

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav patologické fyziologie

**MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU
POMOCÍ IONTOVĚ-SELEKTIVNÍCH ELEKTROD
CITLIVÝCH NA TETRAFENYLFOSFÓNIOVÝ
KATION**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Obor studia: Biomedicínská informatika

Mgr. Anna Lábajová

Školitel: MUDr. Jiří Kofránek, CSc.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně a veškeré literární prameny uvádím v seznamu citované literatury.

V Praze, dne 29. 5. 2007

Anna Lábajová

Předně bych chtěla poděkovat svému školiteli MUDR. Jiřímu Kofránkovi, CSc. za profesionální přístup, se kterým mne vedl během celého postgraduálního studia.

Dále děkuji doc. RNDr. Jiřímu Čerkasovovi, CSc. za cenné rady ohledně iontově-selektivních elektrod a RNDr. Zdeňku Drahotovi, DrSc. za uvedení do světa mitochondrií.

Také děkuji všem členům Ústavu patologické fyziologie, obzvláště Prof. MUDr. Emanuelu Nečasovi, DrSc.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za oporu v průběhu celého studia.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	6
1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 TEORIE IONTOVĚ-SELEKTIVNÍCH ELEKTROD	10
2.1.1 Klasifikace iontově-selektivních elektrod	10
2.1.2 Experimentální měření koeficientů selektivity	14
2.1.3 Detekční limit iontově-selektivních elektrod.....	18
2.2 METODY MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU	21
2.3 MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL VNITŘNÍ MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNY	29
2.4 APOPTÓZA A ÚLOHA „MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE“	33
2.4.1 Vliv <i>t</i> -BHP na mitochondriální funkce	42
3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	44
4. MATERIÁL A METODY	45
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	48
5.1 APARATURA NA MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU	48
5.1.1 Konstrukce aparatury na měření membránového potenciálu s použitím TPP ⁺ - selektivních elektrod	48
5.1.2 Příprava a vlastnosti membrány citlivé na TPP ⁺	52
5.1.3 Výpočet koeficientů selektivity TPP ⁺ -selektivní elektrody	57
5.2 VYUŽITÍ APARATURY NA MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU VNITŘNÍ MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNY	66

5.2.1 Membránový potenciál a hodnocení funkce dýchacího řetězce izolovaných mitochondrií.....	66
5.2.2 Mitochondriální membránový potenciál izolovaných hepatocytů a buněk z buněčných kultur. Hodnocení funkce dýchacího řetězce.....	71
5.2.3 TPP ⁺ -selektivní elektrody jako nástroj pro sledování funkce „mitochondrial permeability transition pore“	78
5.2.4 Vliv <i>t</i> -BHP na funkci dýchacího řetězce izolovaných hepatocytů	85
6. ZÁVĚR.....	89
7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	91
SOUHRN	102
ABSTRACT	103

SEZNAM ZKRATEK

- K_{ij}^{pot} - koeficient selektivity
- $\Delta\psi_m$ - potenciálový rozdíl na vnitřní mitochondriální membráně
- ADP** - adenosindifosfát
- ATP** - adenosintrifosfát
- ANT**- transportér adeninových nukleotidů
- CS** - cyklosporin A
- CyP-D** - cyklofilin D
- Cyt c** - cytochrom c
- DDA⁺** - dibenzylmethyl amonný kation
- DNA** - deoxyribonukleová kyselina
- EDTA** - sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
- EGTA** - kyselina ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)tetraoctová
- EMF** - elektromotorická síla
- FAD** - flavinadenindinukleotid
- FADH₂** - redukovaná forma flavinadenindinukleotidu
- FCCP** - karbonylkyanid p-trifluoromethoxyfenylylhydrazon
- FIM** - fixed interference method
- FMN** - flavinadeninmononukleotid
- FMNH₂** - redukovaná forma flavinadenindinmononukleotidu
- GSH** - redukovaný glutathion
- GSSG** - oxidovaný glutathion
- HFPB⁻** - tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)fenyl]boritanový anion
- IL-4** - interleukin 4
- IUPAC** - Unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
- JC-1** - 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3' - tetraethylbenzimidazolkarbocyanin jodid
- MPT** - mitochondrial permeability transition
- MPTP** - mitochondrial permeability transition pore
- NAD⁺** - nikotinamidadenindinukleotid

NADH - redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidu

NADP⁺ - nikotinamidadeninukleotidfosfát

NADPH - redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu

P_i - fosfát

PVC - poly(vinylchlorid)

Rh123 - rhodamin 123

ROS - reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

***t*-BHP** - *tert*-butylhydroperoxid

TMPD - *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-fenylendiamin

TMRE - tetramethylrhodamin ethylester

TMRM - tetramethylrhodamin methylester

TNF - faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor α)

TPB⁻ - tetrafenylboritanový anion

TPMP⁺ - trifenylmethylfosfoniový kation

TPP⁺ - tetrafenylfosfoniový kation

VDAC - potenciálově-závislý aniontový kanál (porin) (voltage dependent anion channel)

1. ÚVOD

Za posledních 30 let se iontově-selektivní elektrody staly jednou z nejdůležitějších skupin chemických senzorů. Dnes už se prakticky v každé laboratoři rutinně používá skleněná pH elektroda, která patří mezi iontově-selektivní elektrody. Mimo pH elektrody byly vyvinuty různé typy iontově-selektivních elektrod citlivých například na ionty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , I^- [90] až po elektrody citlivé na protamin [92]. Výhodou těchto senzorů je jejich citlivost v širokém rozsahu aktivit sledovaného iontu, často v rozsahu od 1 do 10^{-6} M. V současné době je výzkum v oblasti iontově-selektivních elektrod zaměřen na vylepšování jejich parametrů - selektivity, detekčního limitu, pracovního rozsahu a stability. Iontově-selektivní elektrody našly svoje uplatnění nejen jako analytická technika pro stanovení jednotlivých iontů ve vzorku, ale také jako jeden z nástrojů v oblastech základního výzkumu.

V 70. letech minulého století se iontově-selektivní elektrody začaly používat na monitorování koncentrace lipofilních fosfoniových kationů (jako je například tetrafenylfosfoniový kation) [57], které jsou jedním z nástrojů pro měření membránového potenciálu. Lipofilní kationy (dibenzyl dimethyl amoniový kation, tetrabutyl amoniový kation, trifenylmethylfosfoniový kation) sehrály důležitou úlohu při potvrzení Mitchellovy chemiosmotické teorie, kdy na základě jejich akumulace v mitochondriích byla potvrzena přítomnost potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně ($\Delta\psi_m$) [3, 71]. Kromě lipofilních fosfoniových kationů se pro měření $\Delta\psi_m$ v dnešní době často používají fluorescenčně značené sondy (například různé deriváty rhodaminu). Jejich akumulací v mitochondriích a po překročení limitní koncentrace dochází ke zhášení fluorescence a na základě toho je možné monitorovat změny $\Delta\psi_m$. Vypočítat absolutní hodnotu $\Delta\psi_m$ touto metodou je možné jen v případě, že je provedena kalibrace na K^+ difuzní potenciál (s přidaným valinomycinem) [82]. Pro přímý výpočet $\Delta\psi_m$ je proto vhodnější použít iontově-selektivní elektrody citlivé na tetrafenylfosfoniový kation nebo metyltrifenylfosfoniový kation, pro které tato kalibrace není nutná. Proto jsem se v předkládané dizertační práci zaměřila na konstrukci, optimalizaci a využití aparatury na měření membránových potenciálů pomocí elektrod citlivých na tetrafenylfosfoniový kation. Toto zařízení je připojeno k PC a umožňuje

snadné ukládání a zpracování naměřených dat na rozdíl od běžného připojení k pH-metru nebo k zapisovači.

Funkčnost aparatury byla otestována měřením $\Delta\psi_m$ izolovaných mitochondrií a hodnocením funkce dýchacího řetězce. Protože se v současné době ukazuje, že mitochondrie jsou v úzkém kontaktu s jinými buněčnými strukturami, například endoplasmatickým retikulem, zajímalo nás také hodnocení funkce dýchacího řetězce *in situ* – tj. mitochondrií v buňkách, které mají permeabilizovanou plasmatickou membránou nízkou koncentrací digitoninu, kdy zůstávají zachované interakce mitochondrií s cytosolárním cytoskeletem [37].

Proces otevírání „mitochondrial permeability transition pore“, který hraje důležitou roli v indukci apoptózy, je doprovázen disipací $\Delta\psi_m$ a vede k bobtnání mitochondrií v důsledku osmotického tlaku. Proto byla použita konstruovaná aparatura také na monitorování změn $\Delta\psi_m$ v důsledku otevírání tohoto póru, které lze indukovat vápníkem a prooxidantem, například *tert*-butylhydroperoxidem, a inhibovat cyklosporinem A.

Tyto biologické testy plně ověřily funkčnost námi konstruované aparatury a prokázaly její význam pro studium mechanismu procesů, které způsobují poruchy energetického metabolismu buněk.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 TEORIE IONTOVĚ-SELEKTIVNÍCH ELEKTROD

2.1.1 Klasifikace iontově-selektivních elektrod

Klasifikace iontově-selektivních elektrod vychází z povahy iontově-selektivní membrány, která je součástí iontově-selektivní elektrody. Elektrody můžeme klasifikovat podle různých kritérií jako např. fyzikální vlastnosti membrány, přítomnost inertní matrice nebo chemických vlastností aktivních substancí membrány. Následující klasifikace je podle Burnetta a spol. (2000) [20] podle doporučení IUPAC z roku 1994:

A. Primární iontově-selektivní elektrody

1. Iontově-selektivní elektrody s *krystalickou membránou* :

- **homogenní** - elektrody, jejichž membrána je z krystalického materiálu a je připravená buď z jedné komponenty nebo homogenní směsi komponent (např. Ag_2S nebo $\text{AgI} + \text{Ag}_2\text{S}$)
- **heterogenní** – elektrody, ve kterých aktivní substance nebo směs aktivních substancí je zabudována v inertní matici (např. silikonová guma nebo PVC)

2. Iontově-selektivní elektrody s *nekrystalickou membránou*:

membrána těchto elektrod obsahuje inertní matici a iontoměnič. Obvykle je vložena mezi dvě vodní fáze. Matrice může být pórovitá nebo nepórovitá (např. sklo nebo PVC).

- **Rigidní, matricové elektrody** – membránou je tenký kousek polymeru (např. polystyren sulfonát, amino-poly(vinylchlorid)) s nepohyblivými místy nebo kousek skla. Jejich chemické složení podmiňuje selektivitu membrány. Sem řadíme elektrody citlivé na vodíkové ionty a elektrody citlivé na monovalentní kationy.
- **elektrody s nabitými pohyblivými místy** mají:
 - a. **membrány se zabudovanými pohyblivými hydrofobními kationy** např. kvartérní amonné soli. Inertní maticí může být např. PVC. Jsou citlivé na změnu aktivity anionů v roztoku.

- b. **membrány se zabudovanými pohyblivými hydrofobními aniony** např. tetrafenyl boritan. Jsou citlivé na změnu aktivity kationů v roztoku.
- c. **membrány se zabudovanými nenabitými ionofory** např. antibiotiky (valinomycin) nebo makrocyclickými sloučeninami.
- d. **membrány se zabudovaným hydrofobním iontovým párem** např. sledovaný kation + tetrafenyl boritan.

B. Složené nebo vícemembránové iontově-selektivní elektrody

1. Elektrody pro *detekci plynů*. Tyto elektrody jsou složeny z indikační a referenční elektrody, které jsou v kontaktu s tenkou vrstvou roztoku. Tento roztok je oddělen od měřeného vzorku permeabilní membránou pro plyny. Vložený roztok interaguje s plynem procházejícím membránou a způsobuje změnu koncentrace molekuly (např. H^+), která je následně měřena iontově-selektivní elektrodou. Patří sem také Clarkova elektroda pro měření koncentrace kyslíku v roztoku.
2. *Enzymové elektrody* jsou senzory, jejichž iontově-selektivní elektroda má na svém povrchu vrstvu obsahující enzym, který reaguje se substrátem za vzniku molekul, na které je elektroda citlivá.

C. Iontově-selektivní elektrody na pevném podkladu (s kovovým vnitřním kontaktem)

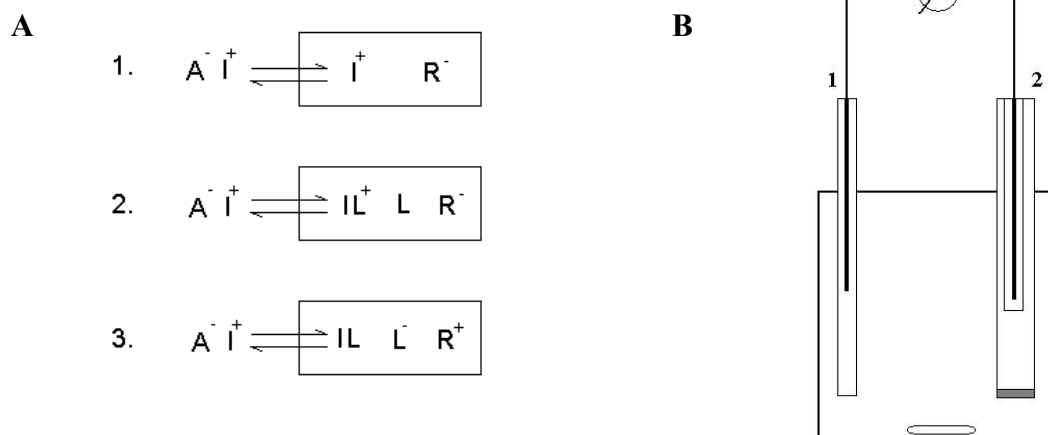
U těchto elektrod je vnitřní elektrodový roztok nahrazen vodičem např. senzor s AgBr filmem je v kontaktu s Ag vodičem.

Primární iontově-selektivní elektrody testujeme v galvanické cele za nulových proudových podmínek. Cela je tvořená referenční elektrodou (kalomelová nebo Ag/AgCl elektroda), měřící elektrodou (Ag/AgCl nebo kalomelová elektroda ponořená do těla měřící elektrody) na jejímž konci je citlivá membrána. Na ní probíhá výměna iontů v závislosti na jejím složení (obr.1 A). Obě elektrody jsou ponořeny do testovaného elektrolytu. Příklad této galvanické cely je na obr.1 B.

Elektromotorická síla (emf) této cely je sumou všech individuálních příspěvků napětí:

$$emf = E_{const} + E_D + E_M, \quad (1)$$

kde E_M je potenciál na membráně, E_D je potenciál na rozhraní vzorek/plnicí elektrodový elektrolyt, který může zůstat dostatečně malý a konstantní za dobře definovaných podmínek (použitím solného můstku) nebo může být odhadnut pomocí Hendersonova formalizmu [15].



Obr.1 A Schématické znázornění rovnováhy mezi vzorkem a iontově-selektivní elektrodou. V membráně je přítomen 1. kationový iontoměnič R^- , 2. neutrální ionofor L a anionové místa R^- a kationové místa R^+ (podle Bakker a spol. 1997).

B Schématický náčrt galvanické cely. 1 Referenční elektroda ($Ag/AgCl$ nebo kalomelová), 2 iontově-selektivní elektroda (s vloženou referenční elektrodou) uzavřená citlivou membránou.

Membránový potenciál E_M tvoří tři příspěvky: potenciálové rozdíly na obou rozhraních elektrolyt/membrána a difuzní potenciál ve vnitřku iontově-selektivní membrány. Ten se může stát významným, jakmile vzniknou koncentrační gradienty iontů s různou pohyblivostí. Ukazuje se, že v mnohých praktických aplikacích je možné difuzní potenciál zanedbat [4]. Potenciál E na rozhraní elektrolyt/membrána můžeme vypočítat na základě následujících úvah s využitím základních termodynamických vztahů.

Elektrochemický potenciál ve vodní fázi elektrolytu ($\tilde{\mu}_s$) a elektrochemický potenciál v organické fázi membrány ($\tilde{\mu}_m$) je vyjádřen vztahy:

$$\tilde{\mu}_s = \mu_s + zF\Phi_s = \mu_s^0 + RT \ln(a_i)_s + zF\Phi_s \quad (2)$$

$$\tilde{\mu}_m = \mu_m + zF\Phi_m = \mu_m^0 + RT \ln(a_i)_m + zF\Phi_m, \quad (3)$$

kde μ je chemický potenciál (μ^0 za standardních podmínek), z je valence, a_i je aktivita iontu i ve vodní/organické fázi, Φ je elektrický potenciál; R je plynová konstanta, T je absolutní teplota a F Faradayova konstanta. Indexy s a m označují vodní fázi a organickou fázi membrány.

V rovnováze platí, že $\tilde{\mu}_s = \tilde{\mu}_m$. Potom:

$$E = \Delta\Phi = -\frac{\mu_m^0 - \mu_s^0}{zF} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{(a_i)_s}{(a_i)_m}. \quad (4)$$

Pokud $(a_i)_m$ zůstává konstantní a jako E^0 označíme členy, které nezávisí na složení vzorku, potom se tento vztah redukuje na Nernstovu rovnici:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln(a_i)_s. \quad (5)$$

Pokud se $(a_i)_m$ mění a nebo jsou v elektrolytu přítomny interferující ionty, případně i elektroneutrální látky, které ovlivňují $(a_i)_m$, můžeme očekávat „ne-Nernstovskou“ závislost na změně $(a_i)_s$. Sub-Nernstovskou odezvu často pozorujeme v přítomnosti interferujících iontů. Super-Nernstovská odezva může být interpretována jako nevhodné zpracování naměřených dat [90].

Popis vlivu interferujících látek je založen na semiempirické Nikolského-Eisenmanovy rovnici [97], kde aktivní člen v Nernstové rovnici je nahrazen:

$$a_i(i) = a_i(ij) + K_{ij}^{pot} a_j(ij)^{z_i/z_j}. \quad (6)$$

Po dosazení do (5) dostáváme:

$$E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln \left(a_i(ij) + K_{ij}^{pot} a_j(ij)^{z_i/z_j} \right), \quad (7)$$

kde $a_i(i)$ je aktivita iontu i v roztoku bez interference jiných iontů, $a_i(ij)$ a $a_j(ij)$ jsou aktivity iontů i a j v jejich společném roztoku, K_{ij}^{pot} je Nikolského koeficient. Použití Nikolského-Eisenmanovy rovnice pro výpočet koeficientů selektivity naráží na problémy, když $z_i \neq z_j$. V tomto případě je rovnice nekonzistentní a záměna indexů i a j

nedává stejné analytické vyjádření a záleží na tom, který z uvažovaných iontů považujeme za primární. Byl vypracován nový formalismus, který bere ohled na rozdílný náboj. Nikolského-Eisenmanova rovnice je potom nahrazena rovnicí [4]:

$$E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln(a_i(ij) + (K_{ij}^{pot})^{z_j/z_i} a_i(i)^{1-(z_j/z_i)} a_j(ij)). \quad (8)$$

Pro ionty stejného náboje se tato rovnice redukuje na Nikolského-Eisenmanovu rovnici. Když je interference relativně malá (cca 10%), rovnice (8) může být aproximována rovnicí:

$$E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln(a_i(ij) + (K_{ij}^{pot})^{z_j/z_i} a_i(ij)^{1-(z_j/z_i)} a_j(ij)). \quad (9)$$

2.1.2 Experimentální měření koeficientů selektivity

Komise IUPAC z roku 1976 doporučuje použití dvou různých přístupů pro měření koeficientů selektivity [102]. Jsou to:

1. Metoda pro měření K_{ij}^{pot} ve smíšených roztocích (Mixed solution method)

- *Aktivita interferujícího iontu je konstantní (Fixed interference method (FIM))*

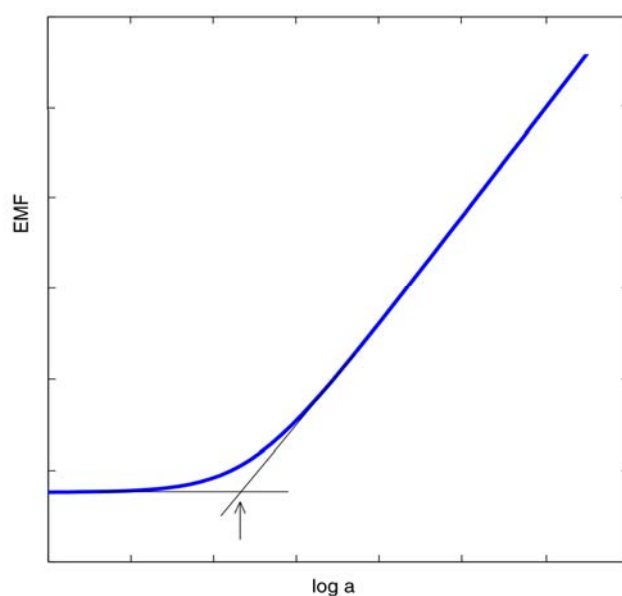
Metoda je založena na měření elektromotorické síly galvanického článku (obr.1 B) pro roztok, kde je konstantní aktivita interferujícího iontu a_j a mění se aktivita primárního iontu a_i . Naměřené hodnoty emf jsou zobrazovány v závislosti na logaritmu aktivity primárního iontu. Průsečík extrapolovaných lineárních částí křivky (obr. 2) udává hodnotu a_i , která je následně použita do vztahu pro výpočet koeficientu selektivity K_{ij}^{pot} z rovnice:

$$K_{ij}^{pot} = \frac{a_i}{(a_j)^{z_i/z_j}}. \quad (10)$$

- *Aktivita primárního iontu je konstantní (Fixed primary ion method)*

V této metodě se měří emf pro konstantní aktivitu primárního iontu a_i a mění se aktivita interferujícího iontu a_j . Naměřené hodnoty emf se zobrazují v závislosti na logaritmu aktivity interferujícího iontu. Průsečík extrapolovaných lineárních částí křivky udává hodnotu a_i , která se použije do vztahu pro výpočet K_{ij}^{pot} :

$$K_{ij}^{pot} = \frac{a_i}{(a_j)^{z_i/z_j}}$$



Obr. 2 Měření koeficientů selektivity podle FIM. Šipka ukazuje hodnotu a_i .

- *Metoda měření emf ve dvou roztocích (Two solution method)*

Touto metodou měříme emf v roztoku primárního iontu - E_i a v roztoku směsi obsahující jak primární tak interferující ionty - E_{i+j} . K_{ij}^{pot} lze potom vypočítat z rovnice:

$$K_{ij}^{pot} = \frac{a_i (e^{\Delta E z_i F / RT} - 1)}{(a_j)^{z_i/z_j}}, \quad (11)$$

kde $\Delta E = E_{i+j} - E_i$.

2. Metoda pro měření K_{ij}^{pot} v roztocích s jedním iontem (Separate solution method) (obr. 3)

- Pro $a_i = a_j$

V této metodě se měří emf pro dva rozdílné roztoky, kde jeden obsahuje ionty i s aktivitou a_i a druhý ionty j s aktivitou a_j , přičemž $a_i = a_j$. K_{ij}^{pot} potom spočítáme ze vztahu:

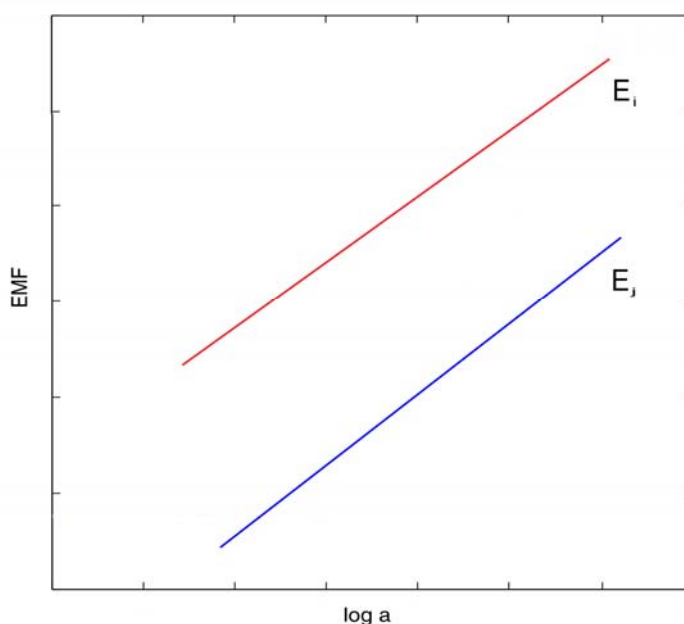
$$K_{ij}^{pot} = a_i^{(1-z_i/z_j)} e^{(E_j - E_i)z_i F / RT} \quad (12)$$

kde E_i a E_j jsou naměřené emf pro aktivitu jednotlivých iontů.

- Pro $E_i = E_j$

Měří se separátně aktivity iontů i a j , které odpovídají stejnému emf. K_{ij}^{pot} potom vypočítáme podle vztahu:

$$K_{ij}^{pot} = \frac{a_i}{(a_j)^{z_i/z_j}}$$



Obr. 3 Určení koeficientů selektivity podle SSM.

Použití vztahů pro výpočet K_{ij}^{pot} podle zmíněných metod je omezen jen pro elektrody s Nernstovskou odezvou pro primární a zároveň i pro interferující ion. Pokud

tato podmínka není splněna, liší se hodnoty K_{ij}^{pot} v závislosti na konkrétní použité membráně, experimentálních podmínkách, použití předchozích roztoků – tzv. „memory effect“, rychlosti míchání vzorku atd. [4]. Výpočet K_{ij}^{pot} podle SSM může být ovlivněn i vyplavováním primárního iontu z membrány při měřeních se slabě interferujícími ionty [6]. Proto pro výpočet K_{ij}^{pot} autoři Bakker a spol. (2000) doporučují použít co nejvyšší možné koncentrace interferujícího iontu, případně použít elektrodu bez předchozího kontaktu s primárním iontem.

3. Metoda dosažení stejného potenciálového rozdílu (Matched potential Method)

V této metodě se do referenčního roztoku o aktivitě iontu a_i přidává známá aktivita primárního iontu a'_i a zaznamená se potenciálový rozdíl. V dalším experimentu se do referenčního roztoku postupně přidává interferující ion a_j , až se dosáhne stejný potenciálový rozdíl (ΔE). Potom:

$$k_{ij}^{MPM} = \frac{a_i - a'_i}{a_j}, \quad (13)$$

kde k_{ij}^{MPM} je selektivitní faktor. Výpočet hodnoty k_{ij}^{MPM} nezávisí na Nikolského-Eisenmanovy rovnici, čím by se měly eliminovat všechny nevýhody, které s sebou přináší použití semiempirické Nikolského-Eisenmanovy rovnice. Tuto metodu je možné použít i v případě, že elektroda nemá Nernstovskou odezvu. Je však nutno zdůraznit, že hodnota k_{ij}^{MPM} na rozdíl od K_{ij}^{pot} všeobecně závisí na experimentálních podmínkách [6]. Když má elektroda Nernstovskou odpověď pro primární i interferující ion, potom jsou hodnoty k_{ij}^{MPM} a K_{ij}^{pot} porovnatelné pod podmínkou, že primární i interferující ion má stejný náboj. Pokud nejsou splněny tyto podmínky, hodnota k_{ij}^{MPM} může být různá v závislosti na použité membráně a na experimentálních podmínkách. Proto se musí tyto podmínky uvádět spolu s hodnotami k_{ij}^{MPM} . V opačném případě by hodnoty k_{ij}^{MPM} ztrácely smysl.

2.1.3 Detekční limit iontově-selektivních elektrod

Detekční limit iontově-selektivních elektrod je oblast aktivit primárního iontu, kde elektroda začíná ztrácet citlivost k primárnímu iontu a tím ztrácí Nernstovskou odpověď (obr. 4). Je definován jako průsečík dvou lineárních úseků kalibrační křivky.

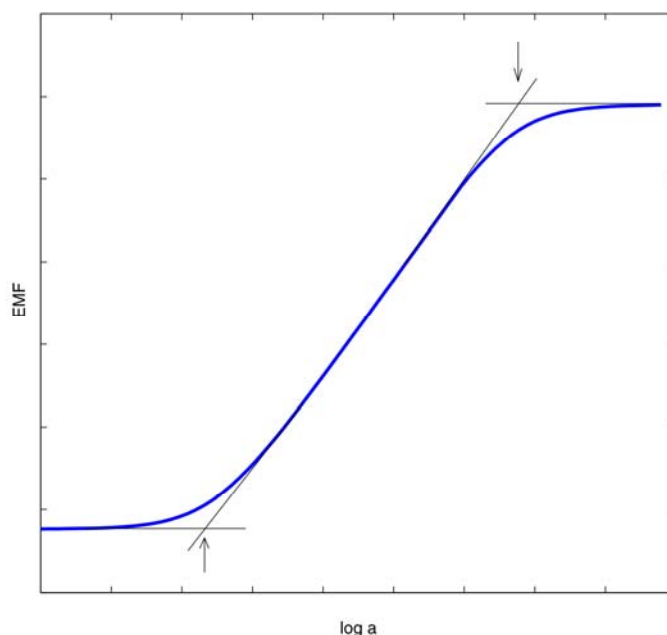
Dolní detekční limit může být způsoben:

1. změnou aktivity vzorku v blízkosti rozhraní membrána/vzorek. Tato změna je nejčastěji způsobena vyplavováním primárního iontu do vzorku a tím se vytváří nenulová aktivita primárního iontu na rozhraní membrána/vzorek;
2. přítomností interferujících iontů. V tomto případě interferující ionty kompetují s primárním iontem a detekční limit je dán selektivitou senzoru.

Horní detekční limit, např. u kationově-selektivních elektrod s ionoforem a přídavkem lipofilního anionu, je určen koncentrací primárního iontu, kde dochází ke ztrátě permselectivity. U těchto elektrod je způsobena průnikem primárních kationů a interferujících anionů do iontově-selektivní membrány. Membrána v tomto případě odpovídá na aniony, protože membrána obsahuje komplexy ionofóru a primárního iontu (všechny molekuly ionofóru jsou v komplexu), lipofilní anion a aniony, které prošly do membrány spolu s primárním iontem. Toto nenastává u elektrod, které obsahují jenom lipofilní kationový iontoměnič, protože není přítomen ionofor, kterého komplex by hrál úlohu anionového iontoměniče [4].

Měřicí rozsah elektrody je definován jako poměr aktivit horního a dolního detekčního limitu (obr. 4). Přibližně odpovídá oblasti, kde má elektroda Nernstovskou odpověď.

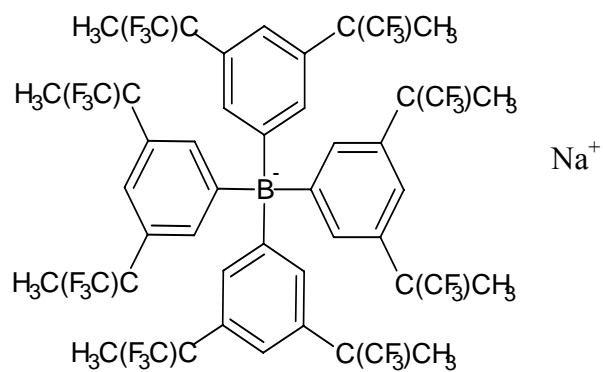
Doba odezvy elektrody je podle doporučení IUPAC definována jako časový interval mezi dvěma okamžiky, kdy iontově-selektivní elektroda a referenční elektroda přijdou do kontaktu se sledovaným vzorkem a prvním okamžikem, kdy potenciál dosahuje ustálené hodnoty v rozmezí 1 mV (nebo dosáhne 90% konečné hodnoty). Pro systémy s driftem je druhý okamžik určen když $\Delta E/\Delta t$ je rovna limitní hodnotě [19].



Obr. 4 Určení horního a dolního detekčního limitu iontově-selektivní elektrody. Šipky ukazují horní a dolní detekční limit.

V současnosti se mnoho autorů zaměřuje na zlepšování parametrů citlivých membrán - selektivitu, pracovní rozsah, detekční limit, optimalizaci složení a přípravu membrán, např. změnou zastoupení obsahu PVC, použitím různých typů změkčovačů, přidavků lipofilních anionů k membránám se zabudovaným ionoforem, přípravou nových typů syntetických ionoforů [41, 67, 68]. V případě iontově-selektivních elektrod se zabudovaným ionoforem má na selektivitu elektrody vliv hlavně chemické vlastnosti ionoforu – t.j. jeho schopnost tvořit komplexy s primárním iontem. Přítomnost lipofilního anionu a jeho lipofilicita může výrazně zvýšit selektivitu elektrody s nenabitými ionofory a také snížit elektrický odpor membrány. Tetrafenylboritany se staly nejčastěji používanými lipofilními aditivami. Jejich chemická stabilita je omezena hlavně v přítomnosti kyselin, oxidantů a světla. Tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)-fenyl] boritan sodný (NaHFPB) (obr. 5) a tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)fenyl] boritan draselný jsou pro svojí chemickou stabilitu a lipofilicitu nejvhodnějšími anionovými aditivami [7]. Také vlastnosti změkčovače, který v citlivé membráně hraje roli rozpouštědla a zabezpečuje pohyblivost složek PVC membrány, výrazně ovlivňují selektivitu, měřící rozsah a odpor elektrod. Například

zvýšením polárnosti změkčovače se může zvýšit selektivita vůči dvoumocným kationům.



