

UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



**Morfologické a funkční aspekty mitochondriálního
póru přechodné permeability – optimalizace metod
a jejich využití pro hodnocení funkčního stavu póru**

HABILITAČNÍ PRÁCE

RNDr. René Endlicher, Ph.D.

Hradec Králové

2023

Poděkování:

*V první řadě bych chtěl poděkovat panu **RNDr. Zdeňkovi Drahotovi, DrSc.** - Kouzelník v říši čar. Mitochondrie, Oxygraf, Spektrofluorimetr, Spektrofotometr a Čáry. Ne!!! Myšlenky proměněné v data. I ta poslední nic neříkající křivka, kterou by většina badatelů zahodila, získávala ve Vašich rukou velkou výpovědní hodnotu. Pane doktore, naučil jste mě velké množství užitečných věcí, za které Vám ještě jednou děkuji. Velmi si Vás vážím a jsem nesmírně poctěn, že jsem mohl být Vaším žákem.*

*Dále bych rád poděkoval paní **Prof. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc.** - Důvěra, upřímnost, spolehlivost, nadhled,... Asi není potřeba víc dodávat. Paní profesorko, děkuji za neocenitelné rady, trpělivost a odbornou pomoc při psaní této habilitační práce.*

*Velké poděkování patří též **Doc. MUDr. Ottovi Kučerovi, Ph.D., Mgr. Pavle Staňkové, Ph.D., MUDr. Davidu Rychtrmocovi, Ph.D., Doc. MUDr. Halce Lotkové, Ph.D., Doc. RNDr. Tomášovi Roušarovi, Ph.D., RNDr. Kateřině Štefkové, Ph.D., MUDr. Olince Rejtarové, Ph.D. a Mgr. Tomášovi Machkovi** nejen za technickou podporu, inspiraci, cenné rady, ale i za skvělé společné sportovní a kulturní zážitky.*

*Děkuji i svým spolupracovníkům **Mgr. Monice Pospíšilové, Janě Ondrákové, Mgr. Majce Vaculové, Ivance Altmannové** a celému kolektivu **Ústavu fyziologie a Ústavu anatomie** za příjemné pracovní prostředí.*

*Děkuji též své **rodině** za podporu a zázemí, které mi během psaní práce vytvořila.*

*Poděkování patří i grantovým agenturám bez jejichž podpory by nikdy nemohla vzniknout tato práce: **PRVOUK P37/02, PROGRES Q40, Inter Cost LTC17044, INOMED CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_069/0010046, GAČR 303/03/H065, GAUK 90/2006 C, MSM VZ 0021620820 a firma Roche.***

OBSAH

Seznam zkratk	3
1. Úvod	5
2. Mitochondriální pór přechodné permeability	7
2. 1. Funkce MPTP	8
2. 2. Historický pohled na MPTP	9
2. 3. Molekulární struktura MPTP	12
2. 3. 1. První (proteinový) model MPTP	12
2. 3. 2. ATP – syntázový model MPTP	13
2. 3. 3. Další modely MPTP	15
2. 4. Faktory regulující otevření MPTP	16
2. 5. Vlastnosti MPTP a jeho role v buněčné signalizaci	19
2. 5. 1. Mitochondrie a MPTP jako významný amplifikátor kalciového signálu	20
2. 5. 2. MPTP a buněčná smrt	21
2. 6. MPTP a jeho role v procesu stárnutí	22
2. 6. 1. Změny citlivosti MPTP k jeho regulačním faktorům indukované stárnutím	24
2. 6. 2. Vliv kalciové homeostázy na aktivaci MPTP v průběhu stárnutí	28
2. 6. 3. Vliv zvýšené produkce ROS na aktivaci MPTP v průběhu stárnutí	29
2. 6. 4. Věkem navozené peroxidační změny ANT ovlivňující MPTP	30
2. 6. 5. Věkem indukované změny MMP a syntézy ATP ovlivňující MPTP	31
2. 6. 6. Posttranslační modifikace Cyp-D ovlivňující MPTP v průběhu stárnutí	32
2. 7. Role MPTP v patogenezi vybraných onemocnění	34
2. 7. 1. Kardiovaskulární onemocnění	36
2. 7. 2. Neurodegenerativní choroby	37
2. 7. 3. Lipotoxické poškození jater	38
2. 7. 4. Role MPTP v karcinogenezi	38
2. 8. Farmakologická inhibice MPTP	39
2. 9. MPTP a vize do budoucnosti	40
3. Cíle práce	41
4. Přehled dosažených výsledků s komentářem	42
4. 1. Metody hodnocení MPTP	42
4. 1. 1. Optimalizace metody swellingu mitochondrií	44
4. 1. 2. Stanovení retenční kapacity mitochondrií pro kalcium	46
4. 2. Vliv různých faktorů a jejich kombinací na MPTP	49
4. 2. 1. Vliv Ca^{2+} iontů a cyklosporinu A na funkci MPTP	49
4. 2. 2. Vliv anorganického fosfátu na funkci MPTP	51

4. 2. 3. Vnímavost MPTP vůči akutnímu působení terciárního butylhydroperoxidu, anorganického fosfátu a jejich vzájemných kombinací	52
4. 3. Vnímavost MPTP vůči působení trijodtyroninu v podmínkách <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	54
4. 3. 1. Účinek <i>in vitro</i> aplikace trijodtyroninu na kalcium indukované bobtnání jaterních mitochondrií	55
4. 3. 2. Vliv anorganického fosfátu a Ca ²⁺ iontů na průběh MPT po aplikaci trijodtyroninu potkanům <i>in vivo</i>	56
4. 4. Pohlavní a tkáňová specifita citlivosti MPTP vůči Ca ²⁺ iontům.....	57
4. 4. 1. Specifita MPTP vázaná na pohlaví	57
4. 4. 2. Tkáňová specifita MPTP.....	58
4. 5. Věkem indukované změny citlivosti mitochondrií ke kalciovým iontům.....	60
4. 5. 1. Ontogenetické změny v citlivosti MPTP ke kalciovým iontům a účinkům ROS po ischemicko/reperfuzním poškození srdeční tkáně.....	60
4. 5. 2. Tkáňově specifické ontogenetické změny v citlivosti MPTP ke kalciovým iontům a účinkům ROS	61
4. 5. 3. Věkem indukované změny citlivosti MPTP ke kalciovým iontům a změny mitochondriální retenční kapacity Ca ²⁺ iontů.....	63
4. 6. Využití zavedených metod pro hodnocení funkčního stavu mitochondrií.....	65
4. 6. 1. Zhodnocení účinků biguanidů na jaterní mitochondrie.....	65
4. 6. 2. Zhodnocení účinků epigalokatechin-3-galátu na jaterní mitochondrie	67
5. Závěry	69
6. Literatura.....	70
7. Soubor předkládaných prací.....	94
7. 1. Příloha č. 1	96
7. 2. Příloha č. 2	97
7. 3. Příloha č. 3	98
7. 4. Příloha č. 4	99
7. 5. Příloha č. 5	100
7. 6. Příloha č. 6	101
7. 7. Příloha č. 7	102
7. 8. Příloha č. 8	103
7. 9. Příloha č. 9	104
7. 10. Příloha č. 10	105
7. 11. Příloha č. 11	106

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
ANT	adenin nukleotidový translokátor
AQP8	akvaporin 8
ATP	adenosintrifosfát
Bak	BCL-2 homologní antagonist
Bax	s BCL-2 asociovaný X protein
Bcl-2	B buněčný lymfom 2 (B-cell lymphoma)
BPR	benzodiazepinový receptor
Ca ²⁺	kalciové ionty
CK	kreatinkináza
CL	kardiolipin
CLOOH	oxidovaný kardiolipin
cpYFP	cirkulární permutovaný žlutý fluorescenční protein (circularly permuted yellow fluorescent protein)
CRC	mitochondriální retenční kapacita pro kalcium (calcium retention capacity)
CsA	cyklosporin A
CytC	cytochrom C
Cyp-D	cyklofilin D
DDR	reakce na poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA damage response)
EGCG	epigalokatechin-3-galát
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
GPx	glutathionperoxidáza
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HK	hexokináza II
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (inner mitochondrial membrane)
IP3R	inositol trifosfátový receptor
MCU	mitochondriální kalciový kanál (mitochondrial calcium uniporter)
MMP	mitochondriální membránový potenciál
MPT	přechodná mitochondriální permeabilita (propustnost) (mitochondrial permeability transition)

MPTP	mitochondriální pór přechodné permeability (mitochondrial permeability transition pore)
mtROS	mitochondriální reaktivní sloučeniny kyslíku
mtUPR	mitochondriální odpověď na nesbalené proteiny (mitochondrial unfolded protein response)
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid oxidovaná forma
NADH	nikotinamidadeninukleotid redukována forma
NAFLD	nealkoholová tuková choroba jater (non-alcoholic fatty liver disease)
nDNA	jaderná deoxyribonukleová kyselina
Nrf2	antioxidační odpověď zprostředkovaná Nrf2 (Nrf2 antioxidant response)
OMM	vnější mitochondriální membrána (outer mitochondrial membrane)
p53	protein p53
p66Shc	protein p66Shc
PARP1	poly-(ADP-ribosyl) polymeráza 1
Pi	anorganický fosfát
PiC	fosfátový přenašeč (phosphate carrier protein)
RNS	reaktivní sloučeniny dusíku
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
SfA	sangliferin A
sirt1	jaderné sirtuiny
sirt3	mitochondriální sirtuiny
SOD2	mitochondriální superoxiddismutáza
SR	sarkoplazmatické retikulum
T ₃	trijodtyronin
t-BHP	terciární butylhydroperoxid
TRAP1	protein 1 asociovaný s TNF receptorem (TNF receptor associated protein 1)
TSPO	translokátorový protein
VDAC	napěťově řízený aniontový kanál (voltage dependent anion channel)

1. ÚVOD

Játra jsou životně důležitým orgánem s velkým množstvím nepostradatelných funkcí. Jednou z nich je udržení homeostázy vnitřního prostředí. Játra mají biotransformační úlohu pro celý organismus, zároveň jsou vzhledem ke svému anatomickému postavení v krevní cirkulaci častým cílem toxického působení. Poškození jaterních mitochondrií tak může mít vliv nejenom na samotné hepatocyty, ale i na funkci celého organismu s následným rozvojem řady onemocnění. Mechanismy, které vedou k poškození hepatocytů, jsou různé. Jedním z častých účinků hepatotoxických látek je zvýšená tvorba volných reaktivních radikálů a jimi indukovaný oxidační stres.

Mitochondrie se významně podílejí na zachování homeostázy intracelulárního prostředí, ale zároveň produkují značné množství reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) a jsou vystaveny účinkům jejich působení. Mitochondrie jsou buněčné organely lokalizované v cytosolu většiny živočišných buněk a mají celou řadu biologických funkcí. Jsou vybaveny enzymovými systémy, které transformují chemickou energii živin do energie chemické vazby v molekule adenosintrifosfátu (ATP). Ta je univerzálním zdrojem energie pro realizaci fyziologických funkcí. Energie uvolněná při štěpení ATP je nezbytná například pro kontrakci svalových buněk, pro syntetickou aktivitu hepatocytů, pro funkci nervových buněk a v neposlední řadě pro realizaci transportních procesů přes biologické membrány.

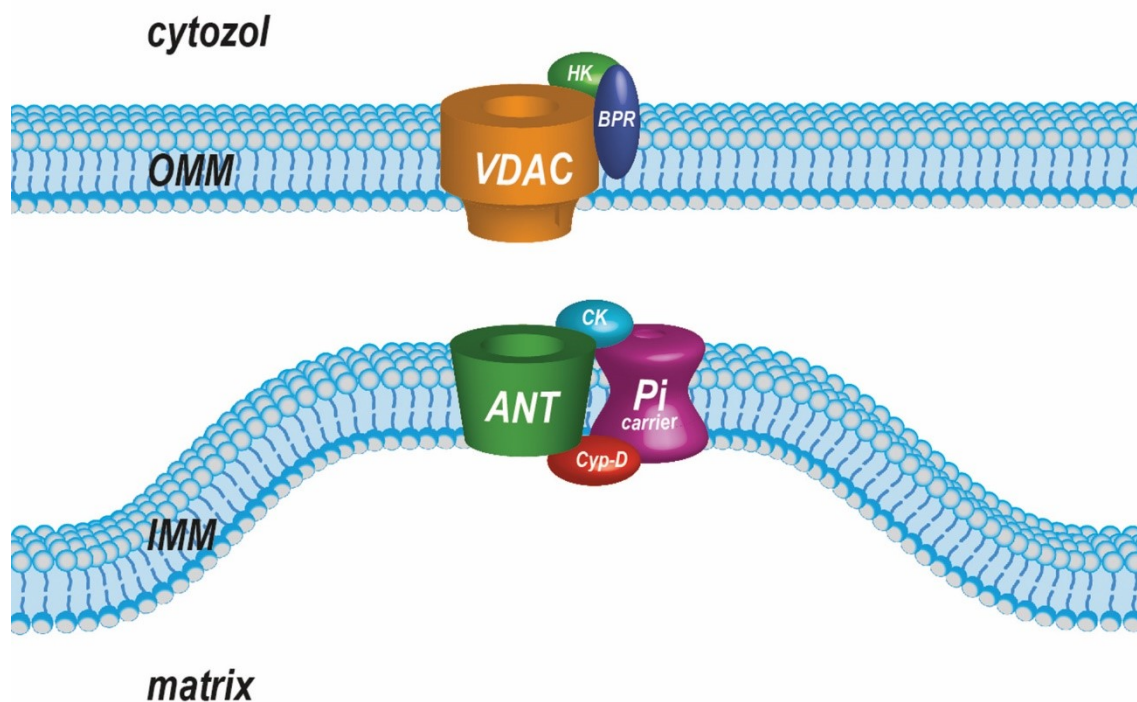
Mitochondrie, kromě dalších významných funkcí, jsou zapojené do procesu stárnutí organismu a v neposlední řadě spouštějí procesy vedoucí k apoptóze či nekróze buněk. Tvorba ATP je zajišťována celou řadou chemických reakcí a transportních procesů a zásah, byť jen do jednoho z těchto dějů, může mít pro buňky fatální následky. Produkce ATP může být narušena působením kyslíkových radikálů, a to jak endogenního, tak exogenního původu, ale i řadou dalších látek. Zvýšená tvorba ROS a nedostatečná antioxidační ochrana mitochondrií vede k jejich poškození, případně až k buněčné smrti. Za posledních dvacet let se nahromadilo velké množství publikací o úloze mitochondrií v procesu stárnutí a jejich vzestup měl exponenciální průběh. Dosud se však nepodařilo objasnit přesné mechanismy tohoto procesu.

V posledních letech se pozornost zaměřila na transport iontů přes biologické membrány a především na funkci mitochondriálního póru přechodné permeability „*mitochondrial permeability transition pore*“ (MPTP). Mitochondrie mají důležitou roli v regulaci cytosolové koncentrace kalciových iontů (Ca^{2+}) a hrají nezanedbatelnou úlohu v buněčné signalizaci. Mitochondrie sice nejsou primární organelou, ve které je kalcium uskladňováno, ale bylo prokázáno, že se velmi výrazně podílejí na modulaci Ca^{2+} signálu v buňkách, a to díky schopnosti opakovaně přijímat a uvolňovat Ca^{2+} ionty dle potřeby buněk. Při transportu Ca^{2+} iontů zpět do cytosolu hraje významnou roli právě MPTP. Podařilo se zjistit za jakých podmínek se aktivuje otevření MPTP a faktory, které ho inhibují, nicméně molekulární struktura tohoto membránového póru zůstává stále nejasná. MPTP při krátkodobém (reverzibilním) otevření chrání buňky před oxidačním poškozením a podílí se na buněčné signalizaci. Při dlouhodobém (ireverzibilním) otevření však dochází k indukci procesů vedoucích k apoptóze či nekróze buněk. Velmi významný podíl v procesu regulace otevírání MPTP mají Ca^{2+} ionty a ROS. Citlivost MPTP ke kalciovým iontům se mění v průběhu stárnutí organismu a aktivace otevření MPTP hraje klíčovou roli v patogenezi velkého počtu onemocnění.

Předkládaná habilitační práce je komentovaným souborem publikovaných prací autora, jejichž obsahem jsou výsledky výzkumu laboratoře experimentální hepatologie v oblasti hodnocení funkčního stavu MPTP. V habilitační práci jsou shrnuty současné znalosti o funkci a regulaci MPTP, neúspěšné snahy o objasnění jeho molekulární struktury a výčet nemocí, na jejichž patogenezi má MPTP značný podíl. Experimentální část práce se zabývá optimalizací metod pro hodnocení funkčního stavu póru. Sleduje vliv jednotlivých faktorů, ale hlavně jejich vzájemných kombinací na regulaci MPTP. Další část práce popisuje tkáňové, pohlavní a věkem indukované změny v citlivosti MPTP k jeho jednotlivým regulačním faktorům. Poslední část práce se zabývá využitím optimalizovaných metod pro hodnocení funkčního stavu mitochondrií po působení vybraných léčivých přípravků a potravinových doplňků.

2. MITOCHONDRIÁLNÍ PÓR PŘECHODNÉ PERMEABILITY

Mitochondriální pór přechodné permeability je definován jako neselektivní kanál propojující intracelulární a intramitochondriální prostor. Za určitých podmínek se mezi mitochondriální matrix a cytoolem v místě, kde se vnitřní (IMM) a vnější (OMM) mitochondriální membrány dostávají do těsné blízkosti, formuje velký komplex proteinů obou membrán, který zde následně vytváří pór (obr. 1) (Crompton, 1999, Ohlendieck et al., 1986, Vyssokikh et al., 1999). Tento pór je Ca^{2+} dependentní (Bernardi et al., 1992, Szabo et al., 1992) a cyklosporin A (CsA) senzitivní (Broekemeier et al., 1989, Crompton et al., 1988, Fournier et al., 1987, Halestrap and Davidson, 1990). Otevřením póru se významně mění propustnost IMM, která se tak stává vysoce propustnou pro soluty a nízkomolekulární látky. Stav indukovaný otevřením MPTP se nazývá „*mitochondrial permeability transition*“ (MPT) – stav přechodné mitochondriální permeability (propustnosti) (Hunter et al., 1976).

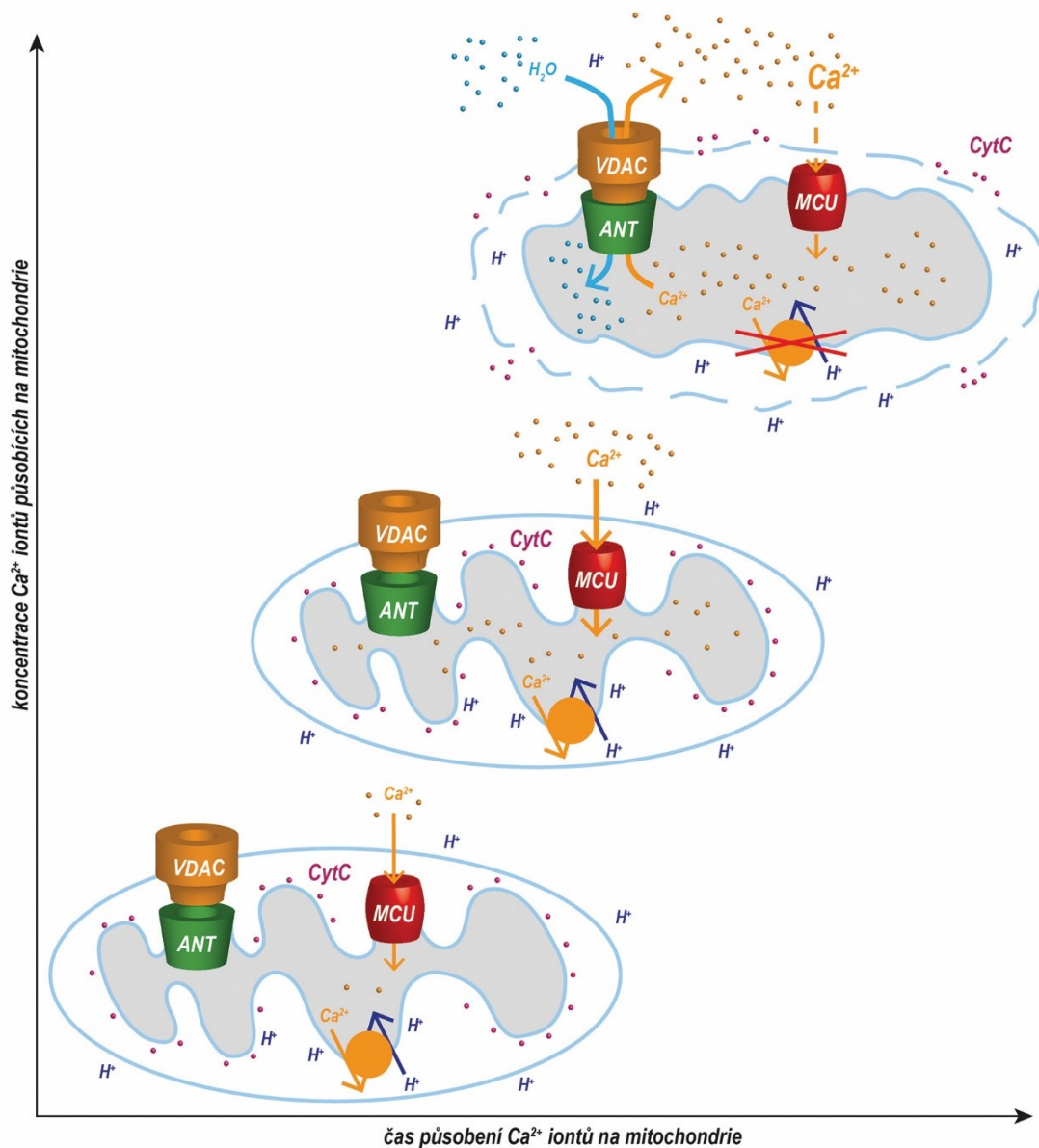


Obr. 1: Jeden z původních modelů MPTP, tzv. proteinový model MPTP. Upraveno podle (Desagher and Martinou, 2000). ANT – adenin nukleotidový translokátor; BPR – benzodiazepinový receptor; CK – kreatinkináza; Cyp-D – cyklofilin D; HK – hexokináza II; IMM – vnitřní mitochondriální membrána; OMM – vnější mitochondriální membrána; PiC – fosfátový přenašeč; VDAC – napěťově řízený aniontový kanál. Barevné uspořádání jednotlivých komponent MPTP je shodné v celé práci. Další zkratky uvedené v následujících obrázcích jsou již vysvětlené v seznamu zkratk.

