila na difúzní. Tzn., že cytochrom c byl uvolněn z mitochondrie do cytosolu.

V posledních letech byla aktivně studována úloha iontů kadmia při nescifickém zvýšení permeability mitochondriální membrány [137].

Propustnost vnější mitochondriální membrány je dána skupinou porinových proteinů. Mitochondriální poriny přenáší malé molekuly a společně tvoří MPTP, tedy mitochondriální pór přechodné permeability (z anglického *mitochondrial permeability transition pore*), který se otevírá v reakci na apoptotické signály. Mitochondriální poriny mají významné role v různých buněčných procesech včetně regulace ATP a toku vápníku [138]. Otevření MPTP je indukováno vápenatými ionty a inhibice, tj. zavření MPTP je indukována cyklosporinem A [139] (*obr.10*). V důsledku otevření MPTP dochází k nabobtnání mitochondrií a k rychlému uvolňování Ca^{2+} z těchto organel [137].

Cd^{2+} aktivuje otevírání pórů tvorbou koordinačních komplexů s $-\text{SH}$ skupinami mitochondrie [140]. Tím ionty Cd^{2+} indukují intenzivní bobtnání mitochondrií zprostředkované nescifickým zvýšením permeability membrány [141]. Bobtnání je také spojeno se zvýšeným uvolňováním cytochromu c z mezimembránového prostoru [131].

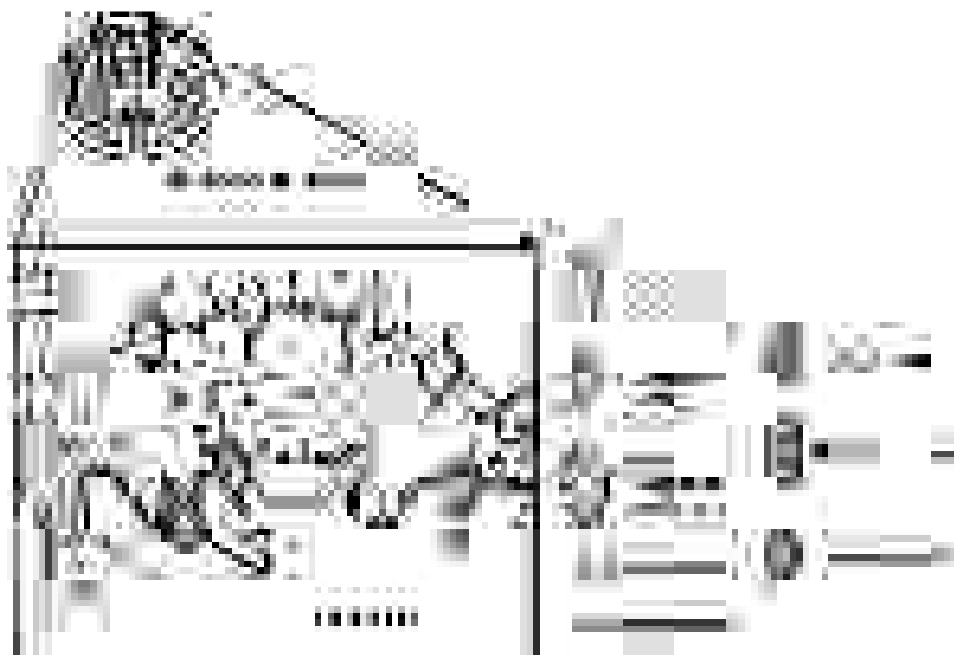
Klíčový prvek pro pochopení toho, jak Cd^{2+} ovlivňuje propustnost vnitřní mitochondriální membrány, je uniporter MCU (*mitochondrial calcium uniporter*). Je-li koncentrace intracelulárního Cd^{2+} dostatečně vysoká, vstupují ionty do matrix skrz uniporter MCU. Po vstupu Cd^{2+} do matrix aktivuje aquaporiny a přítok H_2O vede k osmotickému otoku a uvolnění cytochromu c [131].

Blokátory MCU (rutheniová červeň, Ru360, ionty La^{3+}) zabránily mitochondriálnímu bobtnání a uvolnění cytochromu c. To potvrzuje, že Cd^{2+} a Ca^{2+} jsou transportovány do mitochondrií stejným mechanismem, tj. přes MCU. Přestože transport těchto iontů je stejný, jejich účel uvnitř mitochondrie se značně liší [131].

Cyklus draselných iontů, který přispívá k udržení strukturální a funkční integrity mitochondrií, zahrnuje tok K^+ přes K^+ kanály a výměnu K^+/H^+ , která reguluje fyziologickou mitochondriální homeostázu [142]. Mitochondrie mají několik K^+ kanálů neboli uniporterů na vnitřní mitochondriální membráně. Vstup Cd^{2+} skrz K^+ kanál je také možný a rovněž indukuje osmotické bobtnání [131].

Důležitou složkou MPTP je adeninnukleotidtranslokáza na vnitřní membráně mitochondrie a napěťové řízený aniontový kanál na vnější membráně mitochondrie. Poblíž adeninnukleotidtranslokázy je malý rozpustný protein cyklofilin D. Tento protein

na sebe váže cyklosporin A nebo kyselinu bongkrekovou, což jsou velmi silné inhibitory MPTP. Nicméně účinky těchto inhibitorů na zastavení mitochondriálního otoku indukovaného Cd^{2+} nejsou dostatečně silné [131].



Obr.10: Účinky Cd^{2+} na propustnost mitochondriálních membrán [143].

(PTP = mitochondriální pór přechodné permeability; MCU = uniporter pro vápenaté ionty; RR/Ru360 = rutheniová červeň; CsA = cyklosporin A (CsA))

V buňkách proximálního tubulu se po Cd intoxikaci snížil počet mitochondrií a objevily se degenerované mitochondrie se sníženou hustotou matrix a chybějícími kristami [144]. Co se týče účinků těžkých kovů na mitochondriální transportní řetězec, s největší pravděpodobností v mitochondriích inhibují aktivitu komplexů II a III více než aktivitu ostatních komplexů. Studované byly všechny komplexy: komplex I až V. Výsledky ukazují, že komplex II a komplex III jsou citlivější vůči Cd než komplexy I, IV a V ve třech testovaných tkáních tj. v mitochondriích jater, mozku a srdce morčat. U mitochondrií izolovaných z jaterní tkáně byla maximální inhibice komplexů II a III dosažena v přítomnosti $20 \mu\text{M CdCl}_2$ a enzymové aktivity komplexů II a III byly inhibovány o 58 a 75 %. Inhibice enzymové aktivity komplexů

elektronového transportního řetězce mitochondrií izolovaných z mozkové tkáně vykazovala podobný profil jako u mitochondrií z jaterní tkáně. Komplexy mitochondrií izolovaných ze srdeční tkáně byly méně citlivé na Cd ve srovnání s mitochondriemi jaterními a mozkovými [145].

Za účelem přezkoumání, zda je inhibice komplexu III reverzibilní, byla přidána EDTA k mitochondriím ošetřených kadmíem. Přidání EDTA zvrátilo inhibiční účinek Cd a více než 90 % enzymové aktivity bylo obnoveno [145].

Při použití substrátů specifických pro každý komplex bylo prokázáno, že Cd může indukovat generaci ROS pouze v komplexu III. Cd se váže na Q_o místo komplexu III mezi semiubichinonem a hemem b566. Tudíž se neváže přímo do vazebného místa myxothiazolu (*obr.11*). Tato vazba zabraňuje přenosu elektronů ze semiubichinonu na hem b566 a semiubichinon se hromadí v místě Q_o . Kumulované semiubichinony jsou nestabilní a snadno předají svůj elektron molekulárnímu kyslíku, čímž vzniká superoxidový anion [145].

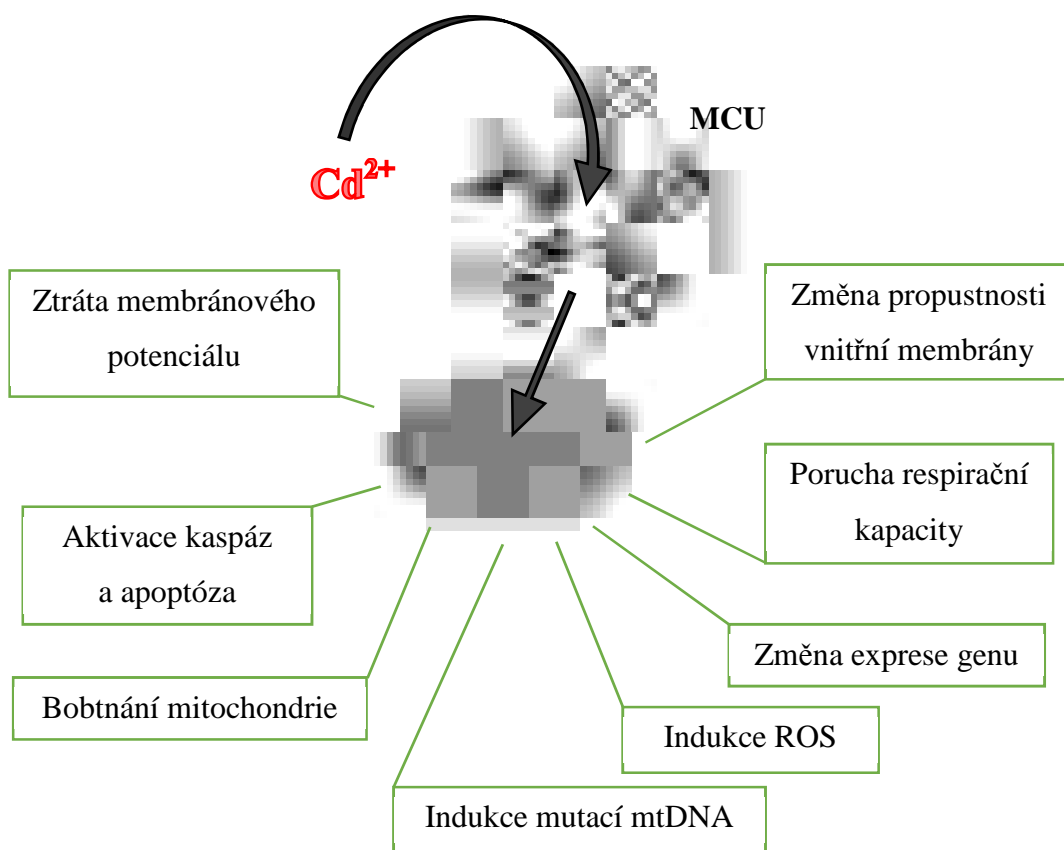


Obr.11: Dráha Q-cyklu [145].

Přenos elektronů z ubichinolu na cytochrom c přes prostetické skupiny komplexu III je zobrazen pevnými šipkami. Q_i představuje negativní stranu membrány, kde je ubichinon redukován. Q_o představuje pozitivní stranu membrány, kde je ubichinol oxidován. Vazebné místo pro Cd se nachází mezi b566 a Q_o - na místě Q_o . Šedé obdélníky ukazují vazebná místa pro inhibitory antimycin A (AA) a myxothiazol (My) [145].

A protože hlavní místo produkce ROS sídlí v komplexu III, jeho dysfunkce může zvýšit produkci ROS nad hranici neutralizační schopnosti antioxidantů, které se rovněž nacházejí v mitochondriích [146]. Po 5 až 10 minutách expozice in vitro kadmium způsobuje lipoperoxidaci mitochondriální membrány [147]. Peroxidy lipidů mohou sloužit jako zdroj reaktivních forem kyslíku, snižují hladiny glutathionu a hladiny antioxidantních enzymů. Typické pro intoxikaci Cd je také abnormální zvýšení acidifikace v důsledku produkce laktátu uvnitř mitochondrie. Tvorba laktátu představuje překážku pro oxidační metabolismus [148]. Kadmium způsobuje pokles triacylglycerolů a cholesterolu uvnitř mitochondrie a indukuje nárůst triacylglycerolů v cytosolu a také zvýšení hladiny cholesterolu a fosfolipidů v jádře [149].

Dalším důležitým cílem ROS je mtDNA. Oxidační poškození často vede ke smrtelnému poškození buněk prostřednictvím inhibice přenosu elektronů, disipaci potenciálu mitochondriální membrány a narušení vzniku ATP. mtDNA je obzvláště citlivá k poškození pomocí ROS, protože nemá dostatek ochranných histonů a je prostorově velmi blízko elektronovému transportnímu řetězci jako hlavnímu místu pro produkci volných radikálů. Reaktivní formy kyslíku mohou například vyvolat tvorbu 8-hydroxydeoxyguanosinu. 8-Hydroxydeoxyguanosin je běžně používaným markerem poškození DNA v důsledku oxidačního stresu. Hladina oxidačně modifikovaných bází v mtDNA je 10 až 20krát vyšší než hladina v jaderné DNA. Oxidační poškození indukované ROS je pravděpodobně hlavním zdrojem mitochondriální genomické nestability. Tato nestabilita mtDNA je považována za jeden z nejdůležitějších faktorů ve stárnutí [150].