Obr. 5 Molekulová struktura tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)-fenyl]boritanu sodného

2.2 METODY MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU

Membránový potenciál hraje důležitou roli pro normální funkci buňky, např. při přenosu nervového vzruchu nebo při tvorbě energie v procesu oxidativní fosforylace a aktivního transportu látek v mitochondriích.

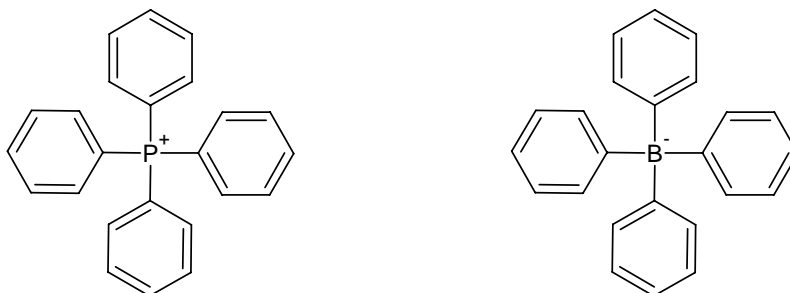
Membránový potenciál plazmatické membrány je možné měřit přímo prostřednictvím mikroelektrod jen u velkých buněk (např. axón sépie). U organel a malých buněk je nutné tento potenciál měřit nepřímými metodami. Tyto metody využívají lipofilní fluorescenčně značené sondy (rhodamin 123 (Rh123), tetrametylrhodamin metyl ester (TMRM), 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolkarbocyanin jodid (JC-1)) nebo jiné lipofilní ionty schopné pronikat buněčnou membránou (dibenzylmethyl amoniový kation (DDA⁺), lipofilní fosfóniové kationy – metyltrifenylfosfoniový kation (TPMP⁺), tetraphenylphosphoniový kation (TPP⁺); tetrafenyl boritanový anion (TPB⁻)) (obr. 6, obr. 7), které mohou být radioaktivně značeny [25, 107] nebo jejich koncentrace může být detekována pomocí iontově-selektivních elektrod.

Schopnost malých nabitých lipofilních molekul pasivně pronikat buněčnou membránou a rozdělit se mezi médiem a intracelulárním prostředím (popřípadě prostředím uvnitř organely) v důsledku přítomnosti membránového potenciálu ($\Delta\psi$) popsali už na začátku 70-tých let Skulachev a spol. [44, 71]. Když byla membrána hyperpolarizována (záporný náboj uvnitř organely), kladně nabitě lipofilní ionty (TPP⁺, DDA⁺) byly elektroforeticky transportovány do buněk/organel, a tak koncentrace lipofilních kationů v médiu klesala. V případě organely s kladným nábojem uvnitř, do organely byly transportovány lipofilní aniony.

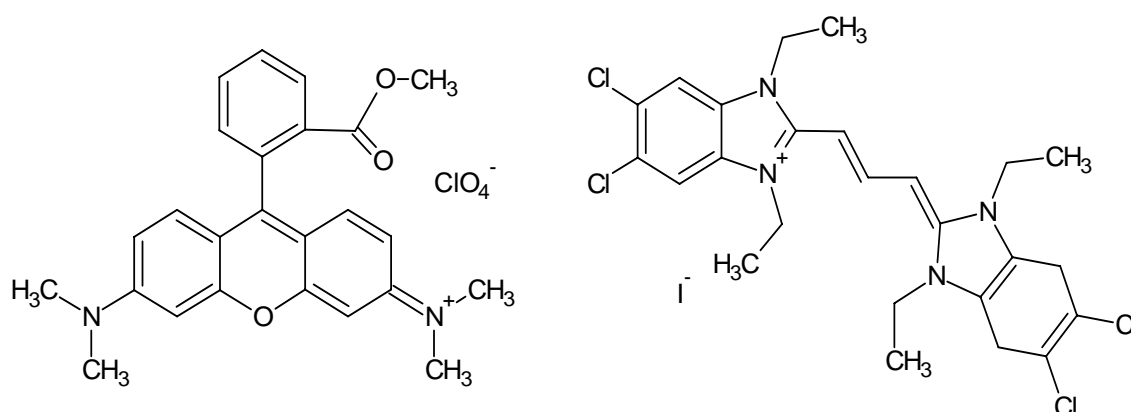
Z úbytku lipofilního kationu z média lze přímo vypočítat hodnotu membránového potenciálu na základě rozdělení iontů mezi médiem a intracelulárním prostředím (případně uvnitř organely), když zjistíme množství lipofilního kationu, které se akumulovalo v buňkách/mitochondriích. Rozdělení iontů v závislosti na $\Delta\psi$ popisuje Nernstova rovnice:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{out}}{a_{in}}, \quad (14)$$

kde a_{out} je aktivita lipofilního iontu v médiu a a_{in} v intracelulárním prostředí (uvnitř organely). Skulachev a spol. pro měření membránového potenciálu mitochondriální membrány využívali DDA^+ , který pro svůj vstup buněčnou membránou vyžaduje



Obr. 6 Molekulová struktura lipofilních iontů: TPP^+ , TPB^- .



Obr. 7 Molekulová struktura některých fluorescenčních indikátorů membránového potenciálu: TMRM, JC-1.

přítomnost lipofilního anionu tetrafenyl boritanu. Později se soustředili na použití metyltrifenylfosfóniového kationu. V tomto případě už nebylo nutné, aby byl v médiu přítomný TPB^- . Také lipofilní fosfóniový kation - TPP^+ byl úspěšně použit pro měření mitochondriálního membránového potenciálu autory Kamo a spol. (1979) [57]. Použití TPP^+ má 2 výhody: vstup TPP^+ biologickými membránami je asi 15-krát rychlejší než DDA^+ a nevyžaduje přítomnost TPB^- v médiu.

Lipofilní fosfoniové kationy jsou schopny pronikat přes fosfolipidové dvouvrstvy v důsledku nižší aktivační energie pro průchod z vodného do lipofilního prostředí membrány než je to u hydrofilních kationů. Aktivační energie má příspěvky z elektrostatických interakcí a hydrofobních sil. Hlavní komponentou elektrostatické energie je Bornova energie, tj. energie nutná na odstranění solvatačních molekul vody z kationu při transportu z vodného prostředí do lipidového jádra membrány [93]. Je dána vztahem:

$$W_B = \frac{q^2}{8\pi\epsilon_0 r} \left(\frac{1}{\epsilon_1} - \frac{1}{\epsilon_2} \right), \quad (15)$$

kde q je elektrický náboj/mol kationu, ϵ_0 je permitivita vakua, r je iontový poloměr, ϵ_1 je dielektrická konstanta uvnitř membrány (~ 2) a ϵ_2 je dielektrická konstanta vody (~ 80) [52].

Z tohoto vztahu vyplývá, že Bornova energie je nepřímo úměrná iontovému poloměru. Je to v důsledku oslabené solvatace kationu, jehož náboj je rozložen na větší plochu a tím má i menší elektrické pole, aby došlo k polarizaci molekul vody. Proto je průchod většího kationu TPP^+ (4.2 Å) pravděpodobnější než průchod malého kationu Na^+ (~ 1 Å). Další komponenty elektrostatické energie, kterých příspěvek je mnohem menší než příspěvek Bornovy energie, jsou dipólová energie a energie související s elektrostatickými silami na rozhraní prostředí s různou dielektrickou konstantou. Dipolová energie vysvětluje proč lipofilní aniony prochází fosfolipidovou dvouvrstvou rychleji než lipofilní kationy při stejné hydrofobitě a iontovému průměru [93].

Lipofilní fosfoniové kationy i fluorescenční indikátory membránového potenciálu mají také schopnost se vázat na hydrofobní straně rozhraní vodního prostředí a membrány v podobě monovrstvy. Nеспецифická vazba lipofilních kationů do membrán způsobuje nadschodnocení membránového potenciálu vypočítaného přímo z Nernstovy rovnice (14). Proto je nutné tuto rovnici korigovat. Množství navázaného kationu závisí na koncentraci a proto i na přítomném membránovém potenciálu, který u mitochondrií může nabývat hodnotu 140 - 180 mV (podle Nernstovy rovnice může být v matrix mitochondrie až sto-násobně vyšší koncentrace kationu v důsledku malého objemu matrix mitochondrie). Z tohoto důvodu se zavedly rozdělovací koeficienty pro obě strany vnitřní mitochondriální membrány. Pro některé lipofilní kationy (etidium^+ , TPP^+ , TPMP^+ , tetrafenyl arzeniový kation (TPA^+), TMRM , TMRE , Rh123) byly změřeny

rozdělovací koeficienty, které popisují vazbu do vnitřní mitochondriální membrány (Tab. 1). Hodnota K'_0 udává rozdělovací koeficient mezi vnějším médiem a cytosolickou stranou vnitřní mitochondriální membrány a K'_i rozdělovací koeficient mezi matrix a matrixovou stranou vnitřní mitochondriální membrány.

	K'_i ($\mu\text{l}/\text{mg}$ proteinu)	K'_0 ($\mu\text{l}/\text{mg}$ proteinu)
TPMP⁺ (25 °C)	2,4	5,0
TPP⁺ (25 °C)	7,9	14,3
TPA⁺ (25 °C)	14,3	-
Etidium⁺ (25 °C)	23,3	39,1
TMRM (28 °C)	33	88
TMRE (28 °C)	60	129
Rh123 (28 °C)	37	109

Tab. 1 Rozdělovací koeficienty K'_i a K'_0 pro jednotlivé lipofilní kationy [94, 98].

Mitochondriální membránový potenciál s ohledem na vazbu lipofilních kationů do vnitřní mitochondriální membrány můžeme vypočítat:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{zF} \ln \left[\frac{(R_C V_0 - K'_0)}{(V_i + K'_i)} \right] \quad (16)$$

kde V_0 je objem média, V_i je objem matrix a R_C je poměr obsahu kationů v matrix a v médiu [94].

Z fluorescenčně značených sond se pro monitorování membránového potenciálu nejčastěji používají deriváty rodaminu - rodamin 123 (Rh123), tetrametylrodamin metyl ester (TMRM) a tetrametylrodamin etyl ester (TMRE) (obr. 7). Akumulace těchto molekul v mitochondriích v důsledku membránového potenciálu způsobí posun absorpčního a emisního spektra k červené oblasti (pro energizované a rozpražené mitochondrie byly hodnoty excitačních vlnových délek 546 a 573 nm, když bylo použito TMRM). Po překročení kritické hodnoty koncentrace derivátů rodaminu uvnitř

mitochondrie dochází k tvorbě nefluorescenčních agregátů a zhášení fluorescence (tzv. quench mode) [98]. Prahová koncentrace pro agregaci je pro většinu fluorescenčních sond v rozmezí 1-100 μM . Měření membránového potenciálu může být uskutečňováno v suspenzi mitochondrií nebo buněk standardní fluorimetrií. Depolarizací mitochondriální membrány dochází ke zvýšení fluorescence v médiu. Nevýhodou použití derivátů rodaminu jako indikátorů hodnoty mitochondriálního membránového potenciálu je skutečnost, že při vyšší koncentraci inhibují mitochondriální respiraci. Největší vliv na respiraci má TMRE, menší Rh123 a TMRM do koncentrace 0,25 μM nemělo žádný vliv na funkci dýchacího řetězce [98].

Průtokovou cytometrií a fluorescenční mikroskopií je možné měřit membránový potenciál i při nízké koncentraci fluorescenční sondy v módu, kde nedochází ke zhasínání (tzv. non-quench mode) fluorescence a mitochondriální depolarizace se projeví jako pokles intenzity fluorescence. Měření membránového potenciálu průtokovou cytometrií s využitím fluorescenčních sond se uplatní hlavně v případě, kdy nás zajímá membránový potenciál heterogenní populace buněk a chceme hodnotit membránový potenciál na úrovni jednotlivé buňky [30].

Pro hodnocení membránového potenciálu a studování vlivu látek ovlivňujících membránový potenciál v homogenní populaci buněk (izolovaných mitochondrií) je vhodná metoda, která pro detekci lipofilních kationů využívá iontově-selektivní elektrody. Poskytuje také hodnocení dynamiky změn membránového potenciálu v reálném čase. Tato metoda byla použita na měření mitochondriálního membránového potenciálu již v 70-tých letech. Maratusgu a spol. (1977) [75] vyvinuli iontově-selektivní elektrodu citlivou na přítomnost DDA^+ v médiu. Tato elektroda pro detekci DDA^+ obsahovala tekutou citlivou membránu uzavřenou dialyzační membránou. V tekuté membráně byly přítomny ionty TPB^- a DDA^+ . Smíšením roztoků 10^{-3} M DDA^+ a TPB^- vznikla bílá sraženina. Přidáním dichloretanu a následným mícháním sraženina přešla do organické fáze, a byla následně oddělena. Dichloretanový extrakt byl poté použit jako tekutý iontoměnič. Elektroda měla Nernstovskou odezvu od $3 \cdot 10^{-6}$ M DDA^+ . Kvůli snadnější přípravě a aby nedocházelo k prostupu DDA^+ do média se místo kapalného iontoměniče začaly používat membrány s PVC matricí a se zabudovaným DDA^+ a TPB^- [99]. Vyrobené elektrody měly přibližně stejný měřicí rozsah a koeficienty selektivity pro interferující ionty, ale s použitím PVC-inertní matrice se snížila doba odezvy z 10 - 15 s na 2 - 3 s. S využíváním TPP^+ pro měření mitochondriálního membránového potenciálu byla zavedena iontově-selektivní

elektroda citlivá na TPP^+ [57]. Citlivá membrána byla vyrobena smícháním iontoměničce TPB^- rozpuštěného v tetrahydrofuranu se směsí PVC a změkčovače dioktylfthalátu rozpuštěného také v tetrahydrofuranu. Tato směs se nechala odpařit při laboratorní teplotě na Petriho miskách a vzniklá membrána se nalepila na elektrodu. Kamo a spol. [57] uvádí směrnici kalibrační křivky 59 mV na změnu koncentrace o řád až do koncentrace přibližně $5 \cdot 10^{-7}$ M TPP^+ a hodnoty K_{ij}^{pot} menší než 10^{-6} . Tyto hodnoty jsou však teoretickými hodnotami, které byly vypočteny z hodnot pro DDA^+ -selektivní elektrodu [99].

Dnes jsou TPP^+ -selektivní elektrody také komerčně vyráběny např. firmou World Precision Instruments (www.wpiinc.com). Elektrody mají sklon kalibrační křivky nejméně 54 mV na řádovou změnu koncentrace v koncentračním rozsahu 0.1 M - $10^{-4,5}$ M TPP^+ . Výrobce uvádí koeficient selektivity jen pro K^+ (10^{-6}) [114].

Některé iontově-selektivní elektrody vykazují nízkou selektivitu vůči TPP^+ např. komerčně dostupná Ca^{2+} -selektivní mikroelektroda s neutrálním ionoforem ETH 1001. Tyto elektrody byly také úspěšně použity pro měření mitochondriálního membránového potenciálu [78].

Iontově-selektivní elektrody citlivé na TPP^+ se nejčastěji využívají pro hodnocení membránového potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně a též je lze využít i k měření membránového potenciálu buněčné membrány u bakterií [58, 77, 85]. Tato metoda má výhodu kromě jednoduchosti výpočtu membránového potenciálu (u izolovaných mitochondrií) a sledování dynamiky změn membránového potenciálu také malou interferenci přidávaných látek s citlivou membránou.

Lipofilní kationy se často používají ke kvalitativnímu hodnocení membránového potenciálu – sledovaná veličina vypovídá jen o tom, jestli je membrána depolarizovaná. Kvantitativní hodnocení naráží hlavně na problém určení objemu mitochondrií. Pro izolované mitochondrie byl stanoven objem mitochondrií k množství mitochondriálního proteinu jako 1 μ l/mg [49]. Tento údaj se přímo použije do vztahu pro výpočet mitochondriálního membránového potenciálu pomocí TPP^+ -selektivních elektrod, který je korigován na nesespecifickou vazbu TPP^+ do mitochondriální membrány a na změnu objemu po přidání mitochondrií a substrátu:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{V_0[TPP^+]_0 / [TPP^+]_t - V_t - K_0P}{V_mP + K_iP}, \quad (17)$$

kde V_0 je objem média před přidáním mitochondrií, V_t je objem média v čase t , V_m je objem matrix mitochondrií ($\mu\text{l}/\text{mg}$ proteinu), $[TPP^+]_0$ a $[TPP^+]_t$ jsou koncentrace TPP^+ před přidáním mitochondrií a v čase t . P je obsah mitochondriálního proteinu v médiu (mg), K_0 ($14,3 \mu\text{l}/\text{mg}$) a K_t ($7,9 \mu\text{l}/\text{mg}$) jsou rozdělovací koeficienty pro vazbu do vnější a vnitřní strany mitochondriální membrány [111]. Pro kvantitativní stanovení hodnoty membránového potenciálu pomocí fluorescenčních sond v quench módu je nutné provést kalibraci závislosti intenzity fluorescence a membránového potenciálu. Pro přesnější hodnocení je potřeba také provést propočtení na rychlost zhasínání fluorescence [8]. Membránový potenciál určíme z Nernstovy rovnice pomocí změny koncentrace K^+ v médiu v přítomnosti mitochondrií s přidavkem valinomycinu. Koncentrace K^+ uvnitř mitochondrie je udávána přibližně 15 mM [110].

V současnosti se zaměřuje pozornost na studie mitochondriálních funkcí *in situ*. Nízkou koncentrací digitoninu ($0,005\%$) je možné selektivně permeabilizovat plazmatickou membránu bez změn permeability vnitřní mitochondriální membrány, membrány endoplazmatického retikula a bez porušení cytoskeletální sítě [37]. Digitonin je steroidní glykosid, který zvyšuje permeabilitu buněk pro různé anorganické ionty a metabolity v důsledku jeho vazby na cholesterol a jiné β -hydroxysteroly přítomné v plazmatické membráně. U eukaryotických buněk je poměr cholesterolu a fosfolipidů plazmatické membrány mnohem větší než u intracelulárních membrán a proto je možné pomocí digitoninu selektivně permeabilizovat plazmatickou membránu. Pokud nás zajímá hodnota mitochondriálního potenciálu, permeabilizací plazmatické membrány zabezpečíme disipaci tohoto potenciálu. Tímto je také umožněn vstup některých substrátů a inhibitorů oxidativní fosforylace, které nejsou schopny procházet plazmatickou membránou. Aby bylo možné kvantitativně stanovit hodnotu mitochondriálního membránového potenciálu u permeabilizovaných buněk, je nutné v těchto buňkách změřit objem mitochondrií. Fluorescenčními sondami (TMRM) v non-quench módu lze průtokovou cytometrií zjistit objem mitochondrií pomocí fluorescenční značky selektivní pro mitochondrie - MitoTracker[®] Green. Tato značka vykazuje fluorescenci, pokud se akumuluje v mitochondriích a to nezávisle na membránovém potenciálu [50]. Potom je možné vyjádřit hodnotu membránového potenciálu mezi dvěma stavy ($\Delta\psi_{12} = \Delta\psi_1 - \Delta\psi_2$) jako:

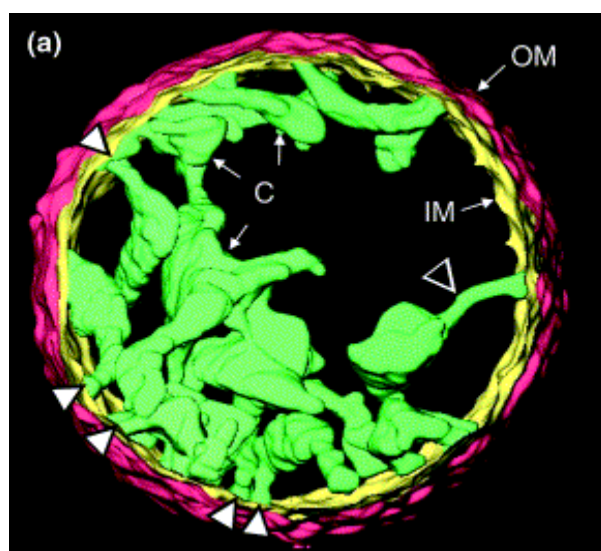
$$\Delta\psi_{12} = 58,7 \log(I_{\psi_2} I_{M1} / I_{M2} I_{\psi_1}), \quad (18)$$

kde I_{M1} a I_{M2} intenzity jsou fluorescence sondy MitoTracker[®] Green buněk, které mají mitochondriální membránový potenciál $\Delta\psi_1$ a $\Delta\psi_2$ a I_{ψ_1} a I_{ψ_2} jsou intenzity fluorescence TMRM pro buňky s mitochondriálním membránovým potenciálem $\Delta\psi_1$ a $\Delta\psi_2$ [88].

Kromě lipofilních fosfoniových kationů a fluorescenčně značených sond na měření membránového potenciálu se používají lipofilní kationy také pro vizualizaci mitochondrií v buňkách (Janus Green, JC-1, MitoTracker[®] Green).

2.3 MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL VNITŘNÍ MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNY

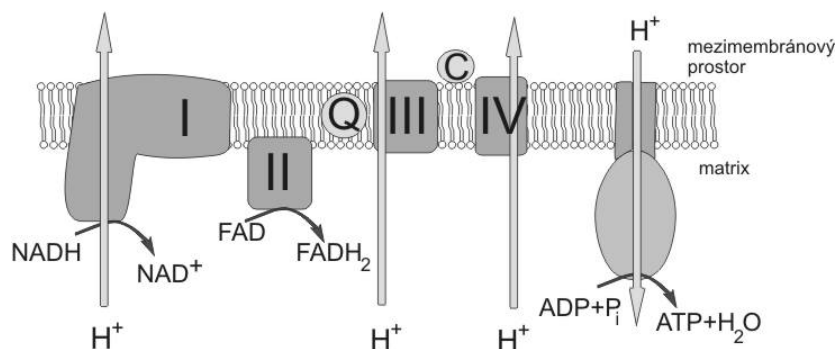
Mitochondrie jsou hlavními producenty energie v eukaryotických buňkách. Jejich tvar v buňce je proměnlivý, liší se podle typu tkáně a jestli se jedná o izolované mitochondrie nebo mitochondrie *in situ*. U hepatocytů a fibroblastů jsou to podlouhlé útvary dlouhé 3-4 μm a široké přibližně 1 μm . Mají vnější a vnitřní membránu a mezi nimi je tzv. mezimembránový prostor. Vnitřní membrána tvoří vchlípeniny do matrix mitochondrie – tzv. kristy; vnitřní část mitochondrie označujeme jako matrix. Množství a tvar krist je také tkáňově-specifický (např. mitochondrie srdečního svalu mají větší plochu krist než jaterní mitochondrie). 3D modely získány z dat elektronové mikroskopie ukazují, že kristy izolovaných mitochondrií a mitochondrií *in situ* mají tabulární strukturu, s množstvím úzkých spojení k perifernímu povrchu vnitřní mitochondriální membrány [101] (obr.8). V některých buňkách mitochondrie fúzí a vytvářejí retikulum, v jiných, např. nervových buňkách tvoří pohyblivá filamenta. Ukazuje se, že mitochondrie jsou také v kontaktu s jinými buněčnými strukturami. Například kontakt s endoplazmatickým retikulem může napomáhat k rychlé výměně vápníku mezi mitochondriemi a endoplazmatickým retikulem.



Obr. 8 Struktura mitochondrií zobrazena „elektronmikroskopickou tomografií“ [101].

Vnější mitochondriální membrána je permeabilní pro většinu malých molekul a iontů. Nachází se v ní membránové proteiny – poriny (také označovány jako potenciálově-závislý aniontový kanál – VDAC), které tvoří póry propustné pro molekuly s molekulovou hmotností menší než 10 kDa. Vnitřní mitochondriální membrána je nepropustná téměř pro všechny ionty a polární molekuly. Vnitřní mitochondriální membrána obsahuje enzymy dýchacího řetězce, ATP-syntasu a transportní proteiny pro transport mnohých metabolitů. V matrix mitochondrie se nachází enzymy citrátového cyklu kromě sukcinátdehydrogenasy, která je vázaná ve vnitřní mitochondriální membráně (komplex II). Kromě důležitých funkcí v procesu tvorby energie hrají mitochondrie také významnou úlohu v regulaci intracelulárního vápníku [56, 81] a v neposlední řadě v programované smrti buňky – apoptóze. V mezimembránovém prostoru se nacházejí proapoptotické mediátory a po jejich uvolnění do cytosolu se spouští kaskáda reakcí, které vedou k aktivaci exekučních kaspas a apoptóze.

Na vnitřní mitochondriální membráně jsou jako integrální membránové komponenty lokalizované enzymy dýchacího řetězce (komplex I, II, III, IV) a mitochondriální ATP-syntasa (komplex V) (obr. 9). Během přenosu elektronů přes komplexy I, II, III, IV dochází k transportu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu z intramitochondriálního prostoru a tím k tvorbě protonového gradientu. ATP-syntáza využívá energii tohoto gradientu pro syntézu ATP. Komplex I (NADH-dehydrogenasa) přijímá redukované ekvivalenty od NADH-dependentních dehydrogenas a přenáší je na koenzym Q. Prvním krokem je navázání NADH a přenos dvou elektronů na FMN a následnou tvorbou FMNH₂. Elektrony jsou potom přeneseny přes Fe-S proteiny na koenzym Q. Redukovaný koenzym Q (QH₂) předá e⁻ a H⁺ komplexu III, který katalyzuje přenos elektronů z redukovaného koenzymu Q na cytochrom *c*, přičemž v cytochromu dochází k redukci kationtu železa Fe³⁺ na Fe²⁺. Komplex IV katalyzuje přenos elektronů z cytochromu *c* na kyslík za vzniku aniontu kyslíku O²⁻. Redukované ekvivalenty dodávají koenzymu Q kromě komplexu I i jiné mitochondriální dehydrogenasy, např. sukcinátdehydrogenasa (komplex II) nebo glycerolfosfátdehydrogenasa [82]. Přenos elektronů v dýchacím řetězci se uskutečňuje od redox systémů s nejnižším redox potenciálem k systému s nejvyšším redox potenciálem. Rozdíl potenciálů mezi redoxními páry NAD⁺/NADH a O₂/2H₂O je 1.16 V.



Obr.9 Schématický náčrt dýchacího řetězce

Transport elektronů je spojen se současným transportem protonů z matrix do mezimembránového prostoru a tím vzniká elektrochemický gradient $\Delta\tilde{\mu}_H$ daný vztahem

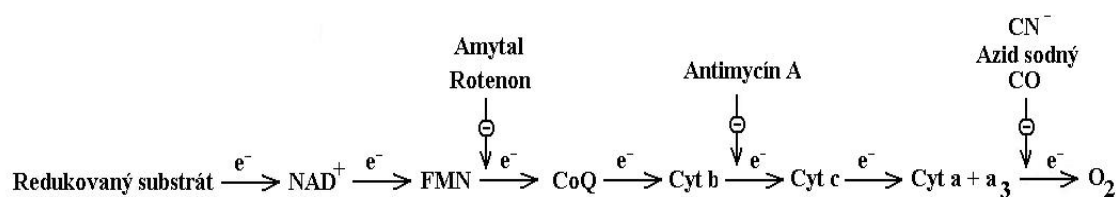
$$\Delta\tilde{\mu}_H = -2,3RT\Delta pH + F\Delta\psi_m, \quad (19)$$

kde $\Delta\psi_m$ je potenciálový rozdíl na membráně a ΔpH je rozdíl pH v matrix a mezimembránovém prostoru [57]. Jeho energie je využívána ATP-syntasou na tvorbu ATP (komplex V). 99% hodnoty $\Delta\tilde{\mu}_H$ je ve formě membránového potenciálu v důsledku pufrovací kapacity mitochondriální matrix. V přítomnosti nabitých iontů jako např. Ca^{2+} nebo K^+ a valinomycinu dochází k disipaci membránového potenciálu a snížení $\Delta\tilde{\mu}_H$. Respirační řetězec odpovídá na snížení $\Delta\tilde{\mu}_H$ zvýšením transportu protonů pro obnovení hodnoty $\Delta\tilde{\mu}_H$. Tím se zvyšuje podíl ΔpH . Nedisociované elektroneutrální slabé kyseliny a báze, které jsou schopny procházet membránou, také mohou ovlivnit relativní příspěvky $\Delta\psi_m$ a ΔpH .

$\Delta\tilde{\mu}_H$ může být určeno nezávislým měřením $\Delta\psi_m$ a ΔpH . Hodnotu $\Delta\psi_m$ je možno měřit distribucí kationů procházejících buněčnými membránami (např. TPP^+) a hodnotu ΔpH určuje akumulace slabých kyselin, které se akumulují v matrix 10-

násobní změnou koncentrace na jednotkovou změnu pH. Aby se zabránilo porušení iontových gradientů, koncentrace látek na měření $\Delta\psi_m$ a ΔpH musí být co nejmenší.

Proces přenosu elektronů v dýchacím řetězci může být inhibován různými látkami, které specificky působí na určitém místě dýchacího řetězce (viz. obr. 10). Rotenon a piericidin jsou inhibitory komplexu I. Antimycin, myxothiazol, stigmatelin inhibují komplex III; CN^- , N_3^- , CO a NO inhibují přenos elektronů přes komplex IV. ATP-syntasa je inhibovatelná oligomycinem.



Obr.10 Místa působení některých inhibitorů v dýchacím řetězci

Některé látky, např. lipofilní slabé kyseliny, jsou schopny přenášet proton přes vnitřní membránu mitochondrie z mezimembránového prostoru do matrix a tím způsobují pokles protonového gradientu bez vzniku ATP. Takovými látkami jsou například dinitrofenol, karbonylkyanid m-chlorofenylhydrazon (CCCP), karbonylkyanid p-trifluoromethoxyfenylhydrazon (FCCP). Tyto látky označujeme jako rozpřahovače. Použitím substrátů dýchacího řetězce, specifických inhibitorů, rozpřahovačů a ionoforů je možné testovat a hodnotit funkci dýchacího řetězce jako celku nebo také jednotlivých enzymů dýchacího řetězce (měřením spotřeby kyslíku nebo membránového potenciálu).

2.4 APOPTÓZA A ÚLOHA „MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE“

Programovaná buněčná smrt – apoptóza je důležitým fyziologickým dějem nezbytným pro normální vývoj a také pro udržení tkáňové homeostázy [1999]. Na rozdíl od nekrózy, apoptóza ve většině případů nevede k indukci zánětlivé reakce. Buňka se smrští, jádro kondenzuje a vznikají apoptotická tělíška. Buňka je poté rozpoznána makrofágy a fagocytována. V současnosti se ale ukazuje, že biochemické a morfologické charakteristiky obou těchto módů (apoptózy a nekrózy) můžeme vidět v jedné buňce a že „klasická“ apoptóza a nekróza jsou extrémny ze širokého spektra programovaných smrtí buňky [89].