2. 1. Funkce MPTP

MPTP se podílí na regulaci fyziologických a patologických buněčných procesů (Bonora et al., 2020). V podmínkách *in vitro* vede otevření MPTP primárně ke kolapsu mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) a inhibici tvorby ATP. Sekundárně pak může vést k bobtnání „*swelling*“ mitochondrií a následné ruptuře OMM (obr. 2). V podmínkách *in vivo* se tento mitochondriální pór podílí na regulaci koncentrace Ca^{2+} iontů, transmembránového potenciálu a rozložení solutů a dalších látek mezi mitochondriální matrix a cytosolem. Přechodné otevření póru má fyziologický význam pro uvolnění kalcia z mitochondrií do cytosolu (Altschuld et al., 1992, Ichas et al., 1997, Szabo and Zoratti, 2014). Otevření MPTP je rovněž jedním z důležitých mechanismů, které významným způsobem ovlivňují energetickou homeostázu buňky. A to jak pozitivně (při reverzibilním otevírání) snižováním produkce ROS (Elrod and Molkenin, 2013, Hausenloy et al., 2004), tak i negativně (po ireverzibilním otevření) inhibicí tvorby ATP a indukci proapoptotických a nekrotických procesů (Bernardi, 1996, Crompton, 1999, Kroemer and Reed, 2000).

Úplné otevření MPTP vede k uvolnění protonů z mezimembránového prostoru, ke kolapsu MMP s následným rozprážením oxidativní fosforylace (Beutner et al., 2017, Hunter and Ford, 1955) a může vést až k buněčné smrti (Lemasters et al., 2002). V důsledku otevření MPTP se významně mění propustnost IMM. Ta se stává vysoce propustnou pro soluty a nízkomolekulární látky a umožňuje volnou difuzi látek do velikosti 1,5 kD mezi mitochondriální matrix a cytosolem (Haworth and Hunter, 1979, Hunter and Haworth, 1979a, Hunter and Haworth, 1979b, Kowaltowski, 2000). Celý tento proces indukuje osmotické změny uvnitř mitochondrií. Otevřením póru dochází k vyrovnání koncentrací jednotlivých solutů, které procházejí přes IMM. Vysoká koncentrace proteinů v matrix mitochondrií, které nemohou procházet tímto pórem, způsobuje zvýšení koloidně osmotického tlaku, který vede k nasávání vody z cytosolu do mitochondriální matrix. Dochází k masivnímu bobtnání mitochondrií, přestavbě mitochondriálních krist a posléze až k ruptuře OMM (Desagher and Martinou, 2000, Lehninger, 1962) (obr. 2). Porušení OMM je příčinou vyplavování bílkovin, iontů a nukleotidů lokalizovaných mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou do cytosolu. Rovněž dochází k uvolnění proapoptotických proteinů z mezimembránového prostoru do cytosolu (např. cytochrom c, aktivátor apoptotických proteáz 1 a další), což vede v konečném důsledku k zániku buňky (Crompton, 1999, Lemasters et al., 1998, Rasola and Bernardi, 2007).



Obr. 2: Změny v uspořádání mitochondriálních membrán indukované otevřením Ca²⁺ dependentního MPTP s následnými osmotickými procesy. Bobtnání (*swelling*) mitochondrií je závislé nejenom na koncentraci Ca²⁺ iontů, ale také na čase, po který kalciové ionty působí na mitochondrie. Upraveno podle (Desagher and Martinou, 2000) a (Mammucari et al., 2018).

2. 2. Historický pohled na MPTP

Propustnost mitochondriální membrány byla považována nejdříve za artefakt vznikající v laboratorních podmínkách v průběhu izolace mitochondrií (Massari and Azzone, 1972). Další výzkum ale prokázal, že tento jev vzniká v důsledku otevření MPTP. O existenci tohoto póru se začalo uvažovat již v roce 1953, kdy bylo pozorováno,

že vlivem různých podmínek během izolace mitochondrií dochází k procesu bobtnání mitochondrií (Raaflaub, 1953), doprovázenému zvýšením permeability IMM a poruchou fosforylace adenosindifosfátu (ADP) (Hunter and Ford, 1955). V dalších letech byl tento fenomén bobtnání mitochondrií opakovaně potvrzen a podrobněji studován v řadě laboratoří (Azzone and Azzi, 1965a, Bernardi, 1999, Crofts and Chappell, 1965, Lehninger, 1962). Bylo prokázáno, že mitochondriální *swelling* lze indukovat Ca^{2+} ionty (Hackenbrock and Caplan, 1969, Tedeschi and Hegarty, 1965), Fe^{2+} ionty (Rauen et al., 2003, Rauen et al., 2004), hormony štítné žlázy (Lehninger, 1960b, Tapley, 1956), dále anorganickým fosfátem (Pi) (Azzone and Azzi, 1965b, Crompton and Costi, 1988, Tedeschi et al., 1965) a mastnými kyselinami (Hunter et al., 1976, Lehninger and Remmert, 1959, Skulachev, 1991, Zborowski and Wojtczak, 1963). Naopak MPTP lze inhibovat přítomností ADP (Hunter and Haworth, 1979a), Mg^{2+} ionty (Bernardi et al., 1992, Hunter et al., 1976), kyselým pH (Halestrap, 1991, Haworth and Hunter, 1979, Nicolli et al., 1993) a melatoninem (Petrosillo et al., 2009). Při optimalizaci média pro izolaci mitochondrií bylo zjištěno, že substráty respiračního řetězce, jež produkují redukovaný nikotinamidadenindinukleotid (NADH), podporují akumulaci kalciových iontů v mitochondriích. Ca^{2+} ionty sice primárně aktivují respiraci, ale jejich nadměrná akumulace naopak způsobuje inhibici respiračního řetězce. Tyto substráty zvyšují permeabilitu membrány s následným únikem Ca^{2+} iontů z mitochondriální matrix, proto se v laboratorních podmínkách jako substrát respiračního řetězce začal používat sukcinát (Vinogradov et al., 1972).

Pevné základy popisu MPTP však položili Haworth a Hunter (Haworth and Hunter, 1979, Hunter and Haworth, 1979a, Hunter and Haworth, 1979b, Hunter et al., 1976) ve své rozsáhlé práci. Výsledkem jejich studií jsou dodnes platné závěry: 1. proces kalcium indukované permeability IMM se nazývá stav přechodné mitochondriální propustnosti a vede k bobtnání mitochondrií, 2. propustnost membrány je dána zkratováním – otevřením proteinového, hydrofilního póru, jenž byl pojmenován mitochondriální pór přechodné permeability, 3. pór je propustný pro molekuly do velikosti 1,5 kDa, 4. k aktivaci MPTP jsou potřeba Ca^{2+} ionty, které se váží na IMM z matrixové strany, 5. Ca^{2+} ionty soutěží o stejné vazebné místo s Mg^{2+} ionty, 6. Ca^{2+} ionty inhibují oxidaci NADH, 7. otevírání MPTP je do určité míry reverzibilní a lze ho inhibovat přidáním chelatačních činidel. V objasňování struktury MPTP pak pokračovala celá řada vědců. Nejdůležitější poznatky charakterizující MPTP a faktory, které ovlivňují jeho funkční stav, jsou shrnuty v tabulce 1.

Charakteristika MPTP	Hodnota/Stav	Reference
velikost permeabilita maximální vodivost subvodivostní stav další vodivostní stavy iontová selektivita reverzibilita	1,4 nm ≤ 1,5 kDa 1,0 - 1,3 nS < 500 pS přehledně uvedené v tabulce iontově nespecifický kanál s mírnou anion-selektivitou může se přepnout na kation- selektivní kanál ano	(Massari and Azzone, 1972) (Haworth and Hunter, 1979) (Kinnally et al., 1989) (Petronilli et al., 1989) (Kinnally et al., 1989) (Szabo et al., 1992) (Beutner et al., 2017) (Hunter et al., 1976) (Szabo and Zoratti, 2014) (Hunter et al., 1976)
Aktivátory MPTP	Známa hodnota	Reference
Ca ²⁺ v matrix Pi Cyp-D ROS/RNS pH atraktylosidy mastné kyseliny morfologie mitochondrií	100 - 200 nmol/mg/ml mitochondrií 10 nM extramitochondriální vazba na MPTP např. 1 mM t-BHP optimum 7,2 - 7,4 25 μM/0,5 mg/ml mitochondriálního proteinu fragmentace mitochondrií	(Lehninger, 1962) (Tedeschi and Hegarty, 1965) (Hackenbrock and Caplan, 1969) (Hunter et al., 1976) (Chalmers and Nicholls, 2003) (Azzone and Azzi, 1965b) (Tedeschi et al., 1965) (Hunter et al., 1976) (Crompton and Costi, 1988) (Connern and Halestrap, 1994) (Tanveer et al., 1996) (Hunter and Haworth, 1979a) (Scarlett et al., 1996) (Halestrap et al., 1997) (Brookes et al., 2004) (Halestrap, 1991) (Hunter and Haworth, 1979a) (Rottenberg and Marbach, 1990) (Zborowski and Wojtczak, 1963) (Hunter et al., 1976) (Skulachev, 1991) (Ong et al., 2010)
Inhibitory MPTP	Známa hodnota	Reference
cyklosporin A Mg ²⁺ ionty Mn ²⁺ ; Ba ²⁺ ; Sr ²⁺ ADP kyselé pH kyselinou bongkreková NADH > NAD ⁺ vysoký MMP	1 μM 2 mM v matrix (fyziologické rozmezí v matrix je 0,8 - 1,5 mM) 2 mM v matrix 6 μM < 7,0 20 μM/0,5 mg/ml mitochondriálního proteinu	(Fournier et al., 1987) (Crompton et al., 1988) (Hunter et al., 1976) (Hunter and Haworth, 1979b) (Bernardi et al., 1992) (Hunter et al., 1976) (Bernardi et al., 1992) (Hunter and Haworth, 1979a) (Haworth and Hunter, 1979) (Halestrap, 1991) (Nicolli et al., 1993) (Hunter and Haworth, 1979a) (Rottenberg and Marbach, 1990) (Hunter and Haworth, 1979a) (Hunter and Haworth, 1979a)

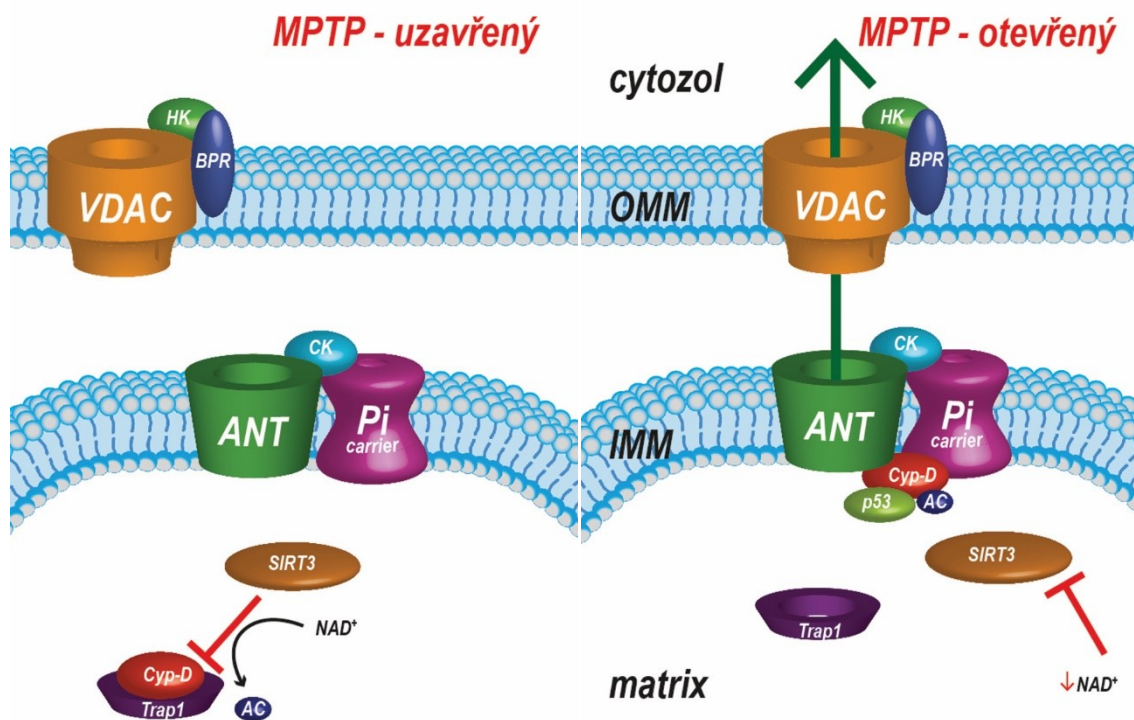
Tab. 1: Stručný přehled vlastností, jež charakterizují MPTP, a faktorů, které otevření póru aktivují nebo inhibují. Upraveno podle (Beutner et al., 2017) a (Hurst et al., 2017).

2. 3. Molekulární struktura MPTP

MPTP je dnes definovaný jako multiproteinový komplex vnitřní a vnější mitochondriální membrány, který může za určitých podmínek vytvořit membránový napěťově řízený neselektivní pór (kanál). Názory na molekulární složení póru se v průběhu dosavadního výzkumu několikrát měnily. Genetické experimenty však vyloučily většinu proteinů, o kterých se uvažovalo, že by mohly tvořit molekulární podstatu MPTP a tyto proteiny jsou nyní považovány za regulační složky. Mezi četnými komponenty, které byly navrženy, je pouze cyklofilin D (Cyp-D) prokázán jako skutečný regulátor MPTP, nicméně to rovněž není strukturální složka.

2. 3. 1. První (proteinový) model MPTP

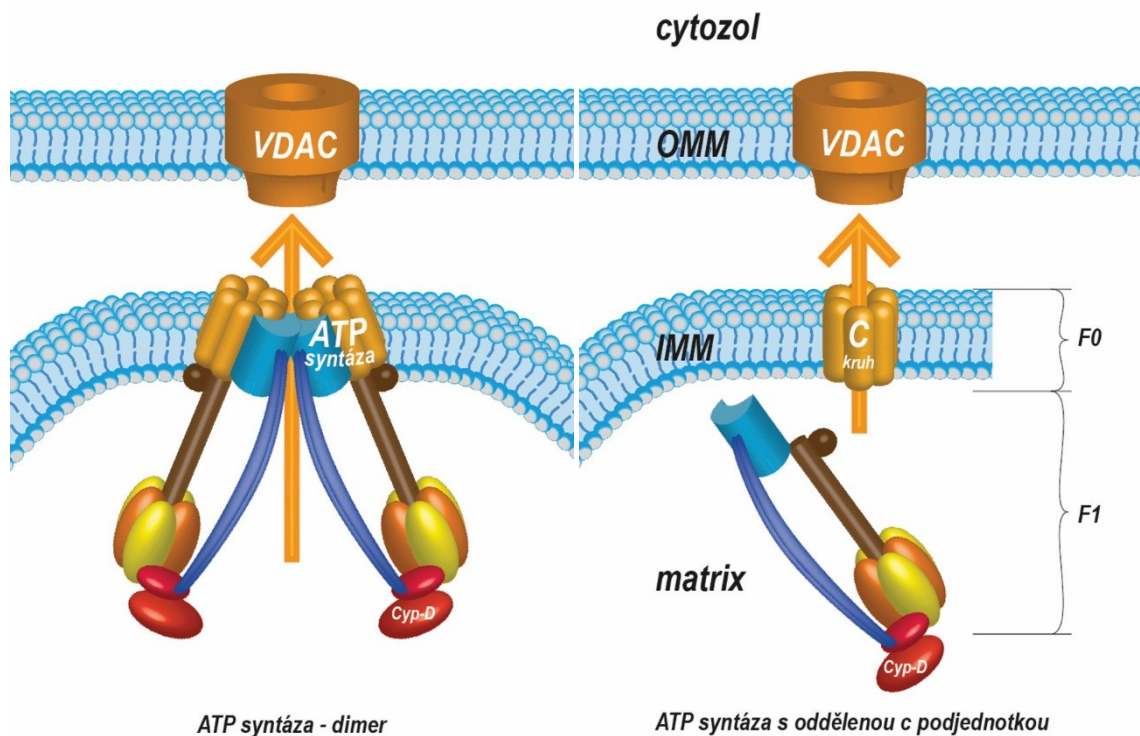
Původní představy o molekulární struktuře MPTP byly velmi jednoznačné. Předpokládalo se, že pór tvoří tři základní komponenty: adenin nukleotidový translokátor (ANT) (Hunter and Haworth, 1979a), napěťově řízený aniontový kanál – *voltage dependent anion channel* (VDAC) (Szabo et al., 1993, Szabo and Zoratti, 1993) a Cyp-D (Crompton et al., 1998, Woodfield et al., 1998). VDAC je významný porin lokalizovaný na OMM, ANT je transportér IMM a Cyp-D je enzym v matrix mitochondrií. Společnou interakcí jsou tyto složky schopny vytvořit Ca^{2+} dependentní a cyklosporin A senzitivní pór, propojující vnější a vnitřní mitochondriální membránu (obr. 1) (Beutner et al., 1998, Crompton et al., 1998, Zamzami and Kroemer, 2001). Mezi struktury tvořící původní model MPTP byl zahrnut rovněž fosfátový přenašeč (PiC) (Crompton and Costi, 1988, Herick et al., 1997, Leung et al., 2008), dále translokátorový protein (TSPO) dříve nazývaný mitochondriální benzodiazepinový receptor (BPR) (McEnery et al., 1992), hexokináza II (HK), kreatinkináza (CK) a proteiny Bcl-2 rodiny (Beutner et al., 1998, Marzo et al., 1998) (obr. 1). V průběhu několika desítek let usilovného hledání molekulární podstaty póru přibyla celá řada dalších proteinů a byly prezentovány modely póru ve fázi otevřené a zavřené (obr. 3) (Baines, 2009, Doul and Charvátová, 2017, Zamzami and Kroemer, 2001, Zorov et al., 2009). Pomocí genetických studií se však prokázalo, že všechny tyto navržené proteiny, nejsou nezbytné pro funkci MPTP, ale podílejí se spíše na jeho regulaci (Baines et al., 2007, Gutierrez-Aguilar et al., 2014, Kokoszka et al., 2004, Sileikyte et al., 2014). Nicméně jedna z posledních prací navrácí do hry opět ANT. Autoři, na základě genetických pokusů, navrhují, že MPTP se skládá ze dvou odlišných molekulárních struktur: ANT a neznámé molekuly závislé na Cyp-D (Karch et al., 2019).



Obr. 3: Jeden z původních modelů MPTP v uzavřeném a otevřeném stavu. Upraveno podle (Javadov and Karmazyn, 2007, Panel et al., 2018).

2. 3. 2. ATP – syntázový model MPTP

Model MPTP prošel v posledních dvaceti letech radikální změnou. Původní strukturální komponenty (VDAC, PiC a TSPO) již nelze považovat za esenciální, ale spíše za regulační součást póru. Jednou z posledních molekul, která je spojována se strukturou MPTP je ATP syntáza. ATP syntáza se skládá z několika podjednotek a funkčně se dělí na dvě základní části (označované jako domény F1 a F0). Katalytická F1 doména je lokalizovaná v matrix mitochondrií. Centrální a periferní stopkou je připojená k F0 doméně, která je zanořena do IMM (obr. 4). V průběhu zkoumání strukturální podstaty MPTP tvořené ATP syntázou vznikaly prakticky současně dva modely MPTP. První předpokládá, že MPTP vzniká na rozhraní dvou ATP syntázových jednotek (dímeru ATP syntázy) (Bernardi et al., 2015a, Giorgio et al., 2013). Druhý model uvádí jako hlavní strukturální jednotku MPTP c kruh ATP syntázy (Alavian et al., 2014, Bonora et al., 2013). Poprvé, tak byla formulována možnost, že pór by nemusel mít vlastní strukturální komponenty a mohl by vznikat na rozhraní dvou ATP syntázových proteinových komplexů nebo jen jejich některých částí (obr. 4) (Bonora et al., 2022, Bonora et al., 2017, Gerle, 2016).