Obr.12: Obecné schéma biologického důsledku intoxikace Cd na mitochondrie savčích buněk.
Upraveno dle [151].

3. CÍL PRÁCE

- 1) Zavést metodu izolace PBMC z periferní krve.
- 2) Využít PBMC a buněčné linie k měření buněčné respirace *in vitro*.
- 3) Zavést metodu izolace mitochondrií z buněčných kultur.
- 4) Využít různé typy biologického *in vitro* materiálu ke sledování změn buněčné respirace po ovlivnění kadmíem.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POMŮCKY A PŘÍSTROJE

Analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, Německo)

Centrifuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf AG, Německo)

Centrifuga Hettich Mikro 22R (Hettich, Německo)

Centrifugační zkumavky kónické (Nunc, Dánsko)

Dounce homogenizátor Kontes (Kimble Chase, USA)

Hematologický analyzátor Sysmex XS-1000i (Sysmex Europe GmbH, Německo)

Lednice s mrazákem (Gorenje, Slovinsko)

Mikrostříkačky Hamilton (Hamilton Company, USA)

Mikrotitrační destičky 96jamkové (Nunc, Dánsko)

Mikrozkumavky (Neptune, Mexiko)

Multimodální čtečka mikrotitračních destiček Spark (Tecan, Rakousko)

Odběrové zkumavky Vacuette K3EDTA (Greiner Bio-One, Rakousko)

Odsávací systém ISS (Oroboros Instruments, Rakousko)

Pipety Finnpiette (Thermo Fisher Scientific, USA)

pH-metr inoLab pH 720 + elektroda SenTix 81 (WTW, Česká republika)

Respirometr Oroboros O2k (Oroboros Instruments, Rakousko)

Vortex Heidolph Reax Top (Heidolph, USA)

Software

DatLab6 (Oroboros Instruments, Rakousko)

Microsoft Office – Word, Excel (Microsoft, USA)

SparkControl (Tecan, Rakousko)

4.2 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

4.2.1 Chemikálie pro izolaci PBMC

Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, USA)

Fosfátový pufr DPBS (GIBCO, USA)

Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA)

4.2.2 Chemikálie pro izolaci mitochondrií

Sacharóza (Mr = 342,3; Sigma-Aldrich, USA)

SEKT médium: 250 mmol/l sacharóza, 40 mmol/l KCl, 20 mmol/l Tris-Cl,
2 mmol/l EGTA; pH= 7,6

TRIS (Mr = 121,14; Sigma-Aldrich, USA)

4.2.3 Chemikálie pro měření buněčné respirace

Adenosindifosfát (Mr = 501,32; Sigma-Aldrich, USA)

Antimycin A ze *Streptomyces sp.* (Mr = 540; Sigma-Aldrich, USA)

Cytochrom c (Mr = 12,384; Sigma-Aldrich, USA)

Digitonin (Mr = 1229,31; Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol 96% (PENTA, Česká republika)

FCCP (Mr = 254,17; Sigma-Aldrich, USA)

Glutamát (Mr = 169,1; Sigma-Aldrich, USA)

K-médium: 80 mmol/l KCl, 5 mmol/l K₂HPO₄, 3 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l
EDTA; pH = 7,4

Malát (Mr = 134,1; Sigma-Aldrich, USA)

Médium MiRO5: 0,5 mmol/l EGTA, 3 mmol/l MgCl₂ · 6H₂O, 60 mmol/l
kyselina

laktobionová, 20 mmol/l taurin, 10 mmol/l KH₂PO₄,
20 mmol/ HEPES, 110 mmol/l D-sacharóza, 1 g/l BSA; pH = 7,1

Oligomycin ze *Streptomyces diastatochromogenes* (Mr = 800, Sigma-Aldrich, USA)

Pyruvát (Mr = 110,0; Sigma-Aldrich, USA)

Rotenon (Mr = 394,42; Sigma-Aldrich, USA)

RPMI 1640 bez L-glutaminu (Sigma-Aldrich, USA)

Sukcinát (Mr = 270,1; Sigma-Aldrich, USA)

4.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Adenosindifosfát

K navážce 501,3 mg ADP bylo přidáno 1,2 ml deionizované vody. Po neutralizaci pomocí KOH (5 mol/l) byl roztok byl doplněn vodou na konečný objem 2 ml. Výsledná koncentrace roztoku ADP je 500 mmol/l. Roztok byl skladován při -80 °C.

Digitonin

Zásobní roztok digitoninu o koncentraci 10 mg/ml byl připraven navážením 10 mg digitoninu a rozpuštěním v 1 ml dimethylsulfoxidu. Roztok byl skladován při teplotě -20 °C.

Fosfátový pufr DPBS

Ke 450 ml deionizované vody bylo přidáno 50 ml pufru DPBS. Takto připravený roztok byl okamžitě spotřebován nebo uchováván v lednici při 4 °C maximálně 2 týdny.

Glutamát

Zásobní roztok glutamátu (2 mol/l) byl připraven navážením 1,691 g kyseliny L-glutamové a rozpuštěním v 5 ml deionizované vody. Bylo upraveno pH roztokem KOH ($c = 5 \text{ mol/l}$) na hodnotu 7,0. Roztok byl skladován při teplotě -20 °C.

K-médium

Ve 300 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 1,789 g KCl, 0,086 g MgCl₂, 0,209 g K₂HPO₄ a 0,133 g EDTA. Takto připravený pufr byl následně upraven pomocí KOH (0,1 mol/l) na pH = 7,2 a skladován v lednici při 4 °C.

Malát

Zásobní roztok malátu o koncentraci 400 mmol/l byl připraven navážením 268,2 mg kyseliny L-jablečné a rozpuštěním v 5 ml deionizované vody. Roztok byl neutralizován roztokem KOH a uchováván při teplotě -20 °C.

MiRO5

Dle níže uvedené tabulky (*tab.4*) byly naváženy chemikálie a rozpuštěny v 1 l deionizované vody. Roztokem KOH bylo upraveno pH na hodnotu 7,1. Medium bylo skladováno při -20 °C.

Tabulka 4: Mitochondriální respirační médium MiRO5

Sloučenina	Mr	Navážka	Koncentrace
EGTA	380,4	0,190 g	0,5 mmol/l
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203,3	0,620 g	3 mmol/l
Laktobionová k.	358,3	120 ml 0,5 mol/l ⊖	60 mmol/l
Taurin	125,1	2,502 g	20 mmol/l
KH ₂ PO ₄	136,1	1,361 g	10 mmol/l
HEPES	238,3	4,77 g	20 mmol/l
D-sacharóza	342,3	37,65 g	110 mmol/l
BSA		1 g	1 g/l

Oligomycin

Zásobní roztok oligomycinu o koncentraci 5 mmol/l byl připraven rozpuštěním 4 mg oligomycinu v 1 ml 100% etanolu. Roztok byl uchováván při teplotě -20 °C.

Sacharóza

Roztok sacharózy o koncentraci 1,5 mol/l byl připraven rozpuštěním 2,56 g sacharózy v 5 ml Tris pufru.

SEKT médium

Dle tabulky (tab.5) bylo naváženo uvedené množství chemikálií a deionizovanou vodou doplněno na objem 10 ml. Pomocí KOH bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 7,6.

Tabulka 5: SEKT médium

Sloučenina	Mr	Navážka	Koncentrace
Sacharóza	342,3	0,8557 g	250 mmol/l
KCl	74,55	0,0298 g	40 mmol/l
TRIS	121,14	0,0316 g	20 mmol/l
EGTA	380,4	0,0076 g	2 mmol/l

Sukcinát

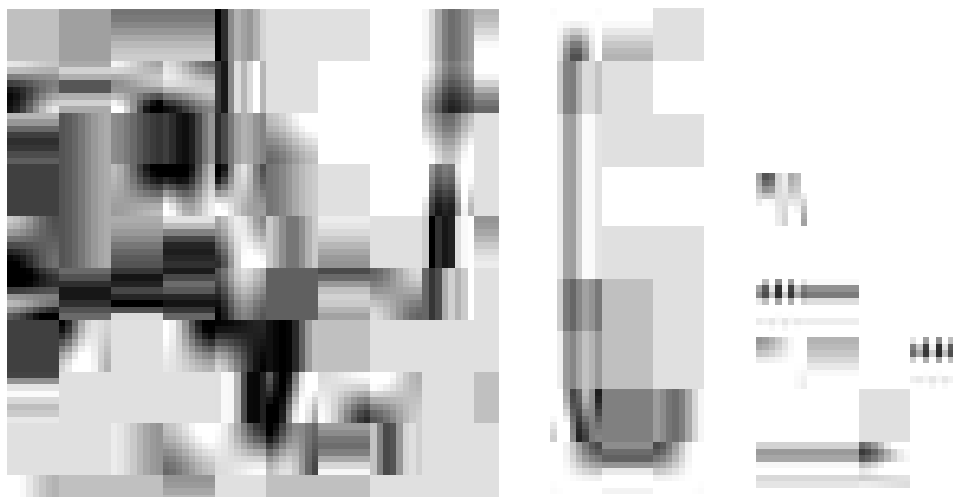
Zásobní roztok sukcinátu o koncentraci 1 mol/l byl připraven rozpuštěním 1,3505 g sukcinátu v 5 ml deionizované vody. Roztok byl skladován při teplotě -20 °C.

Tris pufr

Tris pufr o koncentraci 10 mmol/l byl připraven navážením 0,032 g TRIS a doplněním deionizovanou vodou na objem 20 ml. Pomocí KOH bylo upraveno pH pufru na hodnotu 7,6.

4.4 IZOLACE PBMC Z PERIFERNÍ KRVE

Pro izolaci a separaci buněk z biologického materiálu je možné využít gradientové separace buněk. Nesrážlivá krev navrstvená na separační médium Histopaque nebo Ficoll-Paque Plus se rozdělí centrifugací na hustotním gradientu. Dochází k tvorbě vrstev obsahujících různé typy buněk (*obr.13*). Spodní vrstva obsahuje erytrocyty a granulocyty, které byly agregovány, a proto sedimentují. Střední vrstvu tvoří separační médium a bezprostředně nad vrstvou, na rozhraní mezi plazmou a vrstvou separačního média, jsou mononukleární buňky společně s jinými pomalu sedimentujícími krevními částicemi s nízkou hustotou, například trombocyty. Vrchní vrstva je krevní plazma [31,152].



Obr.13: Gradientová separace buněk na základě hustoty buněk. Schéma převzato z [152]

Krev byla odebrána do odběrové zkumavky s K_3EDTA a uchovávána při laboratorní teplotě (RT). Do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml byly přidány 3 ml vytemperovaného separačního média (Histopaque nebo Ficoll-Paque Plus). Na separační médium byla navrstvena krev o objemu 5 ml. Takto připravené zkumavky byly poté centrifugovány (RT, 1000g, 10 min). Po stočení byla pipetováním odstraněna vrchní vrstva a poté opatrně odebrána vrstva PBMC a trombocytů, tzv. „*buffy coat*“.

Tento *buffy coat* byl odebrán ze všech zkumavek a přenesen do společné centrifugační zkumavky. Získaný objem *buffy coat* ze všech zkumavek byl přibližně 5 ml a k němu byl přidán pufr DPBS tak, aby celkový objem byl 25 ml. Zkumavka byla centrifugována (RT, 120g, 10 min).

Roztok nad peletou buněk byl odebrán, peleta resuspendována v optimálním objemu DPBS. Poté byl přidán DPBS na celkový objem 25 ml a zkumavka ještě jednou centrifugována za stejných podmínek. Po promytí byl odstraněn supernatant a peleta buněk byla opět opatrně resuspendována a naředěna v DPBS na celkový objem 500 μ l. Buňky byly poté spočítány na hematologickém analyzátoru Sysmex XS-1000 (Sysmex Europe GmbH, Německo) a byla měřena jejich respirace ve vysokoúčinném respirometru.