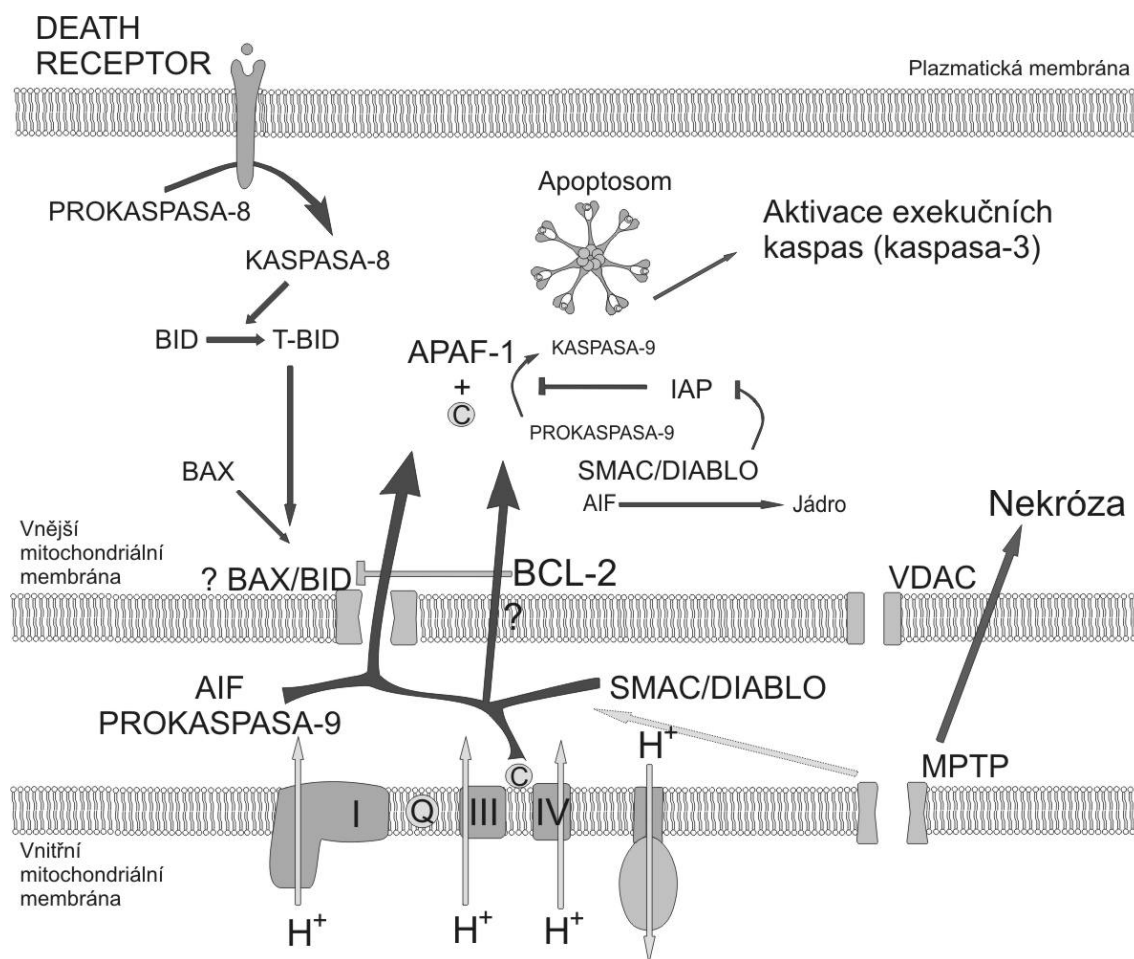
Apoptóza může být spuštěna dvěma způsoby: vnější nebo vnitřní cestou [61]. Vnitřní cesta (mitochondriální) je aktivována v důsledku působení fyzikálních nebo chemických podnětů (UV záření, hypoxie, tepelný šok), poškození DNA, deficit ATP a jiných stresových faktorů. Působení těchto faktorů iniciuje procesy, které vyústí v permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a uvolnění apoptotických mediátorů - cytochromu *c*, Smac/DIABLO, AIF (apoptosis-inducing factor), endonukleasy G. V cytoplazmě cytochrom *c* indukuje oligomerizaci proteinu Apaf-1 (v přítomnosti ATP/dATP) a formuje se tzv. apoptosom s následnou dimerizací a agregací prokaspasy-9, která je tímto aktivována [40]. Aktivovaná kaspasa-9 proteolyticky štěpí prokaspasy (např. prokaspasa-3 a prokaspasa-7) na kaspasy a spouští se reakce, které vedou k apoptóze [43]. Existují 2 hypotézy, podle kterých dochází k uvolnění proapoptotických mediátorů z mezimembránového prostoru:

1. oligomerizací Bax/Bak - proapoptotických členů Bcl-2 rodiny s následnou tvorbou pórů ve vnější mitochondriální membráně;
2. zvýšením permeability vnitřní mitochondriální membrány otevřením nespecifického póru tvořeného proteiny vnitřní a vnější mitochondriální membrány – tzv. „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP).

Není také vyloučeno propojení obou těchto procesů [39], protože proteiny Bcl-2 rodiny působí kromě vnější mitochondriální membrány také v endoplazmatickém retikulu, kde proapoptotické členy napomáhají mobilizaci Ca^{2+} z endoplazmatického retikula v průběhu apoptózy prostřednictvím regulace inositol trifosfátového receptoru [84]. Mobilizovaný Ca^{2+} může poté vést k iniciaci MPT.

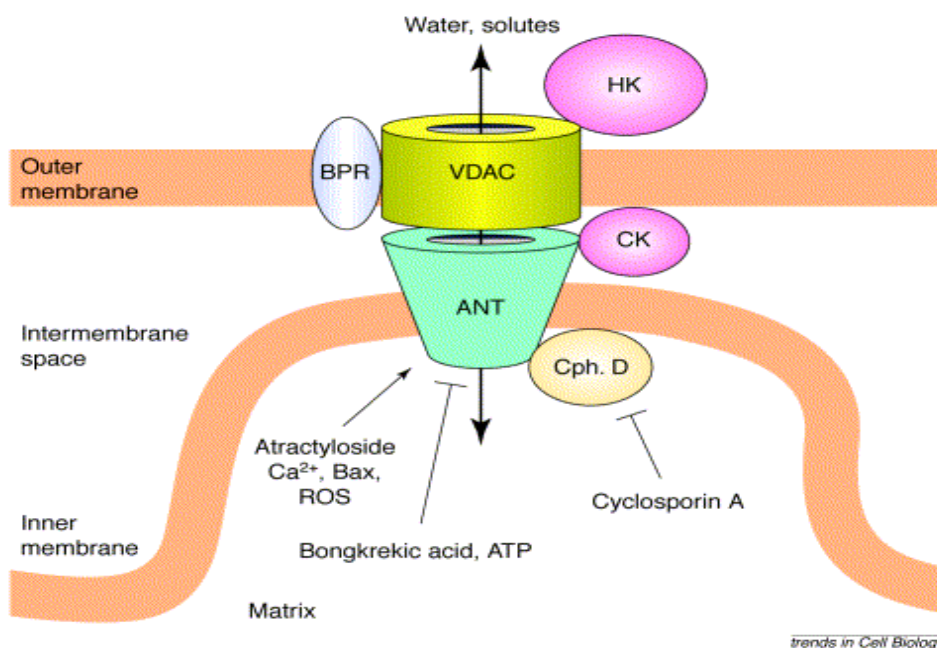
Vnější cesta iniciace apoptózy začíná navázáním „smrtícího“ ligandu (death ligand) na „smrtící“ receptor (death receptor). Smrtící ligandy patří do rodiny TNF (tumor necrosis factor), které zahrnují TNF- α , Fas ligand, TRAIL atd. Vazbou TNF ligandu na TNF receptor dochází k jeho konformační změně a poté formování multiproteinového signálního komplexu – DISC (death-inducing signalling complex) zahrnující prokaspasu-8 a 10 [60]. Substrátem pro DISC jsou prokaspasa-3, -6 a 7, které aktivují další prokaspasy, a Bid (proapoptotický člen Bcl-2 rodiny) [27], který se po štěpení transportuje (t-Bid) do mitochondrie a indukuje vyplavení cytochromu *c*, čím se propojuje vnitřní a vnější cesta iniciace apoptózy (obr. 11).

Uvolnění proapoptotických faktorů z mezimembránového prostoru je také hlavní amplifikační krok v apoptotické signální dráze a je stále otázkou diskuzí. Do popředí v tomto procesu se dostala úloha a složení MPTP, které je doposud nejasné. Otevření tohoto póru je spojeno se zvýšenou permeabilitou mitochondriální membrány (mitochondrial permeability transition (MPT)) pro molekuly s hmotností do ~ 1500 Da [11], které nastává v podmínkách zvýšené koncentrace vápníku a oxidačního stresu. Zvýšení propustnosti mitochondriální membrány má za následek depolarizaci vnitřní mitochondriální membrány a masivní bobtnání mitochondrií v důsledku osmotického tlaku, který vzniká kvůli značné koncentraci proteinů v mitochondriální matrix. Následně dochází k prasknutí vnější mitochondriální membrány. Otevření póru je indukováno a modulováno mnohými faktory, ze kterých jsou nejdůležitějšími oxidační stres, zvýšená koncentrace vápníku, nedostatek adeninových nukleotidů, nárůst koncentrace anorganického fosfátu a také depolarizace vnitřní mitochondriální membrány a zvýšení hodnoty pH. Někteří autoři považují MPT za artefakt, protože ve vhodných podmínkách je tento proces neindukovatelný a závisí ve velké míře na zvolených experimentálních podmínkách (např. složení inkubačního média a jeho pH), použitých substrátech dýchacího řetězce, případně použitých inhibitory a také izolačních protokolech pro izolaci mitochondrií [10].



Obr. 11 Schématické znázornění vnější cesty iniciace apoptózy.

V současnosti existuje několik modelů jak pro samotnou strukturu MPTP, tak i pro proces otevírání tohoto póru a podmínek, za jakých k němu dochází. Mezi kandidáty proteinů, které by tvořily jádro tohoto póru, patří transportér adeninových nukleotidů (ANT) vnitřní mitochondriální membrány, napětově- závislý anionový kanál (VDAC, porin) ve vnější mitochondriální membráně a matrixový protein cyklofilin D (CyP-D). Mnoho proteinů může hrát regulační roli. Jsou to např. kreatinkinasa, VDAC-asociovaná hexokinasa, periferní benzodiazepinový receptor [12], pro-apoptické a anti-apoptické proteiny Bcl-2 rodiny. Otevření MPTP závisí také na pH matrix a potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně. V deenergizovaných mitochondriích je optimální pH pro MPT 7,4 v důsledku protonizace důležitých histidinových zbytků [115]. Navrhovaná struktura MPTP je zobrazena na obr. 12. Přesná struktura tohoto póru je ale stále otázkou diskuzí.

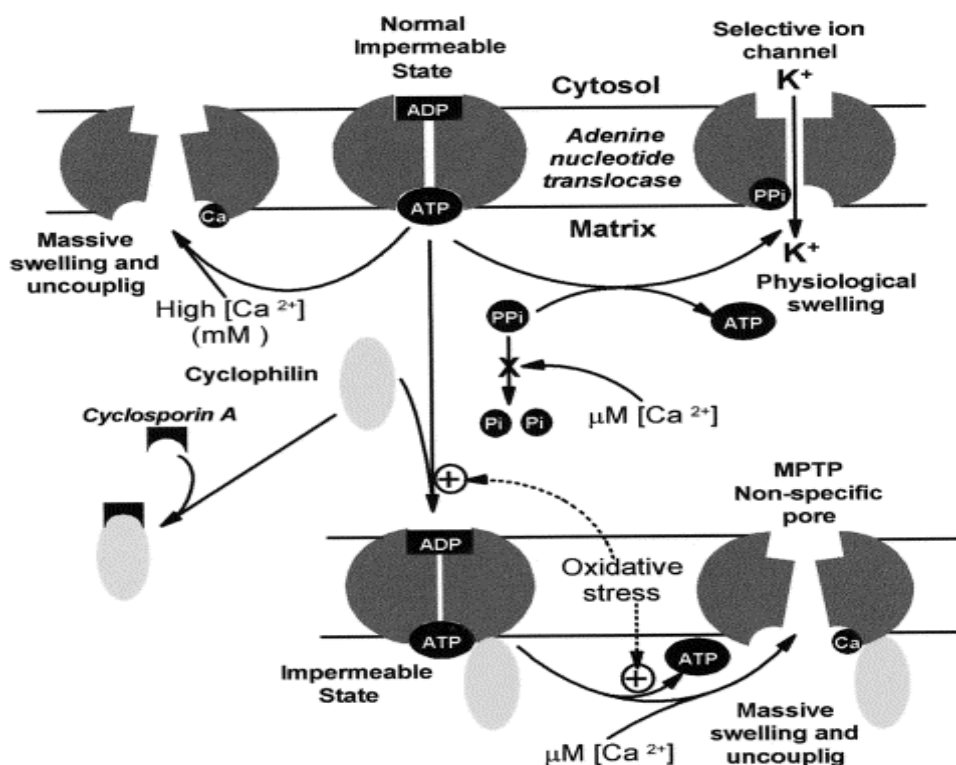


Obr.12 Schéma navrhovaných komponent MPTP: translokátor adeninových nukleotidů (ANT), periferní benzodiazepinový receptor (BPR), kreatin kináza (CK), hexokináza (HK), napěťově-závislý aniontový kanál (VDAC), cyklofilin D (Cph. D). **MPTP aktivátory:** atraktylosid, Ca^{2+} , Bax, reaktivní formy kyslíku (ROS). **Inhibitory:** Cyklosporin A, bongkreková kyselina, ATP [32].

Otevírání MPTP může být aktivováno nebo inhibováno různými faktory. Inhibitory otevírání tohoto póru jsou ADP, ATP (substráty ANT) a bongkreková kyselina, která stabilizuje ANT v „m“ konformaci (obrácené do matrix). Mnoho iontů hraje roli inhibitorů MPTP – např. Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} a protony, jako důsledek své vazby do vazebního místa pro vápník v ANT [112]. Mnohé faktory hlavně oxidační stres a s ním související zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) zvyšují citlivost MPTP pro vápník. Také atraktylosid a karboxyatraktylosid zvyšují pravděpodobnost otevření MPTP stabilizací „c“ konformace ANT (obrácené do strany cytosolu) a tím zvyšují citlivost póru pro vápník. Ireverzibilní otevření MPTP může být indukováno zvýšenou koncentrací anorganického fosfátu prostřednictvím zvýšené tvorby ROS a lipoperoxidace [64, 65]. Modulátory funkce MPTP jsou také pro- a anti-apoptické členy BCL-2 rodiny. Ukazuje se, že rotenon je také inhibitorem MPTP [26], a přesto se rotenon v mnoha pracích rutinně používá jako inhibitor komplexu I a sukcinát jako substrát dýchacího řetězce. Nejvýznamnějším inhibitorem MPTP a také důležitým nástrojem pro charakterizaci MPTP je cyklosporin A [17].

Jeden z klíčových regulátorů MPTP je cyklofilin D, který je schopen se vázat na ANT. Cyklofilin D má peptidylprolyl *cis-trans* izomerasovou aktivitu a jeho role v MPT je indukovat konformační změnu ANT. Tím umožňuje navázání vápníku [28, 48]. Cyklosporin A – inhibitor MPTP – je schopen se vázat na CyP-D a tím zabránit jeho interakci s ANT [108]. Model pro MPTP a jeho otevírání, ve kterém CyP-D hraje významnou roli CyP-D, navrhli Halestrap a spol. [48] (obr. 13). V tomto modelu hrají VDAC a jiné proteiny jen regulační roli. V navrženém modelu se vápník váže na určité místo na ANT (toto místo zahrnuje mnoho glutamátových a aspartátových zbytků smyčky polypeptidového řetězce ANT otočené do matrix mitochondrie, ale přesná pozice tohoto místa zatím není známa). Navázání adeninových nukleotidů na místo vazby substrátů značně redukuje citlivost tvorby MPTP na vápník, pravděpodobně maskováním vazebního místa pro vápník. V případě, že dojde k navázání vápníku na ANT, je spuštěna konformační změna nevyhnutelná pro indukování tvorby MPTP. CyP-D se váže na Pro⁶¹ ANT a jeho vazba se výrazně zesiluje v případě, kdy thiolové skupiny Cys⁵⁶ a Cys¹⁵⁹ vytvoří vazbu. Vytvoření této vazby je indukované oxidačním stresem (např. diamidem) [47]. Tím dojde k oslabení vazby adeninových nukleotidů na ANT jak na vysokoafinitním tak i na nízkoafinitním místě a zvýší se síla vazby pro CyP-D. Tento model vysvětluje působení mnohých regulátorů jako ADP, ATP, oxidačního stresu, zvýšené koncentrace fosfátu a změny konformace ANT, která je ovlivněna vazbou atraktylosidu a bongkrekové kyseliny. Model ale nevysvětluje působení jiných inhibitorů jako např. trifluoroperazin, který inhibuje MPTP jenom za energizovaných podmínek [47].

Crompton a spol. (1998) navrhli modelový systém pro studium MPTP, který dokazuje, že procesu MPT se zúčastňuje i VDAC. Vytvořili proteoliposomy s inkorporovaným komplexem VDAC/ANT a glutathion S-transferasa/cyklofilin D fúzním proteinem. Vlastnosti tohoto modelového systému byly identické s vlastnostmi pozorovanými u mitochondrií v průběhu MPT. Na tomto modelu ukázali, že hlavními komponentami MPTP by měly být ANT, VDAC a cyklofilin D na rozdíl od předchozího popisovaného modelu, který nebral v úvahu VDAC. Také studie s novým inhibitorem MPTP – Ro 68-3400 naznačují, že VDAC (konkrétně VDAC1) je součástí tohoto póru [24]. Na druhé straně MPT u mitochondrií z izolovaných z *VDAC1*^{-/-} myši byl indukován stejně jako u kontrolní skupiny [66].



Obr.13 Navrhovaný mechanismus MPT [47].

Pro objasnění složení MPTP a úlohu jeho jednotlivých komponent byly použity i molekulárně genetické techniky, které zpochybnilly zapojení ANT, CyP-D a VDAC jako základní součásti MPTP. U mitochondrií izolovaných z myších jater, které postrádaly gen pro ANT, bylo stále možné indukovat MPT vysokou koncentrací vápníku. Tato koncentrace byla ale třikrát vyšší než v případě kontrolních mitochondrií [63]. Proto autoři usoudili, že ANT není nevyhnutelný pro MPT.

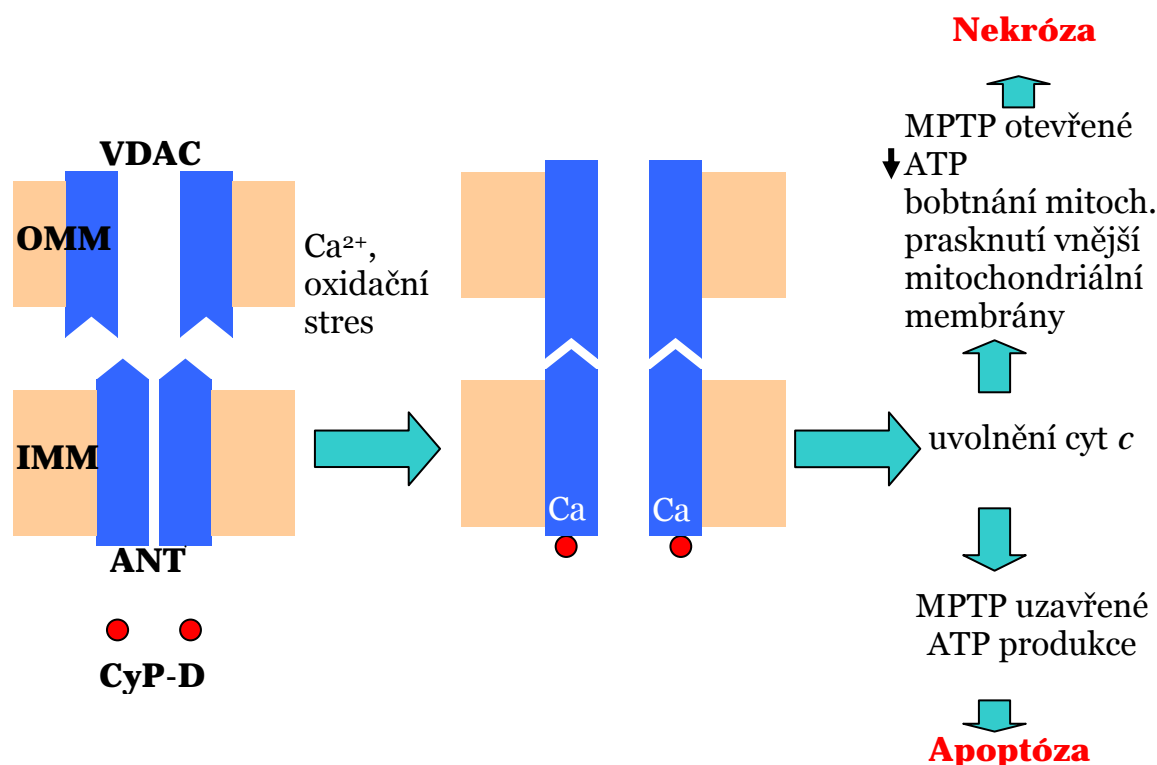
Bienes a spol. (2005) [2] a Nakagawa a spol. (2005) [80] chtěli testovat, jakou úlohu hraje CyP-D v regulaci MPT. Proto vytvořili myš bez genu pro CyP-D (*Ppif* genový produkt). U těchto myší byl MPT kompletně inhibován při použití nízké koncentrace vápníku. Tyto myši vykazovaly menší citlivost na ischemii/reperfúzní zranění, které bylo skoro identické jako u kontrolních myší s podávaným cyklosporinem A [2]. Vysoká koncentrace vápníku přibližně 1 mM měla za následek i v případě *Ppif*^{-/-} myší únik vápníku z mitochondrií, kolaps membránového potenciálu a následné bobtnání mitochondrií [80] – tj. otevření MPTP i bez přítomnosti CyP-D. Na druhé straně, odpověď MPTP na ubichinon 0, depolarizaci, pH, adeninové nukleotidy a oxidační stres byla nerozeznatelná od kontrolních myší a *Ppif*^{-/-} myší. To naznačuje, že žádný z těchto naposledy jmenovaných regulátorů MPTP není modulován CyP-D. Byl

také testován vliv proapoptotických proteinů na indukcii apoptózy u CyP-D deficientních buněk. Tyto buňky podléhaly apoptóze stejně jako kontrolní buňky. Proto Nakagawa a spol. přišli s hypotézou, že CyP-D je regulátorem MPTP v průběhu nekrotické buněčné smrti, ve které jsou klíčovými faktory zvýšená koncentrace vápníku a produkce reaktivních forem kyslíku a nemá žádnou funkci v procesu apoptózy. Tento závěr byl zpochybněn, protože přidání t-BID a BAX k izolovaným mitochondriím vede k přímé permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a nemusí být tak žádný rozdíl ve vlivu na uvolnění cytochromu *c* u *Ppif*^{-/-} myši a kontrolní skupinou [39].

V procesu apoptózy může být rozhodující také doba, po kterou zůstává MPTP otevřen. Předpokládá se, že přechodné otevření MPTP (takové, aby nezpůsobilo nedostatek ATP a bobtnání mitochondrií) způsobí únik cytochromu *c* z mezimembránového prostoru a následně aktivaci kaspas, což vede k apoptóze [46]. Ukazuje se také, že přechodné otevření MPTP, které není provázeno bobtnáním mitochondrií, zprostředkuje rychlé uvolnění Ca^{2+} z mitochondrií [54]. Otevření MPTP trvající delší dobu, snížení koncentrace ATP a následná depolarizace mají za následek ještě větší spotřebu ATP (kvůli udržení membránového potenciálu) a buňka následně umírá nekrotickou formou buněčné smrti [38, 46] (obr.14).

Studie indukce apoptózy u hepatocytů působením $\text{TNF}\alpha$ metodou měření membránového potenciálu pomocí TMRM a koncentrace vápníku kalceinem ukazují, že MPTP se může podílet na procesu apoptózy i tím, že v individuálních mitochondriích je iniciován MPT. Tyto depolarizované mitochondrie koexistují s polarizovanými mitochondriemi, u kterých ještě nedošlo k MPT [70].

Další otázky v procesu MPT se otevírají v důsledku faktu, že inhibitor MPTP-cyklosporin A sice inhibuje MPTP, ale ne vždy. Například za vysoké koncentrace vápníku a oxidačních činidel už MPTP není citlivý na přítomnost cyklosporinu A. Autoři He a Lemasters (2002) [51] navrhuji hypotézu dvou vodivostních módů pro MPTP, jeden aktivovaný a inhibovaný cyklosporinem A, druhý neregulovaný. MPTP by se tak mohl formovat z membránových proteinů, které mají změněnou konformaci nebo jsou poškozeny v důsledku oxidačního stresu. Zoratti a spol. (2005) [112] navrhuji, že vhodným kandidátem by mohly být proteinové importní komplexy, např. Tim22 nebo Tim23. Tato otázka však zůstává nadále otevřená.



Obr. 14 Faktory, které vedou k apoptóze nebo nekróze po otevření MPTP [46]. OMM – vnější mitochondriální membrána, IMM - vnitřní mitochondriální membrána, ANT – transportér adeninových nukleotidů, VDAC – napětově-závislý aniontový kanál, CyP-D – cyklofilin D.

Úloha MPTP v patofyziologii některých onemocnění byla testována také na modelech *in vivo*. Ukazuje se, že MPT hraje důležitou roli v myokardiální ischemii/reperfúzním zranění a může být proto vhodným cílem pro kardioprotekci. Ischémie sama nezpůsobuje otevření MPTP v důsledku protektivních účinků acidózy [13], zatímco znovuoobnovení respirace při reperfúzi, v podmínkách zvýšené koncentrace intracelulárního vápníku, nadprodukcí ROS a obnovení neutrálního pH, poskytuje podmínky pro otevření MPTP. Úlohu MPTP dokazuje působení cyklosporinu A, který oddálil vznik morfologických změn indukovaných anoxií [116] u izolovaných kardiomyocytů. Definitivní důkaz úlohy MPTP v patogenezi ischemie/reperfúze přinesla studie ukazující rezistenci CyP-D-deficientních myší k ischemii/reperfúznímu zranění [33, 80]. MPTP se může uplatnit také v některých jaterních onemocněních, neurologických onemocněních (např. Alzheimerova nemoc [22]) a také v onemocněních svalů [10], patogenezi Reyeova syndromu [70] a procesech spojených se stárnutím [33].

Pro studium funkce MPTP se využívají 4 metody:

1. měření bobtnání mitochondrií monitorováním poklesu světelného rozptylu na mitochondriích;
2. sledování membránového potenciálu pomocí fluorescenčních sond nebo iontově selektivních elektrod (TPP^+ , TPMP^+). Protože k disipaci membránového potenciálu může nastat i v případě přítomnosti rozpřahovačů (volné mastné kyseliny, FCCP), je nutné pomocí inhibitoru MPTP – cyklosporinu A ověřit, že změna potenciálu nastala v důsledku otevření tohoto póru;
3. měření úniku akumulovaného vápníku indikátorem citlivým na vápník, například kalceinem nebo iontově-selektivní elektrodou citlivou na vápník;
4. měření průniku [^{14}C] sacharosy do mitochondrií.

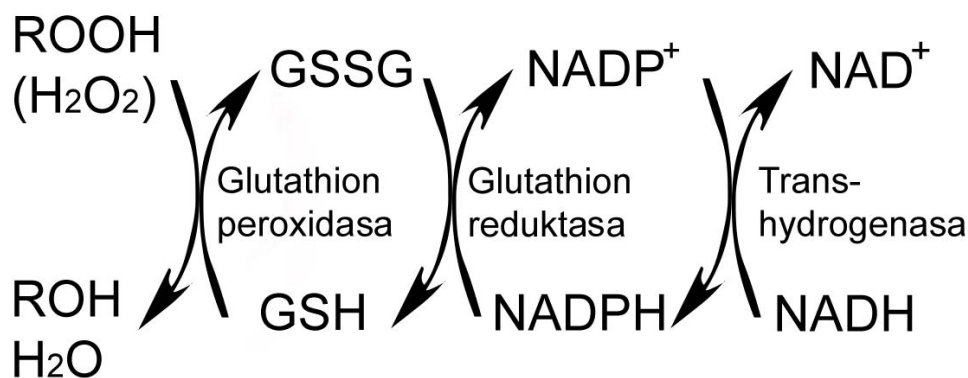
2.4.1 Vliv *t*-BHP na mitochondriální funkce

Terc-butylhydroperoxid (*t*-BHP) je organický hydroperoxid, který je analogem lipidových hydroperoxidů vznikajících v průběhu oxidačního stresu a ischemie/reperfúze. Proti účinkům oxidačního poškození buňka disponuje antioxidačním systémem, který zahrnuje například glutathion, kyselinu askorbovou a enzymy superoxidodismutasy, glutathionperoxidasy a katalasy. K oxidačnímu stresu dochází v případě, že je antioxidační systém překonán reaktivními formami kyslíku (ROS). Následné oxidační poškození vede k buněčné smrti.

t-BHP se používá jako modelová látka pro objasnění senzitivity buněčných struktur a enzymů na oxidační poškození [59, 83, 109]. Při nízkých dávkách navozuje apoptózu provázenou fragmentací DNA a kondenzací jádra. Vysoké dávky způsobují uvolnění laktátdehydrogenasy a poškození plazmatické membrány („blebs“) vznikající v důsledku poruchy organizace cytoskeletu.

t-BHP je detoxikováno prostřednictvím glutathion peroxidase-glutathion reduktasevého systému v souhře s mitochondriální NADP/NAD transhydrogenasou (obr. 15). To vede k oxidaci glutathionu a pyridinových nukleotidů [73]. Tyto enzymy jsou lokalizovány jak v cytosolu, tak i v mitochondriích. Další cesta metabolismu *t*-BHP zahrnuje cytochrom P-450 a vede k tvorbě *tert*-butoxylových radikálů a k inicializaci peroxidace lipidů [72, 96], která zahrnuje i membránové lipidy. Tyto procesy vedou ke změně integrity mitochondriální membrány [62]. Vedle snižování intracelulární koncentrace GSH dochází i k oxidaci důležitých SH skupin mitochondriálních enzymů [76].

V důsledku působení prooxidantů dochází také k narušení Ca^{2+} homeostázy souvisejícím s poruchou transportu Ca^{2+} . Toto narušení vyústí do zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě. Tento nárůst může vést k aktivaci Ca^{2+} -závislých enzymů (např. fosfolipas, proteas a endonukleas), které pak také přispívají k procesům vedoucím k buněčné smrti [86].



Obr. 15 Detoxikace organických hydroperoxidů (ROOH), například *t*-BHP a H_2O_2 systémem enzymů glutathionperoxidasa, glutathionreduktasa a transhydrogenasa.[73, 82].

t-BHP je také potenciální aktivátor MPT jak u izolovaných mitochondrií tak u hepatocytů [45, 83]. Zvýšená tvorba ROS, která nastává po počáteční rychlé oxidaci mitochondriálního NAD(P)H [70], může vést k oxidaci thiolových skupin proteinů a následné aktivaci MPT [29, 64, 65]. V souhrě se zvýšenou tvorbou ROS může otevření MPTP iniciovat také narušená mitochondriální homeostáza Ca^{2+} a zvýšená koncentrace Ca^{2+} . Depolarizace vnitřní membrány způsobená inicializací MPT má za následek rozpojení oxidační fosforylace, inhibice tvorby ATP v mitochondriích, zvýšenou ATP hydrolýzu mitochondriální ATPasou v důsledku snahy mitochondrie o obnovu membránového potenciálu. Vyčerpání buněčného ATP poté vede k nekrotické formě buněčné smrti.

3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo zkonstruovat aparaturu připojenou na počítač pro měření membránového potenciálu, která využívá iontově-selektivní elektrody citlivé na tetrafenylfosfóniový kation. Protože bylo optimalizováno složení selektivní membrány, bylo nutné se zaměřit na vlastnosti nově připravené membrány, tzn. spočítat koeficienty selektivity pro vybrané ionty. Dalším cílem bylo ověřit funkčnost aparatury měřením mitochondriálního membránového potenciálu a dále využít tuto aparaturu pro měření $\Delta\psi_m$ *in situ* – v buňkách s permeabilizovanou plazmatickou membránou.

1. Konstrukce aparatury na měření membránového potenciálu pomocí iontově selektivních elektrod citlivých na TPP⁺

- Konstrukce aparatury pro měření membránového potenciálu využívající TPP⁺-selektivní elektrody.
- Připojení aparatury k počítači, sběr a zpracování dat v MATLAB/Simulink
- Optimalizace složení membrány citlivé na TPP⁺.
- Výpočet koeficientů selektivity TPP⁺-selektivní elektrody pro vybrané ionty.

2. Využití aparatury na měření potenciálu vnitřní mitochondriální membrány

- Využití aparatury na měření potenciálu vnitřní mitochondriální membrány izolovaných mitochondrií – hodnocení funkce dýchacího řetězce.
- Měření membránového potenciálu mitochondrií izolovaných hepatocytů a buněk z buněčných kultur *in situ*. Hodnocení funkce dýchacího řetězce.
- Vliv vápníku a *terc*-butylhydroperoxidu na membránový potenciál izolovaných hepatocytů a izolovaných mitochondrií. Úloha „mitochondrial permeability transition pore“.

4. MATERIÁL A METODY

Chemikálie:

Tetrafenylfosfonium (TPP^+Cl^- , TPP^+Br^-), tetraphenylboritan sodný (Na^+TPB^-) a substráty respiračního řetězce (pyruvát, malát a sukcinát) byly analytické čistoty od firmy Sigma-Aldrich (USA), stejně tak inhibitory dýchacího řetězce (rotenon, oligomycin, FCCP). Tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)fenyl]boritan sodný, digitonin a *terc*-butylhydroperoxid byl od firmy Fluka (USA). Poly(vinylchlorid) Neralit 581, 682 a 702 byl poskytnut jako dar od firmy Spolana a.s. (Neratovice).

Aparatura na měření membránového potenciálu:

Teflonová komůrka a těla elektrod byly vyrobeny firmou Mikrotechna Praha, a.s. Měřicí karta PCI-6036E se svorkovnicí BNC-2110 byla od firmy National Instruments. Data byla zpracována programem MATLAB (The MathWorks, Inc.). Real Time Toolbox pro MATLAB/Simulink byl od firmy HUMUSOFT®.

Měření koeficientů selektivity:

Koeficienty selektivity pro ionty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} byly měřeny metodou „fixed interference method“. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm směrodatná odchylka, která byla vypočtena ze 3 nezávislých kalibrací.

Měření membránového potenciálu:

Koncentrace TPP^+ v čase t [TPP^+](t) v médiu byla přepočítaná z měřeného napětí na elektrodách v čase t ($U(t)$) z kalibrační přímkou podle vztahu:

$$[TPP^+](t) = 10^{\frac{U(t)-b}{k}},$$

kde k je směrnice kalibrační přímkou a b je koeficient z rovnice kalibrační přímkou $U_i = k \cdot x_i + b$, kde $x_i = \log[TPP^+](i)$ ($[TPP^+](i)$ byla koncentrace TPP^+ i -tého bodu kalibrace). Koeficienty k a b byly určeny lineární regresí metodou nejmenších čtverců v programu MATLAB.