Obr. 4: Model MPTP na rozhraní dvou ATP syntázových jednotek (dimeru) a model MPTP po oddělení c kruhu z ATP syntázové jednotky. Upraveno podle (Bonora et al., 2022, Panel, 2018).

2. 3. 2. 1. Dimery ATP syntázy jako molekulární podklad MPTP

ATP syntáza je sice plně funkční jako monomer, nicméně bylo prokázáno, že vytváří dimery a oligomery, které zvyšují její enzymatickou aktivitu (Bornhovd et al., 2006). Tvorba dimerů a oligomerů umožňuje ohýbání IMM a přispívá ke správné modelaci mitochondriálních krist (Davies et al., 2012, Wittig and Schagger, 2008). Vlastní kanál (MPTP) by se pak měl formulovat mezi dvěma F0 podjednotkami ATP syntáz (Bonora et al., 2022, Giorgio et al., 2013). Nicméně tvorbě dimerů ATP syntáz, jež by utvářely strukturální podstatu MPTP, neodpovídá následující fakt. Mitochondrie mladých jedinců mají větší počet dimerů ATP syntáz a sníženou citlivost k aktivaci MPTP než mitochondrie starších jedinců. V průběhu stárnutí organismu totiž dochází k rozpojení dimerů ATP syntázy, což vede ke změně uspořádání mitochondriálních krist až k jejich zániku, poklesu produkce ATP (Daum et al., 2013) a zvýšené frekvenci aktivace MPTP (Panel et al., 2018). Úloha dimeru ATP syntázy jako strukturální složky MPTP není tak jednoznačná a byla v posledních letech předmětem řady studií s protichůdnými výsledky (Carraro et al., 2014, He et al., 2017a, Mnatsakanyan et al., 2019, Urbani et al., 2019).

2. 3. 2. 2. C podjednotka ATP syntázy jako hlavní komponenta MPTP

Nejnověji byl MPTP spojován s c podjednotkou ATP syntázy (Alavian et al., 2014, Bonora et al., 2013). Jeden z navrhovaných modelů předpokládal, že v důsledku konformačních změn v F₁ části ATP syntázy dojde k oddělení c podjednotky a vytvoření póru přímo v této membránové složce ATP syntázy (Bonora et al., 2017). Další model navrhoval, že c podjednotka ATP syntázy interaguje s ANT a/nebo PiC a/nebo Cyp-D a společně s VDAC vytváří supramolekulární komplex tzv. ATP syntasom. Tento komplex umožňuje efektivní průběh oxidativní fosforylace, nicméně za určitých podmínek by mohl vytvářet MPTP (Beutner et al., 2017, Halestrap, 2014, Chen et al., 2004, Chinopoulos and Adam-Vizi, 2012, Ko et al., 2003, Paradies et al., 2019). Genetické pokusy však potvrdily, že c podjednotka ATP syntázy nevytváří strukturu MPTP. V buňkách, ve kterých byla down-regulována syntéza proteinů pro všechny tři izoformy c podjednotky ATP syntázy, nebyl prokázán rozdíl v MPT oproti kontrolním buňkám (He et al., 2017b). Naproti tomu jiná studie předpokládá, že c podjednotka ATP syntázy je důležitou strukturální komponentou MPTP (Neginskaya et al., 2019). Nicméně rozuzlení přišlo ve stejném roce (2019), kdy byla publikována práce, jež z molekulární struktury MPTP definitivně vylučují ATP syntázu. Byl totiž prokázán kalciem indukovaný MPT i v mitochondriích s absencí ATP syntázy (Carroll et al., 2019), což vede k závěru, že ATP syntáza nevytváří molekulární podklad MPTP.

2. 3. 3. Další modely MPTP

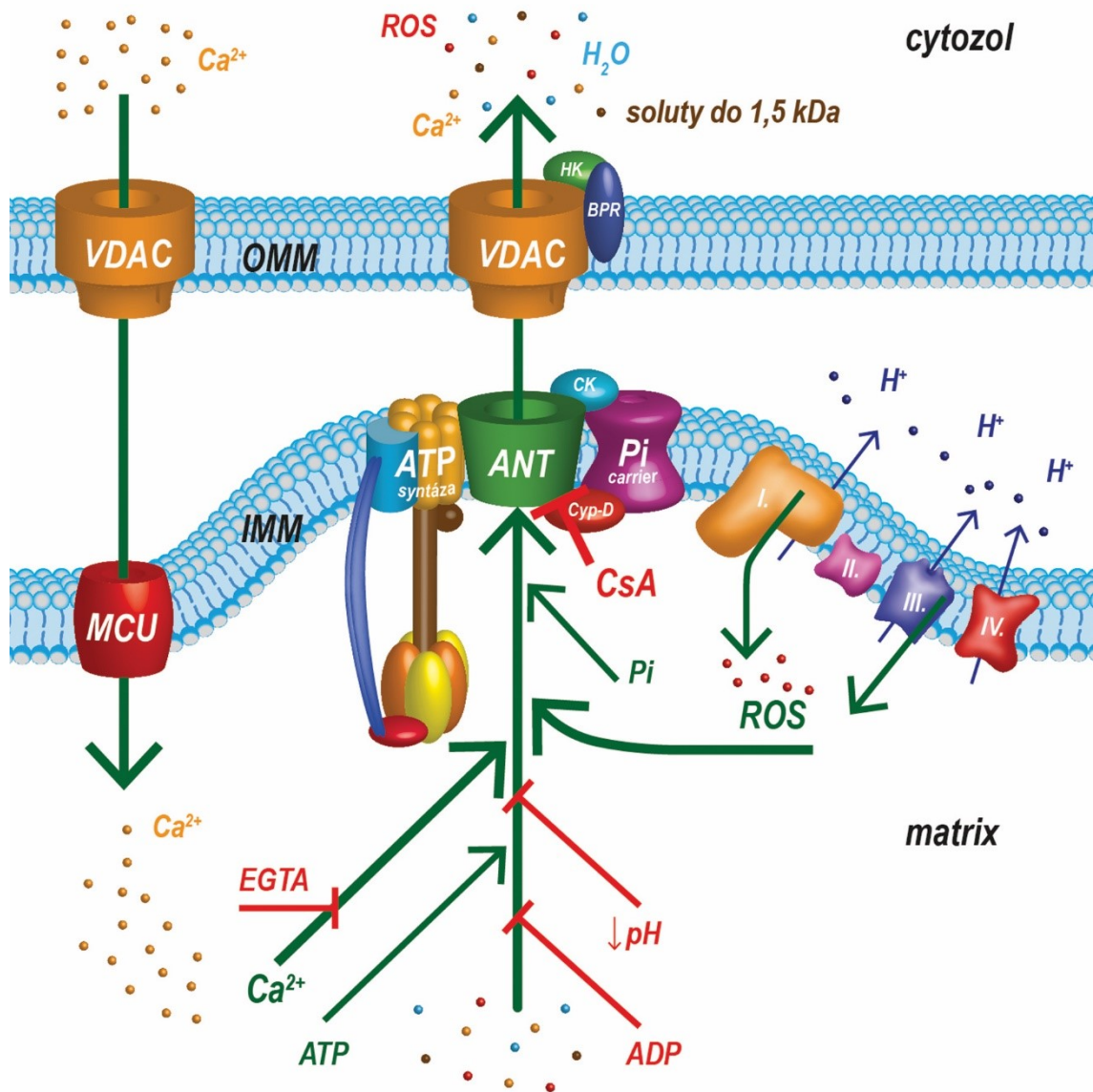
Jak je patrné z výše popsaných výsledků, téměř 70 let usilovného bádání nevedlo k objasnění molekulární podstaty MPTP. První zmínky o MPTP jsou z roku 1953 (Raaflaub, 1953) a dnes, 70 let poté, máme k dispozici pouze kandidáty na jeho složení (Karch and Molkenin, 2018). Možná se budeme muset spokojit s výše uvedenými návrhy, že MPTP nemusí mít svůj vlastní molekulární podklad. Může existovat několik různých pórů a tvořit je mohou různé komponenty (Bonora et al., 2022). Z předešlého období výzkumu tak zůstává představa, o které uvažovali již i Szabová a Zoratti (2014), že MPTP by mohl vznikat na rozhraní dvou proteinů mitochondriální membrány. To znamená, že kalciem indukovaný, CsA inhibovaný vznik póru by mohl znamenat vznik odlišných kanálů na rozhraní dvou stejných nebo různých molekul, či komplexů (Gerle, 2016, Szabo and Zoratti, 2014). Tyto hypotézy se začaly objevovat již dříve ve starší literatuře. Například když se prokázalo, že existují dva póry, citlivý/necitlivý na CsA (Davidson and Halestrap, 1990) nebo vysoko- a nízkonapěťový (Ichas and Mazat,

1998, Zorov et al., 1992), a také kalcie indukované bobtnání s malou a velkou amplitudou (Azzi and Azzone, 1965a, Azzi and Azzone, 1965b), ale přitom nebylo jasné, zda se jedná o modifikaci jednoho póru nebo o dva různé póry. Stejně tak, když byly doloženy rozdíly v bobtnání pro heterogenní populace mitochondrií v jedné tkáni, např., že subsarkolemální a interfibrilární frakce kardiomyocytů se liší hodnotami koncentrace kalcia nezbytnými pro otevírání póru (Hofer et al., 2009).

V tuto chvíli je možno uvažovat o existenci několika typů pórů. Této variantě je, jak již bylo zmíněno, nejvíce pozornosti věnováno v obsáhlém článku Szabové a Zorattiho (2014) o mitochondriálních iontových kanálech, který má 90 stran a 1457 citací. Na řadě míst této publikace je vyjádřena přetrvávající nejistota ohledně struktury MPTP, např. těmito slovy: *„MPTP je mnohotvárný a multifaktoriální jev bez jednoznačné závislosti na kterémkoliv jednotlivém parametru.“* *„Vzhledem k chybění konečných genetických důkazů o jeho složení musí být MPTP definován operativně (funkčně) na základě svých farmaceutických a biofyzikálních vlastností.“* *„Permeabilizace (nárůst propustnosti) vnitřní mitochondriální membrány docela dobře může být výsledkem aktivace nebo vzniku více než jednoho druhu kanálu, tedy je nutné mít na paměti i možnou existenci více než jednoho MPTP.“* Tato konstatování potvrzují, že několik desítek let trvající úsilí řady světových laboratoří popsat molekulární strukturu jednoho z významných buněčných mechanismů, bylo zaměřeno špatným směrem (Biasutto et al., 2016, Izzo et al., 2016). To znamená, že nebralo v úvahu fakt, že pórem může být také jen a pouze „díra“ (otvor v mitochondriálních membránách).

2. 4. Faktory regulující otevření MPTP

Funkční stav MPTP ovlivňuje celá řada faktorů, přehledně popsaných např. v práci Hursta a spolupracovníků (2017), (rovněž tabulka 1). Byly prokázány endogenní i exogenní faktory (obr. 5), které moduluje otevření MPTP, mezi něž patří porucha kalciové (Gunter and Pfeiffer, 1990, Gunter et al., 2004, Hunter et al., 1976, Tedeschi and Hegarty, 1965) nebo fosfátové (Azzone and Azzi, 1965b, Kowaltowski et al., 1996a, Tedeschi et al., 1965) homeostázy či zvýšená tvorba ROS (Tajeddine, 2016), případně jejich vzájemné kombinace (Byrne et al., 1999, Crompton and Costi, 1988, Drahotka et al., 2012a, Endlicher et al., 2019). Oxidanty mimo jiné svými účinky zvyšují schopnost Cyp-D vázat se k ANT a tím zvyšují citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům (Brustovetsky et al., 2002, Connern and Halestrap, 1994).



Obr. 5: Jeden z dalších modelů MPTP – ATP syntasom a významné faktory regulující jeho funkční stav. Zelené šipky jsou u faktorů aktivujících otevření MPTP. Červené značky jsou u činitelů inhibujících otevření MPTP. Upraveno podle (Javadov et al., 2011, Paul et al., 2008).

Ca^{2+} ionty, ROS a Cyp-D patří mezi nejvýznamnější regulátory MPTP. Cyp-D se nachází jako rozpustný protein v matrix mitochondrií a má významnou roli v indukcii otevření MPTP (Nicolli et al., 1996). Ukázalo se, že pro aktivaci otevření póru Ca^{2+} ionty je třeba, aby se Cyp-D navázal na IMM, konkrétně na ANT (Crompton et al., 2002, Woodfield et al., 1998) a/nebo na fosfátový přenašeč (Leung and Halestrap, 2008, Leung et al., 2008) a/nebo na ATP syntázu (Giorgio et al., 2009).

Jak je uvedeno, Cyp-D se může vázat na různé molekuly, které by mohly tvořit strukturu MPTP, ale dodnes nebylo zjištěno, která vazba je klíčová pro otevření póru a aktivaci MPT. Nicméně po vazbě Cyp-D na strukturální složky MPTP mohou Ca^{2+} ionty vyvolat bobtnání mitochondrií, resp. otevření póru (Gutierrez-Aguilar and Baines, 2015). Rovněž tato vazba výrazně snižuje prahovou hodnotu intracelulární koncentrace kalcia nutnou k aktivaci otevření MPTP. Pomocí genetických studií se podařilo prokázat, že role Cyp-D je zásadní, a pro otevření MPTP bez této interakce, je zapotřebí několikanásobně vyšší koncentrace Ca^{2+} iontů (Baines et al., 2005). Zvýšená exprese Cyp-D zvyšuje citlivost póru k Ca^{2+} iontům (Lam et al., 2015) a knock-out genu pro Cyp-D naopak snižuje citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům, Pi a ROS (Basso et al., 2005, Shum et al., 2016). Aktivitu Cyp-D lze inhibovat CsA (Halestrap and Davidson, 1990, Nicolli et al., 1996), nicméně se nejedná o absolutní inhibici póru, a otevření MPTP lze aktivovat vysokou koncentrací Ca^{2+} iontů, jak bude diskutováno v experimentální části habilitační práce. Dosavadní down-regulace jednotlivých předpokládaných strukturálních částí MPTP nebo inhibice póru pomocí CsA vždy pouze snížila citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům. Velmi důležitým milníkem proto bylo kompletní zablokování MPTP. Potlačení exprese genů všech tří izoforem ANT a zároveň genu pro Cyp-D vedlo k naprosté deaktivaci MPTP (Karch et al., 2019). Cyp-D je tak zatím jediná prokázaná nepostradatelná regulační komponenta MPTP. Nadále ale zůstává otázka, na jakou strukturu póru se Cyp-D při aktivaci MPT váže a za jakých podmínek.

Při vstupu Ca^{2+} iontů do mitochondrií dochází ke stimulaci buněčné respirace a zvýšené produkci ROS, kvůli čemuž je MPTP v této fázi výrazně citlivější ke kalciovým iontům (Starkov, 2008, Tajeddine, 2016). Stimulovaná aktivita komplexu I respiračního řetězce má rovněž značný vliv na citlivost MPTP ke kalciovým iontům. Tok elektronů přes komplex I podporuje aktivaci kalcie indukované propustnosti mitochondriálních membrán. Citlivost MPTP ke kalciovým iontům se zvyšuje (Fontaine et al., 1998a) a použití rotenonu (inhibitor komplexu I) vede naopak k poklesu citlivosti póru k Ca^{2+} iontům (Li et al., 2012). Dokonce bylo navrženo že komplex I respiračního řetězce by mohl být součástí MPTP (Fontaine et al., 1998a).

Citlivost póru naopak inhibují Mg^{2+} ionty, jež s Ca^{2+} ionty soutěží o vazebná místa a jsou schopny inhibovat Ca^{2+} kanály v plazmatické membráně, a regulovat koncentrace Ca^{2+} iontů v mitochondriích (Bernardi et al., 1992, Hunter et al., 1976). Fe^{2+} ionty indukují MPT (Gáll et al., 2012, Gogvadze et al., 2003, Rauen et al., 2004) a další bivalentní ionty (Mn^{2+} ; Ba^{2+} ; Sr^{2+}) rovněž působí na MPTP (Bernardi et al., 1992, Hunter

et al., 1976). Velmi silným hráčem v regulaci MPTP je anorganický fosfát (Pi) (Azzone and Azzi, 1965b, Crompton and Costi, 1988, Tedeschi et al., 1965). Pi indukuje MPT, tím že zvyšuje citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům. Jeho účinky, hlavně v kombinaci s dalšími regulátory MPTP, jsou detailně popsány v experimentální části habilitační práce autora.

Pór dále ovlivňují adeninové nukleotidy (Lehninger, 1959). Fyziologické koncentrace adeninových nukleotidů snižují citlivost MPTP k jeho otevření. ADP patří mezi silné endogenní inhibitory MPTP a jeho přidání k bobtnajícím mitochondriím, vede k uzavření MPTP. Inhibice póru je výsledkem vazby ADP na ANT, která stabilizuje ANT v m-konformaci (Hunter and Haworth, 1979a). Hodnota pH v matrix mitochondrií je dalším významným endogenním faktorem, jež ovlivňuje MPTP. K otevření póru dochází při hodnotách pH kolem 7,4. Protonace histidinových zbytků Cyp-D, v důsledku nízkého pH, vede k uvolnění Cyp-D z vazby na struktury tvořící MPTP a k uzavření póru (Halestrap, 1991, Haworth and Hunter, 1979, Nicolli et al., 1993).

Další regulační molekulou jsou mastné kyseliny (Zborowski and Wojtczak, 1963). Neesterifikované mastné kyseliny s dlouhým řetězcem aktivují otevření MPTP (Lehninger and Remmert, 1959). Jejich mechanismus účinku je dán vysokou afinitou k ANT. Mastné kyseliny stabilizují ANT naopak v otevřené c-konformaci (Skulachev, 1991). Mezi další faktory, jež regulují MPTP, patří hormony štítné žlázy (Endlicher et al., 2016, Lehninger, 1960b, Tapley, 1956), melatonin (Martinis et al., 2012, Petrosillo et al., 2009) a další látky. Pór je kontrolován celou řadou přidružených proteinů (Szabo and Zoratti, 2014). Některé z nich proces otevírání póru aktivují, jiné inhibují (obr. 5 a tabulka 1). Nezanedbatelné jsou také posttranslační modifikace a vazba iontů na tyto přidružené proteiny či na samotný pór (Alves-Figueiredo et al., 2021).

2. 5. Vlastnosti MPTP a jeho role v buněčné signalizaci

MPTP je rovněž regulován napětím a otevření póru je jedním z důležitých mechanismů, které významným způsobem ovlivňují iontovou a energetickou homeostázu buňky (Hunter et al., 1976). Pór vykazuje několik vodivých stavů a v závislosti na napětí se MPTP může otevírat na krátkou (milisekundy) nebo dlouhou (sekundy) dobu s různou permeabilitou (Biasutto et al., 2016). Vodivost tohoto kanálu se pohybuje od 0,3 do 1,5 nS, a vykazuje mírnou anion-selektivitu, nicméně se může přepnout na kation-selektivní kanál (Bonora et al., 2022, Ichas and Mazat, 1998, Szabo and Zoratti, 2014, Zorov et al., 1992). V přehledové práci Beutnera a spolupracovníků (2017) jsou shrnuty podrobné informace o vodivosti póru za různých experimentálních

podmínek a pro jednotlivá strukturální uspořádání MPTP. Otevření MPTP je do určité míry reverzibilní (Hunter et al., 1976) a MPTP může být otevřen ve dvou různých módech, a to přechodně či trvale (Boyman et al., 2019, Jacobson and Duchen, 2002, Petronilli et al., 1999).

Otevření MPTP rozhoduje o životě a smrti buňky. Krátkodobé, reverzibilní otevření MPTP s nízkou vodivostí je spojeno s uvolňováním signálních molekul, dále chrání mitochondrie před oxidačním poškozením a podílí se na redistribuci Ca^{2+} iontů a regulaci transmembránového potenciálu (Ichas et al., 1997). Jeho otevření umožňuje transport protonů, Ca^{2+} iontů a mitochondriálních ROS (mtROS) z mitochondrií do cytosolu (Boyman et al., 2019, Giorgio et al., 2018). Změna MMP vede k aktivaci respiračního řetězce a zrychlení toku elektronů s následným poklesem produkce mtROS (Hausenloy et al., 2004, Zorov et al., 2000). Dlouhodobé, ireverzibilní otevření MPTP je spojeno s vysokou vodivostí a vede k dramatickým změnám. Dochází ke kolapsu MMP s následnou inhibicí tvorby ATP. Mitochondrie dokonce samy spotřebovávají ATP. Ve snaze udržet MMP totiž dochází ke štěpení ATP a toku protonů do mezimembránového prostoru (Zorov et al., 2009). Dále dochází k poškození suprakomplexů respiračního řetězce (Jang et al., 2017), což vede ke zpomalení toku elektronů přes jednotlivé komplexy respiračního řetězce a zvýšené tvorbě mtROS (Batandier et al., 2004). Uvolňování mtROS, Ca^{2+} iontů, NAD^+ , glutathionu a dalších metabolitů do cytosolu narušuje buněčnou homeostázu a zvyšuje oxidační poškození proteinů, jaderné DNA, membránových fosfolipidů, iontových kanálů a transportérů (Zorov et al., 2014). Vzhledem k nedostatku ATP dochází k inhibici mitochondriálního metabolismu a až k indukci procesů vedoucích ke smrti buňky (Bernardi and Rasola, 2007, Orrenius et al., 2015, Rasola and Bernardi, 2011).