4.5 IZOLACE MITOCHONDRIÍ Z BUNĚČNÝCH KULTUR

Resuspendovaná peleta buněk (cca 100×10^6 bb) byla centrifugována (4 °C, 600g, 10 min). Po centrifugaci byl odtažen supernatant a peleta buněk byla resuspendována v roztoku 10 mmol/l Tris pufru a inhibitorů proteáz. Poté byly buňky homogenizovány Dounce homogenizátorem. Následně byl přidán roztok sacharózy (1,5 mol/l v Tris pufru) a rozrušené buňky byly centrifugovány (4 °C, 600g, 10 min). Poté byl odebrán supernatant obsahující mitochondrie a opět centrifugován (4 °C, 10000g, 10 min). Po centrifugaci byl odebrán supernatant a k mitochondriálnímu peletu bylo přidáno 500 μ l SEKT média. Peleta byla resuspendována a centrifugována (4 °C, 10000g, 10 min). 300-350 μ l supernatantu bylo odebráno a ve zbylém množství (cca 150-200 μ l) byla peleta mitochondrií resuspendována. Všechny roztoky, média, homogenizátor i buňky byly po celou dobu izolace uchovávány na ledu.

4.6 MĚŘENÍ BUNĚČNÉ RESPIRACE *in vitro*

Vysokoučinný respirometr Oroboros O2k (Oroboros Instruments, Rakousko) je systém pro výzkum mitochondrií a buněčné respirace. Systém kombinuje měření respirace, tvorby ROS, potenciálu mitochondriální membrány, produkce ATP, Ca^{2+} , nebo pH. Principem vysokoučinné respirometrie je velmi citlivá a kvantitativní detekce koncentrace kyslíku a spotřeby kyslíku v uzavřené komoře respirometru [153].

Polarografický kyslíkový senzor je založen na principu Clarkovy elektrody. Je tvořen zlatou katodou, argentschloridovou anodou a zásobníkem elektrolytu KCl, který je oddělený od vzorku membránou. Získaný amperometrický signál se převádí na napětí [153].

V uzavřené komoře respirometru, která je maximálně izolována a chráněna proti výměně kyslíku ze vzduchu, způsobují reakce spotřebovávající kyslík, že koncentrace kyslíku klesá s časem. Konstantní pokles koncentrace kyslíku s časem v uzavřené komoře je výsledkem konstantní rychlosti chemické reakce. Pak je míra spotřeby kyslíku na jednotku objemu úměrná záporné derivaci závislosti koncentrace kyslíku na čase. Koncentrace kyslíku je v grafech na levé ose Y (modrá křivka) a míra spotřeby kyslíku je v grafech na pravé ose Y (červená křivka) (*obr.14*). Spotřeba kyslíku závisí na mnoha faktorech, včetně velikosti buněk, hustotě a stavu mitochondrií [37].



Obr.14: Typický záznam buněčné respirace v komoře respirometru. Převzato z [37]. (PGM = pyruvát, glutamát, malát; D = ADP; c = cytochrom c; S = sukcinát; U = rozpojovač; Rot = rotenon; Azd = azid sodný)

Oxidativní fosforylaci je možné analyzovat na intaktních buňkách i v izolovaných mitochondriích, homogenátech nebo permeabilizovaných buňkách. Ovšem mitochondrie, homogenáty i permeabilizované buňky vyžadují současnou aplikaci substrátů (glutamát, malát, pyruvát, sukcinát). Nutno si uvědomit, že tok elektronů z komplexu I a komplexu II se sbíhá u koenzymu Q a má tedy aditivní efekt na respiraci. Proto je vhodné pro měření *ex vivo* zásobovat substrátem jak komplex I (pyruvát, malát, glutamát), tak i komplex II (sukcinát) [37].

Při analýze oxidativní fosforylace se pracuje i s přidáním cytochromu c, který tak poskytuje kontrolu kvality izolovaných mitochondrií nebo permeabilizovaných tkání a buněk. Uvolnění cytochromu c, a to buď za patofyziologických podmínek buňky nebo v důsledku přípravy vzorku, může omezit úroveň dýchání [37].

Při analýze mitochondriální respirace a oxidativní fosforylace mohou být použity inhibitory jednotlivých komplexů, které jsou propustné přes buňky a mitochondriální membrány. Oligomycin, inhibitor ATP-syntázy, je v současné době nejčastěji používaným inhibitorem indukujícím stav LEAK, tj. stav, při kterém nedochází k oxidativní fosforylaci ADP na ATP, přičemž protony hnané respiračními komplexy stále procházejí z matrix do mezimembránového prostoru [37].

Rozpojení dýchání se indukuje aplikací zavedených rozpojovačů (FCCP, CCCP) s cílem vyhodnocení maximální respirační kapacity elektronovým transportním systémem [37].

4.6.1 Optimalizace dávky digitoninu

Koncentrace digitoninu potřebná pro permeabilizaci buněčné membrány musí být optimalizována pro každý druh buněk a koncentraci buněk v komoře respirometru. Za tímto účelem byly do komory zavedeny buňky v požadovaných denzitách a byly použity níže uvedené protokoly.

1) Respirometrický test optimální koncentrace digitoninu (převzato z [154])

Buňky byly inkubovány v uzavřené komoře v respiračním médiu K-médium a bylo u nich změřeno dýchání ROUTINE. Po cca 10 minutách bylo přidáno 20 μ l sukcinátu a 10 μ l ADP. Následně byl přidán 1 μ l rotenonu. Po inhibici komplexu I byl pomocí

mikrostříkačky postupně titrován digitonin (po 0,5 μl) a byla sledována postupná stimulace dýchání díky zvýšení dostupnosti sukcinátu a digitoninu pro mitochondrie. Titrace byla opakována, dokud nebylo dosaženo maximální úrovně respirace.

2) Optimalizace koncentrace digitoninu pomocí substrátů a cytochromu c

Buňky byly inkubovány v uzavřené komoře respirometru v respiračním médiu MiR05 a bylo u nich změřeno dýchání ROUTINE. Po cca 10 minutách bylo přidáno po 10 μl glutamátu, malátu a ADP. Poté byl po 0,4 μl titrován digitonin. Poté, co byl pozorován nárůst respirace, byla celistvost vnější mitochondriální membrány zkontrolována přidávkem 5 μl cytochromu c.

4.6.2 Protokol měření respirace – mitochondrie a permeabilizované buňky

Tento protokol slouží ke zjištění respirace závislé na komplexu I a používá se při studiu respirace izolovaných mitochondrií, tkáňových homogenátů a permeabilizovaných buněk. Tyto biologické materiály vyžadují intracelulární prostředí, a proto jsou do komor respirometru používána média bohatá na draselné ionty, například K-médium nebo MiR05. Do komor jsou postupně titrovány substráty, rozpojovače a inhibitory a sleduje se závislost přídavek jednotlivých látek na respiraci.

Námi použitý protokol (*tab.6*) byl vytvořen s úpravami dle protokolu doktorky Doerrierové [154].

Tabulka 6: Protokol pro permeabilizované buňky

Přídavek	Zkr.	Titrace	Koncentrace ve 2ml komoře respirometru
1.	Buňky	BB (v závislosti na druhu bb)	$3-10 \times 10^6$ bb
2.	Digitonin	Dig	0,3 - 5 μl / 5×10^6 bb (v závislosti na druhu bb)
3.	Glutamát	G	10 μl 10 mmol/l
4.	Malát	M	10 μl 2 mmol/l
5.	ADP	ADP	10 μl 2,5 mmol/l
6.	Cytochrom c	Cyt	5 μl 10 $\mu\text{mol/l}$
7.	Rozpojovač	FCCP	$\Delta 0,3$ μl $\Delta 0,15$ $\mu\text{mol/l}$
8.	Rotenon	ROT	1 μl 0,5 $\mu\text{mol/l}$
9.	Sukcinát	S	20 μl 10 mmol/l
10.	Antimycin A	AMA	1 μl 2,5 $\mu\text{mol/l}$

4.6.3 Protokol pro intaktní buňky

Respirace intaktních buněk byla analyzována pomocí protokolu kontroly spřažení (angl.: *coupling control protocol*) [155]. Tento protokol (*tab.7*) trvá přibližně 30 minut, počínaje 10minutovou periodou buněčné respirace ROUTINE, která nás informuje o aerobní metabolické aktivitě za běžných kultivačních podmínek, tzn. s přítomnými substráty v kultivačním médiu. Sledují se tři titrační kroky: LEAK, ETS, a ROX [155]. Protokol slouží pro zjištění maximální a minimální míry respirace.

Všechny inhibitory a rozpojovače použité v tomto protokolu snadno přechází přes intaktní plazmatickou membránu a nevyžadují proto permeabilizaci buněčné membrány [153].

Tabulka 7: Protokol pro intaktní buňky

Přídavek	Zkr.	Titrace	Koncentrace ve 2ml komoře respirometru
1.	Buňky	BB (v závislosti na druhu bb)	$3-10 \times 10^6$ bb
2.	Oligomycin	OMY	1 μ l
3.	Rozpojovač	FCCP	$\Delta 0,3$ μ l
4.	Rotenon	ROT	1 μ l
5.	Antimycin A	AMA	1 μ l

4.7 MĚŘENÍ RESPIRACE PO OVLIVNĚNÍ KADMIEM

4.7.1 Buňky inkubované s CdCl₂

Byly využity buněčné linie Jurkat a HK-2. Buňky byly inkubovány se 100 μmol/l CdCl₂ po dobu 2 a 4 hod. Poté byly promyty a dané množství buněk bylo nadávkováno do komory B respirometru. Do komory A bylo vloženo stejné množství kontrolních neovlivněných buněk. Jurkat buňky byly přidávány v množství 5×10⁶ buněk, HK-2 buňky v množství 10×10⁶ buněk. Pro sledování změn buněčné respirace u buněk ovlivněných CdCl₂ byl proveden protokol pro permeabilizované buňky i protokol kontroly spřažení. Křivky ze souběžné analýzy kontrol a CdCl₂ ovlivněných buněk byly vzájemně porovnávány. Také byla určena závislost změny respirace na době kultivace buněk s těžkým kovem.

4.7.2 Buňky přímo ovlivněné CdCl₂ v komoře respirometru

Pro sledování vlivu přímého přídatku CdCl₂ na buněčnou respiraci byl použit protokol pro permeabilizované buňky. Jako respirační médium bylo použito K-médium. Buňky Jurkat (5×10⁶ buněk) a A549 (5×10⁶ buněk) byly permeabilizovány optimálním přídatkem digitoninu, poté byly do komory přidány substráty glutamát a malát (po 10 μl) a 10 μl ADP. Šetrná digitonizace byla ověřena přídatkem 5 μl cytochromu c. Následně bylo do komory B respirometru přidáno 10 μl roztoku CdCl₂. Výsledná koncentrace CdCl₂ v komoře byla 100 μmol/l. V komoře A přídatek CdCl₂ nebyl proveden. Poté, tj. po přídatku CdCl₂ do komory B, byly ponechány buňky kontrolní i buňky s CdCl₂ až po dobu 2 hod bez přídatku jakékoliv další chemikálie. Po dvou hodinách byl dokončen protokol ve standardním pořadí: FCCP, rotenon, sukcinát a antimycin A. Křivky ze souběžné analýzy přímého účinku CdCl₂ na buňky vs. kontroly byly vzájemně porovnávány.

4.7.3 WST-1 test

Měření viability buněk je jedním z nejzákladnějších testů, kterým se hodnotí funkční stav zdravých buněk ve vzorku. Velmi často jsou pro toto stanovení využívány kolorimetrické metody. Jednou z nich je právě WST-1 test, jehož principem je redukce WST-1 činidla buněčnými dehydrogenázami na vysoce rozpustný formazan [156].

Do 96jamkové mikrotitrační destičky bylo nasazeno po 60 tis. buňkách Jurkat inkubovaných v médiu RPMI. Polovina buněk byla ovlivněna CdCl_2 a druhá polovina sloužila jako kontroly. Koncentrace CdCl_2 byla 50 a 100 $\mu\text{mol/l}$. Buňky byly proměřovány v čase 1, 2, 3, 4 hod spektrofotometricky na přístroji Spark (Tecan, Rakousko) při vlnové délce 440 nm. Ve stanovený čas bylo do jamek k buňkám přidáno WST-1 činidlo o objemu 20 μl . Ihned a po 1 hodině byla měřena absorbance ve všech použitých jamkách s buňkami. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako průměr \pm SD a byly porovnány se změnou absorbance kontrolních buněk vyjádřenou jako 100 %.