Membránový potenciál byl měřen v K-médiu (80 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 3 mM $MgCl_2$, 5 mM KH_2PO_4 and 1 mM EDTA, pH 7,2) a v sacharózovém médiu (125 mM sacharóza, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM KH_2PO_4 , pH 7,2) při laboratorní

teplotě. Každý ze zobrazených průběhů byl opakován pro tři nezávisle připravené vzorky hepatocytů/mitochondrií/buněčných kultur.

Statistické zpracování dat:

Sklon kalibrační křivky byl určen lineární regresí, koeficienty selektivity byly určeny nelineární regresí v programu MATLAB. Koeficienty selektivity vypočtené z nelineární regrese jsou uváděné spolu s intervalem spolehlivosti pro $p=95\%$.

Příprava izolovaných mitochondrií a hepatocytů:

Pro izolaci byly použity dvouměsíční potkani (samci) Wistar (Velaz Lysolaje, Česká republika) o počáteční hmotnosti 180-220 g. Zvířata měla volný přístup ke standardní laboratorní stravě a vodě. Zvířata byla usmrcena v Narkotanové narkóze. Jaterní mitochondrie byly izolovány z jater potkanů hladovějících přes noc metodou diferenciální centrifugace v sacharózovém médiu (0.25 mM sacharóza, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) a poté resuspendovány ve stejném médiu [100]. Množství mitochondriálního proteinu bylo určeno podle Bradforda [14]. Potkani hepatocyty byly izolovány metodou dvoustupňové perfúze v Krebs-Henseleitovém médiu podle Farghali a spol. (1994) [36].

Buněčné kultury:

Kontrolní transmitochondriální cybridy, HeLa G a BSC-40 buňky byly kultivovány v Dulbescem modifikovaném Eaglově médiu (SEVAC, Česká republika) s 10% fetálním telecím sérem (Sigma, USA) při 37 °C a 5% CO₂ ve vzduchu. Buňky byly sklizeny použitím 0,05% trypsinu a 0,02% EDTA. Oddělené buňky byly suspendovány v ledovém kultivačním médiu, sedimentovány centrifugací a dvakrát promyty PBS (0,15 M NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, pH 7,2).

Měření spotřeby kyslíku:

Spotřeba kyslíku byla měřena na přístroji Oxygraph-2k (Oroboros, Rakousko) v K-médiu (80 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM KH₂PO₄ and 1 mM EDTA, pH 7.4) při 30 °C. Data byla zpracována programem DatLab 2 (Oroboros, Rakousko). Rychlost spotřeby kyslíku v experimentu s permeabilizovanými hepatocyty byla vyjádřena jako pmol O₂/s/ milion buněk.

Index respirační kontroly byl měřen jako poměr spotřeby kyslíku v přítomnosti ADP a bez ADP (+ADP/-ADP).

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 APARATURA NA MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU

5.1.1 Konstrukce aparatury na měření membránového potenciálu s použitím TPP⁺-selektivních elektrod

V naší laboratoři byla sestrojena aparatura pro měření membránových potenciálů, která je připojena na počítač. Toto zařízení umožňuje snímání a zpracování signálů v reálném čase.

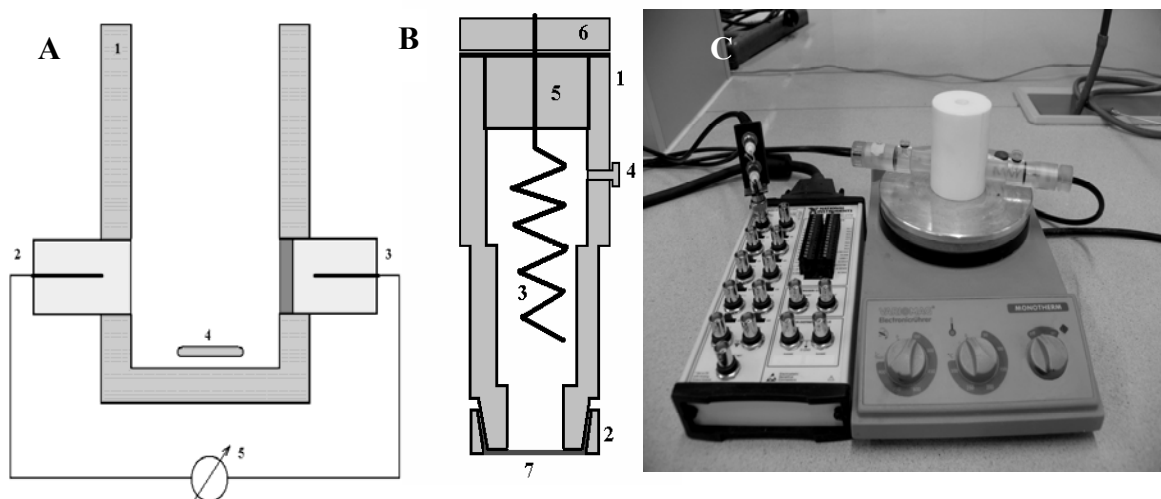
Výsledný prototyp měřící aparatury je složen z měřící komůrky (maximální objem 5 ml), referenční Ag/AgCl elektrody, iontově-selektivní elektrody citlivé na TPP⁺ a měřící karty s vysokou vstupní impedancí PCI-6036E (National Instruments). Díky vysoké vstupní impedanci měřící karty nedochází k polarizaci elektrod. Aparatura je schématicky znázorněna na obr. 16 A. Iontově-selektivní elektroda a referenční elektroda jsou připojeny ke svorkovnici a celá měřící aparatura se svorkovnicí je vložena do Faradayovy klece, aby byl potlačen vliv elektromagnetického záření z vnějšího prostředí. Svorkovnice je připojena na měřící kartu v počítači.

Pro konstrukci aparatury je velmi důležitý výběr materiálu, ze kterého jsou vyrobeny těla elektrod a měřící komůrka. Jako nejvhodnější materiál pro výrobu měřící komůrky se nám osvědčil teflon pro svoje fyzikální vlastnosti. Zabezpečoval dostatečnou těsnost po vložení elektrod a tím zabránil vytékání média z měřící komůrky. Těla elektrod byla zhotovena z plexiskla (detailní nákres obr. 16 B). To umožňovalo kontrolu správného naplnění elektrod plnicím roztokem tak, aby nevznikaly bubliny. Bloček se zataveným drátem byl vložen do těla elektrody a utěsněn O-kroužkem (obr. 16 B).

Citlivá membrána byla přilepena na tělo elektrody namočením těla elektrody do tetrahydrofuranu, následným přiložením membrány a zatlačením plexisklového přítlačného kroužku na tělo elektrody. Poté došlo k odpaření tetrahydrofuranu a membrána zůstala těsně přilepena na těle elektrody. Fouknutím do těla elektrody se lze

přesvědčit, zda nejsou v membráně malé trhliny. Přitlačení citlivé membrány na tělo elektrody zabezpečuje přitlačný kroužek z plexiskla s vnitřním zkoseným průřezem. To umožnilo lepší přitlačení membrány na tělo elektrody než námi dříve používané silikónové O-kroužky, které nezabezpečovaly konstantní napětí membrány.

TPP⁺-selektivní elektroda byla plněna roztokem 10⁻² M TPP⁺. Referenční elektroda stejné konstrukce jako iontově-selektivní elektroda byla pokryta teflonovou membránou s malou dírkou, aby se zabezpečila elektrická vodivost. Nad teflonovou membránou byla přibližně 0,5 cm vrstva agarového gelu s rozpuštěným 2 M KCl, který tvoří solný můstek. Referenční elektroda byla naplněna 2 M KCl.



Obr. 16 A - Schématický náčrt aparatury pro měření membránových potenciálů. 1. Měřící komůrka. 2. Referenční Ag/AgCl elektroda. 3. Ionově-selektivní elektroda citlivá na změnu koncentrace TPP⁺. 4. Magnetické míchadlo. 5. Počítač s kartou PCI-6036E

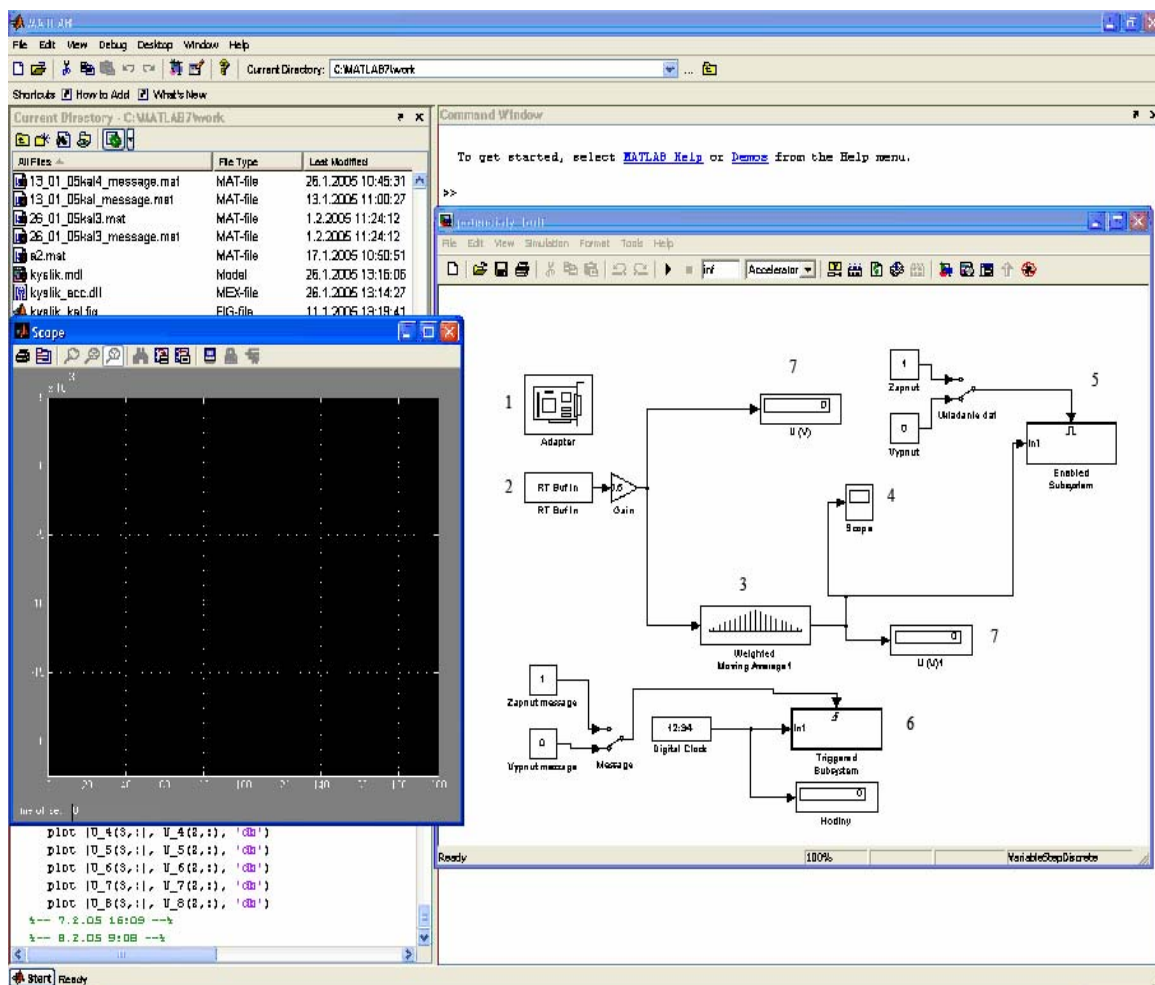
B - Náčrt konstrukce iontově-selektivní elektrody. 1. Tělo elektrody. 2. Přitlačný plexisklový kroužek. 3. Stříbrný drát s vrstvou AgCl. 4. Otvor pro plnění elektrody elektrolytem. 5. Plexisklový bloček, do kterého je zataven stříbrný drát. 6. Přitlačný kroužek. 7. Membrána citlivá na TPP⁺

C - Fotografie aparatury se svorkovnicí a magnetickou míchačkou.

Na rozdíl od námi vyrobené elektrody je komerčně vyráběná elektroda od firmy World Precision Instruments složena z trubičky s průměrem 2 mm, na jejímž konci je citlivá membrána. Do této trubičky je vložen drát vrstvou AgCl. Námi vyrobené elektrody mají

proti komerčně vyráběným elektrodám sice větší průměr, ale to umožní lepší kontrolu tvoření bublin při plnění elektrody.

Sběr, zpracování a zobrazování měřených signálů bylo uskutečněno v prostředí MATLAB/Simulink. Prostředí MATLAB/Simulink umožňuje sběr dat pod operačním systémem Windows a vlastní sestavení komponent vykonávajících sběr, filtraci a zobrazování měřených signálů. Zapojení jednotlivých bloků v programu MATLAB/Simulink je zobrazen na obr. 17. Komponenta Adaptér umožňuje komunikaci s měřicí kartou. Nastavení kanálu, velikost zásobníku a vzorkovací frekvenci je možné měnit prostřednictvím komponenty „RT Bufň“. Vzorkování signálu je vykonáváno s frekvencí 30 Hz. Zásobník byl nastaven na 1000 vzorků. Nežádoucí šum byl odstraněn pomocí plovoucího průměru. Filtrovaná data jsou ukládána do souboru pro další zpracování. Ukládání dat je aktivováno kliknutím myši na příslušný přepínač. Události jsou zaznamenány do dalšího souboru jako časový údaj, ve kterém k události došlo. Měřená data jsou zobrazována v reálném čase do grafu a také jako číselný údaj.



Obr. 17 Zapojení komponent v programu MATLAB/Simulink pro měření membránového potenciálu. 1. Adaptér zabezpečuje komunikaci s měřicí kartou. 2. Nastavení parametrů vstupů se zásobníkem – frekvence sběru dat a kanál, ze kterého se mají sbírat data. Zásobník je nastaven na 1000 vzorků. 3. Filtrace dat. 4. Zobrazení dat v reálném čase ve formě osciloskopu. 5. Zápis dat do souboru aktivován kliknutím. 6. Zápis událostí aktivován kliknutím. 7. Zobrazování dat ve formě displeje.

5.1.2 Příprava a vlastnosti membrány citlivé na TPP⁺

Nejdůležitější součástí iontově-selektivní elektrody je citlivá membrána. Komponenty na přípravu podle Kama a spol (1979) [57] (přepočítané na průměr Petriho misek) jsou shrnuty v tabulce 2. Směs A vznikne rozpuštěním poly(vinylchloridu) (PVC) v tetrahydrofuranu a změkčovači dioktylfthalátu. Směs B obsahuje rozpuštěný tetrafenylboritan sodný (Na⁺TPB⁻) v tetrahydrofuranu. Směs A a směs B se slije, promíchá a poté nalije na Petriho misky příslušného průměru. Rozpouštědlo se nechá pomalu odpařit při laboratorní teplotě.

Citlivou membránu jsme připravili v souladu s prací podle Kama a spol.(1979). Na Petriho misky jsme před nalitím směsi pro přípravu membrán přidali přibližně 1 ml tetrahydrofuranu a nechali odpařit. Tento postup zabezpečí lepší odloupení membrány po odpaření rozpouštědla. Z připravené membrány se vystříhne přibližně 1 cm² membrány a nalepí se na tělo elektrody. Autoři Kamo a spol. neuvádějí jaký typ PVC pro přípravu membrány použili, proto jsme otestovali 3 typy poly(vinylchloridu) (PVC) vyráběného v České republice (Spolana, Neratovice): Neralit 581 (nízkomolekulární typ), Neralit 682 (středně molekulární typ) a Neralit 702 (vysokomolekulární typ). Typ PVC určuje elastické vlastnosti a pevnost připravované membrány. Nejvhodnějším typem byl PVC Neralit 702 kvůli svým elastickým vlastnostem a dobré pevnosti. Pokud byl použit Neralit 581, došlo k protrhnutí membrány během nalepování na tělo elektrody. Také použití Neralitu 682 je nevhodné, neboť dochází v místě kontaktu těla elektrody a přítlačného kroužku k trhání membrány.

Připravená elektroda s nalepenou membránou byla naplněna 10⁻² M TPP⁺. Autoři Kamo a spol. neuvádějí jakou sůl TPP⁺ používali, proto jsme si zvolili TPP⁺Cl⁻. Membrána připravená podle Kama a spol. a plnicí roztok obsahující 10⁻² M TPP⁺Cl⁻ se nám neosvědčila, protože elektroda neměla Nernstovskou odezvu v sledovaném rozsahu koncentrací a také jednotlivé kalibrace byly nereprodukovatelné. (obr.18)

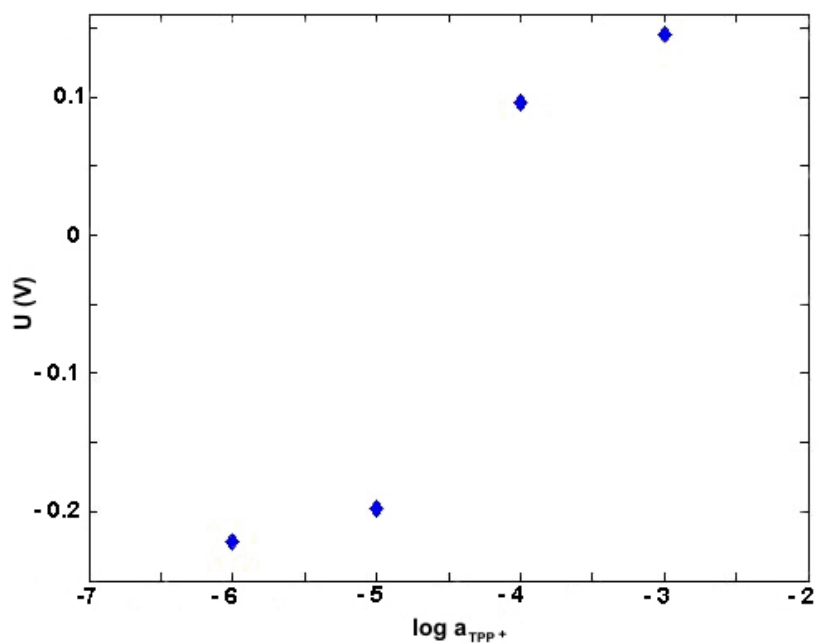
Změnou plnicího roztoku elektrody za TPP⁺Br⁻ se vylepšili její parametry – měla Nernstovskou odezvu přibližně od 10⁻⁷ M TPP⁺. Elektroda pro jednu konkrétní membránu měla reprodukovatelnou odpověď (obr.19), avšak po výměně membrány byl měřený signál nestabilní pro jednotlivé koncentrace TPP⁺. Kalibrace byla z tohoto důvodu neproveditelná. Nestability byly pravděpodobně způsobeny změnami

koncentrace TPB^- v membráně, pravděpodobně jejím postupným prostupem do roztoku [4].

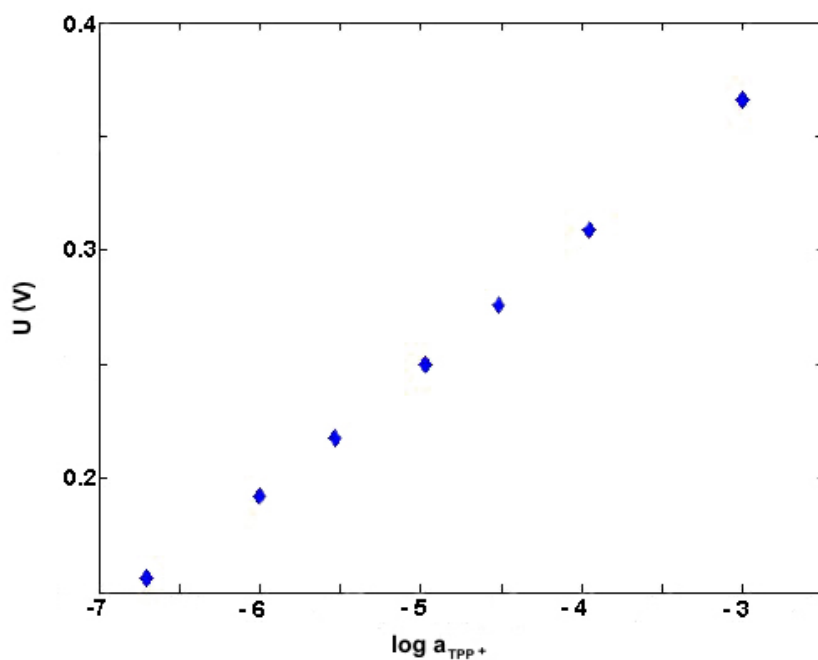
Vnitřní průměr Petriho misky d (mm)	40	50	89	137
Směs A				
Poly(vinylchlorid) (PVC Neralit 581) (PVC Neralit 682) (PVC Neralit 702)	125 mg	195,4 mg	619,1 mg	1467,05 mg
Tetrahydrofuran (THF)	2,5 ml	3,9 ml	12,38 ml	29,34 ml
Diocetyl ftalát (DPH)	0,3 ml	0,46 ml	1,44 ml	3,52 ml
Směs B				
Tetrafenylboritan sodný (TPB)	5 mg	7,8 mg	24,7 mg	58,6 mg
Tetrahydrofuran (THF)	1,0 ml	1,56 ml	4,95 ml	11,73 ml

Tab. 2 Komponenty na přípravu membrány citlivé na TPP^+ .

Následně jsme modifikovali postup přípravy membrán podle Shinbo a spol. (1978) [99]. Do směsi B jsme místo Na^+TPB^- přidali sraženinu TPP^+TPB^- rozpustěnou v organickém rozpouštědle dichlorethan. Sraženina vznikla smíšením 7 ml roztoků Na^+TPB^- a TPP^+Cl^- (10^{-2} M). Vzniklá bílá sraženina byla oddělena od vodní fáze třepáním s přidávkem 24 ml organického rozpouštědla - dichlorethanu. Třepání bylo ukončeno když sraženina přešla do organické fáze. Z oddělené organické fáze se nechal odpařit dichlorethan a sraženina byla rozpuštěna ve směsi rozpouštědel (5 ml tetrahydrofuranu + 5 ml dichlorethanu). Směsi A a B se smíchaly a nalily na připravené Petriho misky a rozpouštědla se nechala pomalu odpařit při laboratorní teplotě. Takto připravené membrány vydrží v suchém prostředí a bez přístupu světla přibližně 1 rok. Připravená membrána byla nalepena na tělo elektrody podle předešlého postupu. Připravené elektrody byly nakonec namočený na noc do 10^{-2} M TPP^+ . Poté byly elektrody vyjmuty a skladovány za sucha. Před měřením bylo nutné elektrody namočit na hodinu do 10^{-2} M TPP^+ [69].

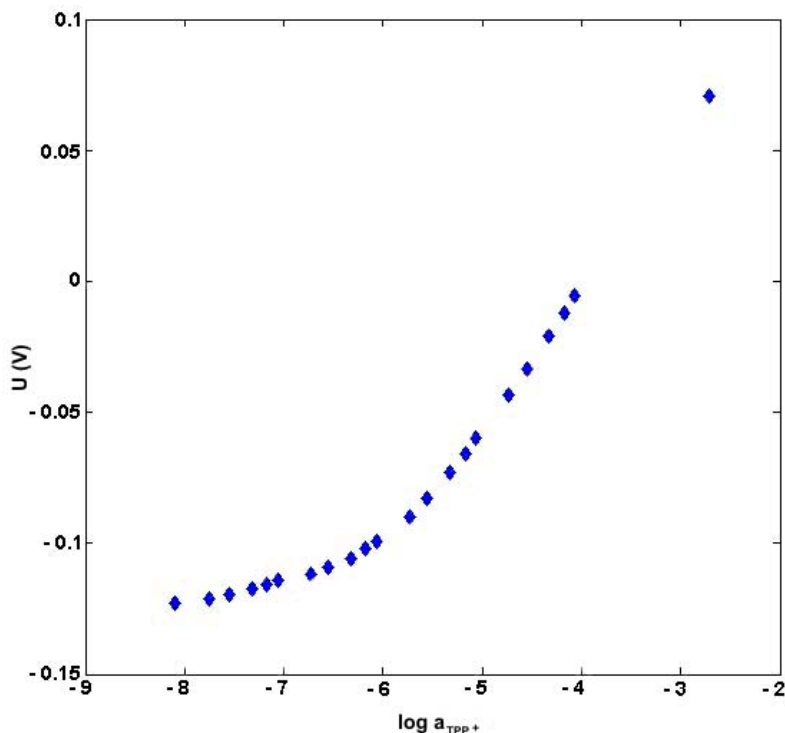


Obr.18 Příklad kalibrace TPP⁺-selektivní elektrody v koncentračním rozsahu 10⁻⁶-10⁻³ M TPP⁺ v 0,1 M NaCl TPP⁺-selektivní membrána byla připravena podle Kamo a spol. (1979), plnicí roztok byl 10⁻² M TPP⁺Cl.



Obr.19 Příklad kalibrace TPP⁺-selektivní elektrody od koncentrace 2.10⁻⁷- 10⁻³M TPP⁺ v 0,1 M NaCl. TPP⁺-selektivní membrána byla připravena podle Kamo a spol. (1979), plnicí roztok byl 10⁻² M TPP⁺Br.

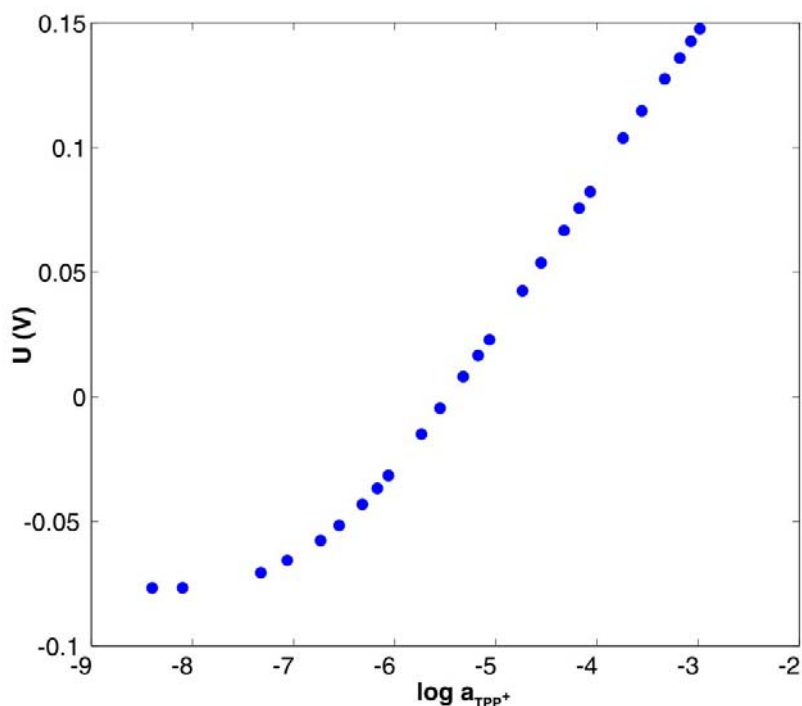
Takto připravené elektrody mají Nernstovskou odezvu od koncentrace $3 \cdot 10^{-6}$ M TPP^+ a potenciál je reprodukovatelný i po výměně membrán (obr.20). Doba odezvy elektrody byla 4-6 s. Membrána po nalepení na elektrodu vydrží minimálně 2 měsíce opakovaného používání. Po měření je nutné membránu opláchnout destilovanou vodou. V případě použití látek rozpuštěných v etanolu např. FCCP nebo rotenon je nutné membránu ještě opláchnout etanolem.



Obr.20 Příklad kalibrace TPP^+ -selektivní elektrody v koncentračním rozsahu 10^{-8} - 10^{-3} M TPP^+ v roztoku 0,1 M NaCl. TPP^+ -selektivní membrána obsahovala sraženinu TPP^+TPB^- .

Protože citlivá membrána obsahovala i ionty TPP^+ , docházelo pravděpodobně při nízkých koncentracích TPP^+ (do 10^{-6} M) k vyplavování TPP^+ z membrány. Vyplavování TPP^+ se projevilo jako stále se zvyšující potenciálový rozdíl elektrod při koncentraci do 10^{-6} M TPP^+ . Po vyrovnání koncentrací na povrchu membrány a roztokem v těsné blízkosti membrány už ke zvyšování napětí nedocházelo. Proto jsme se vrátili k původnímu složení membrány podle Kamo a spol., ale jako komponentu ve směsi B jsme místo TPB^- použili tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)fenyl]boritan sodný (HFPB^-) [7]. Plnicím roztokem elektrody byl 10^{-2} M TPP^+Cl^- . Elektroda s takto připravenou membránou měla Nernstovskou odezvu od koncentrace $1 \cdot 10^{-6}$ M TPP^+ (Obr.21). V tomto případě nedocházelo k vyplavování TPP^+

do měřeného elektrolytu (tj. rozdíl napětí na elektrodách po ustálení zůstával konstantní) a také bylo možno vypočítat koeficienty selektivity pro jednotlivé ionty. I po výměně membrány byla odpověď elektrody reprodukovatelná a signál při konstantní koncentraci TPP^+ byl stabilní. Doba odezvy elektrody byla 8-12 s. Tato hodnota je vyšší než v případě elektrody, která obsahuje v membráně TPP^+ , protože musí dojít na povrchu membrány k výměně interferujícího iontu za TPP^+ .



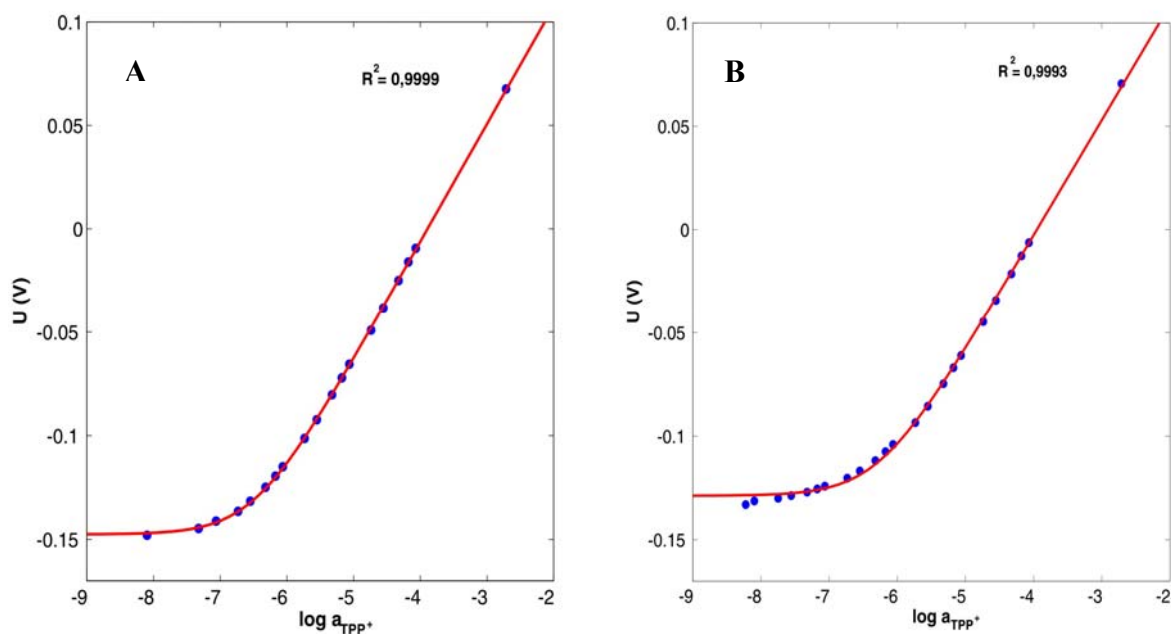
Obr. 21 Příklad kalibrace TPP^+ -selektivní elektrody v koncentračním rozsahu 10^{-9} - 10^{-3} M TPP^+ v 0,1 M NaCl. TPP^+ -selektivní membrána obsahovala HFPB $^-$.

Na rozdíl od komerčně vyráběné elektrody, u které garantuje výrobce Nernstovskou odezvu od $10^{-4,5}$ M TPP^+ , elektrody s membránou obsahující jak TPP^+TPB^- tak i HFPB $^-$ mají Nernstovskou odezvu už přibližně od $3 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-6}$ M TPP^+ . To má za následek zvýšení citlivosti měření při rozsahu koncentrací 10^{-6} – 10^{-5} M. V tomto rozmezí koncentrací je nevhodnější měření mitochondriálního membránového potenciálu, aby nedocházelo k ovlivnění hodnoty $\Delta\psi_m$.