2. 5. 1. Mitochondrie a MPTP jako významný amplifikátor kalciového signálu

Ca^{2+} ionty fungují jako druzí poslové buněčné signalizace. Mitochondrie významně ovlivňují koncentraci Ca^{2+} iontů v cytosolu během signalizace a přechodné otevření MPTP má klíčovou roli v tomto procesu (Feng et al., 2017, Giorgi et al., 2008, Miller, 1998). Při přenosu signálu, kdy se kalciové ionty uvolňují z ER do cytosolu, totiž mitochondrie přijímají určité kvantum Ca^{2+} iontů, které jsou později schopné opět uvolnit. Přechodným zadržením části kalciových iontů jsou tak mitochondrie schopné modulovat (zeslabit/zesílit nebo zkrátit/prodloužit) intenzitu kalciového signálu v cytosolu (Rasola and Bernardi, 2011). Mitochondrie tak generují nové kalciové signální

vlny napříč cytosolem. Tento proces se nazývá Ca^{2+} dependentní uvolnění kalciových iontů „*mitochondrial calcium induced calcium release*“. Otevřeným MPTP dochází rovněž k úniku protonů, a tedy i k poklesu protonového gradientu. V cytosolu tím dochází ke vzniku depolarizačních vln a amplifikaci kalciového signálu vyvolaného uvolněním Ca^{2+} iontů z ER (Endo, 2009, Ichas et al., 1997). Za fyziologických podmínek je koncentrace Ca^{2+} iontů v mitochondriích nízká, nicméně při porušení kalciové homeostázy a v průběhu rozvoje onemocnění jsou mitochondrie schopné pojmout velké množství těchto iontů. V důsledku značné akumulace Ca^{2+} iontů v mitochondriích dochází k otevření MPTP, bobtnání mitochondrií a prasknutí OMM, což má za následek iniciaci signalizační kaskády vedoucí až k buněčné smrti (Garbincius and Elrod, 2022, Orrenius et al., 2015).

2. 5. 2. MPTP a buněčná smrt

Mitochondrie hrají centrální roli ve spouštění programované buněčné smrti (Tait and Green, 2013). Poškození malého množství mitochondrií v buňce vede k jejich odstranění autofagickou cestou (Green et al., 2011), v případě poškození velkého počtu mitochondrií však dochází, v závislosti na dostupnosti ATP, k navození apoptózy nebo nekrózy buňky (Kroemer et al., 2007). Cesta k indukci buněčné smrti vnitřní (mitochondriální) cestou pak vede přes permeabilizaci OMM a tento proces může být aktivován dvěma mechanismy. První cesta, jež vede k permeabilizaci OMM, je aktivace proapoptotických proteinů rodiny Bcl-2, Bax a Bak (Tait and Green, 2010, Wei et al., 2001). Tyto proteiny se nacházejí na OMM a po aktivaci jsou schopné tvořit v membráně póry, kterými prochází do cytosolu již zmiňované mezimembránové induktory apoptózy (např. cytochrom c) (Kale et al., 2018). Druhý způsob je indukce permeabilizace IMM, a to otevřením MPTP, s následným porušením celistvosti OMM (Kroemer et al., 2007). V obou případech dochází ke kolapsu MMP (Waterhouse et al., 2001), zastavení syntézy ATP a dalších procesů závislých na MMP, jako je např. transport proteinů (Ricci et al., 2004). Permeabilizace OMM v konečném důsledku vede opět k uvolnění proapoptotických látek, které jsou lokalizovány v mezimembránovém prostoru nebo vázány na mitochondriální membrány, do cytosolu (Munoz-Pinedo et al., 2006). Pokud buňka disponuje dostatečným množstvím ATP, tak tyto látky následně aktivují kaspázy, jež indukují apoptózu. V případě nedostatku ATP dochází k rozvoji nekrózy (Kroemer et al., 2007, Leist et al., 1997).

2. 6. MPTP a jeho role v procesu stárnutí

V posledních letech se v souvislosti s teorií stárnutí stále častěji hovoří o změně propustnosti mitochondriálních membrán (Angeli et al., 2021, Godoy et al., 2021, Gonzalez-Freire et al., 2015, Sartori et al., 2022, Sautchuk et al., 2023, Zhou et al., 2019). Zvýšená indukce MPT stárnoucích mitochondrií byla zpočátku považována za důsledek nescifického poškození IMM vlivem aktivace Ca^{2+} dependentních fosfolipáz, které svou aktivitou permeabilizují IMM (Pfeiffer et al., 1979, Scarpa and Lindsay, 1972). Nicméně další studie prokázaly, že jde o již zmiňovaný MPTP, který je zodpovědný za tento proces (Crompton, 2004). Jak již bylo uvedeno, MPT vzniká hlavně v důsledku zvýšené koncentrace Ca^{2+} iontů v matrix mitochondrií a/nebo v důsledku působení oxidačního stresu (Tajeddine, 2016). Oba tyto faktory mají s věkem zvyšující se tendenci kumulovat se v organismu. Vedou ke stále častějšímu otevírání MPTP a indukci buněčné smrti stárnoucích buněk (Panel et al., 2018, Rottenberg and Hoek, 2017).

První důkazy o existenci různé citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům, a zvyšující se frekvenci otevírání MPTP v průběhu ontogeneze přišly už před více než 20 lety. Rottenberg a Wu prezentovali, že aktivace MPTP je zvýšena v lymfocytech starých myší. U těchto starších lymfocytů byly MMP a respirace nižší než u lymfocytů izolovaných z krve mladých myší a měřené parametry bylo možno obnovit na normální hodnoty za použití inhibitoru MPTP CsA (Mather and Rottenberg, 2002, Rottenberg and Wu, 1997). V další publikované práci mitochondrie izolované z jater a mozku starších myší vykazovaly rovněž vyšší citlivost k Ca^{2+} iontům. Rychlost bobtnání mitochondrií (otevření MPTP) po aktivaci kalciovými ionty byla vyšší u starších jedinců (Goodell and Cortopassi, 1998). U těchto mitochondrií byla prokázána také nižší mitochondriální retenční kapacita pro kalciové ionty (nižší množství Ca^{2+} iontů nutné k otevření MPTP) (Mather and Rottenberg, 2000).

Další studie už jen potvrdily věkem indukovanou zvýšenou citlivost MPTP k jeho regulačním faktorům. Byly nalezeny rozdíly ve vlastnostech (citlivosti) MPTP a účincích stárnutí na tento pór mezi mitochondriemi izolovanými z různých organismů a různých tkání (Rottenberg and Hoek, 2017). Navíc byly prokázány i rozdíly v citlivosti MPTP mezi různými typy buněk ze stejné tkáně. Citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům u mitochondrií izolovaných z mozku, vykazovala rozdíly nejenom na věku závislé (Krestinina et al., 2015, Lores-Arnaiz et al., 2016, Marques-Aleixo et al., 2012), ale byla ovlivněna i oblastí mozku, ze které byly mitochondrie izolovány (Bambrick et al., 2006, Brown et al., 2004, LaFrance et al., 2005). Dokonce i mezi mitochondriemi izolovanými

z různých míst v buňce byly nalezeny odlišnosti v citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům závislé na věku (Brown et al., 2006, Hofer et al., 2009). V kombinaci s narušenou kalciovou homeostázou a zvýšeným oxidačním stresem navozeným v průběhu stárnutí hraje tento fakt výraznou roli v patogenezi některých neurodegenerativních chorob spojených se stárnutím organismu.

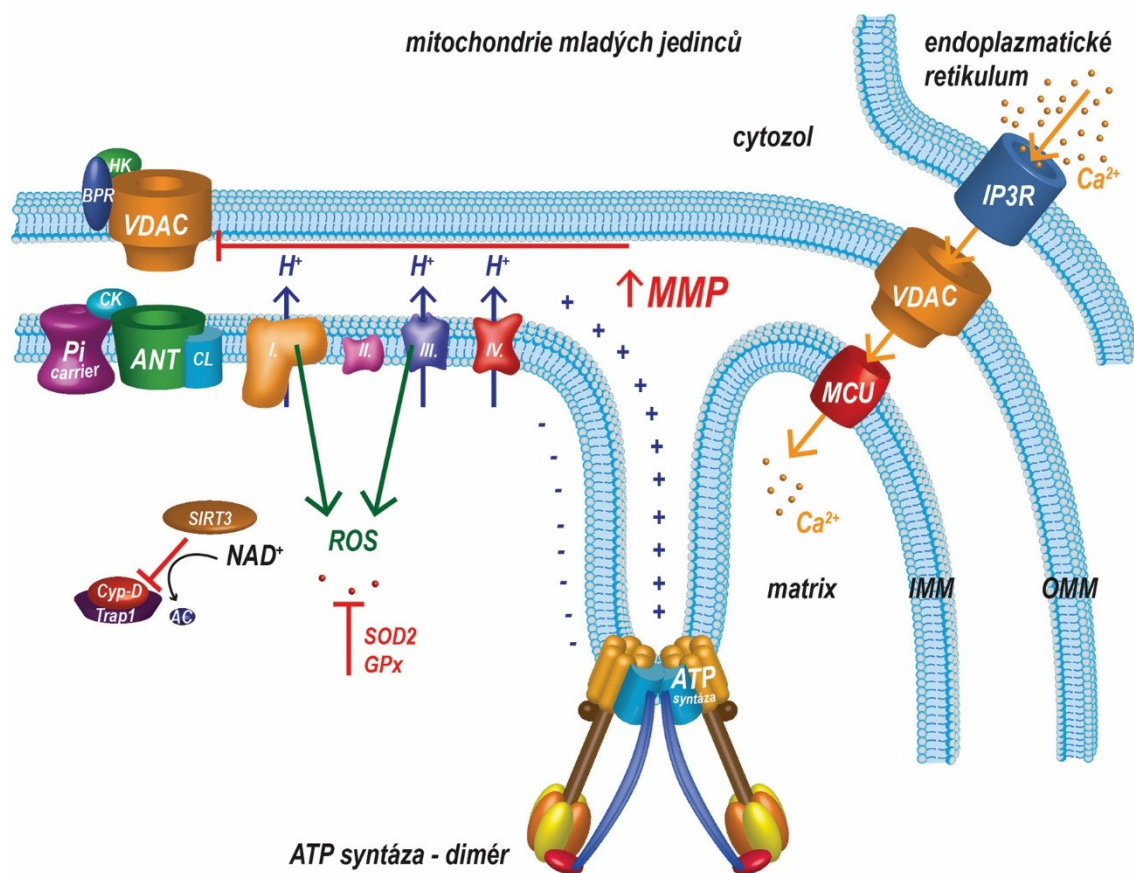
Přehled prací zabývajících se věkově a tkáňově dependentními změnami citlivosti MPTP je uveden v tabulce 2. Variabilita v citlivosti MPTP k jeho regulačním faktorům pravděpodobně vyplývá z velkých rozdílů v expresi a aktivitě proteinů, které regulují aktivaci (otevření) MPTP. Farmakologické inhibitory, např. CsA, jsou v průběhu stárnutí organismu rovněž méně účinné v inhibici MPTP a prodloužení doby nezbytné k jeho otevření (Garcia et al., 2009, Liu et al., 2011). Narůstající citlivost MPTP k faktorům indukujícím jeho otevření v průběhu stárnutí organismu tak podporuje hypotézu postupné aktivace MPTP a zvýšené proapoptotické vnímavosti pozorované v různých orgánech (Chabi et al., 2008, Kwak et al., 2006).

Druh:	Tkáň:	Reference:
myš	lymfocyty	(Mather and Rottenberg, 2000, Rottenberg and Wu, 1997)
myš	T lymfocyty	(Mather and Rottenberg, 2002)
myš	jaterní mitochondrie	(Goodell and Cortopassi, 1998, Mather and Rottenberg, 2000)
potkan	jaterní mitochondrie	(Endlicher et al., 2021)
myš	mozkové mitochondrie	(Lores-Arnaiz et al., 2016, Mather and Rottenberg, 2000)
potkan	mozkové mitochondrie	(Brown et al., 2004, Krestinina et al., 2015, LaFrance et al., 2005)
myš	srdeční mitochondrie	(Fernandez-Sanz et al., 2015, Fernandez-Sanz et al., 2014)
potkan	srdeční mitochondrie	(Escobales et al., 2014, Jahangir et al., 2001, Ljubicic et al., 2010, Petrosillo et al., 2010)
potkan	mitochondrie příčně pruhovaného svalu	(Marzetti et al., 2008, Picard et al., 2011, Picard et al., 2010)
potkan	myocyty	(Liu et al., 2011)
člověk	permeabilizované myofibrily	(Gouspillou et al., 2014)
myš	osteocyty	(Shum et al., 2016)

Tab. 2: Přehled prací podporujících zvýšenou citlivost MPTP k jeho regulačním faktorům indukovanou stárnutím organismu v různých organismech, tkáních a buňkách. Upraveno podle (Rottenberg and Hoek, 2017).

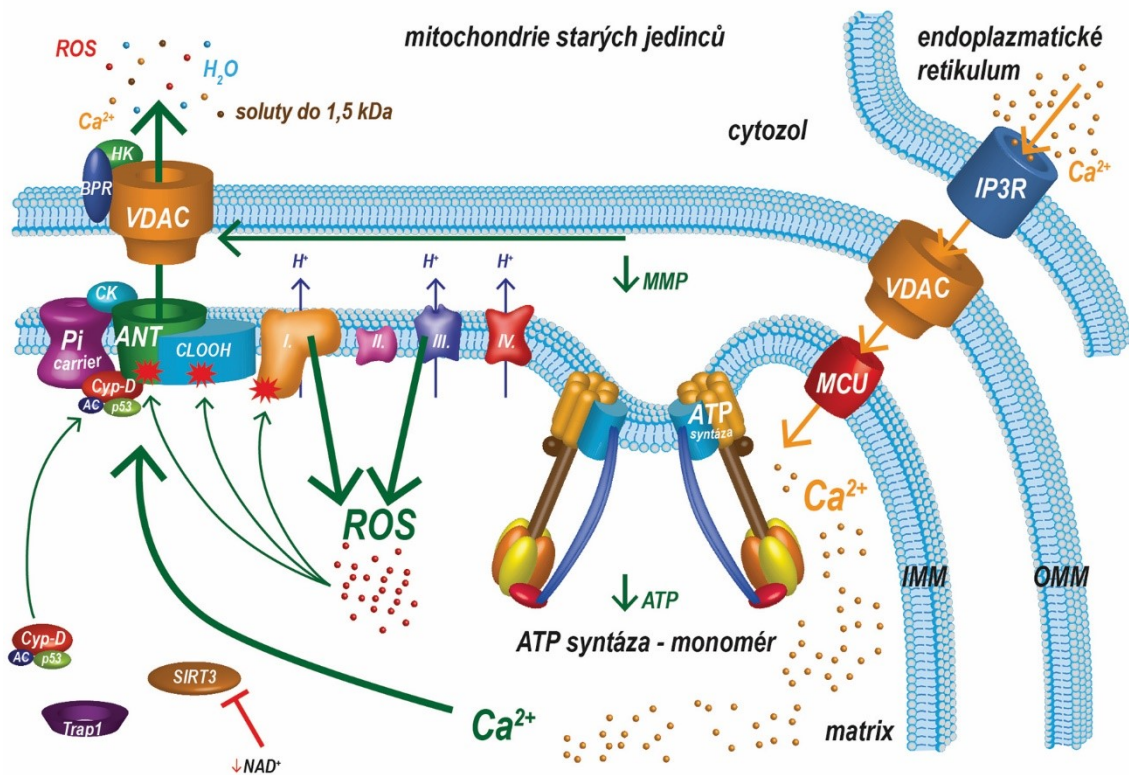
2. 6. 1. Změny citlivosti MPTP k jeho regulačním faktorům indukované stárnutím

MPTP hraje klíčovou roli v procesu stárnutí organismu a existuje celá řada věkem indukovaných stimulů, jenž aktivují otevření MPTP. Nejčastěji nárůst koncentrace mitochondriálního kalcia a/nebo ROS zvyšují frekvenci otevírání MPTP během stárnutí (Panel et al., 2018, Rottenberg and Hoek, 2017). Oxidační stres a relativně vysoké koncentrace Ca^{2+} iontů mění permeabilitu IMM. Změna propustnosti vede ke kolapsu MMP, depleci ATP a významně ovlivňuje buněčnou (kalciovou) signalizaci. Bylo prokázáno, že v průběhu stárnutí dochází nejenom k zásahu do homeostázy kalcia (Buchholz et al., 2007), ale i ke změnám citlivosti MPTP vůči Ca^{2+} iontům (Endlicher et al., 2021) a dalším faktorům regulujícím jeho otevření. Dobře fungující regulace koncentrace kalcia v matrix mitochondrií, účinná eliminace vzniklých mtROS a vysoký MMP tak významně brání otevření MPTP v mladém věku (Rottenberg and Hoek, 2017) (obr. 6).



Obr. 6: Vliv Ca^{2+} iontů, ROS a MMP v procesu aktivace MPTP během stárnutí. Obrázek poukazuje na uspořádání mitochondriálních krist a probíhající procesy v mitochondriích mladých jedinců. Upraveno podle (Panel et al., 2018, Paradies et al., 2013).

Během stárnutí se v mitochondriích zvyšuje koncentrace Ca^{2+} iontů a produkce ROS. Dochází k poklesu MMP a účinnosti antioxidačního systému (superoxiddismutáza (SOD) a glutathionperoxidáza (GPx)). U starších jedinců dochází také k rozpojení dimerů ATP syntázy, což vede k přestavbě mitochondriálních krist až k jejich zániku a poklesu produkce ATP (Daum et al., 2013, Panel et al., 2018). Oxidační poškození transportérů Ca^{2+} iontů rovněž ovlivňuje kalciovou homeostázu v mitochondriích (Dong et al., 2017). Tyto změny se projeví zvýšením koncentrace Ca^{2+} iontů v matrix mitochondrií a Ca^{2+} ionty se tak stávají primárním spouštěčem otevření MPTP. Mitochondriální respirační řetězec je hlavním zdrojem, ale i cílem mtROS. Peroxidace komplexů respiračního řetězce následně vede k další produkci mtROS a poklesu MMP v začarovaném kruhu. Zvýšená produkce mtROS rovněž podporuje oxidaci kardiolipinu, jenž je pevně vázán na ANT a jehož peroxidace má za následek zvýšenou citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům (Hoffmann et al., 1994, Panel et al., 2018, Paradies et al., 2014, Petrosillo et al., 2006) (obr. 7).

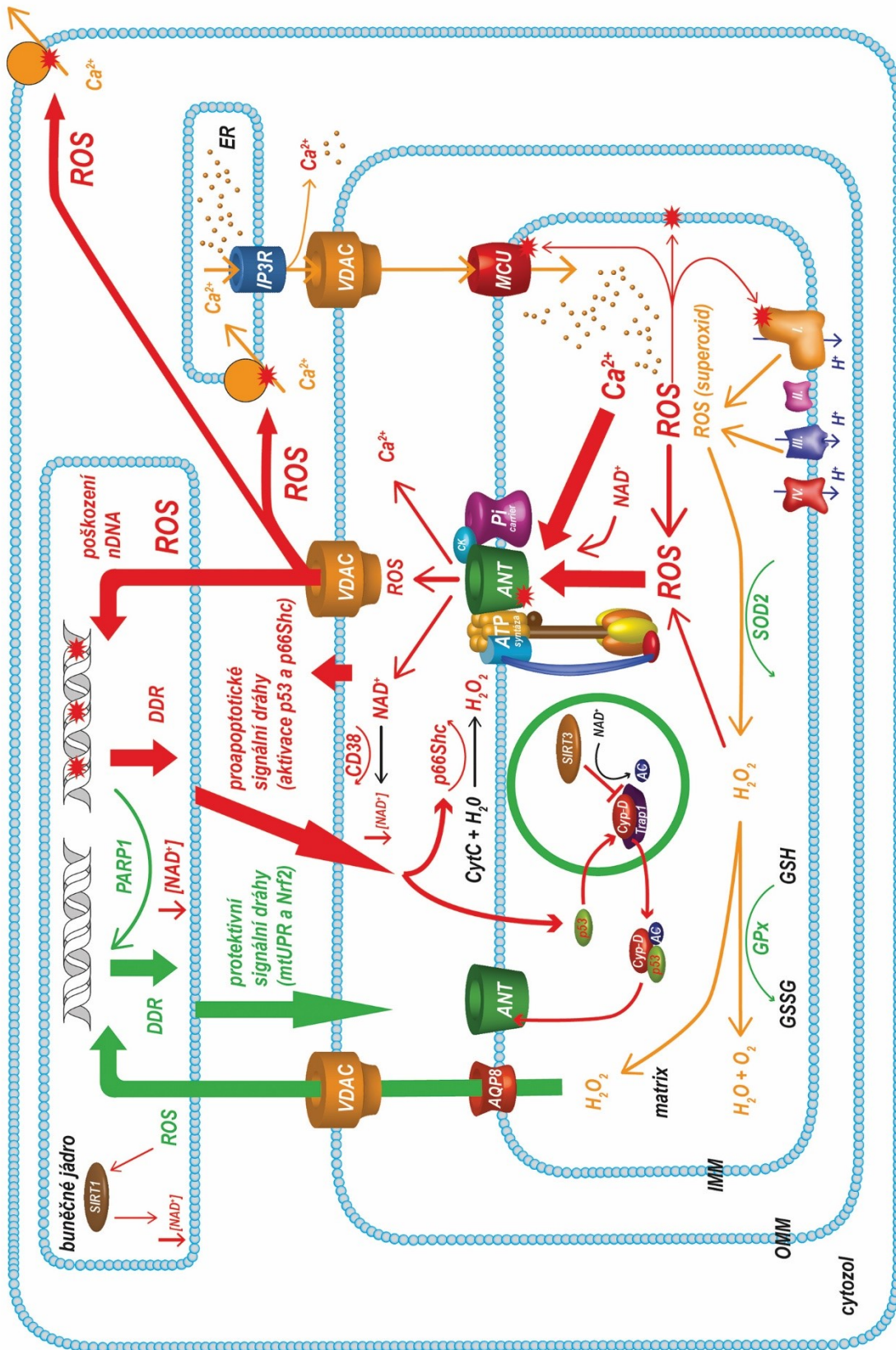


Obr. 7: Vliv Ca^{2+} iontů, ROS a MMP v procesu aktivace MPTP během stárnutí. Obrázek poukazuje na uspořádání mitochondriálních krist a probíhající procesy ve stárnoucích mitochondriích. Upraveno podle (Panel et al., 2018, Paradies et al., 2013).