5. VÝSLEDKY

5.1 PŘÍPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

5.1.1 Izolace PBMC

Příprava izolace PBMC z periferní krve probíhala v souladu s postupem popsaným v experimentální části. Po separaci krve na hustotním gradientu izolačního média Histopaque byly erythrocyty a většina neutrofilů na dně zkumavky. *Buffy coat* obsahující lymfocyty a monocyty byl sbírán pro další použití. S ním však bylo sbíráno i množství trombocytů obsažených v plazmě, kdy cílem bylo snížit jejich počet pro měření respirace na minimum. Po prvním promývání v DPBS bylo odstraněno 34 % trombocytů. Během promývání došlo také ale ke ztrátám leukocytů. Těch bylo v supernatantu při promývání obsaženo v průměru 1 %. Lze ovšem předpokládat, že se jednalo hlavně o neutrofilní granulocyty. Po druhém promývání bylo odstraněno 5 % trombocytů a ztráty leukocytů nebyly žádné, nebo byly zanedbatelné. V tabulce 8 jsou uvedeny hodnoty jednotlivých parametrů v průběhu izolace PBMC. Z 12 ml plné krve bylo typicky získáváno 0,5 ml PBMC frakce obsahující $44,5 \times 10^6$ buněk, neboli výtěžek izolace PBMC byl 48 %.

Tabulka 8: Počty PBMC v jednotlivých krocích a jejich izolace

	Plná krev (počet buněk)	Promývání (počet buněk)	PBMC frakce (počet buněk)
ERY	$5,93 \times 10^{12}/l$	$0,00 \times 10^{12}/l$	$0,00 \times 10^{12}/l$
LEU	$10,24 \times 10^9/l$	$0,07 \times 10^9/l$	$1,86 \times 10^9/l$
%LYMF	27,1 %	---	71 %
%MONO	9,2 %	---	24,7 %
%NEU	60,6 %	---	4,3 %
%EO+BASO	3,1 %	---	0 %
PBMC	$3,72 \times 10^9/l$	---	$1,78 \times 10^9/l$
PLT	$251 \times 10^9/l$	$88 \times 10^9/l$	$2 \times 10^9/l$
PLT/PBMC	67,5	---	1,1

5.1.2 Izolace mitochondrií

Mitochondrie byly izolovány ze 150 milionů buněk A549. Koncentrace proteinu získaného izolací činila 2,5 mg/ml. Do komor respirometru bylo dáváno 20 µl izolátu, výsledné množství proteinu v komoře respirometru bylo tedy 50 µg. Po přidání mitochondrií byly přidány také substráty glutamát, malát a sukcinát, ADP a cytochrom c.

5.1.3 Optimalizace permeabilizace buněk Jurkat

Nejprve byla sledována rutinní respirace v intaktních buňkách. V tomto stavu buňky dýchají endogenními substráty, protože médium v komoře (K-médium) neobsahuje žádné vnější substráty. Následně přidány sukcinát a ADP nestimulovaly dýchání intaktních buněk, protože cytoplazmatická membrána nebyla porušena. Po přidání rotenonu byl inhibován komplex I. V následujících krocích byl v dávkách 0,5 µl přidáván digitonin, aby byla postupně permeabilizována membrána buněk pro dosažení maximální respirace buněk (tab.9). Tato optimální koncentrace digitoninu byla stanovena při dávce 3,5 µl digitoninu o koncentraci 1 mg/ml, kdy ještě mitochondriální membrány zůstávají neporušené.

Tabulka 9: Zjištění optimální koncentrace digitoninu. Buňky Jurkat (5×10^6 bb; K-médium). (BB = buňky; S = sukcinát; ROT = rotenon; Cyt = cytochrom c)

	BB	S	ADP	ROT	Digitonin (µl)										Cyt
					0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0			
Respirace (pmol/(s×Mill))	15,4	13,4	14,3	3,6	3,4	4,5	7,5	8,4	7,0	6,8	8,6	4,2	4,5		

Při použití druhé, referenční metody pro stanovení optimální dávky digitoninu nebyl inhibován žádný z komplexů a byla sledována respirace všech komplexů. V prvním kroku bylo do komory respirometru s K-médiem dávkováno 5 milionů buněk Jurkat. Následně byly přidány substráty glutamát a malát a ADP. Aby byla optimální dávka určena co nejpřesněji, byl přidáván digitonin o koncentraci 1 mg/ml nejprve po 0,8 μ l a následně po 0,4 μ l. Byl sledován pomalý nárůst respirace. Maximální respirace bylo dosaženo při 3,4 μ l digitoninu v komoře respirometru (*graf 1*). Oproti rutinní respiraci intaktních buněk činil nárůst respirace buněk permeabilizovaných o 16 %. Celistvost mitochondriální membrány byla ověřena přidáním cytochromu c. Tímto experimentem bylo tedy potvrzeno, že dávka digitoninu 3,5 μ l je pro permeabilizaci buněčné membrány optimální, a proto byla využita v dalších experimentech studujících respiraci.



Graf 1: Optimalizace koncentrace digitoninu pomocí substrátů a cytochromu c. Buňky Jurkat (5×10^6 bb; K-médium). (BB = buňky; GM = glutamát a malát; Dig = digitonin; Cyt = cytochrom c)

5.2 STUDIUM VLIVU KADMIA NA MITOCHONDRIÁLNÍ RESPIRACI

5.2.1 Toxicita CdCl_2 – buňky Jurkat

Buňky Jurkat byly inkubovány se $100 \mu\text{mol/l}$ CdCl_2 po dobu 2 a 4 hod. Byla u nich sledována rutinní, maximální a minimální respirace a reziduální spotřeba kyslíku (graf 2 a 3) v médiu RPMI v komoře respirometru Oroboros O2k. Záznamy respirace jsou získány ze software Datlab a udávají respiraci buněk kontrolních (červená křivka) a buněk ovlivněných CdCl_2 (zelená křivka). Hodnoty na pravé ose Y jsou vztaženy na milion buněk a jejich jednotka je $\text{pmol}/(\text{s} \times \text{Mill})$.



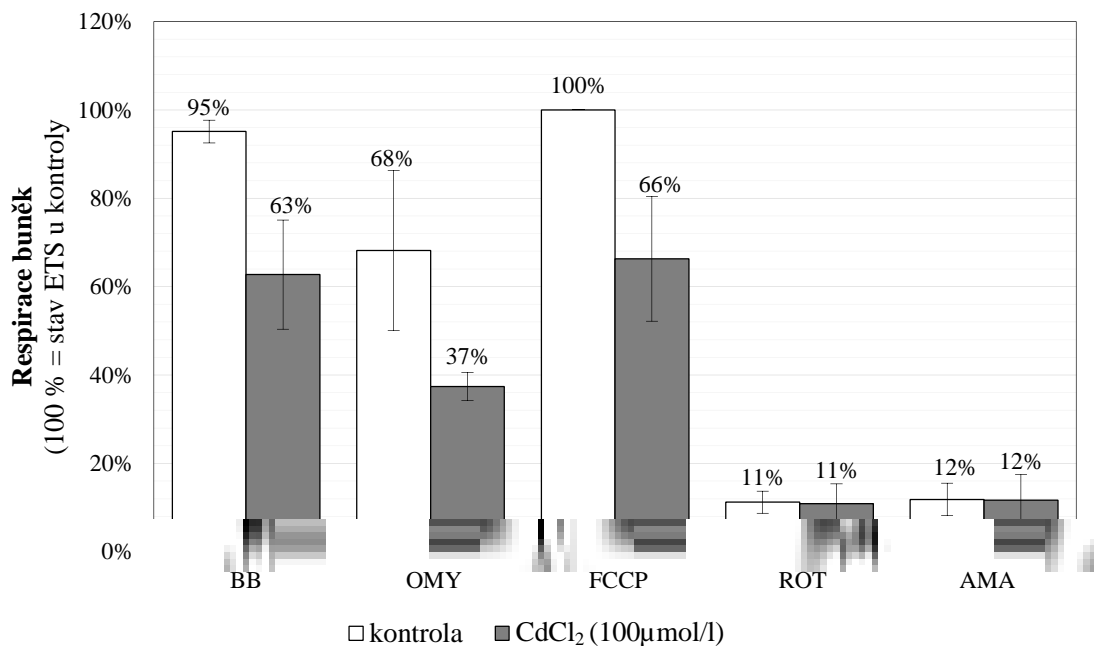
Graf 2: Vliv kadmia na respiraci buněk Jurkat – protokol kontroly spřažení. Buňky Jurkat (5×10^6 bb; RPMI médium); CdCl_2 ($100 \mu\text{mol/l}$, 2 hod). Kontrolní buňky = červená křivka; buňky s CdCl_2 = zelená křivka. (BB = buňky Jurkat; OMY = oligomycin; FCCP = rozpojovač; ROT = rotenon; AMA = antimycin A)



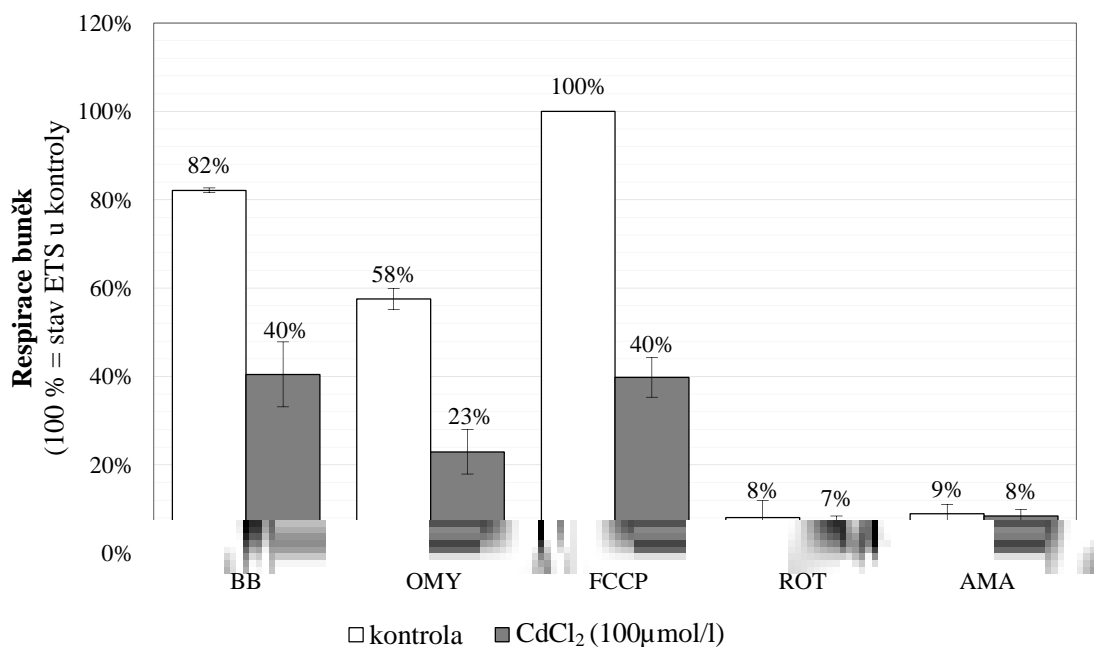
Graf 3: Vliv kadmia na respiraci buněk Jurkat – protokol kontroly spřažení. Buňky Jurkat (5×10^6 bb; RPMI médium); CdCl_2 (100 $\mu\text{mol/l}$, 4 hod). Kontrolní buňky = červená křivka; buňky s CdCl_2 = zelená křivka. (BB = buňky Jurkat; OMY = oligomycin; FCCP = rozpojovač; ROT = rotenon; AMA = antimycin A)

Do komory B respirometru bylo dávkováno 5×10^6 buněk Jurkat ovlivněných 2 hod 100 $\mu\text{mol/l}$ CdCl_2 . Do komory A bylo dávkováno stejné množství kontrolních buněk Jurkat. Respirace u buněk ovlivněných 100 $\mu\text{mol/l}$ CdCl_2 byla po celou dobu trvání protokolu nižší v porovnání s kontrolními buňkami (graf 4). Respirace buněk ovlivněných poklesla ve stavech ROUTINE, LEAK a ETS na 67 % v porovnání s kontrolami. K vyrovnání křivek docházelo až po inhibici komplexu I a komplexu III, kdy byla měřena reziduální spotřeba kyslíku. Rozdíl mezi minimální a maximální respirací kontrolních buněk byl 32 %. U buněk ovlivněných CdCl_2 , pokud je jejich stav ETS udán jako 100 %, je rozdíl mezi minimální a maximální respirací 42 %.