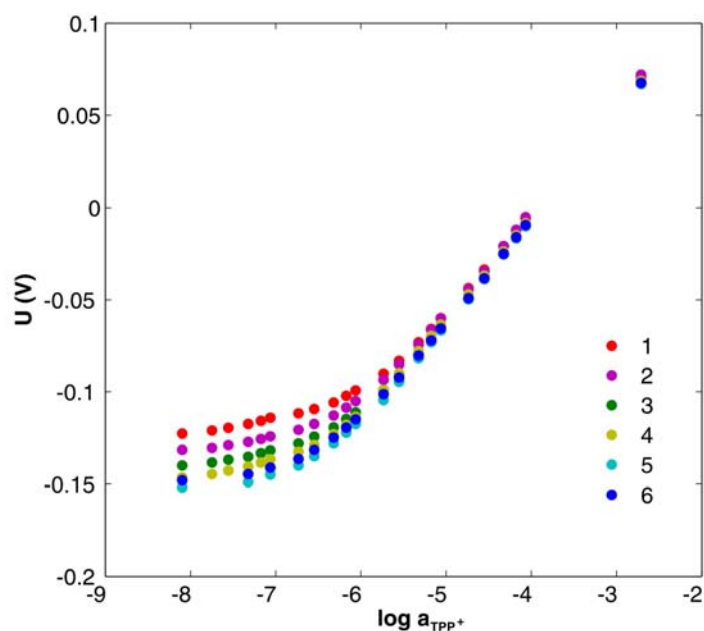
5.1.3 Výpočet koeficientů selektivity TPP⁺-selektivní elektrody

Koeficienty selektivity TPP⁺-selektivní elektrody s membránou vyrobenou podle Kamo a spol. (1979) nebylo možné vypočítat v důsledku neproveditelnosti kalibrace jak pro elektrodu plněnou TPP⁺Cl⁻, tak pro TPP⁺Br⁻.

V případě membrány vyrobené modifikovaným postupem podle Shinbo a spol. s TPP⁺ přítomným v membráně docházelo k vyplavování TPP⁺ z membrány do elektrolytu v těsné blízkosti membrány. Detekční limit této elektrody byl proto určen tímto procesem [4]. Vyplavování TPP⁺ také zkreslovalo hodnoty koeficientů selektivity K_{ij}^{pot} pro jednotlivé interferující ionty určené podle *FIM*, protože tyto koeficienty se počítají z průsečíku lineárních částí kalibračních křivek. Tento efekt se projeví hlavně pro slabě interferující ionty, které jsme většinou používali (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺). K_{ij}^{pot} v tomto případě pravděpodobně představuje detekční limit elektrody. Na obr. 22 je zobrazen průběh kalibrace v 0,1 M NaCl a 0,1 M KCl (i s podmínkami, za kterých bylo měření vykonáno podle doporučení Bakker a spol. (2000) [6]) a modelový průběh podle Nikolského-Eisenmanovy rovnice. Vypočtené hodnoty K_{ij}^{pot} podle *FIM* pro K⁺ a Na⁺ jsou $(4,23 \pm 0,97) \cdot 10^{-6}$ a $(4,38 \pm 2,29) \cdot 10^{-6}$. Hodnoty K_{ij}^{pot} vypočteny z Nikolského-Eisenmanovy rovnice nelineární metodou nejmenších čtverců byly $(5,126 \pm 0,70) \cdot 10^{-6}$ pro K⁺ a $(3,40 \pm 1,06) \cdot 10^{-6}$ pro Na⁺. Detekční limit po přípravě nové elektrody závisel od množství TPP⁺, které se uvolnilo z membrány. Při další provedené kalibraci se hodnota detekčního limitu snižovala v závislosti na tom, jak bylo TPP⁺ po promytí odstraněno (obr 23). Změny potenciálu elektrody při vyšších koncentracích jsou způsobeny tzv. „driftem“ – změnou potenciálového rozdílu elektrod v závislosti na čase.



Obr. 22 Kalibrace elektrody se zabudovaným TPP^+TPB^- v pozadí interferujícího iontu **A** Na^+ (0,1 M), **B** K^+ (0,1 M). Křivka představuje průběh podle Nikolského-Eisenmanovy rovnice.

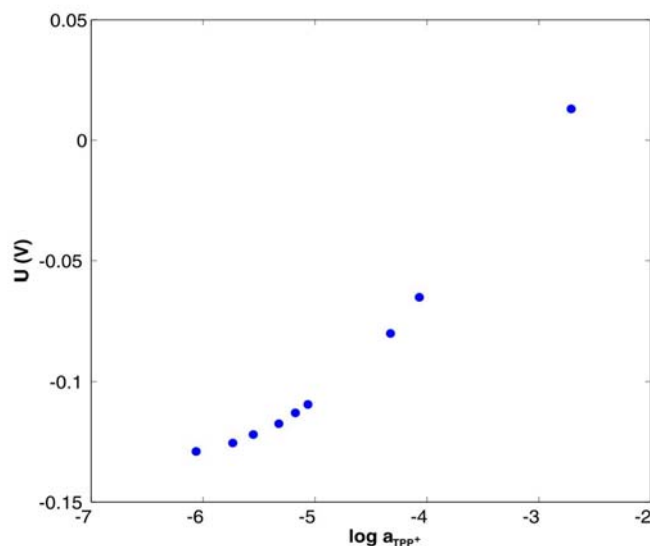


Obr. 23 Opakovaná kalibrace v 0,1 M NaCl (membrána se zabudovaným TPP^+TPB^-). Vliv vyplavování TPP^+ do měřeného elektrolytu. Čísla ukazují pořadí experimentu.

V případě, že v testovaném elektrolytu nejsou přítomny interferující ionty, lineární úsek kalibrační křivky by měl při nízkých koncentracích TPP^+ reprezentovat dolní detekční limit elektrody. V našem případě docházelo k značnému vyplavování TPP^+ a tím se zvyšoval dolní detekční limit. (obr. 24) Nernstovská odezva byla v tomto případě pozorována až od 10^{-4} M TPP^+ . Tento fakt se uplatní v případě, že chceme vypočítat K_{ij}^{pot} podle (10)

$$K_{ij}^{pot} = \frac{a_i}{(a_j)^{z_i/z_j}},$$

ale nemůžeme použít vysokou koncentraci interferující látky (z důvodu toxicity látky, např. FCCP). Průběh kalibrace by byl pro nízké koncentrace FCCP dán detekčním limitem elektrody jako na obr. 24 a hodnota K_{ij}^{pot} by se měnila podle použité koncentrace FCCP.



Obr. 24 Kalibrace bez přítomnosti interferujících iontů (membrána se zabudovaným $\text{TPP}^+ \text{TPB}^-$).

Při měření mitochondriálního membránového potenciálu se měří jenom změna koncentrace TPP⁺ v průběhu experimentu. Protože se nemění složení média, ve kterém je měření prováděno a přidávané látky jsou známé (na rozdíl od klasické detekce iontů v roztocích), není nutné přímo znát hodnoty koeficientů selektivity pro všechny používané ionty. Je nutné ale dodržet následující zásady:

1. Před každým měřením provést kalibraci v médiu, ve kterém bude prováděn experiment. Kalibrace se provádí v předpokládaném rozsahu změn koncentrací v průběhu experimentu. Kalibrací provedenou před každým experimentem také omezíme vliv driftu elektrody na měřené hodnoty.
2. Zjistit interferenci komponent, které se nenacházejí v kalibračním médiu a jsou přidávány v průběhu experimentu. V tomto případě stačí přidat dané množství komponenty a zaznamenat změnu potenciálu elektrody. Ve většině případů byla tato interference minimální a neměla vliv na samotné měření.

Vyplavováním TPP⁺ z PVC membrány mělo za následek také změnu selektivity v čase pro některé ionty. Tento jev jsme pozorovali pro FCCP. Interferenci je možné korigovat na změnu potenciálu po přidání FCCP nebo vyměnit na elektrodě TPP⁺-selektivní membránu a znovu připravit elektrodu.

Protože pro elektrody s membránou obsahující HFPB⁻ nedochází k vyplavování TPP⁺, hodnota koeficientů selektivity by tímto neměla být ovlivněna. V tabulce 3 jsou shrnuty koeficienty selektivity měřené metodou FIM podle IUPAC pro ionty: Na⁺, K⁺, Ca²⁺ a Mg²⁺ a K_{ij}^{pot} určené z jednotlivých rovnic (Nikolského-Eisenmanovy rovnice (7), rovnice podle Bakker a spol.(1997) (8) [4]) nelineární metodou nejmenších čtverců.

Použité modely:

$$\text{Nikolského-Eisenmanova rovnice: } E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln \left(a_i(ij) + K_{ij}^{pot} a_j(ij)^{z_i/z_j} \right),$$

$$\text{Podle Bakker a spol.: } E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln \left(a_i(ij) + \left(K_{ij}^{pot} \right)^{z_j/z_i} a_i(i)^{z_j/z_i} a_j(ij) \right). \text{ Pro } i \text{ } z_i=1 \text{ a}$$

$$z_j=2 \text{ je tato rovnice ve tvaru } E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{a_i}{2} + \frac{1}{2} \sqrt{a_i(ij)^2 + 4a_j(ij)(K_{ij}^{pot})^2} \right).$$

Obr. 25 ukazuje detekční limit elektrody, kdy kalibrační křivka byla měřena bez interferujících iontů ($2 \cdot 10^{-7}$ M TPP⁺).

j	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
$K_{TPP,j}^{pot}$ (podle IUPAC)	$(2,31 \pm 0,34) \cdot 10^{-6}$	$(1,94 \pm 0,56) \cdot 10^{-6}$	$(4,76 \pm 0,68) \cdot 10^{-7}$	$(5,29 \pm 1,60) \cdot 10^{-7}$
$K_{TPP,j}^{pot}$ (NE)	$(2,48 \pm 0,58) \cdot 10^{-6}$	$(1,73 \pm 0,13) \cdot 10^{-6}$	$(5,01 \pm 0,55) \cdot 10^{-7}$	$(5,78 \pm 0,22) \cdot 10^{-7}$
$K_{TPP,j}^{pot}$ (Bakker a spol.)	-	-	$(5,46 \pm 0,56) \cdot 10^{-7}$	$(7,1 \pm 2,5) \cdot 10^{-7}$

Tab.3 Hodnoty koeficientů selektivity pro ionty Na⁺, K⁺, Ca²⁺ a Mg²⁺, které byly určeny podle doporučení IUPAC, z Nikolského-Eisenmanovy rovnice (NE) a podle Bakker a spol.(1997) [4].

K_{ij}^{pot} byly měřeny pro vyšší koncentrace interferujících iontů (0,1 a 1 M), při kterých už k interferenci dochází a na obr. 26-29 jsou zobrazeny průběhy kalibrací (podle doporučení Bakker a spol. (2000) [6]). Na obr. 26 B je vidět, že v přítomnosti K⁺ iontů nastává interference až od koncentrace 10^{-3} M KCl. Obr. 26 A ukazuje naměřená data kalibrační křivky v pozadí 0,1 M KCl a modelový průběh podle Nikolského-Eisenmanovy rovnice.

Obr. 27 B ukazuje, že interference Na⁺ iontů je zanedbatelná a hodnota K_{TPP^+,Na^+}^{pot} je určena detekčním limitem elektrody.

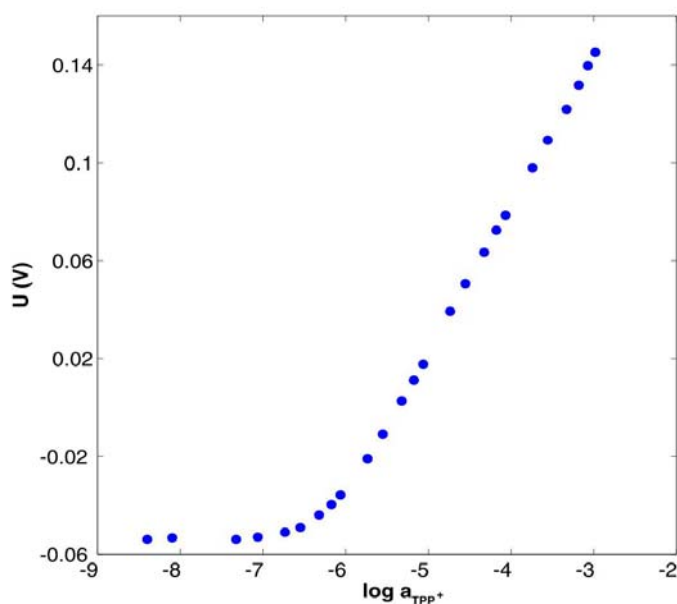
Modelová data z Nikolského-Eisenmanovy rovnice ukazují, že tento model dobře popisuje chování TPP⁺-selektivní elektrody pro kationy Na⁺ a K⁺ (obr. 26 a 27).

Průběh kalibrace v pozadí dvoumocných kationů (Mg²⁺ a Ca²⁺) a modelové průběhy podle Nikolského-Eisenmanovy rovnice, rovnici beroucí v úvahu rozdílný náboj primárního a interferujícího iontu podle Bakker a spol. (1997) (8) a také rovnici pro slabě interferující ionty:

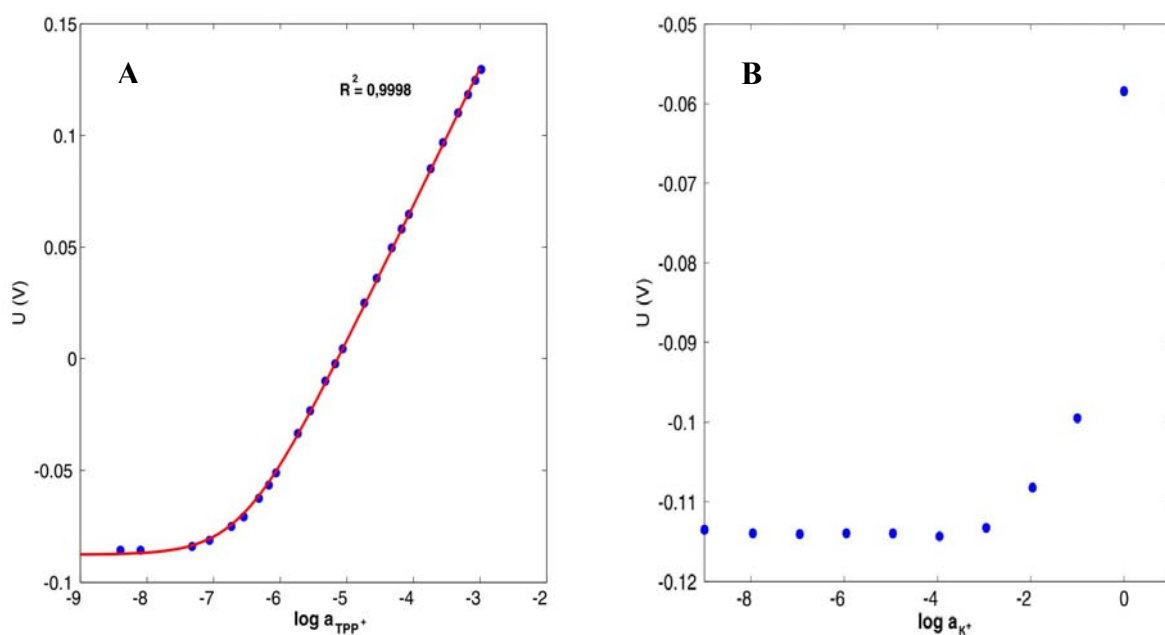
$$E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln(a_i(j) + (K_{ij}^{pot})^{z_j/z_i} a_i(j)^{z_j/z_i} a_j(j))$$

jsou na obr. 28 A a 29 A. K interferenci v případě iontů Mg^{2+} dochází od koncentrace 10^{-4} M, v případě Ca^{2+} od 10^{-5} M (obr. 28 B, 29 B). Z modelových dat na obr. 28A a 29A vidíme, že Nikolského-Eisenmanova rovnice i rovnice podle Bakker a spol. (1997) dobře popisují naměřená data pro uvedené interferující ionty a je možné z nich spočítat K_{ij}^{pot} , přičemž Nikolského-Eisenmanova rovnice je výpočetně méně náročná. Rovnice pro slabě interferující ionty je nevhodná jako model pro chování TPP^+ -selektivní elektrody.

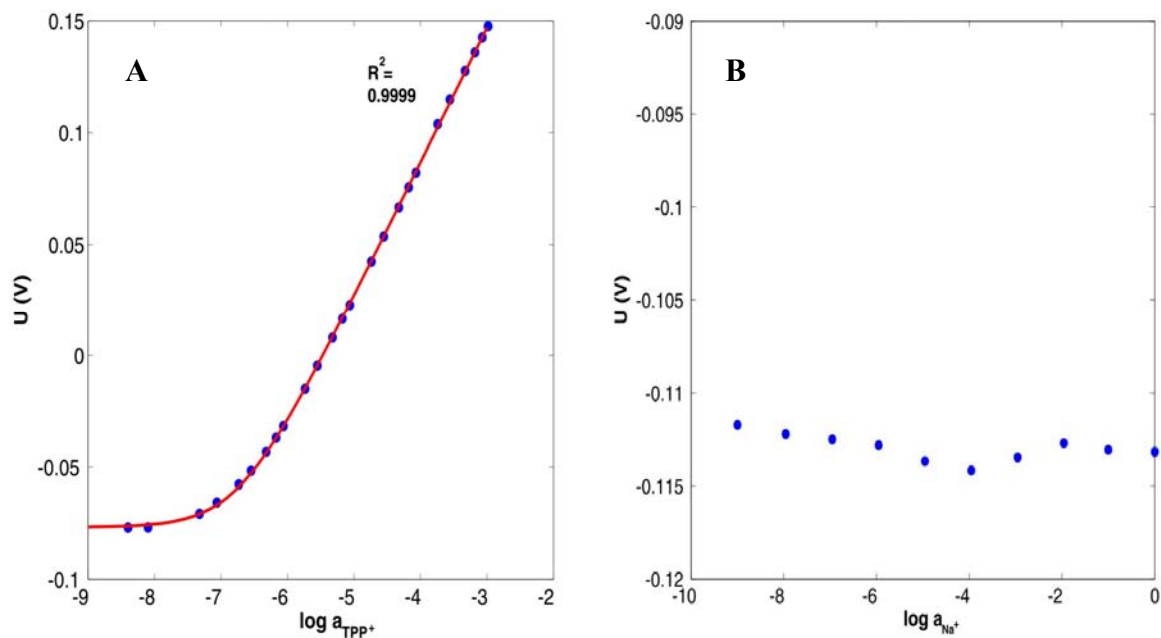
Firma World Precision Instruments (www.wpiinc.com) uvádí hodnotu koeficientu selektivity pro jen pro K^+ (10^{-6}) [114], která je porovnatelná s námi vypočtenou hodnotou (tab. 3).



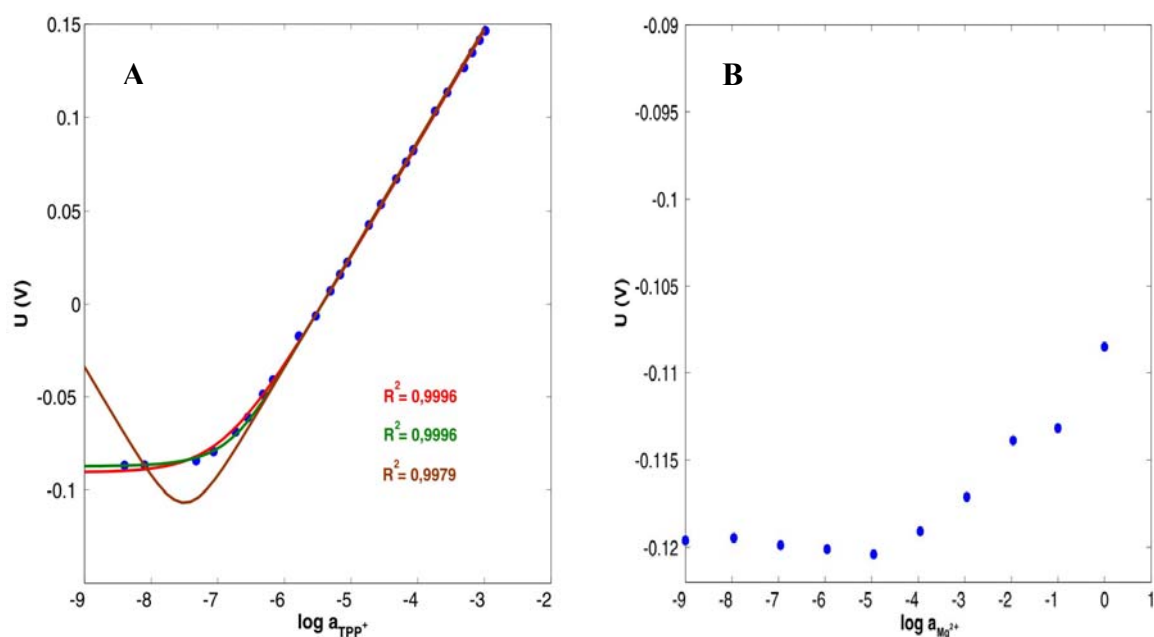
Obr. 25 Kalibrační křivka bez pozadí interferujících iontů určující detekční limit elektrody- $2 \cdot 10^{-7}$ M TPP^+ (membrána s HFPB).



Obr. 26 **A** Kalibrační křivka v 0,1 M KCl (elektroda s membránou s HFPB) a modelová data podle Nikolského-Eisenmanovy rovnice $K_{TPP^+,K^+}^{pot} = 2.833 \cdot 10^{-6}$ ($p=95\%$, $(2,619 \cdot 10^{-6} - 3.048 \cdot 10^{-6})$). **B** Změna potenciálu elektrody v závislosti na aktivitě K^+ .

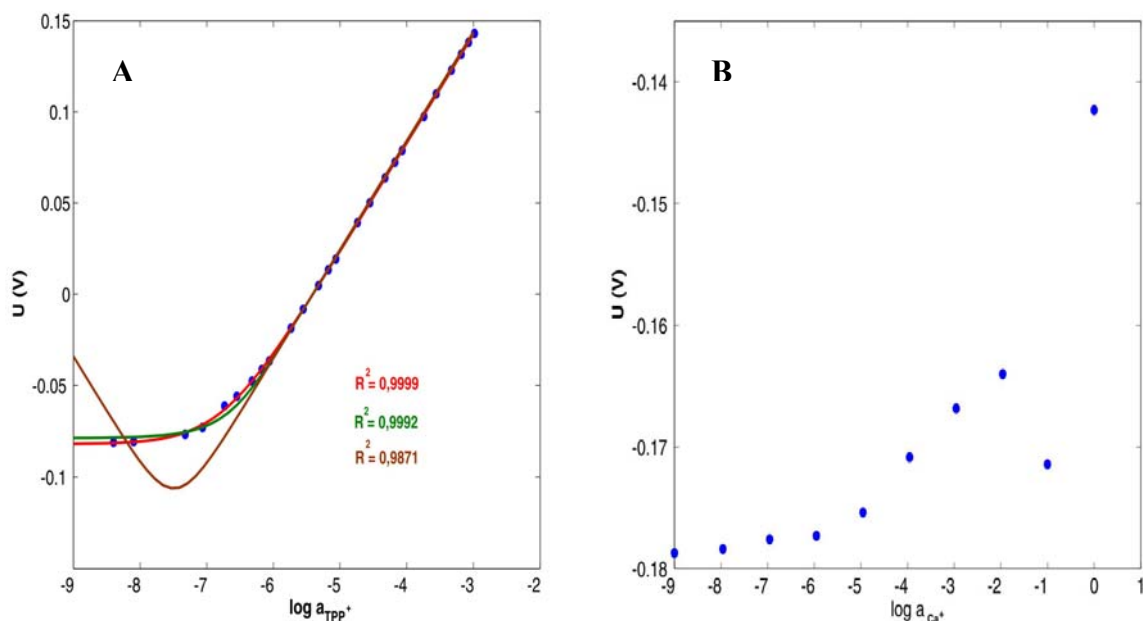


Obr. 27 **A** Kalibrační křivka v pozadí 0,1 M NaCl (elektroda s membránou s HFPB) a modelová data podle Nikolského-Eisenmanovy rovnice $K_{TPP^+,Na^+}^{pot} = 1,669 \cdot 10^{-6}$ ($p=95\%$, $(1,479 \cdot 10^{-6} - 1,859 \cdot 10^{-6})$). **B** Závislost potenciálu elektrody na aktivitě Na^+ .



Obr. 28 A Kalibrace pro primární iont TPP^+ (elektroda s membránou s HFPB⁻) v pozadí interferujícího iontu Mg^{2+} (0,1 M) a teoretický průběh podle Nikolského-Eisenmanovy rovnice (-) $K_{\text{TPP}^+, \text{Mg}^{2+}}^{\text{pot}} = 3,895$ (p=95%, $(3,353 \cdot 10^{-7} - 4,438 \cdot 10^{-7})$), podle Bakker a spol. (1997) (-) $K_{\text{TPP}^+, \text{Mg}^{2+}}^{\text{pot}} = 4,239 \cdot 10^{-7}$ (p=95%, $(3,883 \cdot 10^{-7} - 4,595 \cdot 10^{-6})$) a pro slabě interferující ionty (Bakker a spol., 1997) (-) $K_{\text{TPP}^+, \text{Mg}^{2+}}^{\text{pot}} = 7,104 \cdot 10^{-8}$ (p=95%, $(5,67 \cdot 10^{-8} - 8,537 \cdot 10^{-8})$).

B Závislost potenciálu elektrody na aktivitě Mg^{2+} .



Obr. 29 A Kalibrace pro primární iont TPP^+ (elektroda s membránou s HFPB⁻) v pozadí interferujícího iontu Ca^{2+} (0,1 M) a teoretický průběh podle Nikolského-Eisenmanovy rovnice (-) $K_{TPP^+,Ca^{2+}}^{pot} = 5,478 \cdot 10^{-7}$ (p=95%, (5,161.10⁻⁷ - 5,795.10⁻⁷)), podle Bakker a spol. (1997) (-) $K_{TPP^+,Ca^{2+}}^{pot} = 5,959 \cdot 10^{-7}$ (p=95%, (5,359.10⁻⁷ - 6,559.10⁻⁷)) a pro slabě interferující ionty (Bakker a spol., 1997) (-) $K_{TPP^+,Ca^{2+}}^{pot} = 1,02 \cdot 10^{-7}$ (p=95%, (7,356.10⁻⁸ - 1,305.10⁻⁷)).

B Závislost potenciálu elektrody na aktivitě Ca^{2+} .

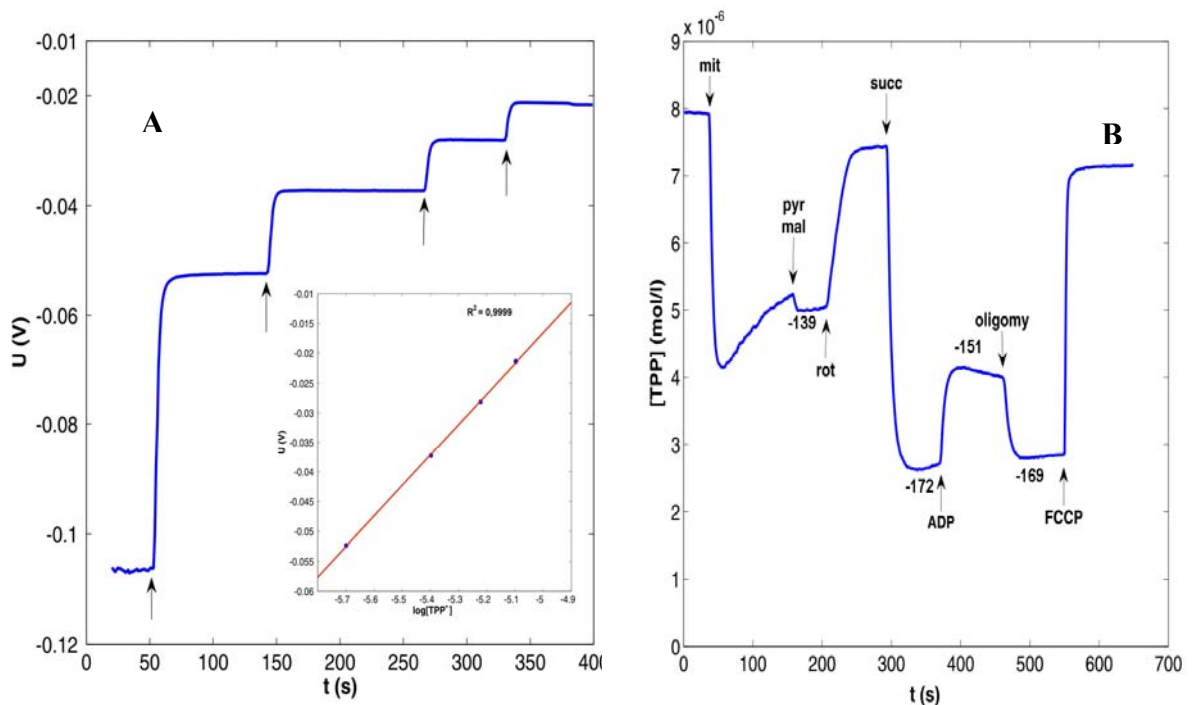
V experimentu na měření membránového potenciálu pomocí TPP^+ -selektivní elektrody nemusíme znát hodnoty koeficientů selektivity, pokud kalibrace proběhne v médiu, ve kterém také proběhne měření. Látky, které se přidávají během měření je nutno otestovat jestli jejich interference není zanedbatelná a můžeme postupovat jako v předchozím případě popsaném na str. 60.

5.2 VYUŽITÍ APARATURY NA MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU VNITŘNÍ MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNY

5.2.1 Membránový potenciál a hodnocení funkce dýchacího řetězce izolovaných mitochondrií

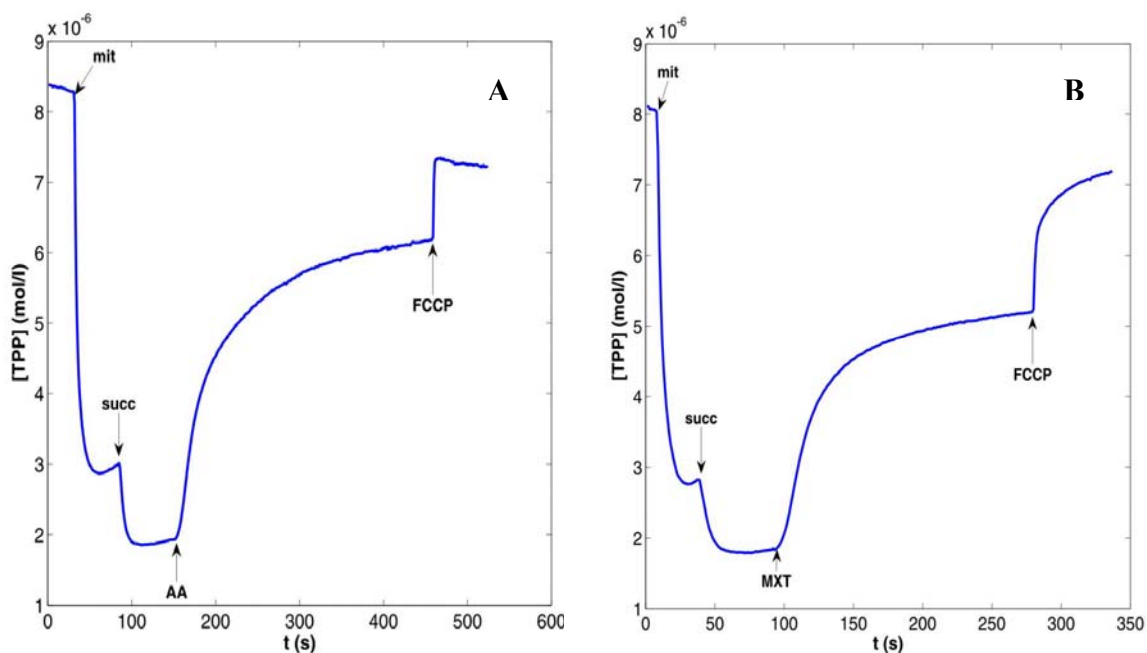
Aparatura popsaná v předchozí kapitole byla využita na měření mitochondriálního membránového potenciálu a na hodnocení funkce dýchacího řetězce izolovaných mitochondrií i permeabilizovaných buněk. Na obrázku 30 B je uveden příklad experimentu měření membránového potenciálu izolovaných potkaních mitochondrií jako závislost koncentrace TPP^+ na čase. Před každým měřením bylo nutné provést kalibraci postupným přidáváním TPP^+ do média (obr. 30 A), aby bylo možné z takto získaných hodnot vypočítat množství akumulovaného TPP^+ v mitochondriích. Tím byl také omezen vliv „driftu“ TPP^+ -selektivní elektrody a následné zkreslení měřených dat. Kalibrace byla prováděna v rozsahu 2 – 8 μM TPP^+ (obr. 30 A). Po přidání suspenze mitochondrií docházelo ke snižování koncentrace TPP^+ v médiu (obr. 30 B) v důsledku akumulace TPP^+ v matrix mitochondrií v závislosti na hodnotě membránového potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně. Množství přidávaných mitochondrií je voleno tak, aby v průběhu experimentu nebyla překročena oblast kalibrační křivky, většinou v rozmezí 0,2 – 0,4 mg proteinu/ml. Po přidání mitochondrií do média došlo k akumulaci TPP^+ v mitochondriích a ke snižování koncentrace TPP^+ v médiu (obr. 30 B). Po dosažení maxima v akumulaci TPP^+ bylo vidět pozvolný nárůst koncentrace TPP^+ (snižování membránového potenciálu) v důsledku nízké koncentrace endogenních substrátů. Přidání substrátů, které jsou oxidované NADH-dependentními dehydrogenasami (pyruvát, malát), zabránilo dalšímu poklesu membránového potenciálu. Přidáním rotenonu je inhibován komplex I dýchacího řetězce, čímž dochází ke zvýšení koncentrace TPP^+ v médiu (pokles membránového potenciálu). Následným přidáním sukcinátu - substrátu komplexu II došlo k obnově membránového potenciálu (akumulace TPP^+ v mitochondriích). Aby byla otestována funkčnost ATP-syntázy, bylo do média přidáno ADP. ATP-syntáza využívá pro syntézu ATP protonový gradient, proto po přidání ADP docházelo k poklesu membránového potenciálu. ATP-syntáza byla inhibována oligomycinem. To se

projevilo obnovením membránového potenciálu na přibližně stejnou hodnotu jako po přidání sukcinátu. Dále byl otestován vliv rozpráhače FCCP, který je schopen vybijet protonový gradient. Na obr. 30 B je to patrné jako únik TPP⁺ z matrix mitochondrie do média.