Nicméně mtROS rovněž indukují mechanismy, které mají protektivní vliv na mitochondrie. Mitochondriální poškození vyvolané mtROS nebo přímo samotné mtROS iniciují signály, které aktivují několik drah chránících mitochondrie před oxidačním stresem (obr. 8). Dále spouštějí kaskády zpomalující stárnutí, inhibující buněčnou smrt a zvyšující životnost buněk (Desjardins et al., 2017, Sun et al., 2016). Metabolismus spojený s nárůstem produkce mtROS indukuje signalizaci do jádra, kde mtROS aktivují reakci poškození jaderné deoxyribonukleové kyseliny (nDNA) „DNA damage response“ (DDR), která v něm spouští kaskádu ochranných mechanismů (Fang et al., 2016, Golia et al., 2015, Sun et al., 2016).

V buňkách mladých zvířat není otevírání MPTP tak časté. Mírnější produkce mtROS spouští různé protektivní mechanismy, které upravují buněčné procesy a chrání mitochondrie a buňku před oxidačním poškozením (Patterson et al., 2015, Reczek and Chandel, 2015, Wei and Kenyon, 2016). Vzniklé mtROS jsou následně eliminovány účinnými antioxidantními systémy. Avšak při překročení jejich kapacity zvýšený oxidační stres aktivuje otevírání MPTP. Krátké a občasné otevírání MPTP stimuluje ochranné cesty (pokles produkce mtROS) (Feng et al., 2017, Hou et al., 2014), nicméně opakované a dlouhodobé otevírání MPTP vede k dalšímu oxidačnímu poškození, které může urychlit proces stárnutí a vést až k buněčné smrti (Rottenberg and Hoek, 2017).

Oxidační stres, jenž se kumuluje v průběhu stárnutí, poškozuje mitochondriální suprakomplexy respiračního řetězce a transportéry Ca^{2+} iontů v endoplazmatickém retikulu (ER), v mitochondrii a v plazmatické membráně (obr. 8), což vede ke zvýšené produkci mtROS a přetížení mitochondrií Ca^{2+} ionty, které dále zvyšují frekvenci otevírání MPTP (Batandier et al., 2004, Fernandez-Sanz et al., 2015, Fernandez-Sanz et al., 2014, Jang et al., 2017). Zvýšená koncentrace mtROS, uvolněných přes MPTP do cytosolu může přemoci antioxidantní systémy buňky, což vede k rozsáhlému poškození nDNA a zvýšené proapoptotické signalizaci (Fang et al., 2016, Gomes et al., 2013, Imai and Guarente, 2014, Nicolai et al., 2015). Výsledkem těchto procesů je snížení ochrany před účinky ROS spolu s převahou proapoptotické dráhy. Všechny tyto změny oslabují mitochondriální ochranné systémy před působením a tvorbou dalších mtROS, a dále zvyšují citlivost MPTP k jeho regulačním faktorům. Tento cyklus vede k častějším a delším aktivacím otevírání MPTP. Postupně dochází ke slabší a slabší signalizaci ochrany před účinky mtROS a silnější a silnější proapoptotické signalizaci. Celý tento proces nakonec směřuje k ireverzibilnímu otevření MPTP, k poškození mitochondrií, případně až k buněčné smrti (Rottenberg and Hoek, 2017, Rottenberg and Hoek, 2021).



Obr. 8: Aktivace protektivních (zeleně) a proapoptotických (červeně) drah v buňce indukované změnou homeostázy kalciových iontů a mtROS. Upraveno podle (Rottenberg and Hoek, 2021).

2. 6. 2. Vliv kalciové homeostázy na aktivaci MPTP v průběhu stárnutí

Zvýšená koncentrace Ca^{2+} iontů v matrix mitochondrií byla prvním popsáním faktorem nezbytným pro aktivaci otevření MPTP (Haworth and Hunter, 1979, Hunter et al., 1976). Dokonce už v roce 1969 popisovali Hackenbrock a Caplan kalcium indukované změny ve struktuře izolovaných mitochondrií. Jak již bylo řečeno, Ca^{2+} ionty, ROS, Cyp-D a ANT jsou zatím jediné prokázané klíčové komponenty důležité pro otevření/regulaci MPTP (Karch et al., 2019, Tajeddine, 2016). Přetížení mitochondrií Ca^{2+} ionty je základním spouštěčem otevření MPTP a změny v homeostáze intracelulárního, potažmo mitochondriálního kalcia tak výrazně ovlivňují jeho funkční stav. Citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům, které mají svá vazebná místa na matrixové straně IMM, ale významně ovlivňují i další faktory, jako je již zmiňovaný oxidační stres, vysoká koncentrace Pi a další.

Je nesporné, že stárnutí má vliv na kalciovou homeostázu a že v průběhu stárnutí dochází ke změnám ve vazbě a distribuci kalcia v buňce (Mattson, 2007). Tyto změny v kalciové homeostáze zvyšují množství kalcia v cytosolu a následně indukují přetížení mitochondrií Ca^{2+} ionty. Schopnost vázat (pufrovat) cytosolové kalcium je u starších buněk obecně snížena (Pandya et al., 2015, Tsai et al., 1997). Oxidační poškození transportérů a kanálů Ca^{2+} iontů, včetně samotného mitochondriálního kalciového kanálu (MCU), jsou dalšími věkem indukovanými ději, které ovlivňují kalciovou homeostázu buňky a přispívají k indukci buněčné smrti vyvolané kalciovým přetížením (Andersson et al., 2011, Cooper et al., 2013, Dong et al., 2017).

Jak bylo uvedeno, tak stárnutí výrazně mění kapacitu transportu kalcia přes membrány a jeho skladování v sarkoplazmatickém retikulu (SR) a ER. V průběhu stárnutí klesá také schopnost mitochondrií vázat Ca^{2+} ionty a dochází ke změnám v kalciové komunikaci mezi SR/ER a mitochondriemi (Fernandez-Sanz et al., 2014, Pandya et al., 2015). Zvýšený přímý transport kalcia z ER do mitochondrií vyústí k nadbytku Ca^{2+} iontů v matrix mitochondrií (Calvo-Rodriguez et al., 2016). Zvýšená bazální hladina Ca^{2+} iontů pak vede k aktivaci kalcium dependentních enzymů, jako jsou fosfolipázy, proteázy a nukleázy a ke změnám oxidativní fosforylace (Jahangir et al., 2001). Ca^{2+} ionty významně ovlivňují produkci ATP dvěma mechanismy. Ca^{2+} ionty zvyšují aktivitu Krebsova cyklu tím, že stimulují pyruvátdehydrogenázu, izocitrátdehydrogenázu a α -ketoglutarátdehydrogenázu. Při zvýšené aktivitě těchto enzymů roste produkce mitochondriálního NADH, substrátu pro komplex I respiračního řetězce. Zvýšená dostupnost volného substrátu zvyšuje gradient protonů, což stimuluje

produkci ATP (McCormack and Denton, 1989, McCormack et al., 1990). Druhý způsob, jehož mechanismus není zatím zcela objasněn, spočívá v přímé Ca^{2+} indukované stimulaci komplexu V, jež vede ke zvýšení produkce ATP (Das and Harris, 1990, Territo et al., 2001). Zvýšená aktivita respiračního řetězce je ale spojena se vzestupem produkce mtROS, jenž ve výsledku poškozuje enzymy respiračního řetězce s následným poklesem produkce ATP (Gunter et al., 2004, Nicholls and Ferguson, 2013, Tajeddine, 2016).

Závěrem lze shrnout, že stářím indukované změny kalciové homeostázy ovlivňují komunikaci mezi SR/ER a mitochondriemi, vedou ke změnám v transportu kalcia, poklesu produkce ATP a k zesílení oxidačního stresu (Fernandez-Sanz et al., 2014, Szalai et al., 2000). Toto přetížení mitochondrií Ca^{2+} ionty, zvýšenou tvorbou mtROS a poklesem produkce ATP pak vede k otevření MPTP. Ve stárnoucích buňkách je koncentrace cytosolového volného kalcia často vyšší, než je hodnota nutná pro otevření MCU a pro příjem Ca^{2+} iontů do mitochondrií. Rovněž koncentrace Ca^{2+} iontů nutná k aktivaci a otevření MPTP se v průběhu stárnutí snižuje, což v konečném důsledku vede k častějšímu otevření MPTP a kalciem indukované buněčné smrti u starších buněk (Mather and Rottenberg, 2000, Rottenberg and Hoek, 2021).

2. 6. 3. Vliv zvýšené produkce ROS na aktivaci MPTP v průběhu stárnutí

Mitochondriální ROS jsou významným, možná i nejvýznamnějším, regulačním faktorem, jež indukuje otevření MPTP (Hunter and Haworth, 1979a, Tajeddine, 2016). mtROS svými účinky významně snižují koncentraci Ca^{2+} iontů potřebnou k otevření póru (Drahota et al., 2012a, Endlicher et al., 2019, Halestrap et al., 1997). Rovněž není pochyb o tom, že stárnutí a zpomalení transportu elektronů přes komplexy respiračního řetězce vede ke zvýšené produkci mtROS (Barja, 2014, Forkink et al., 2015). Věkem indukovaná zvýšená produkce mtROS je připisována oxidačnímu poškození jednotlivých komplexů respiračního řetězce a mitochondriální DNA, která kóduje proteiny těchto komplexů. To vede k syntéze defektních komplexů respiračního řetězce a tvorbě dalších mtROS. Tím vzniká bludný kruh, který má za následek s rostoucím věkem stále více defektní komplexy respiračního řetězce a zpomalení toku elektronů přes tyto komplexy (Dai et al., 2014, Zorov et al., 2014).

V průběhu stárnutí nedochází pouze k oxidaci jednotlivých komplexů respiračního řetězce, ale i další důležité struktury jsou vystaveny účinkům ROS. Jednotlivé složky MPTP a membránové mitochondriální fosfolipidy, např. kardiolipin, podléhají rovněž oxidačním změnám. Většina proteinů, o nichž je známo, že by se mohly

podílet na molekulární podstatě MPTP, případně na jeho regulaci, nese -SH skupinu, která může podléhat oxidacím, jež následně vedou ke konformačním a funkčním změnám (Tajeddine, 2016). Bylo prokázáno, že oxidovaný kardiolipin zvyšuje citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům (Petrosillo et al., 2006). Kardiolipin je specifický mitochondriální fosfolipid, který se váže na různé proteiny a hraje významnou roli v molekulárním uspořádání a funkci IMM včetně mitochondriálních krist (Klingenberg, 2009, Schlame and Greenberg, 2017). Vzhledem k tomu, že se kardiolipin nachází v blízkosti zdroje mtROS a obsahuje vysoký podíl nenasycených mastných kyselin, je náchylný k lipoperoxidaci. Podíl nepoškozeného kardiolipinu se tak v důsledku působení ROS s věkem snižuje a zastoupení oxidovaného kardiolipinu se zvyšuje, čímž dochází ke změnám vlastností mitochondriálních membrán a zvýšené citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům (Paradies et al., 2019, Petrosillo et al., 2010).

Zvýšená tvorba ROS a oxidace mitochondriálních membránových lipidů a proteinů spojených s MPTP tak podporují hypotézu snadnější aktivace MPTP během stárnutí. Stručně řečeno, oxidační stres, který vzrůstá ve stárnoucích buňkách (Dai et al., 2014), zvyšuje frekvenci otevírání MPTP a to různými mechanismy, jež zase dále potencují produkci ROS a otevírání MPTP (Zorov et al., 2014). Je vhodné zmínit, že citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům a ROS se mění nejenom v závislosti na věku (Drahota et al., 2012b, Mather and Rottenberg, 2000), ale je také tkáňově specifická (Endlicher et al., 2009a) a závislá na pohlaví (Milerova et al., 2016). Tyto rozdíly v citlivost MPTP k regulačním faktorům budou více diskutovány v experimentální části habilitační práce.

2. 6. 4. Věkem navozené peroxidační změny ANT ovlivňující MPTP

ANT byl hned od samého počátku výzkumu MPTP považován za molekulu nezbytnou pro spoluvytváření MPTP (Brustovetsky, 2020, Hunter and Haworth, 1979a). ANT interaguje s Cyp-D, čímž snižuje práh pro aktivaci MPTP Ca^{2+} ionty (Crompton et al., 1998, Woodfield et al., 1998). Přestože první genetické experimenty prokázaly, že ANT není nezbytnou součástí MPTP (Kokoszka et al., 2004), další údaje svědčí pro důležitou roli ANT při otevírání MPTP (Halestrap and Richardson, 2015) a dokonce poslední genetické experimenty opět vrací ANT do hry jako jeho nezbytnou strukturální část (Karch et al., 2019). Kardiolipin, jak již bylo zmíněno, se pevně váže na ANT a ovlivňuje transport adeninových nukleotidů (Hoffmann et al., 1994). Oxidace kardiolipinu mění konformaci ANT a pravděpodobně i vlastnosti MPTP.

Oxidace klíčových postranních řetězců bílkovin může rovněž ovlivnit funkční stav MPTP (Chernyak and Bernardi, 1996). Vzhledem k tomu, že do dnešní doby není jednoznačně definována molekulární struktura MPTP, nemůžeme tak přesně určit, které struktury podléhají oxidačním změnám vedoucím k ovlivnění citlivosti MPTP. Známa je ale oxidace thiolových skupin v aminokyselině cysteinu (Go and Jones, 2017). Oxidací cysteinu se mění konformace proteinů, o nichž se uvažuje, že se podílejí na tvorbě póru nebo na regulaci jeho otevření, jako je ANT (Costantini et al., 2000, Halestrap et al., 1997), Cyp-D (Nguyen et al., 2011), ATP syntáza (Wang et al., 2013), případně i navrhovaný komplex I respiračního řetězce (Chouchani et al., 2013) a další.

ANT obsahuje tři redukované cysteiny, které jsou obzvláště citlivé k oxidaci během stárnutí (Yan and Sohal, 1998). Oxidace thiolových skupin ANT v důsledku zvýšeného oxidačního stresu vede mimo jiné ke změně v uspořádání ANT a jeho specifitě vůči ADP (McStay et al., 2002). Vlivem zvýšeného oxidačního stresu dochází nejprve k oxidaci zmiňovaných thiolových skupin a posléze k ireverzibilním změnám. Významné jsou pak změny na rozhraní ANT a kardiolipinu. V důsledku těchto dějů dochází ke konformačním změnám v uspořádání ANT a pravděpodobně ke vzniku MPTP (Brustovetsky and Klingenberg, 1996, Hoffmann et al., 1994). V neposlední řadě dochází v průběhu stárnutí k oxidaci glutathionu, což je důležitý antioxidant, a tím k narušení rovnováhy produkce a eliminace ROS. Jakmile se cysteinové molekuly během stárnutí oxidují, může to přispívat ke zvýšené citlivosti póru k jeho regulačním faktorům a vyšší frekvenci otevírání MPTP. Pokud je navíc oslabena nebo vyčerpána antioxidační kapacita, stávají se mitochondrie náchylnějšími k MPT (Kowaltowski et al., 2009).

2. 6. 5. Věkem indukované změny MMP a syntézy ATP ovlivňující MPTP

V podmínkách *in vitro* a v přítomnosti Ca^{2+} iontů depolarizace mitochondriální membrány indukuje otevření MPTP a *swelling* izolovaných mitochondrií (Bernardi, 1992, Scorrano et al., 1997). V intaktních mitochondriích je MPTP napěťově řízený kanál a pokles MMP ovlivňuje aktivitu póru (Bernardi, 1992). Několik studií potvrdilo, že MMP je ve starších buňkách nižší, a produkce mtROS vyšší (Sastre et al., 1996, Sugrue and Tatton, 2001). Zvýšený oxidační stres a změny v homeostáze intracelulárního kalcia se všemi následky tak podporují otevření MPTP ve stárnoucích mitochondriích. Je rovněž pravděpodobné, že stárnutí snižuje práh potenciálu potřebný k otevření MPTP a následně ke smrti stárnoucích buněk.

Sice se podařilo prokázat, že v průběhu stárnutí MMP klesá, ale dodnes není zcela jasné to, zda pokles MMP je příčinou nebo důsledkem aktivace a zvyšující se frekvence otevírání MPTP ve stárnoucím organismu. Důvod poklesu MMP během stárnutí není zcela objasněn. Pravděpodobně se jedná o důsledky věkem zvýšené tvorby ROS, které oxidují jednotlivé komponenty mitochondriálních membrán. Je známo, že oxidační poškození membránových fosfolipidů zvyšuje propustnost membrány pro ionty (Runas and Malmstadt, 2015), a že s rostoucí věkem se toto oxidační poškození zvyšuje (Pamplona, 2008). Oxidační stres tak mění fluiditu a permeabilitu membrán a podporuje rozpřažení mitochondrií (Knobloch et al., 2015, Runas and Malmstadt, 2015). Rovněž bylo popsáno, že ANT je ve starých buňkách oxidován (Le Bras et al., 2005) a oxidace -SH skupin snižuje hodnotu MMP nutnou k otevření MPTP (Petronilli et al., 1994). Na závěr je třeba zdůraznit, že krátkodobé otevření MPTP a mírná depolarizace MMP má pozitivní účinky na buňku. Mírný pokles MMP vede k rozpřažení mitochondrií a ke snížení produkce mtROS (Skulachev, 1998). Nejnověji se mírné, opakované depolarizaci přikládá významný podíl na zpomalení procesu stárnutí (Vyssokikh et al., 2020).

ATP syntáza byla nejnověji považována za jednu z molekul, která se podílí na tvorbě MPTP. I když genetické studie tuto hypotézu vyvrátily (He et al., 2017b), stále zde je její významná funkce při regulaci otevírání MPTP. V průběhu stárnutí se mění některé vlastnosti ATP syntázy (Frenzel et al., 2010, Guerrieri et al., 1996). Molekula ATP syntázy podléhá oxidačním změnám svých cysteinových zbytků a nitraci tyrosinových zbytků (Fernandez-Sanz et al., 2015, Haynes et al., 2010). V průběhu stárnutí dochází také k reorganizaci IMM, zániku mitochondriálních krist, včetně dimerů ATP syntázy a vzniku nových kontaktních míst mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou, což by mohlo podporovat vznik nových MPTP (Daum et al., 2013, Panel et al., 2018). Stárnutí by tak mohlo snížit maximální aktivitu ATP syntázy a ovlivnit dostupnou koncentraci ATP *in vivo*, a zároveň může také přispět k aktivaci MPTP.

2. 6. 6. *Posttranslanční modifikace Cyp-D ovlivňující MPTP v průběhu stárnutí*

Cyp-D je vedle Ca^{2+} iontů a mtROS hlavním endogenním regulátorem otevření MPTP. Svou vazbou na ANT, nebo podle novějších názorů na ATP syntázu, usnadňuje Ca^{2+} iontům a ROS otevírání MPTP (Crompton et al., 2002, Giorgio et al., 2017, Woodfield et al., 1998). Jeho vazba senzibilizuje otevření MPTP tím, že způsobuje konformační změny v komplexu MPTP, čímž zvyšuje jeho afinitu k Ca^{2+} iontům

a upřednostňuje jejich vazbu před ostatními bivalentními prvky (Bernardi et al., 2015a, Bernardi et al., 2015b). Velmi důležitou roli v procesu stárnutí hrají posttranslační modifikace Cyp-D a jejich změny indukované věkem. U mladých zvířat je Cyp-D v důsledku těchto reakcí do značné míry inhibován (Elrod and Molkenin, 2013). Cyp-D reaguje s inhibičními proteiny např. TRAP1 proteinem (protein 1 asociovaný s TNF receptorem). Tato vazba brání interakci Cyp-D s aktivačními proteiny (např. p53), jež by vedla k otevření MPTP (Lebedev et al., 2016). Stárnutí ale ovlivňuje některé tyto posttranslační modifikace, což má za následek vyšší afinitu Cyp-D ke strukturám tvořícím MPTP. Bylo prokázáno, že v průběhu stárnutí se zvyšuje poměr Cyp-D navázaného na ANT vůči navázanému na TRAP1 (obr. 7), což přispívá ke zvýšení citlivosti MPTP k jeho otevření (Marzetti et al., 2008, Rottenberg and Hoek, 2017).