U Jurkat buněk ovlivněných 100 $\mu\text{mol/l}$ CdCl_2 po dobu 4 hod byl pokles respirace ještě výraznější (graf 5). Respirace ROUTINE poklesla u buněk s CdCl_2 na polovinu ve srovnání s respirací kontrolních buněk. Po přidání rozpojovače FCCP, byl rozdíl respirace kontrolních a ovlivněných buněk 60 %. Rozdíl mezi minimální a maximální respirací u kontrol činil 42 % a u buněk s CdCl_2 byl tento rozdíl také 42 % (vztaženo ke stavu ETS ovlivněných buněk). Po přidání rotenonu a antimycinu A byla reziduální spotřeba kyslíku v komoře respirometru 8 % a došlo také k vyrovnání hodnot obou křivek.



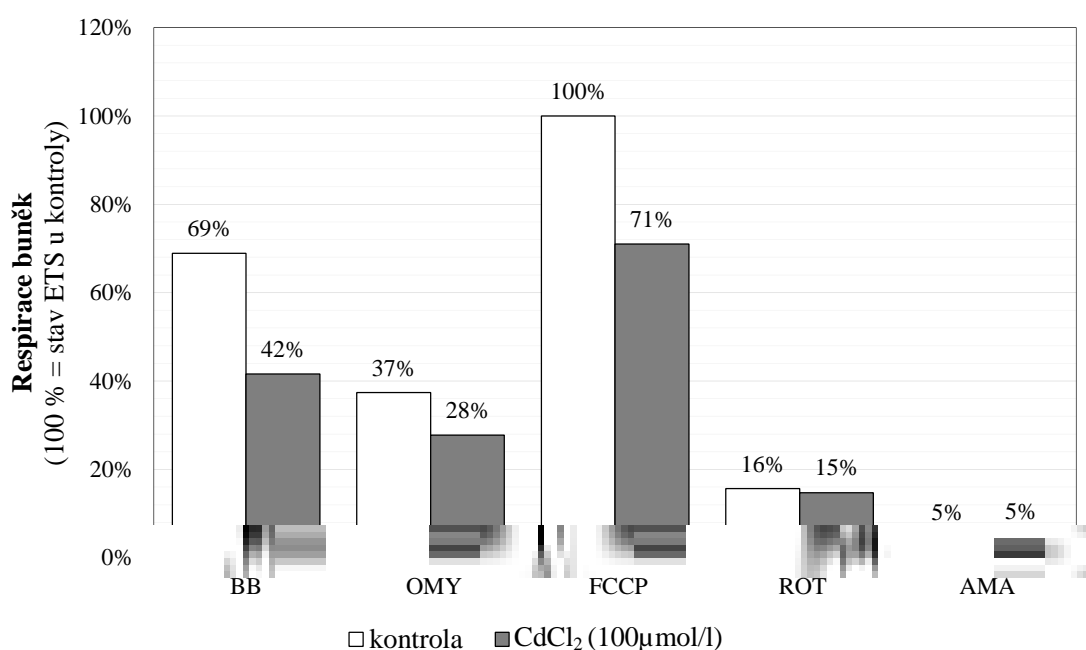
Graf 4: Vliv kadmia na respiraci buněk Jurkat – protokol kontroly spřažení. Buňky Jurkat (5×10^6 bb, RPMI médium), CdCl₂ (100 μmol/l, 2 hod). Výsledky jsou vyjádřeny v procentech jako průměr ± SD (n = 3). Hodnota 100 % je vztažena na stav ETS kontrol, kdy je dosaženo maximální respirace. (BB = buňky; OMY = oligomycin; FCCP = rozpojovač; ROT = rotenon; AMA = antimycin A)



Graf 5: Vliv kadmia na respiraci buněk Jurkat – protokol kontroly spřažení. Buňky Jurkat (5×10^6 bb, RPMI médium), CdCl₂ (100 μmol/l, 4 hod). Výsledky jsou vyjádřeny v procentech jako průměr ± SD (n = 3). Hodnota 100 % je vztažena na stav ETS kontrol, kdy je dosaženo maximální respirace. (BB = buňky; OMY = oligomycin; FCCP = rozpojovač; ROT = rotenon; AMA = antimycin A)

5.2.2 Toxicita CdCl₂ – PBMC

Stejně jako u buněk Jurkat podobný efekt přidání CdCl₂ na respiraci byl nalezen také u PBMC. Ihned po izolaci z krve byla frakce PBMC rozdělena na poloviny, z nichž do jedné zkumavky s buňkami byl přidán CdCl₂ (výsledná koncentrace 100 μmol/l) a druhá zkumavka bez přídavku CdCl₂ sloužila jako buňky kontrolní. Buňky byly ponechány za RT a po dvou hodinách byla proměřena respirace buněk (graf 6). Respirace buněk inkubovaných s CdCl₂ byla snížena ve stavech ROUTINE, LEAK a ETS. Rozdíl v maximální respiraci buněk kontrolních a buněk ovlivněných byl 29 %.



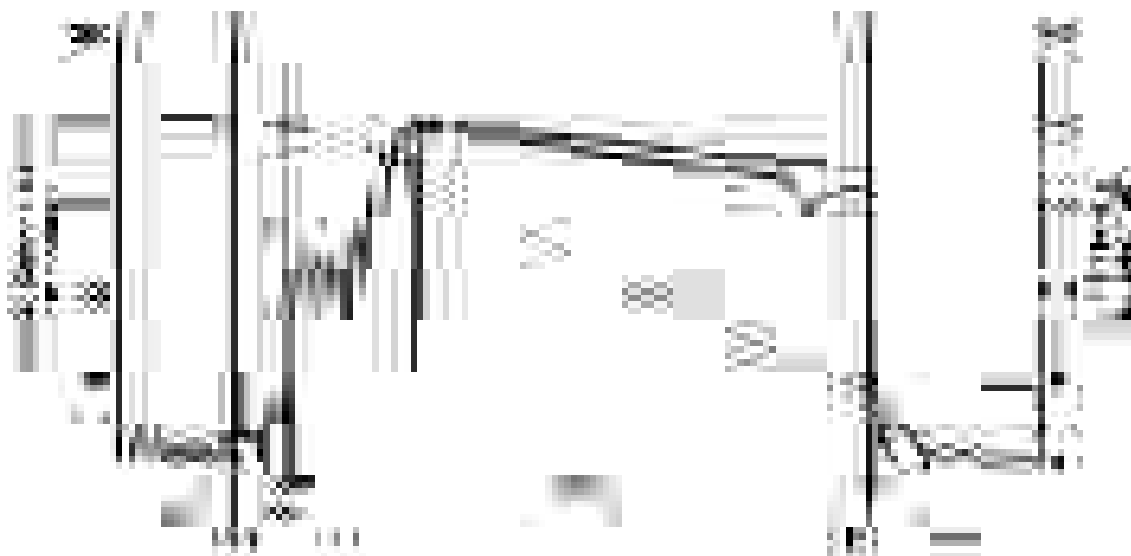
Graf 6: Vliv kadmia na respiraci PBMC – protokol kontroly spřažení. PBMC (5×10^6 bb, RPMI médium), CdCl₂ (100 μmol/l, 2 hod). Hodnota 100 % je vztažena na stav ETS kontrol, kdy je dosaženo maximální respirace. (BB = buňky; OMY = oligomycin; FCCP = rozpojovač; ROT = rotenon; AMA = antimycin A)

5.2.3 Toxicita CdCl₂ – testování přímého přidavku CdCl₂ k buňkám

Do komor respirometru bylo dávkováno respirační médium pro permeabilizované buňky a mitochondrie (MiRO5, K-médium). Po přidání mitochondrií nebo buněk, perforaci jejich cytoplazmatické membrány optimální dávkou digitoninu (v případě buněk) a po přidání substrátů, ADP a cytochromu c, byla sledována respirace závislá na komplexu I a potom bylo do jedné z komor dávkováno 10 µl roztoku CdCl₂ (20 mmol/l). Výsledná koncentrace CdCl₂ v komoře byla tedy 100 µmol/l. Prostředí, ve kterém se buňky v komoře respirometru nacházely nebylo pro jejich existenci optimální. Jejich kondice byla navíc zhoršena narušenou membránou, a proto docházelo ke snížení respirace. Nicméně i za těchto podmínek nebyl prokázán vliv přímého přidavku kadmia na buňky i přesto, že buňky byly permeabilizovány, a proto se Cd²⁺ ionty mohly snadno dostat až k respiračním komplexům. Byla sledována 30-120minutová inkubace u mitochondrií a různých druhů buněk (*tab.10*). Za těchto podmínek se vždy respirační křivka buněk kontrolních a buněk inkubovaných s CdCl₂ překrývala (*graf 7*), a to i u izolovaných mitochondrií (*graf 8*), neboli ani u jednoho experimentálního uspořádání nebyla nalezena žádná změna respirace vlivem přímého přidavku CdCl₂.



Graf 7: Přímý přídavek kadmia k permeabilizovaným buňkám. Buňky Jurkat (5×10^6 bb, K-médium). (BB = buňky; Dig = digitonin; GM = glutamát a malát; Cyt = cytochrom c; med = médium; Cd = CdCl₂ (100 µmol/l); FCCP = rozpojovač; ROT = rotenon; S = sukcinát; AMA = antimycin A)



Graf 8: Přímý přídavek kadmia k izolovaným mitochondriím. Mitochondrie (50 μg ; K-médium). (MITO = mitochondrie; GM = glutamát a malát; D = ADP; c = cytochrom c; S = sukcinát; Cd = CdCl_2 (100 $\mu\text{mol/l}$); ROT = rotenon; AMA = antimycin A)

Tabulka 10: Respirace permeabilizovaných buněk a mitochondrií v okamžiku přidání CdCl_2 a po 30 min.

Materiál	Čas (min)	Respirace – kontroly (pmol/(s×Mill))	Respirace – CdCl_2 (pmol/(s×Mill))
A549	0	41,0	41,6
	30	39,1	38,1
PBMC	0	4,72	4,71
	30	2,77	2,78
Jurkat	0	14,5	15,0
	30	10,3	10,7
Mitochondrie	0	31,6	31,5
	30	29,8	28,4

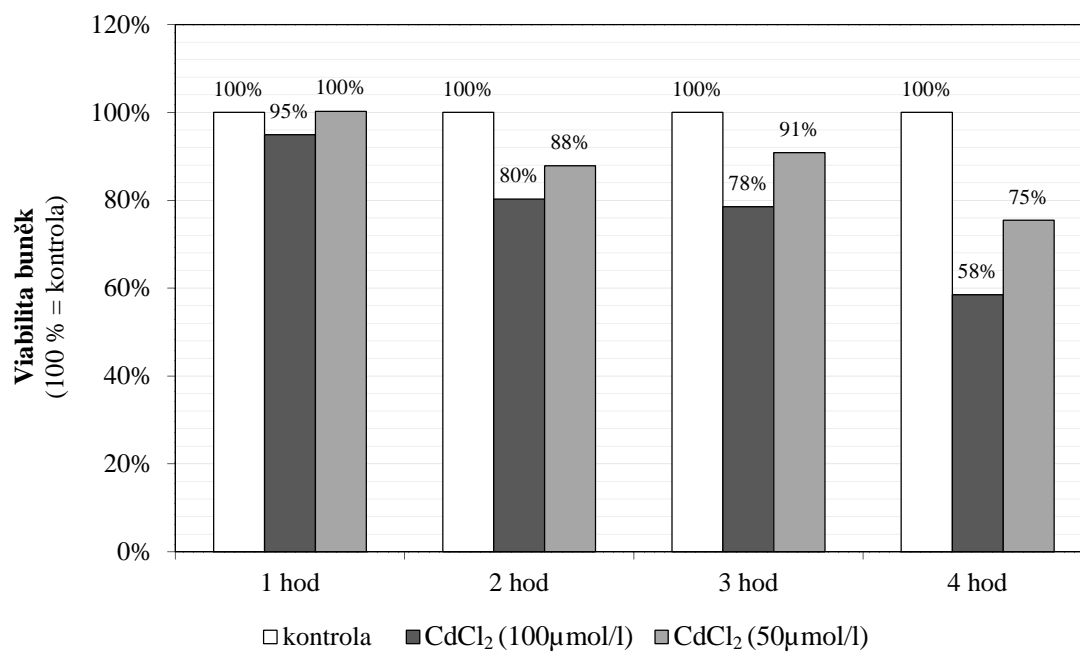
V rámci testování vlivu přímého přídatku CdCl_2 na permeabilizované buňky bylo také měněno pořadí dávkovaných roztoků v respiračním protokolu. Zatímco v předchozí tabulce 10 bylo $10 \mu\text{l}$ CdCl_2 (20 mmol/l) přidáváno po cytochromu c, a po půlhodinové inkubaci byl k buňkám přidán ještě rozpojovač FCCP, inhibitor rotenon, substrát sukcinát a inhibitor antimycin A, v tabulce 11 uvedené níže bylo $10 \mu\text{l}$ CdCl_2 přidáno až po rozpojení dýchacího řetězce. Proto je respirace buněk Jurkat v čase $t = 0$ min v tabulce 11 vyšší než v tabulce 10. Ani tato změna však neukázala rozdíl v respiraci buněk kontrolních a buněk s Cd^{2+} . Neboli opět vliv přímého přídatku kadmia na respiraci prokázán nebyl.