Obr. 30 Měření membránového potenciálu izolovaných mitochondrií. **A** - Kalibrace v rozsahu koncentrací $2 \cdot 10^{-6}$ – $8 \cdot 10^{-6}$ M TPP⁺. Šipky ukazují přidání TPP⁺ do výsledné koncentrace 2 μM, 4 μM, 6 μM, 8 μM. Vložený graf ukazuje závislost změny napětí na elektrodě (U) na logaritmu koncentrace TPP⁺. **B** Změny koncentrace TPP⁺ v závislosti na přidání substrátů a inhibitorů dýchacího řetězce. Šipky označují přidání izolovaných mitochondrií (mit, 0,3 mg proteinu/ml), pyruvátu (pyr, 10 mM) a malátu (mal, 2,5 mM), rotenonu (rot, 1 μM), sukcinátu (succ, 10 mM), ADP (0,5mM), oligomycinu (oligomy, 1 μM), FCCP (1μM). Příslušné hodnoty $\Delta\psi_m$ po přidání substrátů dýchacího řetězce byly vypočítány podle Żólkiewska a spol. 1989.

Komplex III můžeme inhibovat antimycinem nebo myxothiazolem. Po přidání těchto inhibitorů do inkubačního média také došlo k poklesu $\Delta\psi_m$ (obr. 31) a úniku TPP⁺ z mitochondrií. Časové průběhy akumulace TPP⁺ po přidání substrátů a inhibitorů dýchacího řetězce byly v souladu s publikovanými daty [8, 57, 82].



Obr. 31 Inhibice dýchacího řetězce antimycinem A a myxothiazolem. Šipky ukazují přidání mitochondrií (mit, 0,4 mg/ml), sukcinátu (succ, 10 mM), FCCP (1 μM), A antimycinu A (AA, 0,1 μM), B myxothiazolu (MXT, 0,1 μM).

Hodnotu mitochondriálního membránového potenciálu membrány je možné vypočítat ze vztahu, který bere v úvahu nespecifickou vazbu TPP⁺ do vnitřní a vnější strany vnitřní mitochondriální membrány:

$$\Delta\psi_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{V_0[TPP^+]_0 / [TPP^+]_t - V_t - K_0P}{V_mP + K_iP},$$

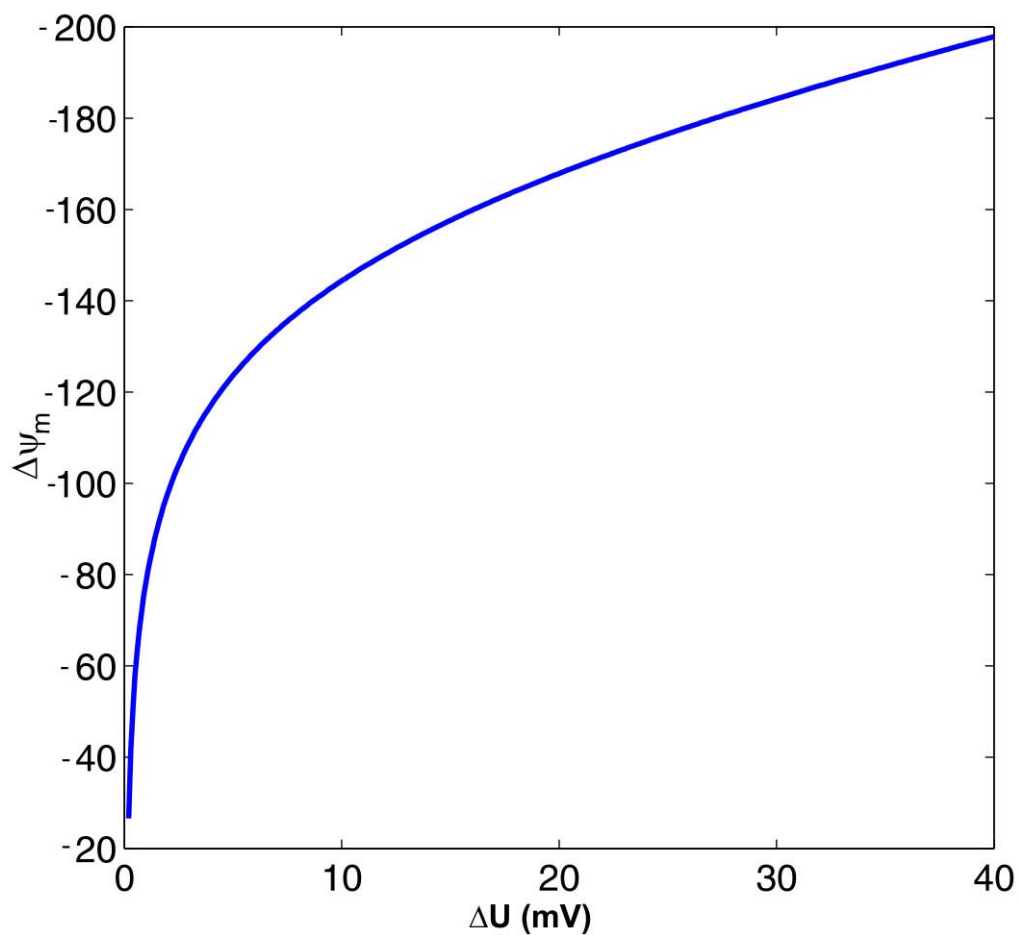
kde V_0 je objem média před přidáním mitochondrií, V_t je objem média v čase t , V_m je objem matrix mitochondrií (μl/mg proteinu), $[TPP^+]_0$ a $[TPP^+]_t$ jsou koncentrace TPP⁺ před přidáním mitochondrií a v čase t . P je obsah mitochondriálního proteinu v médiu (mg), K_0 (14,3 μl/mg) a K_i (7,9 μl/mg) jsou rozdělovací koeficienty pro vnitřní a vnější stranu vnitřní mitochondriální membrány [111]. Hodnoty membránového potenciálu vypočítané pomocí tohoto vztahu jsou zobrazeny na obr. 30. Objem mitochondrií V_m

byl počítán jako 1 $\mu\text{l}/\text{mg}$ proteinu [49]. Hodnoty membránového potenciálu po přidání jednotlivých substrátů jsou shrnuty v tabulce 4.

	pyruvát + malát	sukcinát	ADP	FCCP
$\Delta\psi_m$ (mV)	$-138,2 \pm 3,6$	$-170,3 \pm 3,1$	$-149,0 \pm 4,2$	$-85,8 \pm 23,89$

Tab. 4 Hodnoty $\Delta\psi_m$ po přidání substrátů dýchacího řetězce a FCCP.

Logaritmická závislost membránového potenciálu na akumulaci sondy způsobuje, že při nízkých hodnotách membránového potenciálu může být určení $\Delta\psi_m$ nepřesné. Akumulace TPP^+ , která způsobí změnu EMF o 1 mV představuje změnu $\Delta\psi_m$ až 78 mV (obr. 32). V důsledku toho se po přidání FCCP standardní odchylka měřeného $\Delta\psi_m$ zvýšila přibližně 8-násobně oproti energizovanému stavu. Při vysokých hodnotách $\Delta\psi_m$ (v energizovaném stavu) je tato závislost přibližně lineární a pozorovaná standardní odchylka se snižuje. Na vliv chyby kalibrace na hodnotu $\Delta\psi_m$ poukazuje také Plášek a spol. (2005) [88], kteří používali pro měření $\Delta\psi_m$ fluorescenční sondu TMRM.

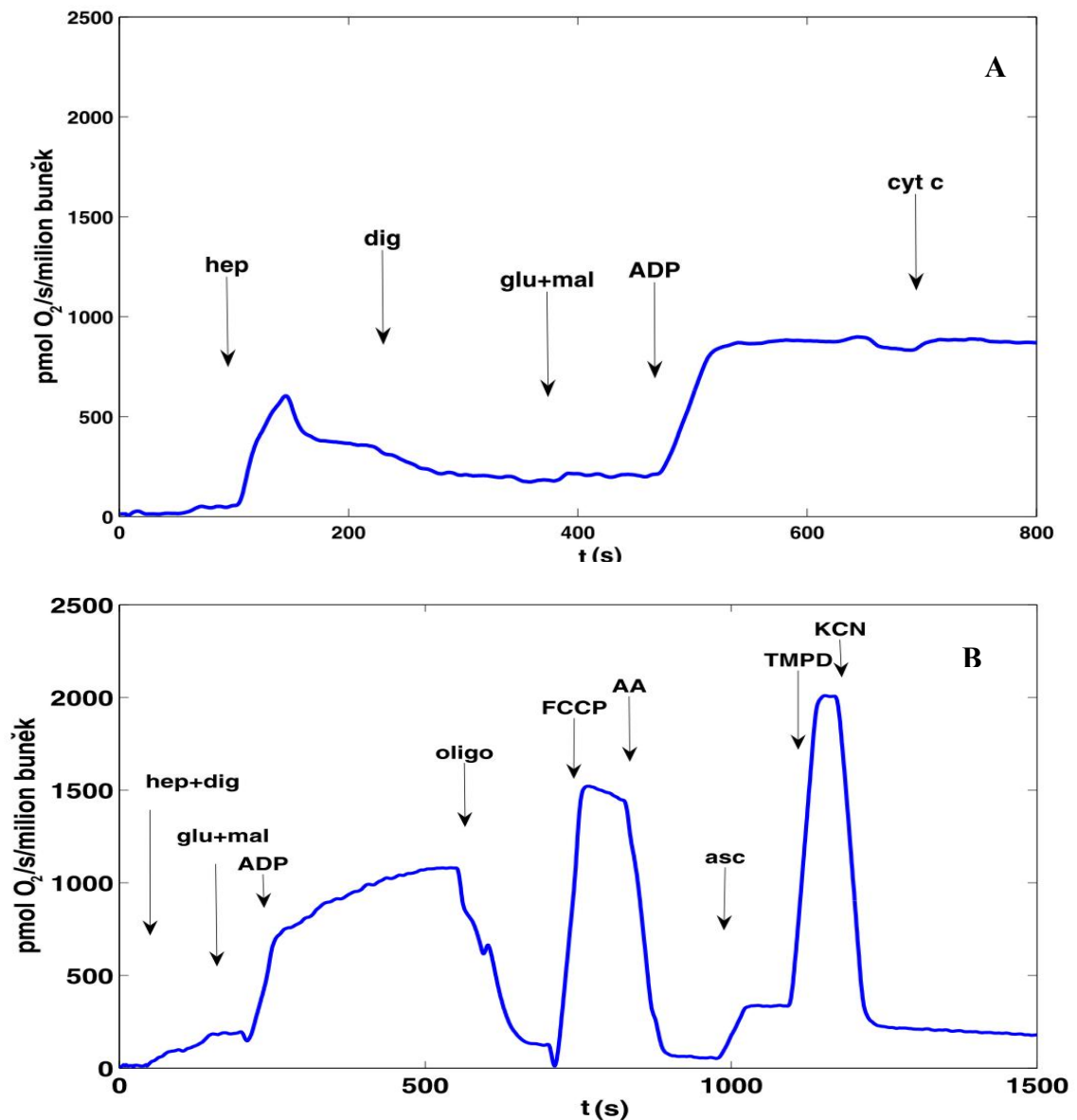


Obr. 32 Simulovaná závislost $\Delta\psi_m$ na změně emf elektrod (ΔU), která byla způsobena změnou koncentrace TPP^+ v médiu. Použité proměnné pro výpočet $\Delta\psi_m$ podle Żółkiewska a spol. (1989): $V_m = 1 \mu\text{l/mg}$ proteinu, $V_0 = 2 \text{ ml}$, $V_t = 2 \text{ ml}$, $P = 0,4 \text{ mg}$, předpokládá se Nernstovská odezva elektrody.

5.2.2 Mitochondriální membránový potenciál izolovaných hepatocytů a buněk z buněčných kultur. Hodnocení funkce dýchacího řetězce

Měření mitochondriálního membránového potenciálu izolovaných mitochondrií umožňuje určit $\Delta\psi_m$ kvantitativně, ale při izolaci dochází ke ztrátě kontaktů s jinými buněčnými organelami a cytoskeletem. Proto se v současnosti upřednostňuje hodnocení mitochondriálních funkcí v podmínkách *in situ* v buňkách permeabilizovaných malým množstvím digitoninu [37, 104]. Steroidní glykosid digitonin způsobuje nárůst permeability plasmatické membrány buněk pro anorganické ionty a metabolity. Za těchto podmínek zůstávají mitochondriální membrány intaktní [104] a jejich interakce s cytoskeletální sítí jsou zachovány [37, 42]. Selektivní permeabilizace plasmatické membrány umožní také eliminovat příspěvek membránového potenciálu na plasmatické membráně. Množství akumulovaného TPP⁺ by bez permeabilizace plasmatické membrány záleželo jak na potenciálu plasmatické membrány, tak na potenciálu vnitřní mitochondriální membrány. Přejít některých substrátů dýchacího řetězce může být také omezen přítomností plasmatické membrány, proto její permeabilizace umožní přímý přístup substrátů k mitochondriím. Množství digitoninu potřebného k permeabilizaci je různé u různých typů buněk. Proto je nutné před experimentem zjistit jeho vhodnou koncentraci tak, aby nedošlo k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány.

Pro hodnocení funkce dýchacího řetězce jsme zvolili hepatocyty izolované z potkaních jater. Pro ověření, že mitochondrie permeabilizovaných hepatocytů jsou dobře spřaženy a že vnější mitochondriální membrána zůstala intaktní jsme použili metodu měření spotřeby kyslíku v médiu. Na obr. 33 je průběh měření respirace u permeabilizovaných hepatocytů. Mitochondrie permeabilizovaných hepatocytů jsou dobře spřaženy (obr. 33 A) a index respirační kontroly (+ADP/-ADP) byl 4,3. Přidání cytochromu *c* nemělo aktivační vliv na rychlost respirace, čím se potvrdilo, že vnější mitochondriální membrána zůstala intaktní při použití nízké koncentrace digitoninu (20 $\mu\text{g/ml}$).



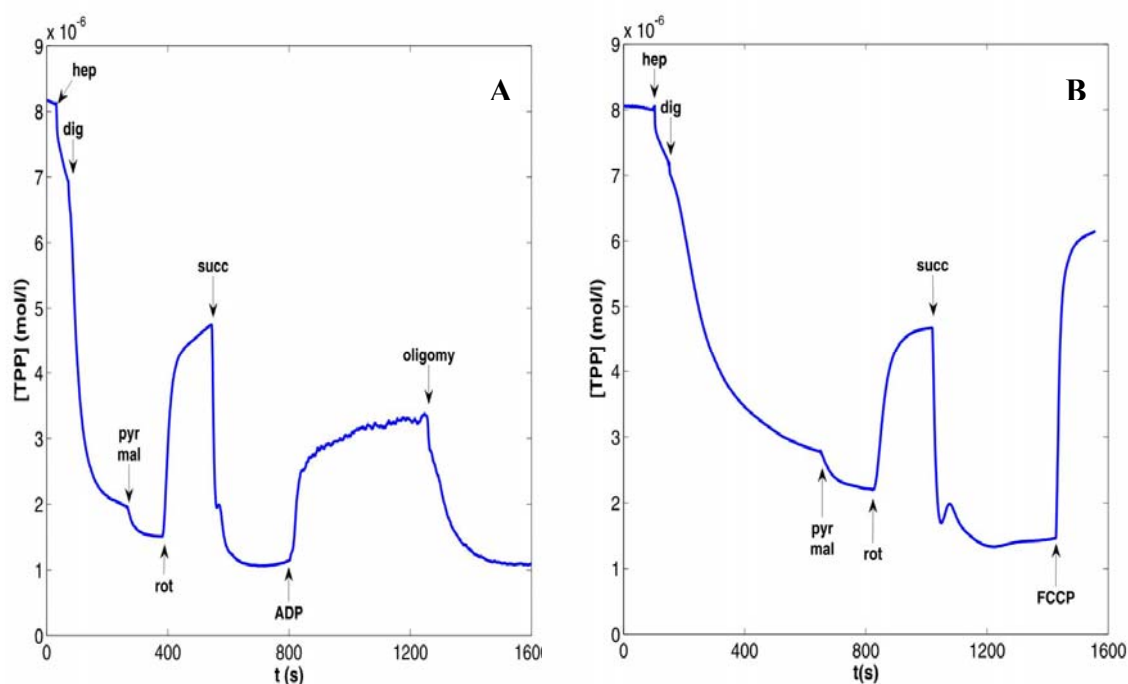
Obr. 33 Respirace hepatocytů permeabilizovaných digitoninem. Šipky označují přidání **A** hepatocytů (*hep*, 0,25 milion buněk/ml), digitoninu (*dig*, 20 $\mu\text{g/ml}$), glutamátu + malátu (*glu+mal*, 10 mmol/l + 3 mmol/l), ADP (1,5 mmol/l), cytochromu *c* (*cyt c*, 20 $\mu\text{mol/l}$). **B**: glutamátu + malátu (*glu+mal*, 10 mmol/l + 3 mmol/l), ADP (1,5 mmol/l), oligomycinu (*oligo*, 2 $\mu\text{mol/l}$), FCCP (1 $\mu\text{mol/l}$), antimycinu *A* (*AA*, 1 $\mu\text{mol/l}$), askorbátu (*asc*, 2 mmol/l), TMPD (0,5 mmol/l), KCN (0,5 mmol/l). Křivky reprezentují negativní derivaci změn tenze kyslíku v inkubačním médiu. Spotřeba kyslíku je vyjádřena jako pmol O_2 / sekundu/ milion buněk.

Obr. 33 B ukazuje průběh změny spotřeby O_2 v médiu po přidání substrátů a inhibitorů dýchacího řetězce. Po přidání ADP došlo k aktivaci respirace, která je inhibovatelná oligomycinem. FCCP rozpražením dýchacího řetězce indukovalo

zvýšenou respiraci, která se snížila přidáním antimycinu A (inhibitoru komplexu III). Přidání askorbátu (donoru elektronů pro cytochrom *c*) a TMPD (*N,N,N',N'*-tetrametyl-*p*-fenylendiamin) (způsobuje redukci askorbátu) znovu iniciuje respiraci, která je následně inhibovatelná KCN - inhibitorem přenosu elektronů přes komplex IV. Působení substrátů a inhibitorů dýchacího řetězce u mitochondrií *in situ* bylo stejné jako v případě izolovaných mitochondrií [82].

Změny koncentrace TPP^+ v médiu a s tím související změny $\Delta\psi_m$ permeabilizovaných hepatocytů jsou zobrazeny na obr. 34. Vidíme, že po přidání hepatocytů do média, koncentrace TPP^+ klesala v důsledku průchodu TPP^+ do buněk na základě přítomného potenciálového rozdílu jak na plasmatické membráně, tak na vnitřní mitochondriální membráně. Přidání digitoninu tento proces ještě urychlilo a zároveň po permeabilizaci plasmatické membrány jsme sledovali už jenom změny $\Delta\psi_m$. Množství digitoninu bylo titrováno až do koncentrace, kdy další přídavek už nezpůsobil akumulaci TPP^+ , ale současně nezpůsobil únik TPP^+ do média v důsledku porušení vnější nebo vnitřní mitochondriální membrány. Vhodná koncentrace digitoninu pro permeabilizaci hepatocytů byla 35 $\mu\text{g/ml}$. Po přidání pyruvátu a malátu se do mitochondrií akumulovalo ještě malé množství TPP^+ , protože v médiu po permeabilizaci byly přítomny jenom endogenní substráty. Rotenon inhibicí komplexu I způsobil vyplavení TPP^+ do média a následné přidání sukcinátu mělo za následek obnovení $\Delta\psi_m$ a akumulaci TPP^+ do mitochondrií tak jako v případě izolovaných mitochondrií. Funkci ATP-synthasy jsme také otestovali přidáním ADP a inhibovali ji oligomycinem. Množství akumulovaného TPP^+ po přidání oligomycinu bylo přibližně stejné jako před přidáním oligomycinu. Hodnota $\Delta\psi_m = 0$ je prezentována hodnotou koncentrace TPP^+ po přidání FCCP. Tato hodnota není totožná s počáteční koncentrací TPP^+ před přidáním hepatocytů v důsledu změny objemu média a také nespecifické vazby TPP^+ do buňčných membrán (obr. 34 B). Průběhy akumulace TPP^+ do mitochondrií permeabilizovaných hepatocytů v přítomnosti substrátů a inhibitorů dýchacího řetězce mají stejný průběh jako v případě izolovaných mitochondrií (obr. 30 B).

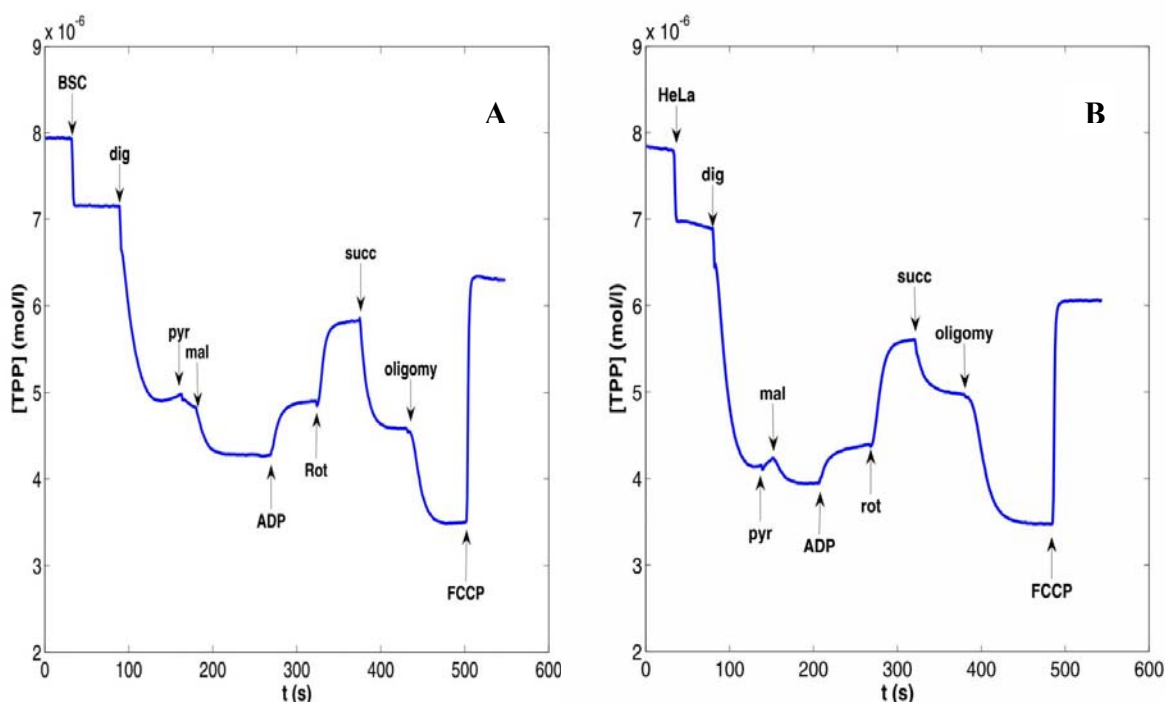
V dalších experimentech jsme metodu měření membránového potenciálu pomocí TPP⁺-selektivních elektrod použili i pro hodnocení $\Delta\psi_m$ u permeabilizovaných buněk z buněčných kultur - HeLa G, BSC-40. Buňky HeLa G získávají ATP převážně z glykolýzy, zatím co BSC-40 z oxidativní fosforylace a mají různou aktivitu enzymů dýchacího řetězce [106]. Tyto odlišnosti v energetickém metabolismu jednotlivých typů buněk se také odrazily v množství akumulovaného TPP⁺ po přidání substrátů a inhibitorů dýchacího řetězce.



Obr. 34 Hodnocení membránového potenciálu izolovaných hepatocytů. Šipky ukazují přidání do finální koncentrace **A** hepatocytů (hep, $1,65 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (dig, 0,035 mg/ml), pyruvátu (pyr, 10 mM) a malátu, (mal, 2,5 mM), rotenonu (rot, 1 μ M), sukcinátu (succ, 10 mM), ADP (0,5 mM), oligomycinu (oligomy, 1 μ M), **B** hepatocytů ($1,65 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (0,035 mg/ml), pyruvátu a malátu (10 mM, 2,5 mM), sukcinátu (10 mM), FCCP (1 μ M).

Na obr. 35 jsou zobrazeny změny koncentrace TPP⁺ po přidání substrátů a inhibitorů dýchacího řetězce u BSC-40 (A) a HeLa G (B) buněk. Aby byla pozorovaná odezva po přidání buněk dostatečná, množství přidávaných buněk bylo v tomto případě 10-krát větší než v případě hepatocytů (minimální množství 3 - 5-násobné oproti hepatocytům). Nutnost použít větší množství buněk pravděpodobně souvisí

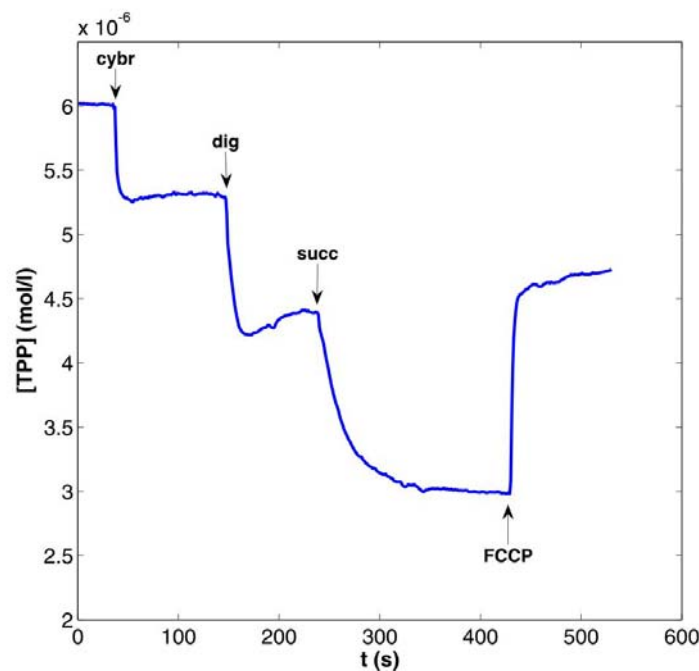
s množstvím mitochondrií připadajících na jednu buňku. Tak jako u hepatocytů, po přidání digitoninu k buňkám dojde k permeabilizaci plasmatické membrány prostupu TPP^+ do mitochondrií. Přidání pyruvátu a malátu mělo za následek ještě další akumulaci TPP^+ . V důsledku využití protonmotivní síly k syntéze ATP po přidání ADP se hodnota membránového potenciálu snížila (vyplavení TPP^+ do média). Tak jako v případě hepatocytů, přidání rotenonu způsobilo zvýšení koncentrace TPP^+ v médiu. Přidání sukcinátu způsobilo znovu akumulaci TPP^+ do mitochondrií. FCCP mělo za následek vyplavení TPP^+ do média. V případě BSC-40 buněk bylo množství akumulovaného TPP^+ po přidání sukcinátu vyšší (60 % akumulovaného TPP^+) než před přidáním rotenonu (50 % akumulovaného TPP^+) (obr. 35 A). Zatímco u HeLa G buněk bylo akumulované množství TPP^+ po přidání sukcinátu menší (35 %) než před přidáním rotenonu (53 %) (obr. 35 B). Množství akumulovaného TPP^+ bylo počítáno jako procento z množství TPP^+ , které se vyplavilo do média po přidání FCCP. Rozdíl v množství akumulovaného TPP^+ po přidání sukcinátu byl pravděpodobně způsoben vyšší aktivitou sukcinátdehydrogenasy, která je přibližně dvakrát větší u BSC-40 než u HeLa G [106].



Obr. 35 Hodnocení funkce dýchacího řetězce u permeabilizovaných buněk **A** BSC-40 (BSC, $1,6 \cdot 10^7$ buněk/ml) a **B** HeLa G (HeLa, $1,6 \cdot 10^7$ buněk/ml). Šipky ukazují přidání digitoninu (dig, 0,075 mg/ml), pyruvátu (pyr, 10 mM) a malátu (mal, 2,5 mM), ADP (0,5 mM), rotenonu (rot, 1 μM), sukcinátu (succ, 10 mM), oligomycinu (oligomy, 1 μM), FCCP (1 μM).

Zkonstruovaná aparatura byla také využita na měření $\Delta\psi_m$ cytoplasmatických hybridních buněk odvozených od fibroblastů – tzv. cybridů [1], které umožňují studovat vliv mutace v mtDNA na funkci dýchacího řetězce. Tyto buňky se používají jako modelový systém pro studium mitochondriálních nemocí (např. MERRF).

Na obr. 36 je zobrazena akumulace TPP^+ do mitochondrií kontrolních cybridů permeabilizovaných digitoninem. Přidání buněk a následná permeabilizace plasmatické membrány digitoninem způsobila akumulaci TPP^+ v mitochondriích. Po přidání sukcinátu do média se zvýšilo množství akumulovaného TPP^+ v mitochondriích. Přidání FCCP způsobilo disipaci membránového potenciálu a vyplavení TPP^+ zpět do média. Tento průběh je shodný s akumulací TPP^+ tak jako v případě izolovaných mitochondrií, hepatocytů, BSC-40 a HeLa G buněk.



Obr. 36 Průběh akumulace TPP^+ do mitochondrií cybridů. Šipky ukazují přidání cybridů (cybr, $9,6 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (dig, 0,1 mg/ml), sukcinátu (succ, 10 mM), FCCP (1 μM).

Experimenty s izolovanými hepatocyty i buněčnými kulturami ukázaly, že metoda permeabilizace plasmatické membrány s použitím nízké koncentrace digitoninu umožňuje hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu v buňkách

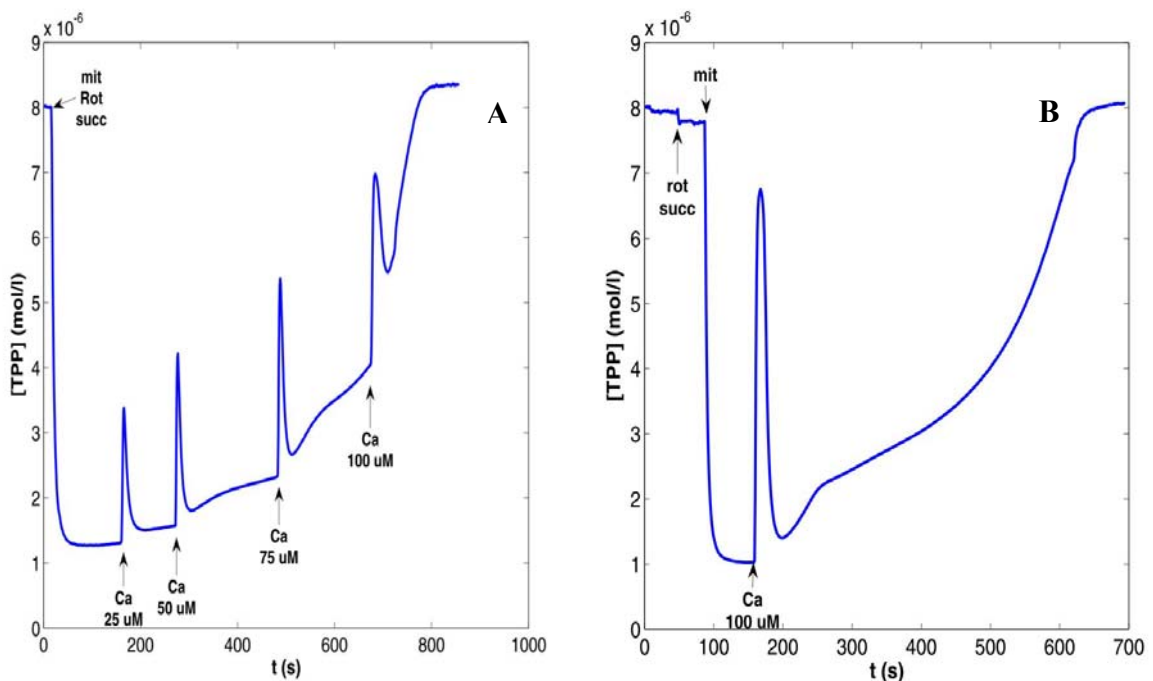
s permeabilizovanou plazmatickou membránou - tj. *in situ*. Na druhé straně je velmi obtížné spočítat hodnotu membránového potenciálu, protože objem mitochondrií permeabilizovaných buněk nutný pro tento výpočet je neznámý. Vztáhnout množství akumulovaného TPP⁺ do mitochondrií na množství přidaných buněk by při porovnávání různých typů buněk mohlo být zavádějící v důsledku různého množství přítomných mitochondrií. Na druhé straně je možné vhodným protokolem přidávání substrátů a inhibitorů dýchacího řetězce získat důležité informace o funkčnosti dýchacího řetězce a přitom nemusíme znát přesnou hodnotu $\Delta\psi_m$.