V mitochondriích mladých zvířat je Cyp-D inhibován vazbou na matrixový protein TRAP1 a pomocí enzymatické reakce katalyzované sirtuiny udržován v neaktivní formě. Sirtuiny deacetylují Cyp-D a udržují ho tak v konformaci, která není schopná se navázat na komplex MPTP (obr. 6). Sirtuiny tím inhibují otevření MPTP a zpomalují proces stárnutí. Věkem indukovaný pokles exprese a aktivity NAD^+ dependentních sirtuinů vede ke změně konformace Cyp-D a jeho uvolnění z vazby na TRAP1 protein (obr. 7). Takto modifikovaný Cyp-D upřednostňuje vazbu na MPTP, konkrétně na ANT, a stimuluje jeho otevření (Hafner et al., 2010, Kwon et al., 2015). Sirtuiny rovněž zasahují do regulace eliminace ROS (obr. 8) (Ansari et al., 2017, Brown et al., 2013, Kincaid and Bossy-Wetzler, 2013), a jejich snížená aktivita může nepřímo zesílit oxidační stres a aktivitu Cyp-D během stárnutí (van de Ven et al., 2017). Dále bylo prokázáno, že oxidační stres navozený v průběhu stárnutí rovněž oxiduje -SH skupiny Cyp-D (Folda et al., 2016) a usnadňuje tak jeho vazbu na ANT a indukci otevírání MPTP (Nguyen et al., 2011).

Další látkou, která se v průběhu stárnutí kvůli oxidačním změnám hromadí v matrix mitochondrií je protein p53. Protein p53 je aktivován poškozenou DNA a slouží jako signální posel k iniciaci apoptózy (Priami et al., 2015, Vaseva et al., 2012). Protein p53 vytváří komplex s Cyp-D, čímž ho vytěsňuje z vazby na protein TRAP1 (obr. 7). Uvolněný Cyp-D po vazbě na ANT pak opět indukuje otevření MPTP (Lebedev et al., 2016). Tomuto stavu nahrává i fakt, že ve stárnoucích buňkách jsou syntéza proteinu TRAP1 a jeho přenos do matrix sníženy (Altieri, 2013, Rottenberg and Hoek, 2017), zatímco transport p53 do matrix mitochondrií je zvýšen (Priami et al., 2015, Vaseva et al., 2012).

2. 7. Role MPTP v patogenezi vybraných onemocnění

Kromě fyziologických funkcí, kde se uplatňuje přechodné otevření MPTP, se pór při dlouhodobém ireverzibilním otevření podílí na rozvoji řady patologických procesů. Otevření MPTP hraje klíčovou roli při vzniku mnoha civilizačních chorob. Mezi nejčastější z nich patří kardiovaskulární a neurodegenerativní choroby. MPTP byl předmětem řady klinických studií. Z jejich závěrů vyplývá, že MPTP má ústřední roli v patogenezi ischemicko/reperfuzního poškození srdce (Halestrap, 2010), mozku (Friberg and Wieloch, 2002), ledvin (Lemoine et al., 2015), jater (Kim et al., 2003) a dalších tkání (Bonora et al., 2020). Významná úloha MPTP je patrná rovněž v rozvoji neurodegenerativních onemocnění (Rao et al., 2014), v patogenezi diabetu (Yan et al., 2016) a v poškození jater vyvolaného léky (Jaeschke et al., 2012). MPTP se dále podílí na vzniku akutní pankreatitidy, rozvoji diabetes mellitus, svalové dystrofie, syndromu suchého oka a Reyeova syndromu. Nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD) s následnou zvýšenou produkcí ROS je rovněž spojená s ireverzibilním otevřením MPTP (Bonora et al., 2020, Nesci et al., 2017).

V neposlední řadě bychom měli zmínit roli MPTP v rozvoji dysfunkce většiny orgánů, jež vzniká v průběhu stárnutí organismu (Hepple, 2016, Rocha-Rodrigues et al., 2013, Toman and Fiskum, 2011). Stárnutí je také jedním z rizikových faktorů karcinogeneze a zdá se, že v tomto procesu hraje významnou roli zvýšená tvorba ROS (Bonora and Pinton, 2014, Park et al., 2011). Nicméně, jakmile se mutovaná buňka přemění na neoplastickou, její antiapoptotická signalizační kapacita se významně aktivuje a MPTP se stává rezistentním vůči aktivaci Ca^{2+} ionty a ROS (Bonora and Pinton, 2014, Rasola and Bernardi, 2014). Úloha MPTP u vybraných chorob a degenerativních onemocnění spojených se stárnutím je shrnuta v tabulce 3.

Kalorická restrikce (Amigo et al., 2017, Hofer et al., 2009, Kristal and Yu, 1998, Menezes-Filho et al., 2017) a cvičení/fyzická aktivita (Ferrara et al., 2008, Goncalves et al., 2016, Marcil et al., 2006), které se jeví jako prokázané strategie zpomalující stárnutí a oddálení nemocí souvisejících s věkem, jsou spojeny rovněž s inhibicí otevírání MPTP. Na základě těchto informací se spekuluje, že by tak cílená regulace (inhibice) MPTP mohla pomoci při léčbě těchto onemocnění a třeba i zpomalit proces stárnutí organismu (Panel et al., 2018, Rottenberg and Hoek, 2017).

Role MPTP v patogenezi jednotlivých onemocnění byla diskutována v našem přehledovém článku (Endlicher et al., 2018). V následujícím textu bych se proto chtěl zmínit pouze o důležitých aspektech, jež vedou k otevření MPTP u vybraných chorob.

Kardiovaskulární onemocnění

(Gordan et al., 2016) (Hafner et al., 2010)
(Weiss et al., 2003) (Zulian et al., 2016)



Neurologická onemocnění

Alzheimerova choroba

(Du and Yan, 2010) (Chen et al., 2016)
(Norenberg and Rao, 2007) (Valasani et al., 2016)



Parkinsonova choroba

(Martin et al., 2014b) (Rasheed et al., 2017)
(Thomas et al., 2012) (Watanabe et al., 2005)



Huntingtonova chorea

(Brustovetsky et al., 2005)
(Quintanilla et al., 2013) (Quintanilla et al., 2017)

Amyotrofická laterální skleróza

(Kawamata and Manfredi, 2010) (Martin et al., 2014a)
(Norenberg and Rao, 2007)

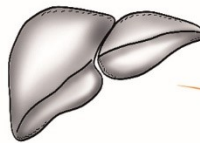


Roztroušená skleróza

(Savino et al., 2013) (Warne et al., 2016)

Nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD)

(Chen and Wang, 2007) (Kang et al., 2013)



Onemocnění pankreatu

(Mukherjee et al., 2016) (Shalbueva et al., 2013)



Diabetes mellitus

(Riojas-Hernandez et al., 2015) (Taddeo et al., 2014)
(Yan et al., 2016)



Akutní poškození ledvin

(Eirin et al., 2012) (Lemoine et al., 2015)

Svalová dystrofie

(Dubinin et al., 2020) (Gospillou et al., 2014)



Osteoporóza

(Shum et al., 2016) (Zhen et al., 2014)



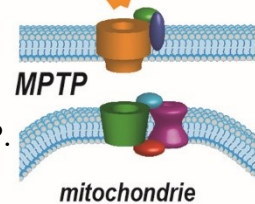
Syndrom suchého oka

(Červenka, 2003) (Gao et al., 2013)



Tab. 3: Přehled onemocnění, na jejichž patogenezi se podílí MPTP.

Upraveno podle (Nesci et al., 2017, Rottenberg and Hoek, 2017).



2. 7. 1. Kardiovaskulární onemocnění

Mitochondrie mají významnou roli v osudu kardiomyocytů během akutního ischemicko/reperfuzního poškození. Ischemické poškození srdce, stejně tak i dalších tkání, je do značné míry výsledkem opětovné reperfuze, která následuje po ischemii (Bonora et al., 2020, Ong et al., 2015). Pro minimalizaci ischemického poškození je nezbytné, co nejdříve provést obnovení krevního průtoku ischemickou tkání. Nicméně výzkumy potvrzují, že i přes jednoznačně pozitivní účinky, je reperfuze zároveň zodpovědná za další poškození myokardu a otevření MPTP je dlouhodobě uznávaným faktorem zodpovědným za ischemicko/reperfuzní poškození srdeční tkáně (Crompton et al., 1987, Crompton et al., 1988). Přestože již v průběhu ischemie vzniká v buňce vhodné indukční prostředí pro otevření MPTP (zvýšená koncentrace Ca^{2+} , Pi a ROS, a pokles MMP a produkce ATP), dochází v této fázi rovněž k silnému poklesu pH a nárůstu koncentrace ADP, faktorů, které dostatečně inhibují MPTP a k otevření póru dochází až v průběhu reperfuze. Ve fázi reperfuze, která následuje po ischemii, se buňky zaplavují dalšími kalciovými ionty a dochází k obnově MMP a produkci ATP, které je ale doprovázeno zvýšenou tvorbou mtROS, poklesem koncentrace ADP a nárůstem pH. Tyto faktory, ale značně aktivují otevření MPTP, což v konečném důsledku vede k rozsáhlé indukci buněčné smrti kardiomyocytů (Bonora et al., 2020, Doul and Charvátová, 2017, Morciano et al., 2017, Ryba, 2015).

Na otevření MPTP u myokardu postiženého ischemií má tak vliv celá řada faktorů a k poškození buněk dochází hlavně ve fázi reoxidace (reperfuze), kdy dojde k částečnému obnovení mitochondriálních funkcí. Klíčovou roli hraje již uvedený oxidační stres (Granger and Kvietys, 2015) a změny v pH. Během samotné ischemie, nejen v důsledku anaerobní glykolýzy, dochází k významnému poklesu intracelulárního pH, jenž silně inhibuje MPT (Halestrap, 1991). Během prvních minut reperfuze však dochází k návratu pH k fyziologické hodnotě, což naopak přispívá k otevření MPTP a ireverzibilnímu poškození tkáně (Bonora et al., 2020, Ong et al., 2015). Za hlavní zdroj mtROS v období reperfuze se pak považuje intenzivní oxidace sukcinátu, jenž se nahromadil v průběhu ischemie. Nadměrná oxidace sukcinátu vede ke zpětnému toku elektronů na komplex I a ke zvýšené produkci mtROS (Chouchani et al., 2014).

Na mnoha zvířecích modelech, včetně humánních (Piot et al., 2008), a v různých tkáních (srdeční a kosterní svalstvo, mozek, ledviny, játra, plíce a varlata) bylo prokázáno, že aplikace CsA snižuje rozsah ischemicko/reperfuzního poškození (Bonora et al., 2020). Důležitým faktorem jeho účinku je ale dávkování a čas podání CsA.

V ischemické fázi, jak bylo uvedeno, zůstává MPTP uzavřený a k jeho otevření dochází až během prvních 2 až 3 minut v období opětovné reperfuze. Aplikace CsA v průběhu časně reperfuze vedla k inhibici otevření MPTP a snížení rozsahu poškození srdeční tkáně (Griffiths and Halestrap, 1993, Griffiths and Halestrap, 1995). Pokud byl ale CsA aplikován až po 15 minutách od počátku reperfuze, k protektivnímu efektu na poškození srdeční tkáně nedošlo (Hausenloy et al., 2003, Ong et al., 2015). Tato pozorování jen potvrzují otevření MPTP na počátku obnovení krevního průtoku ischemickou tkání a inhibice otevření MPTP pomocí farmak na začátku reperfuze může zmírnit rozvoj buněčné smrti kardiomyocytů a snížit tak rozsah infarktu myokardu.

Kromě již zmiňovaných faktorů, indukujících otevření MPTP kardiomyocytů postižených ischemií, má vliv na aktivaci póru také pohlaví a stáří jedince (Ostadal et al., 2019, Ostadal et al., 2009a). Mužské a starší srdce je mnohem náchylnější k poškození způsobenému infarktem myokardu a otevření MPTP je považováno za významný faktor v tomto procesu. Zvýšená citlivost póru k jeho aktivačním faktorům a indukci buněčné smrti u reperfundovaných starších kardiomyocytů je pravděpodobně způsobena nejen samotným oxidačním stresem, ale je podpořena snížením úrovně antioxidační obrany ve stárnoucím organismu (Judge et al., 2005, Meng et al., 2007). Více bude diskutováno v experimentální části habilitační práce.

2. 7. 2. Neurodegenerativní choroby

Navzdory rozdílům v projevech a příznacích jsou všechny neurodegenerativní choroby založeny na chronické ztrátě neuronů. Ztrátu neuronů způsobuje mnoho různých faktorů. Mezi ně patří například geneticky podmíněné změny, metabolické poruchy, oxidační stres, zánětlivé procesy, patologické akumulace a následné agregace nefunkčních a/nebo zmutovaných proteinů a dysregulace funkcí mitochondrií. Většina neurodegenerativních chorob se vyznačuje podobnými znaky, jako jsou mitochondriální dysfunkce, porušená homeostáza kalcia, nadprodukce ROS a excitotoxicita, jež mimo jiné vedou k otevření MPTP (Bonora et al., 2020). Oxidační stres je pak považován za hlavní mechanismus, který se podílí na rozvoji neurodegenerativních chorob v průběhu stárnutí (Dai et al., 2014, Lin and Beal, 2006). Otevření MPTP hraje klíčovou roli v patogenezi Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy chorey, dále amyotrofické laterální sklerózy, roztroušené sklerózy a dalších neurodegenerativních chorob (Angelova and Abramov, 2017, Du and Yan, 2010, Gandhi et al., 2009, Martin, 2012, Norenberg and Rao, 2007, Quintanilla et al., 2017, Rao et al., 2014).

2. 7. 3. Lipotoxické poškození jater

Nealkoholová tuková choroba jater spočívá v ektopickém ukládání tuku v játrech z metabolických příčin. Nejčastějšími příčinami jsou obezita, inzulinová rezistence a diabetes mellitus. Prevalence NAFLD v posledních letech rapidně stoupá, a to až na 25 % u běžné populace a až 76 % u populace s diagnózou diabetes mellitus 2. typu (Younossi et al., 2016). Spektrum poškození jater je široké, od jaterní steatózy až po jaterní cirhózu. Závažnější formou NAFLD je jaterní steatohepatitida, při které dochází k poškození a odumírání hepatocytů a k infiltraci zánětlivými buňkami (Prasun et al., 2021). Steatohepatitida se často rozvíjí v jaterní fibrózu. K rozvoji těchto chorob přispívá oxidační stres (Garnol et al., 2014, Kučera et al., 2008), následovaný apoptózou hepatocytů a přestavbou jaterní tkáně. Klíčovou roli v apoptóze hepatocytů hraje mitochondriální dysfunkce (Singh et al., 2021, Teodoro et al., 2008). Mitochondrie využívají přebytečný intrahepatální tuk procesem β -oxidace. Tímto procesem vzniká nejenom ATP, ale zároveň také velké množství ROS, které jak je známo zvyšují citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům, což vede k vyšší frekvenci otevírání póru a spuštění apoptózy. Určitou roli mohou hrát také ROS indukované změny v homeostáze železa, které mohou rovněž přispívat k rozvoji MPT hepatocytů (Uchiyama et al., 2008).

2. 7. 4. Role MPTP v karcinogenezi

Nádorové buňky podstupují celou řadu metabolických změn, jejichž výsledkem je zvýšená rezistence k programované buněčné smrti. Nádorové buňky získávají energii hlavně anaerobní glykolýzou, která způsobuje silnou acidifikaci intracelulárního prostředí. Dále v nich dochází ke změnám kalciové homeostázy a ke zvýšené tvorbě ROS (Bonora et al., 2020). Nicméně samotné buňky se této produkci ROS dokážou úspěšně bránit. Jedním z jejich adaptačních mechanismů je navyšující se rezistence k oxidačnímu stresu a pravděpodobně i snížená citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům, ROS, a k indukci apoptózy. Nádorové buňky se vyznačují vyšším množstvím antioxidantů a inhibicí exprese proapoptotických drah (Grek and Tew, 2010). Příkladem je hexokináza II, jež vykazuje antioxidantní účinky a nádorové buňky ji exprimují ve vyšším množství, neboť mají vysoký metabolický obrát glukózy (Mathupala et al., 2010, Pantic et al., 2013, Pedersen et al., 2002). Vyšší schopnost odolávat buněčné smrti tak hraje významnou roli v růstu nádorových buněk. Nicméně cílená stimulace produkce ROS a překonání antioxidantních mechanismů nádorově změněných buněk by mohly vést k indukci otevření MPTP a možné léčbě nádorů (Biasutto et al., 2010, Trachootham et al., 2009).

2. 8. Farmakologická inhibice MPTP

Inhibitory MPTP, zejména inhibitory Cyp-D, se považují za potenciální léčiva jmenovaných chorob. Používané, zatím hlavně experimentálně, látky inhibující MPTP jsou CsA, sangliferin A (SfA) a propofol. CsA byl prvním prokázaným inhibitorem MPT. Farmakologická intervence CsA byla experimentálně vyzkoušena např. u pacientů ležících v kómatu s hepatitidou B a napomohla s uzdravením 8 pacientů ze 13 (Yoshida et al., 1995). Dalším klinicky významným testem bylo podání CsA pacientům před provedením reperfuze ischemické srdeční tkáně. Tito pacienti vykazovali až 40% pokles poškození srdeční tkáně v období 72 hodin po podání CsA v porovnání s kontrolní skupinou (Piot et al., 2008). Terapeutické využití inhibice MPTP v klinické praxi by tak bylo významné zejména pro zmírnění ischemicko/reperfuzního poškození myokardu. Důležité je ale podání CsA ve fázi před navozením vlastní reperfuze myokardu (Ong et al., 2015). Farmakologická aplikace CsA u kardiovaskulárních onemocnění je nicméně komplikovaná vzhledem k tomu, že nelze předem předpovídat rozvoj akutního infarktu myokardu. Preventivní podání CsA je ale dobře využitelné u plánovaných kardiochirurgických výkonů.

Další látkou inhibující MPTP je SfA. Stejně jako CsA je primárně používaný jako imunosupresivní léčivo. SfA se rovněž váže na Cyp-D a inhibuje jeho isomerázovou aktivitu. Podobně jako u CsA jeho inhibiční účinek na MPTP není stoprocentní (Clarke et al., 2002). Propofol je krátkodobě působící hypnotikum, jež je schopno inhibovat otevření MPTP. Propofol vykazuje antioxidační účinky, snižuje produkci ROS, a chrání kardiolipin před peroxidací (Javadov et al., 2000, Shao et al., 2008). Propofol dále ovlivňuje kalciové transportéry a akumulaci Ca^{2+} iontů v mitochondriích a je rovněž schopen inhibovat pór přímo svou vazbou na komponenty MPTP (Sztark et al., 1995a, Sztark et al., 1995b). Jeho účinky jsou předmětem řady studií, nicméně jeho rozšíření brání nežádoucí kardiovaskulární účinky (Grundmanová et al., 2016, Krajcova et al., 2015). I když byla objevena celá řada dalších přírodních/syntetických inhibitorů Cyp-D (MPTP), přehledně popsanych v práci (Biasutto et al., 2016, Briston et al., 2019, Izzo et al., 2016), tak nebyly zavedeny do běžné klinické praxe. Tyto inhibitory, pro svou toxicitu, selektivitu a nevhodnou farmakokinetiku, nedosahovaly očekávaných terapeutických výsledků v preklinických a klinických studiích. Těžiště výzkumu vhodného inhibitoru MPTP se proto přesunulo k vývoji nových syntetických molekul. Struktura, aktivita a selektivita těchto nových inhibitorů Cyp-D se podrobně věnuje nově publikovaná rozsáhlá práce autorů Halečková a kolektiv (2022).

2. 9. MPTP a vize do budoucnosti

Řada důkazů naznačuje, že mitochondrie díky svým mnoha nezastupitelným buněčným funkcím, hrají rozhodující roli v životě a smrti buňky, při stárnutí organismu a patogenezi chorob souvisejících s věkem. Mitochondriální bioenergetická dysfunkce, zvýšená produkce ROS, změny kalciové homeostázy, zvýšený oxidační stres a oxidační modifikace proteinů jsou faktory přispívající k otevření MPTP. V poslední době velké množství studií prokázalo, že MPTP, který stále není na molekulární úrovni definitivně charakterizován, je citlivější k otevření u starších zvířat a u nemocí spojených se stárnutím, a že inhibice MPTP může prodloužit život buněk. Ačkoli aktivace MPTP je klíčová během progresu stárnutí, důležitou otázkou stále zůstává, zda jsou předpokládané strukturální složky MPTP souběžně také měněny s věkem. I přes všechny známé důkazy však stále existují pochybnosti o zapojení MPTP do rozvoje stárnutí. Musí být proto předloženy definitivní experimentální důkazy o zapojení MPTP, jež by prokázaly, zda zvýšená aktivita MPTP je příčinou nebo důsledkem stárnutí. Jedinou možností, jak tyto informace ověřit, je získat přesné znalosti o struktuře a regulaci MPTP, jež by pravděpodobně pomohly objasnit roli MPTP v dlouhověkosti a zdraví organismu.

Literární recenze ukazují více než 50 let neúspěšné práce na vyřešení problému molekulární struktury MPTP. Určitě jsou zapotřebí nové strategie a nové metody, jež by vedly k objasnění jeho struktury. Než však budou k dispozici, stále existuje šance na řešení zbývajících problémů týkajících se funkce MPTP, regulace a specifčnosti, jakož i jeho zapojení do mnoha patologických stavů, dvěma dostupnými dobře fungujícími metodami. Tyto údaje budou důležité jak pro diagnostiku, tak pro léčbu uvedených onemocnění.