Tabulka 11: Respirace permeabilizovaných buněk s rozpojeným dýchacím řetězcem v okamžiku přidání CdCl_2 do komory respirometru až po 2 hod.

Materiál	Čas (min)	Respirace – kontroly (pmol/(s×Mill))	Respirace – CdCl_2 (pmol/(s×Mill))
Jurkat	0	41,0	41,6
	30	39,1	38,1
	60	8,97	8,17
	120	6,75	5,82

5.2.4 WST-1 test buněk Jurkat

Toxický vliv CdCl_2 na buňky Jurkat byl hodnocen také testováním viability, tedy měřením aktivity intracelulárních dehydrogenáz pomocí testu WST-1. Vliv kadmnatých iontů byl posuzován v závislosti na koncentraci CdCl_2 a na době inkubace. Buňky Jurkat byly inkubovány s CdCl_2 o koncentraci 50 a $100 \mu\text{mol/l}$. Viabilita buněk byla proměřena po inkubaci s CdCl_2 po 1, 2, 3 a 4 hod. Po jedné hodině nedošlo k žádné významné redukci životaschopnosti, zatímco po delší době inkubace bylo v buňkách zjištěno postupné snižování signálu ve srovnání s kontrolními buňkami (graf 9). Po 4 hod inkubace buněk se $100 \mu\text{mol/l}$ CdCl_2 se aktivita intracelulárních dehydrogenáz snížila o 42 % oproti kontrole.



Graf 9: Testování viability buněk po ovlivnění CdCl₂. Buňky Jurkat, WST-1 test (440 nm).

6. DISKUZE

Těžké kovy, jako je kadmium (Cd^{2+}), rtuť (Hg^{2+}) a měď (Cu^{2+}), jsou široce rozšířené a zároveň vysoce toxické látky s mutagenními, karcinogenními a teratogenními účinky. Mají vysokou afinitu k thiolovým skupinám a z toho vyplývá i jejich tendence hromadit se v orgánech a tkáních. Těžké kovy také stimulují tvorbu ROS, se kterými je spjata mnoho dopadů na buněčnou funkci. Kromě toho je charakteristickým znakem Cd^{2+} jeho schopnost působit také jako antagonist Ca^{2+} pravděpodobně v důsledku extrémní blízkosti poloměrů iontů Cd^{2+} (0,097 nm) a Ca^{2+} (0,099 nm). Ačkoli je nyní dobře známo, že mitochondrie hrají důležitou roli v cytotoxicitě těžkých kovů, mechanismus poruchy mitochondriální funkce nebyl dosud zcela objasněn [157,158].

Studie z roku 2008 se zabývala dopadem hepatotoxických vlastností kadmia, rtuti a mědi na mitochondriální transportní řetězec [159]. Pokusy byly prováděny na buňkách krysího hepatomu AS-30D. Po ovlivnění buněk ionty Cd^{2+} o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ docházelo po třech hodinách inkubace k poklesu respirace o přibližně 30 %. Určitý inhibiční účinek byl pozorován již při koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. Další zvýšení koncentrace Cd^{2+} na 500 $\mu\text{mol/l}$ inhibiční účinek ještě zvýšilo. Tato studie se věnovala také iontům Hg^{2+} a Cu^{2+} . Bylo zjištěno, že toxicitu těchto tří kovových iontů lze seřadit od nejtoxičtějšího (Hg^{2+}) po nejméně toxický (Cu^{2+}) [159].

Tatáž vědecká skupina došla ke stejnému závěru v roce 2012, kdy se zabývala toxicitou těžkých kovů u mitochondrií buněk nervového systému [158], tj. u buněčné linie PC12. Bylo měřeno rutinní dýchání, stav LEAK a stav ETS v přítomnosti různých koncentrací těžkých kovů (10, 50, 100, 500 $\mu\text{mol/l}$) po době expozice 3, 5, 24 a 48 hodin. CdCl_2 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ již po 3 hod inkubace vyvolal inhibici buněčné respirace. Úplné a nevratné inhibice elektronového transportního řetězce bylo dosaženo po 3 hodinách inkubace buněk s 50 $\mu\text{mol/l}$ HgCl_2 , nebo 500 $\mu\text{mol/l}$ CdCl_2 a po 24 hodinách ovlivnění 100 $\mu\text{mol/l}$ Cd^{2+} , zatímco po 48 hodinách inkubace buněk s 500 $\mu\text{mol/l}$ CuCl_2 došlo ke snížení respirace pouze na 50 %. Tento jev je vysvětlován tím, že Cu patří mezi biogenní prvky, zatímco Cd a Hg jsou prvky neesenciální [158].

Pokud bychom měli porovnat naše získané hodnoty s hodnotami z této studie, tak naše výsledky po 2hodinové inkubaci buněk se 100 $\mu\text{mol/l}$ CdCl_2 poukazují na pokles respirace ve stavu ETS na 66 %, po 4 hodinách respirace klesá až na 40 %.

Ve studii, se kterou svá data porovnáváme [158], získali srovnatelné hodnoty po 3 a 5 hodinách inkubace se 100 $\mu\text{mol/l}$ CdCl_2 . Po třech hodinách poklesla respirace buněk na 35 % a po 5 hodinách až na 21 %. Je třeba ale uvést velmi důležitý faktor, a to použití odlišných buněčných linií.

Wang a kol. v roce 2004 zkoumali efekt CdCl_2 (40 $\mu\text{mol/l}$) na jednotlivé komplexy respiračního řetězce [145]. Ke svému studiu použili izolované mitochondrie z jaterní, srdeční a mozkové tkáně morčete. Aktivita jednotlivých komplexů byla stanovena spektrofotometricky. Bylo zjištěno, že komplexy II a III jsou citlivější na Cd^{2+} ionty než komplexy I a IV. Maximální inhibice byla 50–60 % u komplexu II a 30–77 % u komplexu III, zatímco maximální inhibice komplexu I byla pouze 22–30 % a u komplexu IV 16–20 %. Také bylo zjištěno, že inhibice respirace kadmiovými ionty je reverzibilní a jako antidotum lze použít EDTA [145].

Naše práce nebyla specificky zaměřována na studium aktivity a případné inhibice konkrétního mitochondriálního komplexu. Byla sledována hlavně rutinní respirace intaktních buněk v kultivačním médiu. Poté stav LEAK indukovaný oligomycinem, který inhibuje ATP-syntázu. Po rozpojení dýchacího řetězce byly získány hodnoty maximální míry respirace. Důležitá informace pro nás je, že respirace ovlivněná Cd^{2+} byla nižší než u kontrol, a je tedy potvrzeno, že kadmium inhibuje respirační komplexy.

Další možností, jak sledovat účinek CdCl_2 na respiraci, bylo přidání roztoku CdCl_2 přímo k buňkám během měření respirace. Tyto buňky byly permeabilizovány optimální koncentrací digitoninu, byly k nim přidány substráty pro komplex I, ADP a cytochrom c. Přesto, že byla použita vyšší koncentrace CdCl_2 než ve studii výše a respirace buněk s CdCl_2 byla sledována kontinuálně po dobu 30 minut, nebyl zde prokázán žádný vliv přímého přídatku CdCl_2 , ač bychom očekávali změny signálu u buněk inkubovaných s CdCl_2 oproti kontrolám.

Poněkud odlišně na problematiku nahlíží studie z roku 2018 [160], která zkoumá morfologické a funkční změny u mitochondrií buněk INS-1 během maximální možné doby vystavení převážně subletálním koncentracím Cd^{2+} . Zdá se, že mitochondrie jsou schopné reagovat na velmi nízké hladiny kadmia, ale buňky se s nízkými koncentracemi dokáží efektivně vyrovnávat a funkční důsledky lze pozorovat až tehdy, když buňky začnou umírat. Byla proto sledována viabilita buněk INS-1 v přítomnosti kadmia. Buňky po 72 hodinách expozice CdCl_2 (0,125–20 $\mu\text{mol/l}$) byly měřeny průtokovou cytometrií a až při koncentracích nad 2,5 $\mu\text{mol/l}$ CdCl_2 byla významně

snížena viabilita buněk. Ve snaze napodobit dopady chronické expozice stopových dávek Cd^{2+} by bylo vhodné zvážit právě takové koncentrace kadmia, které jsou hluboko pod střední letální dávkou. Respirace v kultivačním médiu byla nejprve zaznamenána pro intaktní buňky a poté v přítomnosti oligomycinu. Hodnoty byly vyjádřeny jako poměr LEAK/ROUTINE a výstupem je, že respirace ovlivněná stopovým množstvím kadmia se nemění. Paralelně v této studii nebyly pozorovány žádné významné účinky CdCl_2 při expozici po dobu 3 nebo 4 dnů. Tato data jsou dalším příkladem toho, jak se buňky snaží přizpůsobit environmentálnímu stresu [160].

Nutno dodat, že žádná z výše uvedených studií, kromě naší práce, nebyla provedena na přístroji Oroboros. Také nebyla nalezena studie, která by používala buňky Jurkat pro analýzu respirace na Oroborosu, případně sledování cytotoxicity kadmia. Je třeba zohlednit nejen vliv různých biologických materiálů, ale také vliv použité metody. Je tedy zřejmé, že je zapotřebí více studií, aby bylo možné objasnit závislost toxicity těžkých kovů na viabilitě buněk na jejich respiraci.

7. ZÁVĚR

Cílem naší diplomové práce bylo zavést metodu izolace PBMC z periferní krve. Tyto izolované PBMC a buněčné linie byly následně využity k měření buněčné respirace *in vitro* a pro charakterizaci toxicity těžkých kovů, konkrétně CdCl₂, na aktivitu mitochondriálního respiračního řetězce.

Závěrem lze shrnout, že toxicita kadmennatých iontů závisí na koncentraci CdCl₂ a také na době inkubace buněk s těžkým kovem. Úroveň respirace byla měřena vysokoúčinnou respirometrií na přístroji Oroboros. CdCl₂ (100 μmol/l) inhiboval respiraci buněčné linie Jurkat již po 2hodinové inkubaci, po 4 hodinách inkubace buněčná respirace poklesla až o 60 %. Po 4 hodinách také výrazně poklesla viabilita buněk měřená spektrofotometricky WST-1 testem.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Altman R. *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Leipzig: Veit, 1890.
- [2] Benda C. Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertbraten. II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. *Archiv für Anatomie und Physiologie*. 1898, 393-398.
- [3] Martin W, Mentel M. The Origin of Mitochondria. *Nature Education*. 2010, 3(9):58.
- [4] Keeling PJ. The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annual Review of Plant Biology*. 2013, 64:583–607.
- [5] Matouš B et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galen, 2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [6] Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H.Freeman, 2013. ISBN 978-1429234146.
- [7] *Sigma Aldrich*. [Online] [Citace: 25. prosinec 2018.] <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/learning-center/metabolic-pathways/electron-transport.html>.
- [8] *MitoPedia: Inhibitors*. *Bioblast.at*. [Online] [Citace: 25. prosinec 2018.] http://www.bioblast.at/index.php/MitoPedia:_Inhibitors.
- [9] Degli Esposti M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998, 1364(2):222-35.
- [10] Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016, 1857(7):902–914.
- [11] Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004, 278(38):36027-36031.
- [12] Esser L, Quinn B, Li YF, Zhang M, Elberry M, Yu L, Yu CA, Xia D. Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: A modified classification of inhibitors for the cytochrome bc1 complex. *The Journal of Molecular Biology*. 2004, 341(1):281-302.
- [13] Muller FL, Roberts AG, Bowman MK, Kramer DM. Architecture of the Qo site of the cytochrome bc1 complex probed by superoxide production. *Biochemistry*. 2003, 42(21):6493-6499.