Tato metoda je také vhodná pro studium látek ovlivňujících mitochondriální membránový potenciál a může být použita pro studium různých aspektů mitochondriální bioenergetiky. Také by mohla být vhodným diagnostickým nástrojem mitochondriálních poruch, u kterých dochází ke změnám membránového potenciálu, např. defekty komplexu I a IV [87] a defekty ATP-synthasy [79, 105].

5.2.3 TPP⁺-selektivní elektrody jako nástroj pro sledování funkce „mitochondrial permeability transition pore“

Protože se TPP⁺-selektivní elektrody osvědčily při studiu funkce dýchacího řetězce a sledování membránového potenciálu, použili jsme tuto metodu také pro sledování funkce „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP). Funkci MPTP jsme sledovali jak u izolovaných mitochondrií, tak u digitoninem permeabilizovaných hepatocytů.

Ověřili jsme, že otevření MPTP je indukováno vysokou koncentrací vápníku. Na obr. 37 A vidíme změny koncentrace TPP⁺ po jednotlivých přidání vápníku u izolovaných mitochondrií. Výraznější změny $\Delta\psi_m$ způsobila koncentrace vápníku až nad 75 μM . Obr. 37 B ukazuje časový průběh změny $\Delta\psi_m$. Protože je Ca²⁺ transportované do mitochondrií prostřednictvím uniporteru v závislosti na $\Delta\psi_m$, dochází také ke změnám $\Delta\psi_m$, které ale mitochondrie dokáží kompenzovat pumpováním H⁺ dýchacím řetězcem. Až otevření MPTP po přidání vysoké koncentrace

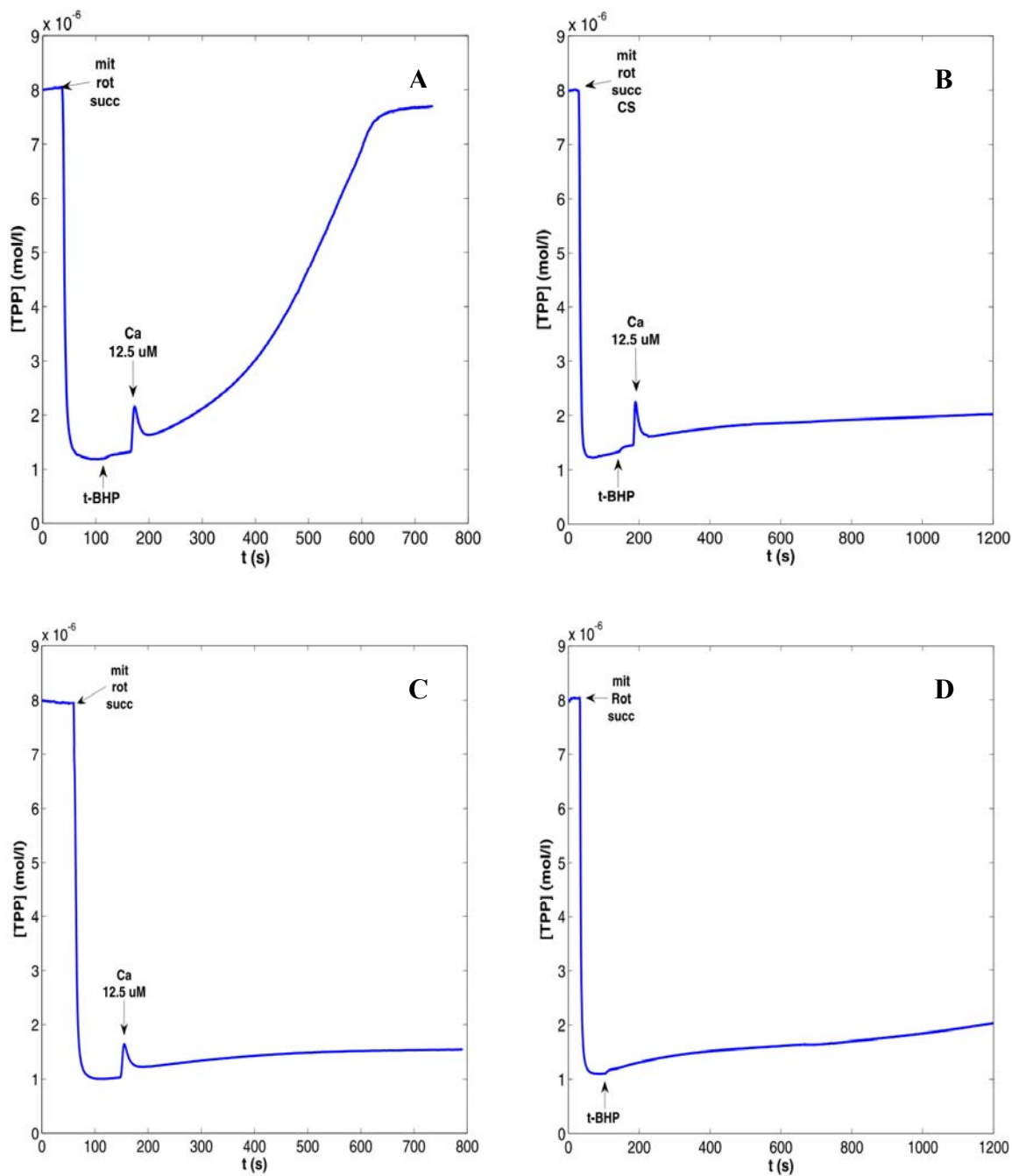


Obr. 37 A Změny koncentrace TPP⁺ po přidání Ca²⁺. Šipky ukazují přidání mitochondrií (0,4 mg/ml), rotenonu (rot, 1 μM), sukcinátu (succ, 10 mM) a Ca²⁺ do finální koncentrace 25, 50, 75 a 100 μM . **B** Časový průběh změny koncentrace TPP⁺ po přidání 100 μM Ca²⁺.

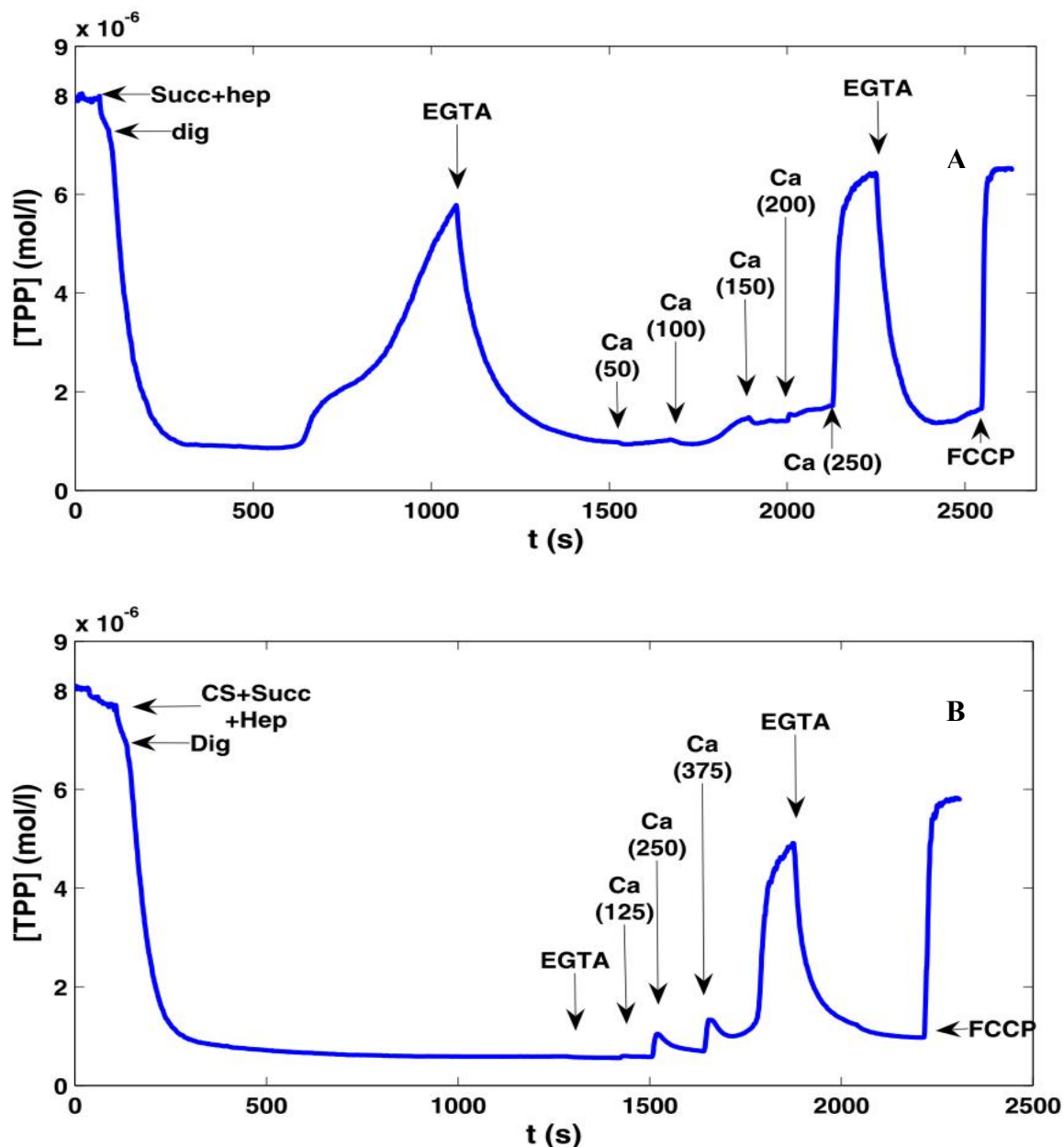
vápníku způsobí disipaci $\Delta\psi_m$ (obr. 37) jak bylo pozorováno dříve [55, 80]. Na obr. 37 B vidíme, že po přidání Ca^{2+} (100 μM) došlo k poklesu membránového potenciálu, který je jenom přechodný a posléze se membránový potenciál vrátil na přibližně stejnou hodnotu. Tato koncentrace vápníku však už způsobí otevření MPTP a disipaci membránového potenciálu.

Účinek vápníku může být zesílen pro-oxidačními látkami, např. *tert*-butyl hydroperoxidem (*t*-BHP). Kombinovaný účinek vápníku a *t*-BHP měl už při nízké koncentraci vápníku (12,5 μM) a 1,5 mM *t*-BHP za následek otevírání MPTP a následnou disipaci $\Delta\psi_m$ (obr. 38 A). Tento proces byl inhibovatelný cyklosporinem A (obr. 38 B)). Protože k disipaci membránového potenciálu může dojít v důsledku přítomnosti rozpřahovačů (např. volné mastné kyseliny), bylo nutné ověřit, že přidáním cyklosporinu A je možné disipaci $\Delta\psi_m$ zabránit. Nízká koncentrace vápníku (12,5 μM CaCl_2) bez přítomnosti *t*-BHP a taktéž samotné *t*-BHP (1,5 mM) nezpůsobilo otevření MPTP ve sledovaném čase (obr. 38 C a D).

Funkci MPTP jsme sledovali také u hepatocytů permeabilizovaných digitoninem. Po permeabilizaci hepatocytů digitoninem a následné akumulaci TPP^+ do mitochondrií došlo přibližně po 4 minutách k poklesu membránového potenciálu i bez přidání Ca^{2+} . (Obr. 39 A). Tento pokles bylo možné zvrátit přidáním chelátoru vápníku EGTA a také cyklosporinu A (Obr. 39 B).



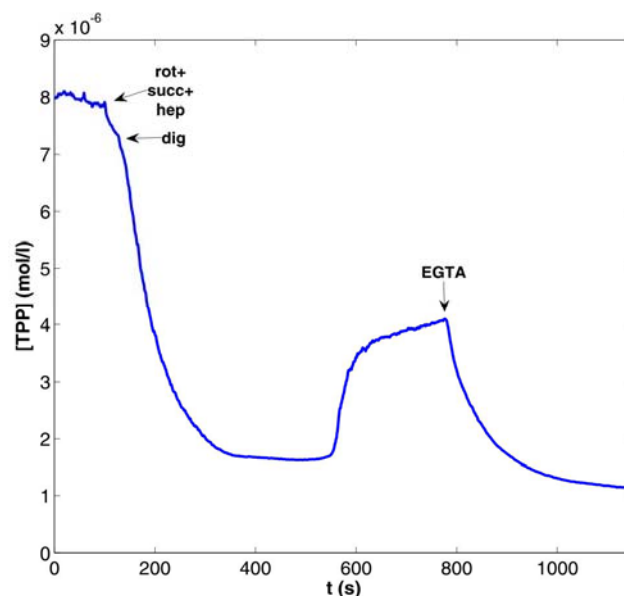
Obr.38 Vliv vápníku a t-BHP na změny koncentrace TPP⁺. Šipky ukazují přidání mitochondrií (mit, 0,4 mg/ml), rotenonu (rot, 1 μM), sukcinátu (succ, 10 mM), Ca²⁺ (Ca, 12,5 μM) a t-BHP (1,5 mM), cyklosporinu A (CS, 2 μM).



Obr. 39 Změny koncentrace TPP^+ v médiu indukované Ca^{2+} a EGTA. Šipky ukazují přidání **A** sukcinátu (succ, 10 mM), hepatocytů (hep, $1,64 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (dig, 0,035 mg/ml), EGTA (350 μM), Ca^{2+} (Ca, 50, 100, 150, 200 μM), EGTA (3 mM), FCCP (1 μM); **B** sukcinátu (10 mM), hepatocytů ($1,64 \cdot 10^6$ buněk/ml), cyklosporinu A (CS, 2 μM), digitoninu (0,035 mg/ml), EGTA (350 μM), Ca^{2+} (125, 250, 375 μM), EGTA (3 mM), FCCP (1 μM).

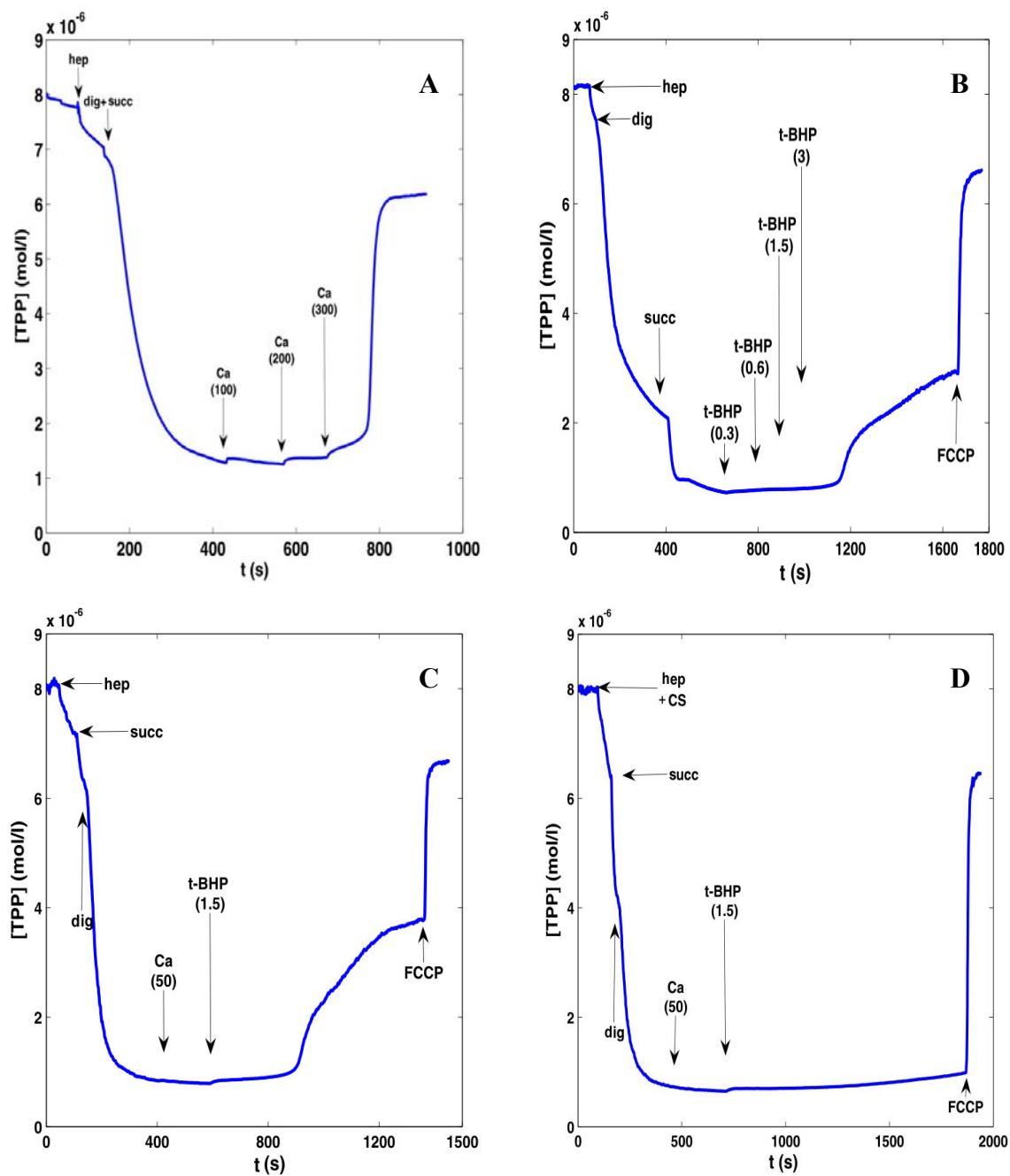
Tyto průběhy naznačují, že dochází k otevírání MPTP i bez přidaného Ca^{2+} . MPTP mohl být otevřen v důsledku Ca^{2+} přítomného v izolačním médiu, který nebyl odstraněn ani po několikanásobném promytí hepatocytů, nebo samotné hepatocyty obsahovaly dostatečné množství vápníku pro otevření MPTP. Proto jsme v dalších experimentech pro studium vlivu *t*-BHP na $\Delta\psi_m$ používali médium s přítomným EDTA (1 mM), který zabránil otevírání MPTP. Dalším přidáváním Ca^{2+} (obr. 39 A, B) je možné znovu způsobit disipaci $\Delta\psi_m$ a znovu jej vrátit na původní hodnotu pomocí EGTA. V souladu s literaturou [47] je otevření MPTP možné indukovat i v přítomnosti cyklosporinu A a to vysokou koncentrací vápníku. V našem případě to byla koncentrace větší než 375 μM Ca^{2+} . Přidáním EGTA je možné i v tomto případě membránový potenciál znovu vrátit na původní hodnotu.

Ukazuje se, že rotenon – inhibitor komplexu I je účinnějším inhibitorem MPTP než cyklosporin A u buněk KB, buněk U937 [26] a u izolovaných jaterních mitochondrií [9]. Proto jsme chtěli ověřit schopnost rotenonu inhibovat MPTP i u hepatocytů permeabilizovaných digitoninem. Hepatocyty byly přidány do K-média bez EDTA jako v případě na obr. 39 A. I v tomto případě dochází ke snížení membránového potenciálu (obr. 40) a nedošlo k úplné inhibici MPTP tak jako v případě cyklosporinu A (obr. 39 B). Přídavek EGTA způsobil znovu akumulaci TPP^+ v mitochondriích, tak jako na obr. 39 A. Z těchto dat by mohlo vyplývat, že existuje tkáňově-specifická regulace otevírání MPTP [26, 74]. Ale také to mohlo být způsobeno rozdílnými podmínkami, při kterých jsme MPTP indukovali. Belyaeva a spol. (2004) [9] inkubovali mitochondrie v 125 mM NH_4NO_3 médiu bez exogenního P_i a Mg^{2+} . Indukce MPT je také závislá na koncentraci P_i v médiu [64, 65] a mohla být tímto ovlivněna.



Obr. 40 Změny koncentrace TPP^+ v médiu indukované Ca^{2+} a EGTA. Šipky ukazují přidání rotenonu (*rot*, $1 \mu M$) sukcinátu (*succ*, 10 mM), hepatocytů (*hep*, $1,64 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (*dig*, $0,035 \text{ mg/ml}$), EGTA ($350 \mu M$).

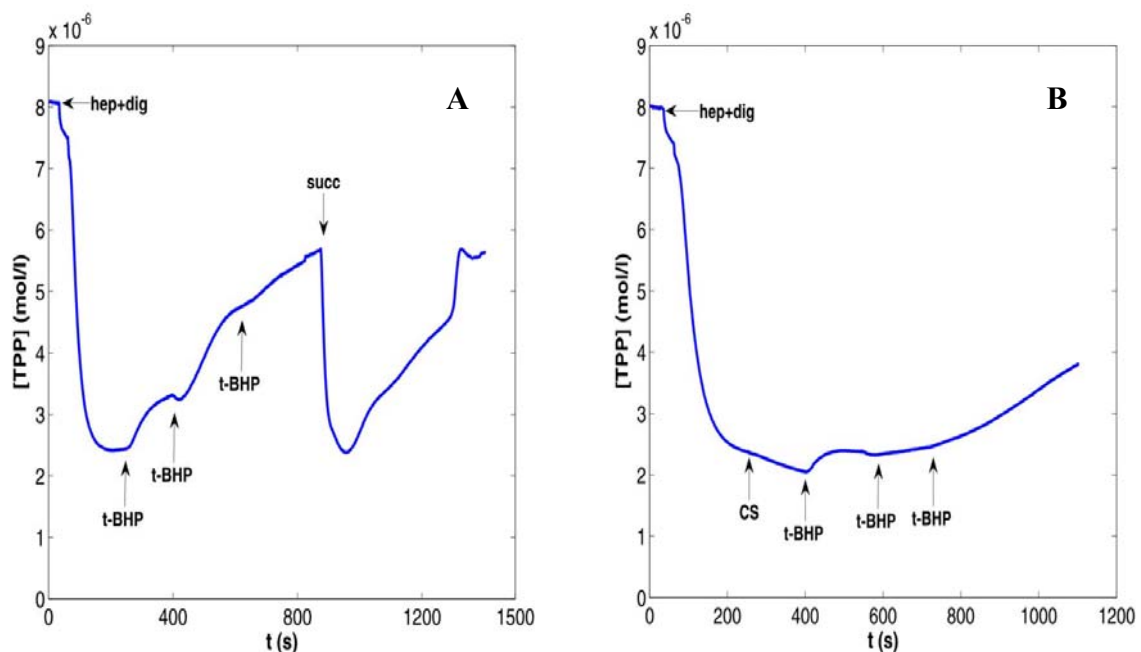
V dalších experimentech, kdy jsme sledovali vliv *t*-BHP na $\Delta\psi_m$ jsme hepatocyty inkubovali v K-médiu s přítomným 1 mM EDTA. Za těchto experimentálních podmínek $\Delta\psi_m$ nebyl ovlivněn přidáním Ca^{2+} až do koncentrace $200 \mu M$ (Obr. 41 A). Také *t*-BHP do koncentrace $1,5 \text{ mM}$ nezpůsobil disipaci $\Delta\psi_m$ (obr. 41 B). Přidání vápníku o koncentraci $50 \mu M$ v přítomnosti $1,5 \text{ mM}$ *t*-BHP mělo za následek disipaci $\Delta\psi_m$ (obr. 41 C) i při této nízké koncentraci vápníku. Disipaci $\Delta\psi_m$ bylo zabráněno přidáním cyklosporinu A (obr. 41 D). Tím jsme potvrdili, že disipace $\Delta\psi_m$ je způsobena otevřením MPTP. I naše experimenty *in situ* potvrzují, že oxidační stres zvyšuje citlivost MPTP k vápníku [47].



Obr.41 Změny koncentrace TPP^+ indukované vápníkem a t -BHP. Šipky ukazují přidání **A** Sukcinátu ($succ$, 10 mmol/l), hepatocytů ($1,8 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (dig , 0,035 mg/ml), Ca^{2+} (Ca^{2+} , 100, 200, 300 μ mol/l); **B** sukcinátu (10 mmol/l), hepatocytů ($1,8 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (0,035 mg/ml), t -BHP (0,3; 0,6; 1,5; 3 mmol/l), FCCP (1 μ mol/l); **C**. sukcinátu (10 mmol/l), hepatocytů ($1,64 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (0,035 mg/ml), Ca^{2+} (50 μ mol/l), t -BHP (1,5 mmol/l), FCCP (1 μ mol/l); **D** hepatocytů ($1,64 \cdot 10^6$ buněk/ml), cyklosporinu A (CS, 2 μ mol/l), sukcinátu (10 mmol/l), digitoninu (0,035 mg/ml), $CaCl_2$ (50 μ mol/l), t -BHP (1,5 mmol/l), FCCP (1 μ mol/l).

5.2.4 Vliv *t*-BHP na funkci dýchacího řetězce izolovaných hepatocytů

V podmínkách *in situ* v permeabilizovacích hepatocytech jsme sledovali účinek prooxidantu *t*-BHP na jednotlivé komplexy dýchacího řetězce. Působení *t*-BHP je závislé jak na množství přítomného *t*-BHP, tak na čase expozice. Jednotlivé komplexy dýchacího řetězce jsou také různě citlivé na účinky *t*-BHP. Komplex I je citlivější než komplex II [35]. Protože kritická koncentrace účinku *t*-BHP je 0,75 – 3 mM, používali jsme pro sledování vlivu *t*-BHP rozmezí koncentrací 0,3 - 3 mM. Na obr. 42 je zobrazeno působení *t*-BHP na membránový potenciál permeabilizovaných hepatocytů bez přítomnosti přidaných substrátů – tj. s endogenními substráty. Koncentrace 0,5 mM *t*-BHP způsobila postupný pokles potenciálu, další přidání *t*-BHP (1,5 a 3 mM) tento pokles ještě urychlilo. Přidáním sukcinátu došlo k návratu potenciálu na přibližně původní hodnotu, ale poté došlo k disipaci $\Delta\psi_m$. Cyklosporin A tento pokles částečně inhibuje (obr. 42 B) a k postupnému snižování $\Delta\psi_m$ v čase



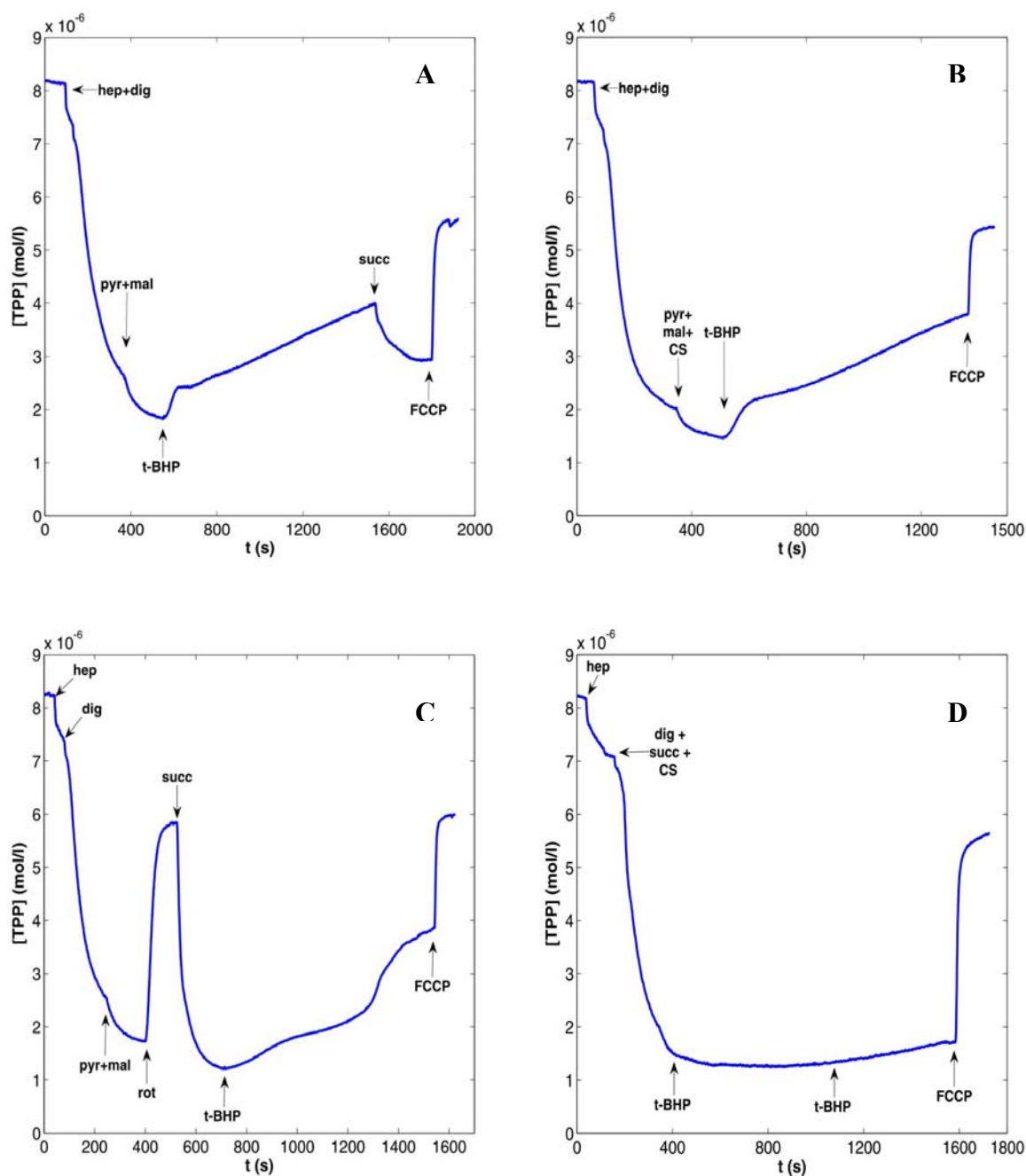
Obr. 42 Změny koncentrace TPP^+ v důsledku působení *t*-BHP. Šipky ukazují přidání **A** hepatocytů (hep, $1,8 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (dig, 0.035 mg/ml), *t*-BHP (0,5 mM, 1,5 mM, 3 mM), sukcinátu (succ, 10 mM), **B** hepatocytů ($1,8 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (0.035 mg/ml), cyklosporinu A (CS, $2 \mu\text{mol/l}$) *t*-BHP (0,5 mM, 1,5 mM, 3 mM).

docházelo i v přítomnosti cyklosporinu A. Může to být způsobeno inhibicí dýchacího řetězce nebo otevíráním MPTP i v přítomnosti cyklosporinu A, které bylo pozorováno v déle trvajících experimentech [18]. Abychom rozlišili vliv *t*-BHP na jednotlivé komplexy dýchacího řetězce, sledovali jsme změny $\Delta\psi_m$ indukované *t*-BHP v přítomnosti substrátů, které jsou oxidovány NADH-dependentními dehydrogenasami - pyruvátu a malátu a následně v přítomnosti substrátu komplexu II - sukcinátu. Přidání *t*-BHP v přítomnosti pyruvátu a malátu (obr. 43 A) mělo za následek postupný pokles $\Delta\psi_m$. Na tento pokles neměl vliv ani přidání cyklosporin A (obr. 43 B). V podmínkách, kdy byl komplex I inhibován rotenonem (jako substrát byl použit sukcinát) také docházelo v přítomnosti *t*-BHP (3 mM) ke snižování $\Delta\psi_m$ (obr. 43 C). Tento proces byl v tomto případě citlivý na přidání cyklosporinu A a $\Delta\psi_m$ se v čase snižoval jenom zanedbatelně (obr. 43 D).

Také měření spotřeby kyslíku [117] poukazuje na rozpráhující efekt *t*-BHP, kde u hepatocytů inkubovaných s 3 mM *t*-BHP dochází ke zvýšení respirace bez přítomnosti ADP. Zůstává však aktivní minimálně 50% sukcinát-dependentní respirace.

Z těchto poznatků můžeme shrnout účinek *t*-BHP na funkci dýchacího řetězce:

1. Snižování $\Delta\psi_m$ v důsledku působení *t*-BHP, které není citlivé na cyklosporin A může být způsobeno inhibičním efektem *t*-BHP na komplex I. Citlivost komplexu I na peroxidační poškození je vysvětlována modifikací Fe-S center, které jsou potřebné k přenosu redukovaných ekvivalentů z NADH na koenzym Q [35]. Snižování $\Delta\psi_m$ by mohlo být také způsobeno inhibicí mitochondriální akonitasy [118].
2. Rozpráhující efekt *t*-BHP, který je citlivý na cyklosporin A. Citlivost na cyklosporin A naznačuje otevírání MPTP indukované působením *t*-BHP.