3. CÍLE PRÁCE

Cílem výzkumu, který je předkládán v rámci této habilitační práce, bylo shrnout parametry charakterizující aktivaci a inhibici otevření MPTP. Optimalizovat metody hodnocení MPT, s důrazem navýšit jejich výpovědní hodnoty. Dále vyhodnotit kinetiku otevírání MPTP a využít těchto poznatků při hodnocení funkčního stavu mitochondrií.

Specifické cíle:

1. Optimalizace turbidimetrické metody pro měření bobtnání (*swellingu*) izolovaných mitochondrií jako ukazatele průběhu MPT.
2. Zavedení a optimalizace fluorescenční metody pro měření retenční kapacity mitochondrií pro kalcium (CRC) u izolovaných mitochondrií jako indikátoru otevření MPTP.
3. Využití optimalizovaných metod pro lepší interpretaci přímého účinku Ca^{2+} iontů, anorganického fosfátu (Pi), terciárního butylhydroperoxidu (t-BHP), trijodtyroninu (T_3) a jejich vzájemných kombinací na Ca^{2+} dependentní MPTP v podmínkách *in vitro*.
4. Posouzení účinků ROS na propustnost mitochondriálních membrán po podání trijodtyroninu potkanům.
5. Porovnání citlivosti Ca^{2+} dependentního MPTP v různých tkáních pomocí obou výše uvedených metod.
6. Zhodnocení změn v citlivosti MPTP indukovaných v průběhu vývoje a stárnutí organismu.
7. Využití optimalizovaných metod pro hodnocení funkčního stavu mitochondrií po působení vybraných léčivých přípravků a potravinových doplňků (fenformin, epigalokatechin-3-galát).

4. PŘEHLED DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ S KOMENTÁŘEM

4. 1. Metody hodnocení MPTP

Důsledkem otevření póru je bobtnání mitochondrií způsobené přesunem vody z cytosolu do mitochondriální matrix, která má zpočátku vyšší osmolaritu a uvolnění naakumulovaných Ca^{2+} iontů z matrix mitochondrií do cytosolu. Pro hodnocení funkčního stavu MPTP a citlivosti k jeho regulačním faktorům existují dva hlavní metodologické přístupy. První metodou je měření mitochondriálního *swellingu*, který nám poskytuje informace o rychlosti otevření MPTP po přidání Ca^{2+} iontů a o maximálním rozsahu mitochondriálního bobtnání (Drahota et al., 2012a, Endlicher et al., 2016). Druhou metodou je stanovení mitochondriální retenční kapacity pro kalcium (CRC), která nás informuje o množství Ca^{2+} iontů potřebných pro otevření MPTP (Drahota et al., 2020, Endlicher et al., 2019).

Vhodné doplňkové metody jsou hodnocení změn MMP pomocí fluorescenčních sond např. safraninu O (Akerman and Wikstrom, 1976) nebo trifenylmethylfosfoniové elektrody (Azzone et al., 1977) a měření respirace mitochondrií po přidavku různých substrátů respiračního řetězce pomocí vysokoúčinné respirometrie (Oxygraph 2k OROBOROS) (Gnaiger et al., 1995). Otevření MPTP vede ke změnám MMP a následně k rozpřažení oxidativní fosforylace a poklesu tvorby ATP (Waterhouse et al., 2001). Obě doplňkové metody dávají více parametrů, ze kterých lze odvodit i změny v citlivosti MPTP. Nevýhodou těchto metod je fakt, že pokles MMP a rozpřažení oxidativní fosforylace nemusí vždy znamenat, že došlo k otevření MPTP. U těchto metod je proto nezbytné doplnit měření o záznamy, kdy je použit CsA jako specifický inhibitor MPTP (Broekemeier et al., 1989, Broekemeier and Pfeiffer, 1989, Fournier et al., 1987).

Mezi méně používané přístupy patří tzv. *patch-clamp* metoda (metoda terčíkového zámku). Tato metoda umožňuje studovat jednotlivé specifické kanály nebo i skupinu iontových kanálů na buněčných, ale i mitochondriálních membránách. K měření se používá skleněná mikroelektroda s otvorem o velikosti 1 μm . Mikroelektroda, přiložená na membránu buňky nebo mitochondrie, umožňuje ohraničit prostor takového rozměru, ve kterém se nachází právě jeden pór. Po vložení napětí se měří proud, který tímto kanálem prochází. Metoda byla opakovaně použita při hledání molekulární podstaty MPTP (Sorgato et al., 1987, Zorov et al., 1992). Významným objevem pomocí této *patch-clamp* techniky byla identifikace mitochondriálního megakanálu s naměřenou vodivostí až 1,3 nS (Kinnally et al., 1989, Petronilli et al.,

1989). Tento megakanál podléhal inhibici CsA a jeho odpověď na podané modulatory byla totožná se známými regulačními faktory MPTP (Szabo and Zoratti, 1991, Szabo and Zoratti, 1992). Podařilo se rovněž prokázat, že kanál zaujímá různé mezistavy o menší vodivosti, blížíci se hodnotám 10 - 30 pS (Kinnally et al., 1989, Petronilli et al., 1989). *Patch-clamp* metoda byla rovněž využita při zkoumání možného zapojení ATP syntázy jako strukturální molekuly MPTP (Alavian et al., 2014, Antoniel et al., 2018).

Existuje několik dalších technik, které se nově objevují a které dovolují měření aktivace MPTP přímo v živých buňkách pomocí fluorescenčního barvení (Bonora et al., 2016, Galluzzi et al., 2007). Tyto metody umožňují přesnější pohled na funkční stav MPTP a měly by být do budoucna preferovány. Frekvenci a dobu trvání otevření MPTP lze pozorovat pomocí fluorescenční sondy cpYFP (*circularly permuted yellow fluorescent protein*) mikroskopicky v buňkách pomocí detekce mitochondriálního záblesku (*mitoflashes*). Intenzita záblesků je spojená s produkcí superoxidových radikálů a koresponduje s přechodným otevřením CsA senzitivního MPTP (Wang et al., 2008, Wang et al., 2016, Wu et al., 2016). Nicméně tato metoda byla zpochybněna, neboť je mnohem citlivější na změny pH, než na detekci superoxidových radikálů (Schwarzländer et al., 2011). Naopak princip zhášení fluorescenčního světla se využívá v další metodě. Kalcein je fluorescenční sonda, jež se distribuuje do všech buněčných organel, včetně mitochondrií. Fluorescenční signál kalceinu se dá zhášet ionty kobaltu. Tyto ionty neprocházejí přes mitochondriální membrány a jsou pouze v cytosolu. Otevření MPTP lze detekovat jako prudký pokles fluorescence mitochondrií v důsledku porušení mitochondriálních membrán a úniku kalceinu do cytosolu (Bonora et al., 2013, Petronilli et al., 1999, Petronilli et al., 1998).

Metoda stanovení rozpadu ^3H 2-deoxyglukózy byla vyvinuta pro sledování otevření MPTP v intaktních buňkách během ischemicko/reperfuzního poškození srdce. Radioaktivně značená ^3H 2-deoxyglukóza vstupuje do buňky přes glukózový transportér a je fosforylována na ^3H 2-deoxyglukóza-6-fosfát. Tento produkt však nemůže být dále metabolizován, neprochází přes IMM a zůstává v cytosolu. Jakmile se ale MPTP otevře, vstupuje ^3H 2-deoxyglukóza-6-fosfát do matrix mitochondrií. Následné měření rozpadů radioaktivního produktu v izolovaných mitochondriálních frakcích umožňuje detekovat dobu otevření MPTP. Pomocí této metody se podařilo prokázat otevření MPTP v období 2. – 3. minuty od začátku reperfuze (Griffiths and Halestrap, 1995).

4. 1. 1. Optimalizace metody swellingu mitochondrií

Od samého počátku v roce 1953 byly vlastnosti póru přechodné permeability hodnoceny metodou bobtnání izolovaných mitochondrií, tj. jako pokles absorbance suspenze mitochondrií po přidání chloridu vápenatého. Při bobtnání mitochondrií dochází ke změně indexu lomu a tím následně klesá množství rozptýleného světla. Tento pokles lze měřit turbidimetricky jako pokles absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 520 nm (Crofts and Chappell, 1965, Chappell and Crofts, 1965, Tedeschi and Harris, 1958). Výstupem byla grafická křivka a proces bobtnání byl posuzován na základě změn ve tvaru této křivky. Výsledná zjištění byla spíše kvalitativní a nemohla poskytnout přesná kvantitativní numerická data o rychlosti procesu bobtnání.

Tato metoda byla velmi užitečná, když bylo třeba definovat optimální podmínky pro zkoumání procesu otevírání póru a pro identifikaci různých látek, které tento proces mohou aktivovat či inhibovat. To vše je možné snadno stanovit z grafických záznamů změn absorbance suspenze izolovaných mitochondrií. V další fázi studia fenoménu MPT, kdy bylo potřeba hodnotit vzájemné interakce několika faktorů, které pór ovlivňují, přestala tato metoda stačit. Měření bobtnání poskytuje pouze grafické údaje, které jsou nevhodné pro vyhodnocení velkého množství dat. Z grafických křivek bobtnání mitochondrií můžeme velmi dobře odečítat hodnoty rozsahu bobtnání, to znamená, o kolik mohou mitochondrie zvětšit svůj objem, když je MPTP otevřen, ale ze záznamu nejsme schopni odečíst rychlost bobtnání.

Klasické křivky hodnocení bobtnání mitochondrií

Do roku 2012 byl v laboratořích používán pouze jeden způsob vyhodnocování křivek popisujících bobtnání mitochondrií, který spočívá v pouhém vynesení naměřených hodnot změn absorbance mitochondriální suspenze v čase. Z těchto grafických záznamů se ale obtížně hodnotí kinetické parametry procesu bobtnání (otevírání MPTP). Z vnesených křivek lze vizuálně posoudit tendence procesu bobtnání, jeho rozsah i rozdíly v čase nástupu bobtnání. Tyto údaje umožňují získat obecné představy o procesu bobtnání, nedovolují ale získat pro jednotlivé hodnocené parametry přesné číselné údaje. Primární data po vynesení do grafu dávají soustavu pozvolna klesajících křivek, které udávají pouze obecnou informaci o permeabilizaci mitochondriálních membrán (Endlicher, 2010).

Derivované křivky hodnocení bobtnání mitochondrií

V naší publikované práci představujeme metodu, kde po derivaci originálních dat jsme schopni snadno hodnotit funkční stav MPTP z hlediska tří parametrů, tj. 1. rozsah bobtnání jako maximální pokles absorbance mitochondriální suspenze po přidání kalciových iontů, 2. maximální rychlost bobtnání po přidání kalciových iontů, 3. přesný čas, kdy je dosaženo maximální rychlosti bobtnání (Drahota et al., 2012a).

Z klasického grafického záznamu bobtnání mitochondrií je vidět, že se mění strmost klesání v různých časových intervalech. Pro zpřesnění odečítání konkrétních výsledků jsme ale potřebovali mnohem sofistikovanější způsob hodnocení naměřených dat tak, aby bylo možné jim přiřadit konkrétní číselné hodnoty. Toho jsme dosáhli derivací primárních dat. Derivace je běžně využívaný matematický úkon pro zpracování dat. Používá se například pro hodnocení rychlosti respirace mitochondrií (Gnaiger et al., 1995). Tento způsob hodnocení bobtnání mitochondrií prvně prezentoval ve své diplomové práci Tichý (2006). Hodnotu derivačního intervalu jsme zvolili 10 sekund. Ta s dostatečnou přesností detekuje změnu strmosti poklesu křivek i dobu, kdy rychlost bobtnání dosahuje maxima. Z grafu, který znázorňuje negativní hodnoty primární derivace, vyjádřené jako změna absorbance v desetisekundových intervalech, lze získat hodnoty rychlosti bobtnání vyjádřené jako $dA_{520}/10$ s. Grafy v publikované práci demonstrují, jakým způsobem se změní finální výstup a jaké to přináší výrazné zlepšení možnosti interpretace získaných dat. Tento postup hodnocení naměřených dat byl poprvé publikován v naší předkládané práci (Drahota et al., 2012a) a později (Endlicher et al., 2016). Jeho výhody jsou jednoznačné. Z derivovaných dat lze jednoduše odečíst několik důležitých informací. Jedná se zejména o počátek nástupu bobtnání po přidání kalciových iontů a o přesný údaj o maximální rychlosti bobtnání. Z derivované křivky lze odečíst i dobu, kdy rychlost bobtnání dosahuje maximální hodnoty. Lze tedy shrnout, že způsob zpracování primárních dat založený na jejich derivování s sebou přináší hned několik podstatných zlepšení oproti dřívějšímu. Pro posouzení funkčního stavu MPTP je nicméně vhodné kombinovat oba způsoby hodnocení dat. Z primárních dat lze získat orientační údaje o průběhu a rozsahu bobtnání, a z derivovaných dat číselné hodnoty pro jednotlivé sledované parametry (Endlicher, 2010).

Podrobněji viz příloha č. 1 a 2

4. 1. 2. Stanovení retenční kapacity mitochondrií pro kalcium

V posledních 25 letech byla pro studium funkce MPTP zavedena další metoda, tzv. měření mitochondriální retenční kapacity pro kalcium, tj. stanovení množství kalciových iontů, které musí mitochondrie akumulovat, aby došlo k indukci otevření MPTP. Tato metoda využívá fluorofor *Calcium green*, jenž neproniká mitochondriální membránou a jehož intenzita fluorescence je závislá na koncentraci kalcia v inkubačním médiu (Fontaine et al., 1998a, Ichas et al., 1997). Jestliže přidáváme postupně k suspenzi mitochondrií za přítomnosti fluoroforu malá kvanta kalciových iontů, dojde (pokaždé) k přechodnému vzestupu fluorescence, který rychle mizí, protože přidané kalcium je akumulováno mitochondriemi. Po opakovaném přidávání dosáhne množství akumulovaného kalcia kritické hodnoty, pór se otevře, akumulované kalcium se vyplaví do média a dojde ke skokovému zvýšení fluorescence.

Posouzení vybraných faktorů ovlivňujících stanovení hodnot CRC

Metoda měření hodnot CRC však dosud nebyla jednoznačně standardizována a údaje získané různými laboratořemi nelze snadno porovnávat. Někteří autoři preferují vysoké píky způsobené přidáním většího množství kalciových iontů, které MPTP otevírá rychleji (Fontaine et al., 1998b). Jiní preferují nízké píky způsobené nižším množstvím kalcia, kterému trvá déle, než dosáhne úplného otevření MPTP (Gizatullina et al., 2005, Pardo et al., 2015).

V našich dvou předkládaných původních pracích popisujeme, že hodnoty CRC mitochondrií jater potkana jsou značně závislé na použitém experimentálním protokolu (Drahota et al., 2020, Endlicher et al., 2019). Podařilo se nám prokázat, že hodnoty CRC významně ovlivňují tři faktory: 1. složení inkubačního média, 2. množství přidávaného kalcia a 3. intervaly mezi jednotlivými přidávkami kalcia. Rovněž jsme ověřili, že množství mitochondrií v hodnocené suspenzi neovlivňuje hodnotu CRC, a po přepočtu na mitochondriální proteiny, vychází hodnoty CRC stejné. V předkládané práci rovněž poukazujeme na to, že detailnější vyhodnocení fluorescenčních křivek může poskytnout nové informace o procesu otevírání MPTP po přidání Ca^{2+} iontů.

V našem uspořádání jsme použili čtyři různá množství (kvanta) přidávaného kalcia (opakované přidání 1,25; 2,5; 5 a 10 nmol do 1 ml media) a dva intervaly (75 s a 150 s) mezi jednotlivými přidávkami kalcia. Složení média bylo ovlivněno různou koncentrací Pi (finální koncentrace 0,1 a 1,0 mM) a t-BHP (finální koncentrace 0,01; 0,1 a 0,25 mM). t-BHP je modelová látka navozující oxidační stres. Pro ověření, že

studované parametry ovlivňují právě MPTP, byl použit CsA jako inhibitor MPTP. Naše výsledky prokázaly, že vyšší množství přidávaného chloridu vápenatého navýšilo hodnoty CRC až trojnásobně ve srovnání s nejnižším množstvím (1,25 nmol), a to v obou námi použitých intervalech. Dále jsme pozorovali, že pokud byl CaCl_2 přidáván v intervalech 75 s, hodnoty CRC se zvýšily o 30 % ve srovnání s přidáváním v intervalu 150 s, a to pro všechna použitá množství (kvanta) přidávaného chloridu vápenatého. Vliv Pi a t-BHP na hodnoty CRC bude probrán v následující kapitole.

Posouzení kinetiky otevírání MPTP po opakované aplikaci Ca^{2+} iontů

Při detailnějším pohledu je z našich dat patrné, že po jednotlivých přídavech malého množství kalciových iontů dojde k akumulaci kalcia do mitochondrií a MPTP zůstává v první fázi (po prvních přídavech) uzavřený. V druhé fázi dochází k postupnému otevírání póru a přídavkem kalcia, jímž se překoná retenční kapacita mitochondrií, dojde k náhlému otevření MPTP a k uvolnění kalciových iontů do cytosolu. Z našich záznamů je tak vidět, že existují různé mezistavy otevření póru. Proces uvolňování Ca^{2+} iontů z mitochondrií není konstantní a MPTP se tedy musí otevírat s různou intenzitou. V našich grafických záznamech jsou patrné dvě různé rychlosti otevírání póru (pomalý a rychlý průchod Ca^{2+} iontů pórem). Naše data tak poskytují nové informace o procesech pohybu Ca^{2+} iontů mezi cytosolem a matrix mitochondrií. Po každém přídavku Ca^{2+} iontů do média můžeme pozorovat, že se kalcium hromadí v mitochondriích a zároveň se MPTP pomalu otevírá, neboť byl zaznamenán pomalý únik Ca^{2+} iontů z mitochondrií. Dosažením koncentrace kalcia potřebné pro úplné otevření póru se MPTP zcela otevře a nahromaděné Ca^{2+} ionty se uvolní z matrix mitochondrií, jak bylo popsáno výše.

V přítomnosti CsA, po jednotlivých přídavech malého množství kalciových iontů, nebyl pozorován pomalý únik Ca^{2+} iontů z mitochondrií. Docházelo k akumulaci kalcia do mitochondrií a MPTP zůstával zcela uzavřený. Teprve přídavkem kalcia, jímž byla překonána retenční kapacita mitochondrií, došlo k náhlému otevření MPTP a k uvolnění kalciových iontů. Dospěli jsme tak k závěru, že v nepřítomnosti CsA se MPTP pomalu otevírá po každém přidání Ca^{2+} iontů, a že tuto rychlost otevírání lze upravit různými faktory, jako je složení média a použitý experimentální protokol.

Posouzení kinetiky otevírání MPTP po jednorázové aplikaci Ca^{2+} iontů

V předkládané práci se nám podařilo prokázat, že nejenom množství přidávaného kalcia má vliv na kinetiku otevírání MPTP, ale i čas, po který Ca^{2+} ionty na pór působí (Drahota et al., 2020). Izolované jaterní mitochondrie jsme vystavili na dobu 30 minut působení jedné dávky kalcia v množství 5 až 200 nmol CaCl_2 (do 1 ml media) a hodnotili rychlost akumulace Ca^{2+} iontů do mitochondrií a jejich následné uvolnění zpět do média. Naše data ukazují, že i velmi nízké koncentrace akumulovaného kalcia, považované za neúčinné během počátečního otevírání MPTP, mohou být účinné, pokud působí na pór dostatečně dlouho. Doba potřebná k otevření MPTP po akumulaci kalcia v mitochondriích se zkracovala s rostoucím množstvím kalcia v jednorázovém přídávku.

Z grafických záznamů je rovněž patrné, že existují dvě různé rychlosti otevírání póru (pomalý a rychlý průchod Ca^{2+} iontů pórem), a to pro všechny naše použité přídávky CaCl_2 . Navíc je zřejmé, že i když je přidáno vyšší množství Ca^{2+} iontů, tak trvá nějakou dobu, než akumulované kalcium aktivuje plné otevření póru. Můžeme tedy dojít k závěru, že je zapotřebí časové období závislé na dávce, než akumulace Ca^{2+} iontů v matrix aktivuje úplné otevření MPTP. Naše data tak svědčí pro to, že otevření póru probíhá v několika fázích, které jsou závislé na množství Ca^{2+} iontů v matrix mitochondrií a na době jejich působení.

Na závěr můžeme shrnout, že mechanismy funkce a regulace MPTP lze snadněji studovat metodou bobtnání mitochondrií. Kinetiku otevírání MPTP a transport Ca^{2+} iontů je pak lépe hodnotit pomocí metody měření retenční kapacity pro kalcium. Metoda CRC je založena na jiných principech než metoda měření bobtnání mitochondrií. Potvrdila však většinu poznatků již dříve získaných pomocí bobtnání, např. aktivaci MPTP fosfátovými ionty nebo t-BHP (viz dále) a poskytla i další nové informace o regulaci a kinetice otevírání MPTP, které nelze získat pomocí hodnocení procesu bobtnání, např. stanovovat množství intramitochondriálního kalcia nezbytného k otevření MPTP.