- [14] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Teiser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2007, 39(1):44-84.
- [15] Bycroft BW, Payne DJ. *Dictionary of antibiotics and related substances, second edition*. London: Taylor & Francis, 2013. ISBN 9781439839522.
- [16] Hazan R, Que YA, Maura D, Strobel B, Majcherczyk PA, Hopper LR, Wilbur DJ, Hreha TN, Barquera B, Rahmea LG. Auto Poisoning of the Respiratory Chain by a Quorum Sensing Regulated Molecule Favors Biofilm Formation and Antibiotic Tolerance. *Current Biology*. 2016, 26(2):195-206.
- [17] Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007, 129(1):111-22.
- [18] Cooper CE, Brown GC. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2008, 40(5):533-539.
- [19] Way JL. Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1984, 24:451-481.
- [20] Björck ML, Zhou S, Lundin CR, Ott M, Ädelroth P, Brzezinski P. Reaction of *S. cerevisiae* mitochondria with ligands: Kinetics of CO and O₂ binding to flavohemoglobin and cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017, 1858(2):182-188.
- [21] Rich PR. Mitochondrial Cytochrome c Oxidase: Catalysis, Coupling and Controversies. *Biochemical Society Transactions*. 2017, 45(3):813-829.
- [22] Markoš A. Akumulátorky života; objasnění mechanismu syntézy ATP. *Vesmír*. 1998.
- [23] Joshna G. *ATP Synthase: Structure and Mechanism* [Online] [Citace: 26. prosinec 2018.] <http://www.biologydiscussion.com/cell-biology/atp-synthase-structure-and-mechanism-cell-biology-biology/78920>.
- [24] Azzi A, Casey RP, Nalecz MJ. The effect of N,N0-dicyclohexylcarbodiimide on enzymes of bioenergetic relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1984, 768(3-4):209-226.
- [25] Palou A, Picó C, Bonet ML, Oliver P. The uncoupling protein, thermogenin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1998, 30(1):7-11.
- [26] Nedergaard J, Ricquier D, Kozak LP. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO Reports*. 2005, 6(10):917-921.

- [27] Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochemical Journal*. 2000, 345(2):161-179.
- [28] *MitoPedia: Uncouplers*. *Bioblast.at*. [Online] [Citace: 28. prosinec 2018.]
http://www.bioblast.at/index.php/MitoPedia:_Uncouplers.
- [29] Berry BJ, Trewin AJ, Amitrano AM, Kim M, Wojtovich AP. Use the Protonmotive Force: Mitochondrial Uncoupling and Reactive Oxygen Species. *Journal of Molecular Biology*. 2018, 430(21):3873-3891.
- [30] *MitoPedia: Sample preparations*. *Bioblast.at*. [Online] [Citace: 20. březen 2019.]
http://bioblast.at/index.php/MitoPedia:_Sample_preparations.
- [31] Sumbalova Z, Droscher S, Hiller E, Chang SC, Garcia-Souza LF, Calabria E, Volani C, Krumschnabel G, Gnaiger E. O2k-Protocols: Isolation of peripheral blood mononuclear cells and platelets from human blood for HRFR. *Mitochondrial Physiology Network*. 2018, 21.17(2):1-15.
- [32] Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry. OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibres from small biopsies of human muscle. *Methods in Molecular Biology*. 2012, 810:25-58.
- [33] *Digitonin, detergent for solubilizing receptors and cellular membranes*. [Online] [Citace: 20. březen 2019.] <https://www.abcam.com/digitonin-detergent-for-solubilizing-receptors-and-cellular-membranes-ab141501.html#top-346>.
- [34] Dröse S, Hanley PJ, Brandt U. Ambivalent effects of diazoxide on mitochondrial ROS production at respiratory chain Complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, 1790:558-65.
- [35] Pecinova A, Drahota Z, Nuskova H, Pecina P, Houstek J. Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion*. 2011, 11:722-8.
- [36] *Seahorse XF Analyzers*. *Agilent.com*. [Online] [Citace: 25. březen 2019.]
<https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-analyzers>.
- [37] Gnaiger E. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control; An Introduction to OXPHOS Analysis*. Innsbruck : Oroboros Instruments Corporation, 2014. ISBN 978-3-9502399-8-0.
- [38] *O2k-Publications: Tissues and cells*. *Bioblast.at*. [Online] [Citace: 8. leden 2019.]
http://www.bioblast.at/index.php/O2k-Publications:_Topics#Tissues_and_cells.
- [39] Tjio JH, Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *The Journal of Experimental Medicine*. 1958, 108(2):259-68.

- [40] *Biocompare.com*. [Online] [Citace: 10. prosinec 2018.]
https://www.biocompare.com/pfu/111694/soids/760407-2259403/Cells_and_Microorganisms/CHO_Cell_Lines.
- [41] Kaneyoshi K, Uchiyama K, Onitsuka M, Yamano N, Koga Y, Omasa T. Analysis of intracellular IgG secretion in Chinese hamster ovary cells to improve IgG production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019, 127(1):107-113.
- [42] Eisenhut P, Klanert G, Weinguny M, Baier L, Jadhav V, Ivansson D, Borth N. A CRISPR/Cas9 based engineering strategy for overexpression of multiple genes in Chinese hamster ovary cells. *Metabolic Engineering*. 2018, 48:72-81.
- [43] Mozo J, Ferry G, Studeny A, Pecqueur C, Rodriguez M, Boutin JA, Bouillaud F. Expression of UCP3 in CHO cells does not cause uncoupling, but controls mitochondrial activity in the presence of glucose. *Biochemical Journal*. 2006, 393(1):431–439.
- [44] Abou-Hamdan A, Guedouari-Bounihi H, Lenoir V, Andriamihaja M, Blachier F, Bouillaud F. *Methods in Enzymology: Chapter Twelve – Oxidation of H₂S in Mammalian Cells and Mitochondria*. Academic Press, 2015. ISBN 9780128015124.
- [45] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*. 1977, 36(1):59-74.
- [46] Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB journal*. 2002, 16(8):869-871.
- [47] *Biocompare.com*. [Online] [Citace: 10. prosinec 2018.]
<https://www.biocompare.com/11023-Cells-Strains/?search=hek&said=41&soids=2259403>.
- [48] Reshma VG, Mohanan PV. Cellular interactions of zinc oxide nanoparticles with human embryonic kidney (HEK 293) cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, 157:182-190.
- [49] Venereo-Sanchez A, Gilbert R, Simoneau M, Caron A, Chahal P, Chen W, Ansorge S, Li X, Henry O, Kamen A. Hemagglutinin and neuraminidase containing virus-like particles produced in HEK-293 suspension culture: An effective influenza vaccine candidate. *Vaccine*. 2016, 34(29):3371-3380.
- [50] Lim SC, Carey KT, McKenzie M. Anti-cancer analogues ME-143 and ME-344 exert toxicity by directly inhibiting mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *American Journal of Cancer Research*. 2015, 5(2):689-701.

- [51] Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2009, 133(9):1463-7.
- [52] Culliton BJ. HeLa Cells: Contaminating Cultures around the World. *Science*. 1974, 184(4141):1058-9.
- [53] British Society for immunology. *Immunology.org*. [Online] [Citace: 12. prosinec 2018.] <https://www.immunology.org/hela-cells-1951>.
- [54] *Nobelprize.org. The Nobel Prize*. [Online] [Citace: 12. prosinec 2018.] <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2009/summary/>.
- [55] *Nobelprize.org. The Nobel Prize*. [Online] [Citace: 12. prosinec 2018.] <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2008/summary/>.
- [56] *O2k-Publications: HeLa. Bioblast.at*. [Online] [Citace: 12. prosinec 2018.] http://www.bioblast.at/index.php/O2k-Publications:_HeLa.
- [57] Voos W. Mitochondrial protein homeostasis: the cooperative roles of chaperones and proteases. *Research in Microbiology*. 2009, 160(9):718-25.
- [58] Lee I, Suzuki CK. Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease – lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008, 1784(5):727-35.
- [59] Bota DA, Ngo JK, Davies KJ. Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005, 38(5):665-77.
- [60] Bota DA, Van Remmen H, Davies KJ. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Letters*. 2002, 532(1-2):103-6.
- [61] Venkatesh S, Lee J, Singh K, Lee I, Suzuki CK. Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, 1823(1):56-66.
- [62] Bayot A, Gareil M, Chavatte L, Hamon MP, L'Hermitte-Stead C, Beaumatin F, Priault M, Rustin P, Lombès A, Friguet B, Bulteau AL. Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells. *Biochimie*. 2014, 100:38-47.
- [63] *ThermoFisher.com. ThermoFisher Scientific*. [Online] [Citace: 13. prosinec 2018.] <https://www.thermoFisher.com/order/catalog/product/M36008>.
- [64] Wang X, Moraes CT. Increases in mitochondrial biogenesis impair carcinogenesis at multiple levels. *Molecular Oncology*. 2011, 5(5):399-409.

- [65] Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *The Journal of General Physiology*. 1926, 8(6):519-30.
- [66] Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2008, 18(1):54-61.
- [67] *O2k-Publications: Neuroblastoma. Bioblast.at*. [Online] [Citace: 27. prosinec 2018.] http://www.bioblast.at/index.php/O2k-Publications:_Neuroblastoma.
- [68] Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments*. 2016, (108):53193.
- [69] Pählman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell differentiation*. 1984, 14(2):135-44.
- [70] Rhein V, Baysang G, Rao S, Meier F, Bonert A, Müller-Spahn F, Eckert A. Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2009, 29(6-7):1063-71.
- [71] *O2k-Publications: HUVEC. Bioblast.at*. [Online] [Citace: 28. prosinec 2018.] http://www.bioblast.at/index.php/O2k-Publications:_HUVEC.
- [72] Félétou M. *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. USA: Morgan & Claypool Publishers, 2011. ISBN 9781615041237.
- [73] *www.promocell.com. Promo Cell*. [Online] [Citace: 28. prosinec 2018.] <https://www.promocell.com/product/human-umbilical-vein-endothelial-cells-huvec/>.
- [74] Yao K, Zhang WW, Yao L, Yang S, Nie W, Huang F. Carvedilol promotes mitochondrial biogenesis by regulating the PGC-1/TFAM pathway in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016, 470(4):961-6.
- [75] Arab HH, El-Sawalhi MM. Carvedilol alleviates adjuvant-induced arthritis and subcutaneous air pouch edema: modulation of oxidative stress and inflammatory mediators. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013, 268(2):241-8.
- [76] Oliveira PJ, Gonçalves L, Monteiro P, Providencia LA, Moreno AJ. Are the antioxidant properties of carvedilol important for the protection of cardiac mitochondria? *Current Vascular Pharmacology*. 2005, 3(2):147-58.
- [77] Kametani R, Miura T, Harada N, Shibuya M, Wang R, Tan H, Fukagawa Y, Kawamura S, Matsuzaki M. Carvedilol inhibits mitochondrial oxygen consumption and superoxide

production during calcium overload in isolated heart mitochondria. *Circulation Journal*. 2006, 70(3):321-6.

[78] Taciak B, Białasek M, Braniewska A, Sas Z, Sawicka P, Kiraga Ł, Rygiel T, Król M. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS one*. 2018, 13(6):e0198943.

[79] Bordbar A, Mo ML, Nakayasu ES, Schrimpe-Rutledge AC, Kim YM, Metz TO, Jones MB, Frank BC, Smith RD, Peterson SN, Hyde DR, Adkins JN, Palsson BO. Model-driven multi-omic data analysis elucidates metabolic immunomodulators of macrophage activation. *Molecular Systems Biology*. 2012, 8:558.

[80] Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003, 73(2):209-12.

[81] *Invivogen.com*. *InvivoGen: Innovation within reach*. [Online] [Citace: 13. leden 2019.] <https://www.invivogen.com/raw>.

[82] Palleroni AV, Varesio L, Wright RB, Brunda MJ. Tumoricidal alveolar macrophage and tumor infiltrating macrophage cell lines. *International Journal of Cancer*. 1991, 49(2):296-302.

[83] Matallo J, Vogt J, McCook O, Wachter U, Tillmans F, Groeger M, Szabo C, Georgieff M, Radermacher P, Calzia E. Sulfide-inhibition of mitochondrial respiration at very low oxygen concentrations. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 2014, 41:79-84.

[84] Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney International*. 1994, 45(1):48-57.

[85] Qiu X, Zhou X, Miao Y, Li B. An in vitro method for nephrotoxicity evaluation using HK-2 human kidney epithelial cells combined with biomarkers of nephrotoxicity. *Toxicology Research*. 2018, 7(6):1205-1213.

[86] Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nature Reviews Nephrology*. 2017, 13(10):629-646.

[87] Gross VS, Greenberg HK, Baranov SV, Carlson GM, Stavrovskaya IG, Lazarev AV, Kristal BS. Isolation of functional mitochondria from rat kidney and skeletal muscle without manual homogenization. *Analytical Biochemistry*. 2011, 418(2):213-23.

[88] Quoilin C, Mouithys-Mickalad A, Duranteau J, Gallez B, Hoebeke M. Endotoxin-induced basal respiration alterations of renal HK-2 cells: a sign of pathologic metabolism down-regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012, 423(2):350-4.