Obr. 43 Změny koncentrace TPP^+ v důsledku působení t -BHP na dýchací řetězec permeabilizovaných hepatocytů. Šipky ukazují přidání **A** hepatocytů (*hep* $1,8 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu (*dig*, $0,035$ mg/ml), pyruvátu a malátu (*pyr*, 10 mM, *mal* $2,5$ mM) t -BHP ($1,5$ mM), sukcinátu (*succ*, 10 mM), FCCP ($1 \mu\text{mol/l}$), **B** hepatocytů ($1,8 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu ($0,035$ mg/ml), pyruvátu a malátu (10 mM, $2,5$ mM), cyklosporinu A (*CS*, $2 \mu\text{M}$), t -BHP ($1,5$ mM), FCCP ($1 \mu\text{M}$), **C** hepatocytů ($1,8 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu ($0,035$ mg/ml), pyruvátu a malátu (10 mM, $2,5$ mM), rotenonu (*rot*, $1 \mu\text{M}$), sukcinátu (10 mM), t -BHP (3 mM), FCCP ($1 \mu\text{M}$), **D** hepatocytů ($1,8 \cdot 10^6$ buněk/ml), digitoninu ($0,035$ mg/ml), rotenonu ($1 \mu\text{M}$), sukcinátu (10 mM), cyklosporinu A ($2 \mu\text{M}$), t -BHP ($1,5$ a 3 mM), FCCP ($1 \mu\text{M}$).

Výsledky získané ze studia vlivu vápníku a *t*-BHP ukazují, že měření membránového potenciálu pomocí TPP⁺-selektivních elektrod je vhodnou metodou pro studium působení hepatotoxických látek (např. *t*-BHP), které poškozují mitochondriální metabolismus cestou otevírání MPTP a dalších faktorů, které ovlivňují mitochondriální membránový potenciál.

6. ZÁVĚR

1. Konstrukce aparatury pro měření membránového potenciálu pomocí iontově selektivních elektrod citlivých na TPP⁺

Byla zkonstruována aparatura na měření membránového potenciálu pomocí iontově-selektivních elektrod, která byla připojena k počítači. Sběr a následné zpracování dat bylo uskutečněno programem MATLAB/Simulink.

Změnou složení citlivé membrány – tj. přidáním sraženiny TPP⁺TPB⁻ se dosáhla Nernstovská odpověď od koncentrace $3 \cdot 10^{-6}$ M TPP⁺. Protože docházelo k vyplavování TPP⁺ z membrány, byla sraženina nahrazena tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)fenyl]boritanem sodným. Takto vyrobené membrány měly Nernstovskou odezvu od koncentrace $1 \cdot 10^{-6}$ M TPP⁺ a nedocházelo k vyplavování TPP⁺ do měřicího média. Proto bylo následně možné vypočítat koeficienty selektivity pro ionty Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ podle doporučení IUPAC a podle Nikolského-Eisenmanovy rovnice (7) a rovnice beroucí v úvahu rozdílný náboj primárního a interferujícího iontu (8). Nikolského-Eisenmanova rovnice popisuje dobře experimentální data kalibrační křivky v případě jednomocných kationů. V případě dvoumocných kationů jsou vhodnými modely Nikolského-Eisenmanova rovnice i rovnice beroucí v úvahu rozdílný náboj primárního a interferujícího iontu (8) podle Bakker a spol. (1997), přičemž Nikolského-Eisenmanova rovnice je výpočetně méně náročná.

Zkonstruovaná aparatura je vhodná pro měření koncentrace TPP⁺, které umožňuje monitorování membránového potenciálu v reálném čase. Optimalizace složení citlivé membrány snížila hodnotu detekčního limitu elektrody oproti komerčně vyráběné elektrodě (World Precision Instruments) a tím se zvýšila citlivost měření koncentrace TPP⁺ v médiu v rozmezí koncentrací 10^{-6} – 10^{-5} M, které je vhodné pro měření membránového potenciálu.

2. Využití aparatury na měření potenciálu vnitřní mitochondriální membrány

Aparatura na měření membránového potenciálu pomocí iontově-selektivních elektrod byla otestována měřením $\Delta\psi_m$ izolovaných mitochondrií. Koncentrace TPP^+ v médiu se měnila v závislosti na přidaných substrátech a inhibitech dýchacího řetězce a získané výsledky byly v souladu s již dříve publikovanými daty.

Měření mitochondriálního membránového potenciálu bylo uskutečněno také u buněk permeabilizovaných digitoninem. Za těchto experimentálních podmínek je měřen mitochondriální membránový potenciál *in situ* – se zachovanými kontakty mezi jednotlivými organelami. $\Delta\psi_m$ bylo měřeno u permeabilizovaných hepatocytů, HeLa G, BSC-40 a cybridů jako množství akumulovaného TPP^+ .

Tato metoda byla použita pro sledování funkce „mitochondrial permeability transition pore“ jak u izolovaných mitochondrií, tak u permeabilizovaných hepatocytů. Otevření MPTP bylo indukováno vysokou koncentrací Ca^{2+} . Účinek vápníku při jeho nízké koncentraci byl zvýšen pro-oxidantem *tert*-butylhydroperoxidem. Tento proces byl inhibovatelný cyklosporinem A. U izolovaných hepatocytů dochází k otevření MPTP po permeabilizaci plazmatické membrány pravděpodobně v důsledku zvýšené akumulace Ca^{2+} v hepatocytech při jejich izolaci nebo kvůli přítomnému vápníku, který nebyl odstraněn ani po promytí hepatocytů.

Z výsledků měření účinku *t*-BHP na funkci dýchacího řetězce hepatocytů vyplývá, že *t*-BHP způsobuje snižování $\Delta\psi_m$, které nebylo citlivé na cyklosporin A. To mohlo být pravděpodobně způsobeno inhibicí komplexu I dýchacího řetězce nebo mitochondriální akonitasy. *t*-BHP také indukovalo otevření MPTP, které bylo citlivé na cyklosporin A.

Experimenty s izolovanými mitochondriemi i permeabilizovanými buňkami ukázaly, že metoda měření membránového potenciálu pomocí iontově-selektivních elektrod je vhodná pro studie zaměřené na základní otázky mitochondriální bioenergetiky. Může být také použita pro studium mitochondriálních poruch a jejich diagnostiku. V neposlední řadě je vhodným nástrojem pro objasňování účinku hepatotoxických látek a dějů spojených s otevíráním MPTP, který může vést k buněčné smrti.

7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Antonická H., Floryk D., Klement P., Stratilová L., Heřmanská J., Houšťková H., Kalous M., Drahoř Z., Zeman J., Houšťek J.; *Defective kinetics of cytochrome c oxidase and alteration of mitochondrial membrane potential in fibroblasts and cytoplasmic hybrid cells with the mutation for myoclonous epilepsy with ragged-red fibres ('MERRF') at position 8344 nt.* Biochem J. 342, 537-544, 1999.
2. Baines C.B., Kaiser R.A., Purcell N.H., Blair N.S., Osinska H., Hambleton M.A., Brunskill E.W., Sayen M.R., Gottlieb R. A., Dorn II G.W., Robbins J., Molkentin J.D.; *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death;* Nature, vol.434, 658-662, 2005.
3. Bakeeva L.E., Grinius L.L., Jasaitis A.A., Kuliene V.V., Levitsky D.O., Liberman E.A., Severina I.I., Skulachev V.P.; *Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II Intact mitochondria.* Biochim Biophys Acta 216, 13-21, 1970.
4. Bakker E., Bühlmann Ph., Pretsch E.; *Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. I. General Characteristics;* Chem Rev, 97, 3083-3132, 1997.
5. Bakker E., Meruva R. K., Pretsch E., Meyerhoff M.E.; *Selectivity of polymer membrane-based ion-selective electrodes: self-consistent model describing the potentiometric response in mixed ion solutions of different charge.* Anal. Chem 66(19),3021-3030, 1994.
6. Bakker E., Pretsch E., Bühlmann Ph.; *Selectivity of Potentiometric Ion Sensors;* Anal. Chem., 72, 1127-1133, 2000.
7. Bakker E., Pretsch E.; *Lipophilicity of tetraphenylborate derivatives as anionic sites in neutral carrier-based solvent polymeric membranes and lifetime of corresponding ion-selective electrochemical and optical sensors;* Anal. Chim. Acta 309, 7-17, 1995.
8. Baracca A., Sgarbi G., Solaini G., Lenaz G.; *Rhodamin 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F_0 during ATP synthesis.* Biochim et Biophys Acta 1606, 137-146, 2003.
9. Belyaeva E.A., Glazunov V.V., Korotkov S.M.; *Cd^{2+} versus Ca^{2+} -produced mitochondrial membrane permeabilization: a proposed direct participation of respiratory complexes I and III.* Chem Biol Interact 150, 253-270, 2004.

10. Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blalchy-Dyson E., Di Lisa F., Forte M.A.; *The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target*, FEBS J 273, 2077-2099, 2006.
11. Bernardi P.; *Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition*. Physiol. Rev. 79, 1127-1155, 1999.
12. Beutner G., Rück A., Riede B., Brdiczka D.; *Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatin kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases*. Biochimica et Biophysica Acta 1368, 7-18, 1998.
13. Bond J.M., Berman B., Lemasters J.J.; *Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes*. Biochem Biophys Res Comm 179, 798-803, 1991.
14. Bradford M. M.; *A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*; Analytical Biochemistry 72, 248-254, 1976.
15. Brdička R., *Základy fyzikální chemie*; Přírodovědecké vydavatelství, Praha 1952
16. Brechtlová M., Halčák L., Líška B., Rendeková V., Turecký L., Uhlíková E.; *Lekárska biochémia*, Univerzita Komenského, Bratislava 1998.
17. Broekemeier K.M., Dempsey M.E., Pfeiffer D.R. *Cyclosporin A is a potent inhibitor of the ihned membrane permeability transition in liver mitochondria*. J Biol Chem 264, 7826-7830, 1989.
18. Broekemeier K.M., Pfeiffer D.R.; *Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the aktivty of mitochondrial phospholipases*. Biochemistry 34, 16440-16449, 1995.
19. Buck R.P., Lindner E.; *Recomendations for nomenclature of ion-selective electrodes*; Pure & Appl. Chem. Vol. 66, No. 12, 2527-2536, 1994.
20. Burnett R.W., Covington A. K., Fogh-Andersen N., Külpmann W. R., Lewenstam A., Maas A. H. J., Müller-Plathe O., VanKessel A. L., Zijlstra W.G.; *Use of Ion-selective Electrodes for Blood-Electrolytes Analysis. Recommendations for Nomenclature, Definitions and Conventions*; Clin Chem Lab Med; 38(4): 363-370, 2000.
21. Cassarino D.S., Swerdlow R.H., Parks J.K., Parker W.D. Jr, Bennett J.P. Jr.; *Cyclosporin A increases resting mitochondrial membrane potential in SY5Y cells*

- and reverses the depressed mitochondrial membrane potential of Alzheimer's disease cybrids.* Biochem Biophys Res Commun. 248 (1), 168-73,1998.
22. Cassarino D.S., Swerdlow R.H., Parks J.K., Parker W.D. Jr., Bennet J.P. Jr.; *Cyclosporin A increases resting mitochondrial membrane potential in SY5Y cells and reverses the depressed mitochondrial membrane potential of Alzheimer's disease cybrids;* Biochem Biophys Res Commun, 248(1), 168 - 173, 1998.
23. Červinková Z., Kučera O., Lotková H., Drahotka Z., Houštěk J.; *Hodnocení energetického metabolismu izolovaných hepatocytů pomocí oxygrafie;* Acta Medica Suppl 45(2): 65-76, 2002.
24. Cesura A.M., Pinard E., Schubnel R., Geotschy V., Friedlein A., Langen H., Polcic P., Forte M.A., Bernardi P., Kemp J.A.; *The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore.* J Biol Chem Vol. 278, No. 50, 49812-49818, 2003.
25. Chapman J., Cohen-Armon M., Shoenfeld Y., Korczyn A.D., *Antiphospholipid antibodies permeabilize and depolarize brain synaptoneuroosomes.* Lupus 8, No 2, 127-133(0), 1999.
26. Chauvin C., De Oliviera F., Ronot X., Rousseau M., Neverve X., Fontaine E.; *Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells.* J Biol Chem 276(44), 41394-41398, 2001.
27. Chou J.J., Li H., Salvesen G.S., Juan J., Wagner G.; *Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling.* Cell 96, 137-143, 1999.
28. Connern C.P., Halestrap A.P.; *Purification and N-terminal sequencing of peptidylprolyl cis-trans isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin.* Biochem J. 284, 381-385, 1992.
29. Constantini P., Chernyak B. V., Petronilli V., Bernardi P.; *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites,* J. Biol. Chem. 271, 6746-6751, 1996.
30. Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G., Franceschi C.; *A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1).* Biochem Biophys Res Commun. 197, No. 1, 40-45, 1993.

31. Crompton M; *Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore*. Eur.J. Biochem 258, 729-735, 1998.
32. Desagher S., Martinou J.C.; *Mitochondria as the central control point of apoptosis*; Trends Cell Biol 10(9), 369-377, 2000.
33. Di Lisa F., Bernardi P.; *Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: Fixing a hole*. Cardiovasc Res 70(2), 191-199, 2006.
34. Di Lisa F., Bernardi P.; *Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition*. Cardiovasc Res 66, 222-232, 2005.
35. Drahotka Z., Křiváková P., Červinková Z., Kmoníčková E., Lotková H., Kučera O., Houšťek J.; *Tert-butyl hydroperoxide selectively inhibits mitochondrial respiratory-chain enzymes in isolated rat hepatocytes*. Physiol Res.54, 67-72, 2005.
36. Farghali H., Kamenikova L., Martinek J., Lincova D., and Hynie S., *Preparation of functionally active immobilized and perfused mammalian cells: an example of the hepatocyte bioreactor*, Physiol Res, 43, 121-5, 1994.
37. Fiskum G., Craig S.W., Decker G.L., Lehninger A.L.; *The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes*; Proc. Natl.Acad. Sci. Vol 77, No. 6, 3430-3434, 1980.
38. Forte M., Bernardi P.; *Genetic dissection of the permeability transition pore*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, vol 37, No.3, 127-128, 2005.
39. Forte M., Bernardi P; *The permeability transition and BCL-2 family proteins in apoptosis: co-conspirators or independent agents?* Cell Death Differ 13, 1287-1290, 2006.
40. Fuentes-Prior P., Salvesen G.S.; *The protein structure that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition*. Biochem J 384, 201-232.
41. Ganjali M. R., Daftari A., Mizani F., Salavati-Niasari M.; *Titanium Acetylacetonate as an Excellent Ion-Carrier in Construction of Iodide Sensor*; Bull. Korean Chem. Soc., vol 24, No. 1, 23-26, 2003.
42. Garesse R., Vallejo C.G.; *Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes*. Gene 263, L189-L198, 2003.
43. Green D.R.; *Apoptotic pathway: ten minutes to dead*. Cell 121, 671-674.
44. Grinius L.L., Jasaitis A.A., Kadziauskas YU.P., Liberman E.A., Skulachev V.P., Topali V.P., Tsofina L.M., Vladimirova M.A.; *Conversion of Biomembrane-produced Energy into Electric Form*; Biochimica et Biophysica Acta 216, 1-12, 1970.

45. Gunter T.E., Pfeiffer D.R.; *Mechanisms by which mitochondria transport calcium* Amer. J. Physiol. 258, C755-C786, 1990.
46. Halestrap A.; *A pore way to die*. Nature 434(7033), 578-9, 2005.
47. Halestrap A.P, McStay G.P. Clarke S.J.; *The permeability transition pore complex: another view*; Biochimie 84, 153-166; 2002.
48. Halestrap A.P. and Davidson A.M.; *Inhibition of Ca²⁺-induced large amplitude swelling of liver and heart by cyclosporin A is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial matrix peptidylprolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase*. Biochem J. 268, 153-160, 1990.
49. Harris E. J., van Dam K.; *Changes of total water and sucrose space accompanying induced ion uptake or phosphate swelling of rat liver mitochondria*. Biochem J. 106(3):759-66, 1968.
50. Haugland R.P.; *Handbook of fluorescent probes and research products*, ninth ed., Molecular Probes, Eugene, 2002.
51. He L., Lemasters J.J.; *Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function?* FEBS Letters 512, 1-7, 2002.
52. Honig B.H., Hubbell W.L., Flewelling R.F.; *Electrostatic interactions in membranes and proteins* Annu Rev Biophys Biophys Chem 15, 163-193, 1986.
53. Houstek J., Klement P., Floryk D., Antonicka J., Hermanska M., Kalous H., Hansikova H., Houťkova H., Chowdhury S.K., Rosipal T., Kmoch S., Stratilova L., Zeman J; *A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin*. Hum. Mol. Genet. 8, 1967-1974, 1995.
54. Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP.; *Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals*. Cell 89(7), 1145-1153, 1997.
55. Ichas F., Mazat JP; *From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state*. Biochim et Biophys Acta 1366, 33-50, 1998.
56. Jouaville L.S., Ichas F., Mazat JP; *Modulation of cell calcium signals by mitochondria*. Mol Cell Biochem 187, 371-376, 1998.
57. Kamo N., Maratsugu M., Hongoh R., Kobatake Y.; *Membrane Potential of Mitochondria Measured with an Electrode Sensitive to Tetraphenyl Phosphonium*

- and Relationship between Proton Electrochemical Potential and Phosphorylation Potential in Steady State*; J. Membrane Biol., 49, 105-121, 1979.
58. Katsu T., Nakagawa H., Yasuda K.; *Interaction between Polyamines and Bacterial Outer Membrane as Investigated with Ion-Selective Electrodes*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1073-1079, 2002.
59. Kennedy C.H., Church D.F., Winston G.W., Pryor W.A.; *Tert-butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria*. Free Rad Biol Med 12, 381-387, 1992.
60. Kischkel F.C., Lawrence D.A., Tinel A., LeBlanc H., Virmani A., Schow P., Gazdar A., Blenis J., Arnott D., Ashkenazi A.; *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. J Biol Chem 276, 46639-46646, 2001.
61. Klener P. JR., Anděra L., Klener P., Nečas E., Živný J.; *Cell Death Signalling Pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: Overview of apoptotic pathways*. Folia Biol (Praha) 52, 34-44, 2006.
62. Kmoníčková E., Drahotka Z., Kameníková L., Červinková Z., Mašek K., Farghali H.; *Modulatory effect of cyclosporine A on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in hepatocytes*. Immunopharmacol Immunotoxicol 23, 43-54, 2001.
63. Kokoszka J.E., Waymire K.G., Levy S.E., Sligh J.E., Cai J., Jones D.P., MacGregor G.R., Wallace D.C.; *The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore*; Nature, vol. 427, 461-465, 2004.
64. Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Grijalba M.T., Bechara E.J., Vercesi A.E.; *Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation*. J Biol Chem 271(6), 2929-2934, 1996.
65. Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E.; *Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species*. FEBS Lett., 378(2), 150-152, 1996.
66. Krauskopf A., Eriksson O., Craigen W.J., Forte M.A., Bernardi P.; *Properties of the permeability transition in VDAC1^{-/-} mitochondria*. Biochim Biophys Acta 1757, 590-595, 2006.

67. Kum-Chul O., Eun Chul K., Young Lag C., Kyu-Sung J., Eun-Ah Y., Ki-Jung P.; *Potassium-Selective PVC Membrane Electrodes Based on Newly Synthesized cis- and trans-Bis(crown ether)s*; Analytical Sciences, vol 14; 1009-1012, 1998.
68. Kuruoğlu D., Canel E., Memon S., Yilmaz M., Kilic E.; *Hydrogen Ion-Selective Poly(vinyl chloride) Membrane Electrode Based on a Calix[4]arene*; Analytical Sciences, vol 19, 217-221, 2003.
69. Labajova A., Vojtiskova A., Krivakova P., Kofranek J., Drahota Z., Houstek J.; *Evaluation of mitochondrial membrane potential using a computerized device with a TPP⁺-selective electrode*. Anal. Biochem. 353, 37-52, 2006.
70. Lemasters J. J., Quian T., Bradham C. A., Brenner D. A., Cascio W., E., Trost L. C., Nishimura Y., Nieminen A.-L., Herman B.; *Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes Vol. 31 No 4, 1999.
71. Liberman E. A., Skulachev V. P.; *Conversion of Membrane-Produced Energy into Electric Form. IV General discussion*; Biochim. Biophys Acta, 216, 30-42, 1970.
72. Lotková H., Červinková Z., Kučera O., Křiváková P., Kand'ár R.; *Protective effect of S-adenosylmethionine on cellular and mitochondrial membrane of rat hepatocytes against tert-butylhydroperoxide-induced injury in primary culture*. Chem Biol Interact 156, 13-23, 2005.
73. Lötscher H.R., Winterhalter K.H., Carafoli E., Richter C.; *Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria*. Proc Natl Acad Sci USA 76(9): 4340-4344, 1979.
74. Maciel E.N., Kowaltowski A.J., Schwalm F.D., Rodrigues J.M., Souza D.O., Vercesi A.E., Wagner M., Castilho R.; *Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition*. J Neurochem 90, 1025-1035, 2004.
75. Maratsugu M., Kamo N., Kurihara K., Kobatake Y.; *Selective Electrode for Dibenzyl dimethyl ammonium cation as Indicator of the membrane potential in biological systems*; Biochimica et Biophysica Acta, 464, 613-619, 1977.
76. Masaki N., Kyle ME, Serroni A., Farber JL.; *Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide*. Arch Biochem Biophys 270, 60-71, 1978.
77. Molenaar D., Bosscher J.S., TEN Brink B., Driessen A. J.M., Konings W.N.; *Generation of Proton Motive Force by Histidine Decarboxylation and Electrogenic*

- Histidin/Histamine Antiport in Lactobacillus buchneri*; Journal of Bacteriology, 2864-2870, 1993.
78. Mootha V.K., French S., Balaban R.S.; *Neutral Carrier-based "Ca²⁺-selective" microelectrodes for the measurement of tetraphenylphosphonium*. Anal Biochem 236, 327-330, 1996.
79. Mracek T, Pecina P, Vojtiskova A, Kalous M, Sebesta O, Houstek J.; *Two components in pathogenic mechanism of mitochondrial ATPase deficiency: energy deprivation and ROS production*. Exp. Gerontol. 41(7), 683-7, 2006.
80. Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T., Tsujimoto Y.; *Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death*; Nature vol.434, 652-658, 2005.
81. Nicholls D.G., Chalmers S.; *The integration of mitochondrial calcium transport and storage*. J Bioenerg Biomembr 36(4), 277-281, 2004.
82. Nicholls D.G., Ferguson S.; Bioenergetics 3, 2002, Oxford, UK.
83. Nieminen A-L., Saylor A.K., Tesfai S.A., Herman B., Lemasters J.J.; *Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide*. Biochem J 307, 99-106, 1995.
84. Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T, Korsmeyer SJ.; *Proapoptotic BAX and BAK regulate the type I inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci USA. Jan 4;102(1):105-110, 2005.
85. Ohmizo C., Masaya Y., Katsu T.; *Bacterial cytoplasmic membrane potential permability assay using ion-selective electrodes*. J Microbiol Methods 59, 173-179, 2004.
86. Orrenius S., Burkitt M.J., Kass GE, Dypbukt J.M., Nicotera P.; *Calcium ions and oxidative cell injury*. Ann Neurol.;32 Suppl:S33-42,1992.
87. Pecina P, Capkova M, Chowdhury SK, Drahotka Z, Dubot A, Vojtiskova A, Hansikova H, Houst'kova H, Zeman J, Godinot C, Houstek J; *Functional alteration of cytochrome c oxidase by SURF1 mutations in Leigh syndrome*. Biochim Biophys Acta, 1639(1), 53-63, 2003.
88. Plášek J., Vojtíšková A., Houš'ek J.; *Flow-cytometric monitoring of mitochondrial depolarisation: from fluorescence intensities to millivolts*. J Photobiochem Photobiol B 78, 99-108, 2005.

89. Proskuryakov S.Y., Konoplyannikov A.G., Gabai V.L.; *Necrosis: a specific form of cell death?* Exp Cell Res 283, 1-16, 2003.
90. Pungor E., Tóth K.; *Ion-selective Membrane Electrodes*; Analyst, vol. 95, No.1132, 625-648, 1970.
91. Pungor E.; *The Theory of Ion-selective Electrodes*; Analytical Sciences, vol 14, 249-256, 1998.
92. Ramamurthy N., Baliga N., Wahr J.A., Schaller U., Yang V.C., Meyerhoff M.E.; *Improved protamin-sensitive membrane electrode for monitoring heparin concentration in whole blood via protamin titration*; Clinical Chemistry 44, 606-613, 1998.
93. Ross M.F., Kelso G.F., Blaikie F.H., James A.M., Cochemé H.M., Filipovska A., Da Ros T., Hurd T.R., Smith R.A.J., Murphy M.P.; *Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology*. Biochemistry (Moscow), Vol 70, No 2, 273-283, 2005.
94. Rottenberg H.; *Membrane potential and surface potential in mitochondria: uptake and binding of lipophilic cations*. J. Membrane Biol. 81, 127 – 138, 1984.
95. Rubin R., Farber J.L.; *Mechanism of the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide*. Arch Biochem Biophys 228, 450-495, 1984.
96. Rush R.F., Alberts D.; *Tert-butyl hydroperoxide metabolism and stimulation of the pentose phosphate pathway in isolated rat hepatocytes*. Toxicol Appl Pharmacol 85, 324-331, 1986.
97. Sandblom J., Eisenman G., Walker J.L., Jr.; *Electrical phenomena associated with the transport of ions and ion pairs in liquid ion-exchange membranes. I. Zero current properties*. J. Phys. Chem. 71, 3862-3870, 1967.
98. Scaduto R.C. Jr., Grotyohann L.W.; *Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives*. Biophysical Journal 76, 469-477.
99. Shinbo T., Kamo N., Kurihara K., Kobatake; *A PVC-Based Electrode Sensitive to DDA^+ as a Device for Monitoring the Membrane Potential in Biological Systems*; Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 187, No. 2, 414-422, 1978.
100. Svatkova R., Cervinkova Z., Kalous M., Rauchova H., and Drahotka Z., *Respiratory control index of mitochondria isolated from regenerating rat liver*, Physiol. Res., (1996) 45, 249-52.

101. Frey T.F., Mannella C.A.; *The internal structure of mitochondria*, Trends Biochem Sci 25(7), 319-324, 2000.
102. Umezawa Y., Bühlmann P., Umezawa K., Tohda K., Amemiya S.; *Potentiometric selectivity coefficient of ion-selective electrodes*; Pure and Applied Chemistry 72, 1851-2082, IUPAC, 2000.
103. Vaux D.L., Korsmeyer S.J.; *Cell death in development*. Cell 96(2), 245-254, 1999.
104. Vercesi H., Bernardes C.F., Hoffmann M.E., Gadelha F.R., Decampo R.; *Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of Trypanozoma cruzi in situ*. J Biol Chem, 226, 14431-14434, 1991.
105. Vojtiskova A., Jesina P., Tesarova M., Kalous M., Dubot A., Godinot C., Fornuskova D., Kaplanova V. Zeman J., Houstek J.; *Mitochondrial membrane potential and ATP production in primary disorders of ATP synthase*. Toxicol. Mech. Methods 14, 7-11 (2004).
106. Vrbacký M., Krijt J., Drahotka Z., Mělková Z.; *Inhibitory effect of Bcl-2 on mitochondrial respiration*. Phydiol. Res. 52, 545-554, 2003.
107. Wan B, Doumen C, Duszynski J, Salama G, LaNoue KF.; *A method of determining electrical potential gradient across mitochondrial membrane in perfused rat hearts*. Am J Physiol. 265, 445-452, 1993.
108. Woodfield K., Rück A., Brdiczka D., Halestrap A.P., *Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition*. Biochem J., 336, 287-290, 1998.
109. Zhao K., Luo G., Giannelli S., Szeto H.H.; *Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines*. Biochem Pharmacol 70, 1796-1806, 2005.
110. Zoetewei J.P., Van de Water B., De Bont H.J.G.M., Nagelkerke J.F.; *Mitochondrial K^+ as modulator of Ca^{2+} -dependent cytotoxicity in hepatocytes*. Biochem J. 299, 539-543, 1994.
111. Żółkiewska A., Zabłocka B., Duszyński J., Wojtczak L.; *Resting State Respiration of Mitochondria: Reappraisal of the Role of Passive Ion Fluxes*; Archives of Biochemistry and Biophysics; Vol 275, No. 2, 580-590, 1989.
112. Zoratti M., Szabò I., De Marchi U.; *Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house?* Biochimica et Biophysica Acta 1706, 40-52, 2005.

113. Zoratti M., Szabò I.; *The mitochondrial permeability transition*. Biochim Biophys Acta 1241, 139-176, 1995.
114. Katalog firmy World Precision Instruments 2007
115. Nicolli A, Petronilli V, Bernardi P.; *Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation*; Biochemistry. 32 (16), 4461-4465, 1993.
116. Nazareth W, Yafei N, Crompton M.; *Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A*; J Mol Cell Cardiol. 23 (12),1351-1354, 1991.
117. Křiváková P., Lábajová A., Červinková Z., Drahotka Z.; *Inhibitory effect of t-butyl hydroperoxide on mitochondrial oxidative phosphorylation in isolated rat hepatocytes*. Physiol Res 56, 137-140, 2007.
118. Bulteau A.L., Ikeda-Saito M., Szweda L.I.; *Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria*. Biochemistry 42, 14846-14855, 2003.

SOUHRN

Byla zkonstruována aparatura na měření membránového potenciálu, která využívá iontově-selektivní elektrody citlivé na tetrafenylfosfóniový kationt (TPP^+). Aparatura byla připojena k počítači a sběr, zpracování a ukládání dat bylo uskutečněno programem MATLAB/Simulink. Složení TPP^+ -selektivní membrány bylo optimalizováno zabudováním sraženiny TPP^+TPB^- do membrány, čím se dosáhla Nernstovská dopověď od koncentrace $3 \cdot 10^{-6}$ M TPP^+ . Protože docházelo k vyplavování TPP^+ z membrány do média, TPP^+TPB^- bylo nahrazeno tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)fenyl]boritanem sodným (NaHFPB). Elektrody s NaHFPB měly Nernstovskou odezvu od $1 \cdot 10^{-6}$ M TPP^+ a tím byla dosažena větší citlivost oproti komerčně vyráběným elektrodám. Byly vypočteny koeficienty selektivity pro K^+ , Na^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} .

Aparatura byla použita pro monitorování mitochondriálního membránového potenciálu izolovaných mitochondrií a pro sledování funkce dýchacího řetězce mitochondrií v buňkách s permeabilizovanou plasmatickou membránou (hepatocytů, BSC-40, HeLa G, cybridů) pomocí nízké koncentrace digitoninu. Tato metoda byla použita i pro sledování funkce „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP) jak u izolovaných mitochondrií, tak u permeabilizovaných hepatocytů. Otevření MPTP bylo indukováno vysokou koncentrací Ca^{2+} . Účinek vápníku při jeho nízké koncentraci byl zvýšen pro-oxidantem *tert*-butylhydroperoxidem (*t*-BHP). Tento proces byl inhibovatelný cyklosporinem A.

U permeabilizovaných hepatocytů *t*-BHP indukovalo snižování $\Delta\psi_m$, které mohlo být způsobeno inhibicí komplexu I dýchacího řetězce nebo mitochondriální akonitasy. Působení *t*-BHP také mělo za následek také otevření MPTP.

Z těchto výsledků vyplývá, že zkonstruovaná aparatura je vhodným nástrojem pro studium základních otázek mitochondriální bioenergetiky, sledování účinku hepatotoxických látek i nástrojem pro studium mitochondriálních poruch a jejich diagnostiku.

ABSTRACT

The computerized device for membrane potential measurement using the tetraphenylphosphonium-selective electrode was constructed. Signal acquisition, processing and data storage were realized by MATLAB/Simulink software. The selective membrane was optimized incorporating TPP^+TPB^- precipitate into the membrane. The electrode had a Nernstian response from $3 \cdot 10^{-6}$ M TPP^+ . The TPP^+TPB^- precipitate was later replaced by sodium tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxy-2-propyl)phenyl]borate (NaHFPB). The electrode with incorporated NaHFPB had a Nernstian response from $1 \cdot 10^{-6}$ M TPP^+ and had better sensitivity than commercially available electrodes. The values of selectivity coefficients for K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} were calculated.

The device was used for mitochondrial membrane potential measurement of isolated mitochondria and for evaluating the respiratory chain function of digitonin-permeabilized cells (hepatocytes, HeLa G, BSC-40 and control transmitochondrial cybrids). This method was used also for monitoring the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) function of isolated mitochondria and permeabilized hepatocytes. MPTP opening was induced by high calcium concentration and the action of calcium was enhanced by pro-oxidant *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP). This process was inhibited by cyclosporin A.

We also found that *t*-BHP caused $\Delta\psi_m$ dissipation in permeabilized hepatocytes which could be caused by complex I or mitochondrial aconitase inhibition. In addition, *t*-BHP brought about MPTP opening.

Our data indicate that the constructed device can be successfully used for studies of many aspects of mitochondrial bioenergetics, for evaluation of hepatotoxic action of various agents and as a diagnostic tool for mitochondrial oxidative phosphorylation disorders.