- [89] Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*. 1977, 19(5):621-6.
- [90] DSMZ.de. Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. [Online] [Citace: 20. leden 2019.]
<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-282.html>.
- [91] Abraham RT, Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews Immunology*. 2004, 4(4):301-8.
- [92] Chen J, Li Q, Pang Z, Gong M, Tang L. Titanium Ions Promote Exogenous Calcium-Dependent Calcium Influx in Activated Jurkat T Cells: A Possible Mechanism to Explain Its Immunostimulatory Properties. *Mediators of Inflammation*. 2018, 3286905.
- [93] Hu S, Chen CW, Chen ST, Tsui KH, Tang TK, Cheng HT, Hwang GS, Yu JW, Li YC, Wang PS, Wang SW. Inhibitory effect of berberine on interleukin-2 secretion from PHA-treated lymphocytic Jurkat cells. *International Immunopharmacology*. 2019, 66:267-273.
- [94] Bray C, Wright D, Haupt S, Thomas S, Stauss H, Zamoyska R. Crispr/Cas Mediated Deletion of PTPN22 in Jurkat T Cells Enhances TCR Signaling and Production of IL-2. *Frontiers in Immunology*. 2018, 9:2595.
- [95] Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 1973, 51(5):1417-23.
- [96] Shapiro DL, Nardone LL, Rooney SA, Motoyama EK, Munoz JL. Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1978, 530(2):197-207.
- [97] Badr KR, Parente-Rocha JA, Baeza LC, Ficcadori FS, Souza M, Soares CM, Guisconi ACP, Almeida TN, Cardoso DD. Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human adenovirus type 2. *Journal of Medical Virology*. 2019, doi: 10.1002/jmv.25439.
- [98] Holandino C, Teixeira CA, de Oliveira FA, Barbosa GM, Siqueira CM, Messeder DJ, de Aguiar FS, da Veiga VF, Girard-Dias W, Miranda K, Galina A, Capella MA, Morales MM. Direct electric current treatment modifies mitochondrial function and lipid body content in the A549 cancer cell line. *Bioelectrochemistry*. 2016, 111:83-92.
- [99] Wedepohl KH. The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1995, 59(7):1217-1232.

- [100] Bernhoft RA. Cadmium Toxicity and Treatment. *The Scientific World Journal*. 2013, 394652.
- [101] Friberg L. Cadmium. *Annual Review of Public Health*. 1983, 4:367–373.
- [102] Järup L, Rogenfelt A, Elinder CG, Nogawa K, Kjellström T. Biological half-time of cadmium in the blood of workers after cessation of exposure. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 1983, 9(4):327-31.
- [103] Thévenod F. Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiology*. 2003, 93(4):87-93.
- [104] Horiguchi H, Teranishi H, Niiya K, Aoshima K, Katoh T, Sakuragawa N, Kasuya M. Hypoproduction of erythropoietin contributes to anemia in chronic cadmium intoxication: clinical study on Itai-itai disease in Japan. *Archives of Toxicology*. 1994, 68(10):632-6.
- [105] Nordberg GF, Nogawa K, Nordberg M, Friberg L. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Amsterdam: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-12-369413-3.
- [106] Chen X, Zhu G, Jin T, Zhou Z, Gu S, Qiu J, Xiao H. Cadmium stimulates the osteoclastic differentiation of RAW264.7 cells in presence of osteoblasts. *Biological Trace Element Research*. 2012, 146(3):349-53.
- [107] Youness ER, Mohammed NA, Morsy FA. Cadmium impact and osteoporosis: mechanism of action. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2012, 22(7):560-7.
- [108] Prozialeck WC, Edwards JR, Woods JM. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sciences*. 2006, 79(16):1493-506.
- [109] Gallagher CM, Meliker JR. Blood and urine cadmium, blood pressure, and hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*. 2010, 118(12):1676-84.
- [110] Edwards JR, Prozialeck WC. Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009, 238(3):289-93.
- [111] Varoni MV, Palomba D, Gianorso S, Anania V. Cadmium as an environmental factor of hypertension in animals: new perspectives on mechanisms. *Veterinary Research Communications*. 2003, 1:807-10.
- [112] Steffensen IL, Mesna OJ, Andruchow E, Namork E, Hylland K, Andersen RA. Cytotoxicity and accumulation of Hg, Ag, Cd, Cu, Pb and Zn in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes in vitro. *General Pharmacology*. 1994, 25(8):1621-33.

- [113] Hanson ML, Holásková I, Elliott M, Brundage KM, Schafer R, Barnett JB. Prenatal cadmium exposure alters postnatal immune cell development and function. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012, 261(2):196-203.
- [114] Fortier M, Omara F, Bernier J, Brousseau P, Fournier M. Effects of physiological concentrations of heavy metals both individually and in mixtures on the viability and function of peripheral blood human leukocytes in vitro. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2008, 71(19):1327-37.
- [115] Chatterjee S, Kundu S, Sengupta S, Bhattacharyya A. Divergence to apoptosis from ROS induced cell cycle arrest: effect of cadmium. *Mutation Research*. 2009, 663(1-2):22-31.
- [116] Christensen KL. Metals in blood and urine, and thyroid function among adults in the United States 2007-2008. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2013, 216(6):624-32.
- [117] Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*. 2012, 64(1):16-64.
- [118] Shagirtha K, Muthumani M, Prabu SM. Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2011, 15(9):1039-50.
- [119] Qu W, Tokar EJ, Kim AJ, Bell MW, Waalkes MP. Chronic cadmium exposure in vitro causes acquisition of multiple tumor cell characteristics in human pancreatic epithelial cells. *Environmental Health Perspectives*. 2012, 120(9):1265-71.
- [120] Julin B, Wolk A, Johansson JE, Andersson SO, Andrén O, Akesson A. Dietary cadmium exposure and prostate cancer incidence: a population-based prospective cohort study. *British Journal of Cancer*. 2012, 107(5):895-900.
- [121] Adams SV, Passarelli MN, Newcomb PA. Cadmium exposure and cancer mortality in the Third National Health and Nutrition Examination Survey cohort. *Occupational and Environmental Medicine*. 2012, 69(2):153-6.
- [122] Romanowicz-Makowska H, Forma E, Bryś M, Krajewska WM, Smolarz B. Concentration of cadmium, nickel and aluminium in female breast cancer. *Polish Journal of Pathology*. 2011, 62(4):257-61.
- [123] Vašák M, Meloni G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2011, 16(7):1067-78.

- [124] Casini A, Karotki A, Gabbiani C, Rugi F, Vašák M, Messori L, Dyson PJ. Reactivity of an antimetastatic organometallic ruthenium compound with metallothionein-2: relevance to the mechanism of action. *Metallomics: Integrated Biometal Science*. 2009, 1(5):434-41.
- [125] Kovacs G, Montalbetti N, Franz MC, Graeter S, Simonin A, Hediger MA. Human TRPV5 and TRPV6: key players in cadmium and zinc toxicity. *Cell Calcium*. 2013, 54(4):276-86.
- [126] Kovacs G, Danko T, Bergeron MJ, Balazs B, Suzuki Y, Zsembery A, Hediger MA. Heavy metal cations permeate the TRPV6 epithelial cation channel. *Cell Calcium*. 2011, 49(1):43-55.
- [127] Thévenod F. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009, 238(3):221-39.
- [128] Lee WK, Thévenod F. Novel roles for ceramides, calpains and caspases in kidney proximal tubule cell apoptosis: lessons from in vitro cadmium toxicity studies. *Biochemical Pharmacology*. 2008, 76(11):1323-32.
- [129] Lawal AO, Ellis EM. Phospholipase C mediates cadmium-dependent apoptosis in HEK 293 cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2012, 110(6):510-517.
- [130] Sharma SK, Goloubinoff P, Christen P. Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008, 372(2):341-5.
- [131] Lee WK, Bork U, Gholamrezaei F, Thévenod F. Cd(2+)-induced cytochrome c release in apoptotic proximal tubule cells: role of mitochondrial permeability transition pore and Ca(2+) uniporter. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005, 288(1):27-39.
- [132] O'Brien P, Salacinski HJ. Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Archives of Toxicology*. 1998, 72(11):690-700.
- [133] Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*. 2001, 92(1):57-70.
- [134] Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996, 86(1):147-57.
- [135] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999, 397(6718):441-6.
- [136] Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000, 102(1):33-42.

- [137] Zoratti M, Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995, 1241(2):139-76.
- [138] Weeber EJ, Levy M, Sampson MJ, Anflous K, Armstrong DL, Brown SE, Sweatt JD, Craigen WJ. The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277(21):18891-7.
- [139] Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochemical Journal*. 1988, 255(1):357-60.
- [140] Kravenskaya EV, Fedirko NV. Molecular Mechanisms of Cadmium-Induced Nonspecific Mitochondrial Permeability. *Neurophysiology*. 2011, 43(6):572-574.
- [141] Kravens'ka EV, Nalyvaiko NV, Fedirko N, Dubyts'kyi LO. Kinetic Analysis of the Calcium- and Cadmium-Induced Development of Nonspecific Permeability of the Mitochondrial Inner Membrane. *Neurophysiology*. 2008, 40(4):252-260.
- [142] Garlid KD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003, 1606(1-3):23-41.
- [143] Lee WK, Spielmann M, Bork U, Thévenod F. Cd²⁺-induced swelling-contraction dynamics in isolated kidney cortex mitochondria: role of Ca²⁺ uniporter, K⁺ cycling, and protonmotive force. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2005, 289(3):656-64.
- [144] Takaki A, Jimi S, Segawa M, Hisano S, Takebayashi S, Iwasaki H. Long-Term Cadmium Exposure Accelerates Age-Related Mitochondrial Changes in Renal Epithelial Cells. *Toxicology*. 2004, 203(1-3):145-154.
- [145] Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*. 2004, 36(11):1434-43.
- [146] Gobe G, Crane D. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicology Letters*. 2010, 198(1):49-55.
- [147] Dorta DJ, Leite S, DeMarco KC, Prado IM, Rodrigues T, Mingatto FE, Uyemura SA, Santos AC, Curti C. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2003, 97(3):251-7.
- [148] Ossola JO, Tomaro ML. Heme oxygenase induction by cadmium chloride: evidence for oxidative stress involvement. *Toxicology*. 1995, 104(1-3):141-7.
- [149] Larregle EV, Varas SM, Oliveros LB, Martinez LD, Antón R, Marchevsky E, Giménez MS. Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46(5):1786-92.

- [150] Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007, 12(5):913-22.
- [151] Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi AM. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*. 2009, 9(6):377-84.
- [152] Healthcare, GE. *Handbook: Isolation of mononuclear cells: Methodology and applications*. *Gelifesciences.com*. [Online] [Citace: 28. březen 2019.]
<https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/cell-therapy/media/ficoll-paque-plus-density-gradient-media-p-05824>.
- [153] Gnaiger E. Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, and High-Resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function. In book: *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*. 2008, 10.1002/9780470372531.ch12.
- [154] Doerrier C, Garcia-Souza LF, Krumschnabel G, Wohlfarter Y, Mészáros AT, Gnaiger E. High-Resolution Fluorescence Respirometry and OXPHOS protocols for human cells, permeabilized fibers from small biopsies of muscle, and isolated mitochondria. *Methods in Molecular Biology*. 2018, 1782:31-70.
- [155] Doerrier C, Gnaiger E. High-resolution respirometry and coupling control protocol with intact cells: ROUTINE, LEAK, ETS, ROX. *Mitochondrial Physiology Network*. 2016, 08.09(11):1-8.
- [156] Yin LM, Wei Y, Wang Y, Xu YD, Yang YQ. Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*. 2013, 10(1):68-72.
- [157] Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, Opdenakker K, Nair AR, Munters E, Artois TJ, Nawrot T, Vangronsveld J, Smeets K. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 2010, 23(5):927-40.
- [158] Belyaeva EA, Sokolova TV, Emelyanova LV, Zakharova IO. Mitochondrial electron transport chain in heavy metal-induced neurotoxicity: effects of cadmium, mercury, and copper. *The Scientific World Journal*. 2012, 136063.
- [159] Belyaeva EA, Dymkowska D, Wieckowski MR, Wojtczak L. Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008, 231(1):34-42.
- [160] Jacquet A, Cottet-Rousselle C, Arnaud J, Julien Saint Amand K, Ben Messaoud R, Lénon M, Demeilliers C, Moulis JM. Mitochondrial Morphology and Function of the Pancreatic β -Cells INS-1 Model upon Chronic Exposure to Sub-Lethal Cadmium Doses. *Toxics*. 2018, 22;6(2).