Všechna výše popisovaná data ale ukazují, že metoda stanovení hodnoty CRC musí být standardizována pro získání reprodukovatelných a obecně srovnatelných údajů z různých laboratoří. Tato standardizace je nutná, protože hodnoty CRC se nemění jen složením inkubačního média, ale také použitým experimentálním protokolem.

Podrobněji viz příloha č. 2, 3 a 4

4. 2. Vliv různých faktorů a jejich kombinací na MPTP

Vzhledem k tomu, že bobtnání mitochondrií může být vyvoláno celou řadou látek, které mění propustnost mitochondriální membrány, bylo stanoveno základní kritérium, že bobtnání mitochondrií způsobené otevřením MPTP lze aktivovat kalcium a inhibovat cyklosporinem A, a bylo definováno, že MPTP je Ca^{2+} dependentní a cyklosporin A senzitivní pór.

4. 2. 1. Vliv Ca^{2+} iontů a cyklosporinu A na funkci MPTP

Zvláště významnou úlohu v indukcii procesu otevření póru mají kalciové ionty. MCU je hlavní transportní kanál, který zprostředkovává vstup Ca^{2+} iontů do matrix mitochondrií a je závislý na elektrochemickém gradientu (Drahota and Lehninger, 1965, Reynafarje and Lehninger, 1977). Aktivita tohoto transportního kanálu je regulována přímo koncentrací Ca^{2+} iontů v cytosolu (Kasparinsky and Vinogradov, 1996, Kroner, 1986, Saris and Kroner, 1990). Vysoká koncentrace Ca^{2+} iontů v buňkách a jejich akumulace v mitochondriích je primárním aktivátorem otevření MPTP, který je naopak zodpovědný za uvolnění Ca^{2+} iontů z mitochondrií. Citlivost MPTP vůči samotnému kalcium dále potencuje zvýšený oxidační stres a vysoké koncentrace fosfátů (Drahota et al., 2012a, Endlicher et al., 2019). Koncentrace kalcia nutná pro otevření MPTP je nicméně značně závislá i na dalších faktorech (Bernardi, 1999, Gunter and Pfeiffer, 1990).

Pokud dojde ke změně v některém z regulačních faktorů MPTP, může být otevření póru stimulováno i fyziologickými koncentracemi Ca^{2+} iontů. Kalciové ionty byly jedním z prvních regulačních faktorů MPTP, nicméně mechanismus aktivace otevření MPTP je dodnes nejasný. Jedním z předpokladů je, že se Ca^{2+} ionty vážou na kardiolipin, jenž blízce souvisí se strukturou póru (hlavně s ANT) a má pravděpodobně regulační funkci v modulaci citlivosti MPTP vůči Ca^{2+} iontům (Pestana et al., 2009). Nověji se předpokládá, že Ca^{2+} ionty se vážou na c podjednotku ATP syntázy, o níž se rovněž uvažuje jako o možné strukturální složce MPTP (Azarashvili et al., 2014). Účinky kalciových iontů, které by mohly vést k otevření MPTP jsou diskutovány v přehledové práci Hursta a spolupracovníků (2017), a v práci Tajeddine (2016). Z jejich závěrů vyplývá, že kalcium indukovaný MPTP je spíše výsledkem stimulace Krebsova cyklu a respiračního řetězce, jenž vede ke zvýšené produkci mtROS.

Důležitým pokrokem bylo zjištění, že indukcii otevření póru Ca^{2+} ionty lze částečně inhibovat aplikací CsA (Crompton et al., 1988, Fournier et al., 1987). Použitím CsA lze zamezit vazbě Cyp-D na komponenty IMM, čímž lze podstatně snížit schopnost

Ca^{2+} iontů aktivovat otevření póru (Halestrap and Davidson, 1990, Nicolli et al., 1996). CsA blokuje otevírání MPTP, ale neinhibuje proces akumulace kalcia v mitochondriích (Broekemeier et al., 1989, Endlicher et al., 2019, Fournier et al., 1987). Inhibiční efekt CsA spočívá ve snížení citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům. CsA je pouze částečným inhibitorem MPTP a jeho inhibiční schopnost lze překonat zvýšenou koncentrací Ca^{2+} iontů (Broekemeier and Pfeiffer, 1989, Davidson and Halestrap, 1990, Novgorodov et al., 1992). Rovněž účinky CsA na inhibici MPTP nejsou vždy stejné. Existují tkáňové (Bambrick et al., 2006) a věkové (Liu et al., 2011, Mather and Rottenberg, 2000) rozdíly v inhibičním účinku CsA na MPTP. Farmakologická inhibice MPTP pomocí CsA se rovněž využívá při terapii různých patologických stavů, jež souvisí s aktivací MPTP, jako je např. infarkt myokardu (Halestrap and Richardson, 2015, Ong et al., 2015) a neurodegenerativní choroby (Keep et al., 2001, Kumar and Kumar, 2009), případně je testován jako potenciální budoucí léčebný postup. Regulace otevření MPTP by tak mohla pomoci při léčbě těchto onemocnění.

Citlivost MPTP vůči jednotlivým faktorům byla opakovaně testována, proto jsme se v našich původních pracích zaměřili hlavně na hodnocení vzájemného ovlivnění vybraných modulujících látek. Cílem naší práce bylo posoudit interakce mezi Ca^{2+} ionty, Pi, t-BHP a T_3 v účinku na aktivaci MPTP v podmínkách *in vitro*. Pro pokusy jsme používali izolované potkaní jaterní mitochondrie a pro hodnocení citlivosti MPTP vůči těmto kombinacím jsme použili obě optimalizované metody. V prvních experimentech jsme pomocí metody *swellingu* mitochondrií potvrdili dřívější nálezy dokazující, že Ca^{2+} ionty jsou silným induktorem otevírání membránového póru a anorganický fosfát působení Ca^{2+} iontů dále zesiluje. V našich pokusech jsme nejprve vystavili mitochondrie vlivu samotných Ca^{2+} iontů (v koncentracích 5-200 μM) (bez přítomnosti Pi). Z našich výsledků je patrné, že samotné Ca^{2+} ionty (o koncentracích 5-12,5 μM) mají na bobtnání mitochondrií jen minimální vliv. Teprve až vyšší koncentrace Ca^{2+} iontů (100-200 μM) indukují bobtnání mitochondrií, jež je závislé na dávce CaCl_2 . Tato měření jsme doplnili srovnáním aktivace bobtnání přídatkem Pi o výsledné koncentraci 0,1 mM nebo 1,0 mM. *Swelling* mitochondrií byl opět aktivován 5-200 μM Ca^{2+} ionty. Naše data ukazují, že za přítomnosti 0,1 mM Pi se zvyšuje jak rychlost bobtnání, tak se zkracuje i doba, kdy po přidání kalciových iontů dosahuje rychlost bobtnání maximálních hodnot. Vyšší koncentrace Pi (1,0 mM) účinky Ca^{2+} iontů ještě více zesílila. Z našich měření je zřejmé, že Pi značně potencuje bobtnání mitochondrií indukované Ca^{2+} ionty. Derivace naměřených hodnot bobtnání nám pak umožnily aktivační efekt Pi kvantifikovat.

4. 2. 2. *Vliv anorganického fosfátu na funkci MPTP*

V literatuře je opakovaně diskutován vliv anorganického fosfátu na modulaci MPT. Role Pi v indukci MPT je pravděpodobně spojená se zvýšením citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům. Je prokázáno, že vysoké koncentrace Pi za přítomnosti Ca^{2+} iontů otevírání póru aktivují, nicméně mechanismus účinků Pi na tuto senzibilizaci zatím nebyl zcela objasněn. Dále se předpokládá, že v důsledku zvýšené koncentrace Pi v matrix mitochondrií dochází k nárůstu produkce ROS, lipoperoxidaci mitochondriálních membrán a otevření MPTP (Kowaltowski et al., 1996a, Kowaltowski et al., 1996b). Nověji bylo navrženo, že PiC je součástí MPTP a Pi působí právě na tuto strukturální složku póru a ovlivňuje její interakci s Cyp-D. Je pravděpodobné, že vysoké koncentrace Pi zvyšuje schopnost vazby Cyp-D na komponenty tvořící MPTP (ANT, PiC) a tím mění jejich konformaci (Leung et al., 2008). Pi v nízkých koncentracích byl některými autory považován za nezbytný pro inhibici MPTP cyklosporinem A nebo při genetické ablaci Cyp-D (Basso et al., 2008). Nepostradatelná role Pi v mechanismu inhibičního účinku CsA na MPTP však byla později vyvrácena (Varanyuwatana and Halestrap, 2012).

Z našich výsledků je patrné, že rychlost bobtnání mitochondrií je přímo úměrná koncentraci Pi v inkubačním médiu. S rostoucí koncentrací Pi (v našem uspořádání to byly koncentrace 0,05 až 1 mM) se rychlost a rozsah bobtnání zvyšuje. Toto bobtnání ale souvisí s přítomností stopového množství Ca^{2+} iontů v médiu. Pro další pokusy jsme proto vybrali dvě koncentrace Pi (0,1 a 1,0 mM) a otevření MPTP indukovali CaCl_2 o koncentraci 5-200 μM . Z derivovaných dat vyplývá, že jak v přítomnosti 0,1 mM, tak i 1,0 mM Pi, dosahuje kalcium maximálního aktivačního efektu ($dA_{520}/10 \text{ s}$) při hodnotách 100 μM CaCl_2 . Další zvyšování koncentrace Ca^{2+} iontů již rychlost bobtnání neovlivnilo. Při použití 1,0 mM Pi vykazují Ca^{2+} ionty podstatně vyšší aktivační efekt (maximální rychlost bobtnání), než při použití 0,1 mM Pi. Dalším poznatkem bylo, že obě použité koncentrace Pi v přítomnosti Ca^{2+} iontů indukují přibližně shodný rozsah bobtnání izolovaných mitochondrií. Můžeme tedy naše poznatky uzavřít tím, že koncentrace Pi ovlivňují především rychlost bobtnání mitochondrií v přítomnosti Ca^{2+} iontů. Aktivační účinek při použití rozdílné koncentrace Pi (0,1 nebo 1 mM) je odlišný. Ovlivní parametry rychlosti a času maximálního bobtnání, ale není významný pro rozsah bobtnání. Dále jsme prokázali, že samotný vliv 1 mM Pi (bez stopového množství Ca^{2+} iontů) na bobtnání mitochondrií je prakticky nulový a samotný Pi bez Ca^{2+} iontů není schopen navodit MPT. Většina dat zmíněných v kapitolách 4. 2. 1. a 4. 2. 2. byla rovněž prezentována v disertační práci autora (Endlicher, 2010).

Druhá metoda naše poznatky jen potvrdila. Ze získaných dat je zřejmé, že hodnoty CRC se snižovaly s rostoucí koncentrací Pi v inkubačním médiu. Z měření retenční kapacity pro kalcium za našich experimentálních podmínek byla získána další data o otevření MPTP. Vypočítali jsme množství kalcia, které se musí akumulovat v mitochondriích pro indukci otevření MPTP. Hodnoty CRC bez přidání fosfátu byly 24,1 nmol Ca²⁺ / mg proteinu. CsA zvýšil tuto hodnotu CRC na 40,6 nmol Ca²⁺ / mg proteinu. 0,1 mM fosfát bez CsA snížil tuto hodnotu na 19,4 nmol Ca²⁺ / mg proteinu a 1,0 mM fosfát bez CsA dokonce na hodnotu 8,9 nmol Ca²⁺ / mg proteinu.

4. 2. 3. Vnímavost MPTP vůči akutnímu působení terciárního butylhydroperoxidu, anorganického fosfátu a jejich vzájemných kombinací

ROS, stejně jako Ca²⁺ ionty, byly jedny z prvních prokázaných regulačních faktorů MPTP. Zatímco přesný mechanismus působení Ca²⁺ iontů vedoucí k otevření MPTP není znám, tak kalcie indukovaná produkce ROS a jejich účinky na MPTP jsou dobře zdokumentovány. Oxidační stres významně aktivuje kalcie indukované bobtnání mitochondrií (Kowaltowski et al., 2001, Kowaltowski and Vercesi, 1999), zvláště pak ještě v kombinaci s Pi (Kowaltowski et al., 1996a, Kowaltowski et al., 1996b). Někteří autoři dokonce prosazují, že oxidační stres je hlavním induktorem zvýšené permeabilizace mitochondriálních membrán (Gorlach et al., 2015, Tajeddine, 2016).

Samotné kalciové ionty indukují otevření MPTP, ale zároveň nadměrná akumulace Ca²⁺ iontů v matrix mitochondrií může vést ke zvýšené produkci mtROS, které zvyšují citlivost póru k Ca²⁺ iontů. Existuje několik cest, kterými Ca²⁺ ionty, prostřednictvím mtROS stimulují otevření MPTP. Většina z nich souvisí s aktivací nebo inhibicí respiračního řetězce, což vede ke zvýšenému nebo sníženému toku elektronů a jejich úniku z komplexů elektron transportního řetězce. Únik elektronů, zejména z komplexu I a komplexu III má za následek produkci superoxidu a dalších mtROS (Gunter et al., 2004, Hurst et al., 2017, Nicholls and Ferguson, 2013, Tajeddine, 2016).

Vysoké koncentrace mtROS v matrix mitochondrií způsobují vyčerpání mitochondriálního antioxidačního systému, následně oxidaci thiolových skupin proteinů respiračního řetězce a dalších membránových proteinů. Oxidace je doprovázena tvorbou disulfidických můstků a agregací proteinů (Le Quoc et al., 1976, Le Quoc et al., 1977). Pro indukci otevření MPTP je pravděpodobně nejdůležitější již dříve diskutovaná oxidace thiolových skupin ANT a zároveň zvýšení vazby CyP-D na ANT, která vede ke změně

jeho konformace a specifity k ADP/ATP (McStay et al., 2002, Ryba, 2015). Vazbu CyP-D na ANT lze rovněž inhibovat přidavkem CsA (Connern and Halestrap, 1994).

t-BHP je modelová látka sloužící k navození oxidačního stresu v buňkách a v mitochondriích. Její účinek je dán mimo jiné peroxidačním poškozením proteinů mitochondriální membrány. V naší práci jsme aktivovali MPTP přidavkem kalcia o různé koncentraci po předchozí preinkubaci izolovaných mitochondrií s t-BHP. Zjistili jsme, že aktivační účinek t-BHP lze detekovat pouze při nízkých koncentracích kalcia. Po přidání 5 μM CaCl_2 za přítomnosti 0,75 mM t-BHP se rychlost bobtnání zvýšila 5krát. Když se však bobtnání vyvolané Ca^{2+} ionty blížilo své maximální hodnotě (150 μM CaCl_2), nebylo možné detekovat žádný další aktivační účinek t-BHP. Tato data ukazují, že peroxidační aktivace bobtnání má důležitou roli, zejména při zrychlení nízkých rychlostí bobtnání tím, že zvyšuje citlivost MPTP vůči Ca^{2+} iontům.

Stanovením hodnot CRC izolovaných jaterních mitochondrií po předchozí preinkubaci s Pi a/nebo t-BHP jsme potvrdili a rozšířili dřívější pozorování popisující aktivaci bobtnání indukovaného kalcie. Pomocí měření CRC jsme prokázali, že jak Pi, tak t-BHP snižují množství akumulovaného kalcia, které je nezbytné pro úplné otevření MPTP na 35 % kontrolních hodnot a pouze na 15 %, v případě společné interakce Pi a t-BHP.

Při vyšším rozlišení je z našich záznamů zřejmé, že za přítomnosti CsA zůstává MPTP po každém přidání CaCl_2 uzavřený (hodnoty fluorescence se vrací na základní úroveň). V nepřítomnosti CsA se bazální fluorescence po každém přidání Ca^{2+} kontinuálně zvyšovala (MPTP se pomalu otevíral). Toto zvýšení bylo potencováno jak účinkem Pi, tak t-BHP až do okamžiku, kdy byla dosažena koncentrace intramitochondriálního kalcia potřebná pro úplné otevření MPTP. Tyto údaje naznačují, jak již bylo diskutováno, že otevření MPTP probíhá ve dvou fázích. V první fázi za nepřítomnosti CsA se hromadí malé množství Ca^{2+} iontů v matrix mitochondrií a MPTP se pomalu otevírá. Úplné otevření MPTP však vyžaduje akumulaci kritického množství intramitochondriálního kalcia a toto kritické množství je značně závislé na koncentracích Pi a t-BHP v inkubačním médiu.

Podrobněji viz příloha č. 1, 2, 3, 4 a 5

4. 3. Vnímavost MPTP vůči působení trijodtyroninu v podmínkách *in vitro* a *in vivo*

Hormony štítné žlázy svými účinky zasahují jak do biogeneze buňky, tak i do energetického metabolismu mitochondrií. Vzhledem k širokému spektru a složitému mechanismu jejich účinků, je časový rozsah jejich působení v řádu minut až dnů. Hormony štítné žlázy zvyšují syntézu komponent respiračního řetězce kódovaných jak v jádře, tak i v mitochondriích. Indukují děje, které vedou ke změnám ve složení lipidů mitochondriálních membrán, zvyšují aktivitu adenin nukleotidových translokáz, stimulují buněčnou respiraci, produkci ATP a uvolňování Ca^{2+} iontů z mitochondrií (Castilho et al., 1998, Goglia et al., 1999, Mracek et al., 2005, Schwartz and Oppenheimer, 1978, Weitzel et al., 2003). Rovněž bylo prokázáno, že hormony štítné žlázy indukují děje vedoucí ke zvýšené regeneraci jater po parciální hepatektomii (Cervinkova et al., 1998, Drahota et al., 1999).

Již velmi staré práce poukazují na to, že hormony štítné žlázy indukují bobtnání mitochondrií (Lehninger, 1960a, Lehninger, 1960b, Tapley, 1956). V té době však nebyla ještě prokázána existence MPTP v mitochondriální membráně a efekt hormonů byl přisuzován změnám v uspořádání mitochondriální membrány. Teprve v nedávné době byl vliv hormonů štítné žlázy studován v souvislosti s funkcí MPTP jako kalcium indukované a cyklosporinem A inhibované bobtnání mitochondrií. Nicméně mechanismus jejich účinků je stále nejasný. Asi nejvíce prostudovaný je vliv hormonů štítné žlázy na indukci MPTP v důsledku zvýšené stimulace tvorby ROS (Castilho et al., 1998, Venditti et al., 2003a, Venditti et al., 2003b, Venditti and Di Meo, 2006).

Zrychlený bazální metabolismus indukovaný hormony štítné žlázy je často spojen s nárůstem produkce ROS a oxidačním poškozením tkání (Videla, 2000). Oxidační stres, jak již bylo diskutováno, mimo jiné indukuje oxidaci thiolových skupin membránových proteinů, u kterých se předpokládá že jsou součástí póru (např. ANT), a vede k aktivaci MPT. Vzhledem k tomu, že strukturální podstata póru je stále neznámá, lze jen velmi obtížně lokalizovat cíl působení hormonů štítné žlázy. Rovněž původní metoda bobtnání mitochondrií neumožňovala dostatečně přesně analyzovat interakce mezi faktory podílejícími se na regulaci otevírání póru. Proto jsme se rozhodli v našich experimentech využít optimalizovanou metodu a posoudit vzájemné interakce T_3 a Pi v účinku na kalcium indukované bobtnání mitochondrií. Vliv T_3 na rychlost bobtnání izolovaných jaterních mitochondrií jsme hodnotili jak v podmínkách *in vitro*, tak po aplikaci T_3 potkanům *in vivo*. Kapitola 4. 3. byla rovněž diskutována v disertační práci autora (Endlicher, 2010).

4. 3. 1. Účinek *in vitro* aplikace trijodtyroninu na kalcium indukované bobtnání jaterních mitochondrií

Vliv ROS na permeabilizaci mitochondriálních membrán, po aplikaci T_3 v podmínkách *in vivo*, byl předmětem celé řady studií. Nicméně účinek T_3 na indukci MPT v podmínkách *in vitro* není detailně prozkoumán. Proto jsme se v naší původní práci zaměřili hlavně na hodnocení přímého vlivu T_3 na MPTP v podmínkách *in vitro*. Pomocí naší optimalizované metody hodnocení mitochondriálního bobtnání (Drahota et al., 2012a) jsme nejprve sledovali účinek T_3 v kombinaci s Ca^{2+} ionty a/nebo P_i na otevření MPTP. Prokázali jsme jednoznačnou závislost mitochondriálního bobtnání indukovaného $50 \mu M Ca^{2+}$, v nepřítomnosti P_i na koncentraci T_3 v inkubačním médiu. Již $1,25 \mu M T_3$ vedl ke dvojnásobnému zvýšení rychlosti mitochondriálního bobtnání oproti kontrolám (aktivace pouze pomocí $50 \mu M Ca^{2+}$, bez P_i a T_3). Nejvyšší efekt T_3 na aktivaci MPTP jsme zaznamenali při koncentračním rozmezí $15-25 \mu M T_3$. Jak je patrné, již z klasických záznamů, rostoucí koncentrace T_3 v reakční směsi zvyšuje míru bobtnání izolovaných mitochondrií. Koncentrace T_3 v rozmezí $1,25-25 \mu M$ ovlivňuje jak dobu nástupu bobtnání, tak i maximální rychlost. V průběhu bobtnání však celkový rozsah (*extent*) tohoto jevu dosáhne za 10 minut přibližně stejných hodnot. Podrobněji a daleko přesněji se nám podařilo tyto parametry analyzovat použitím derivací klasických křivek bobtnání mitochondrií (viz příložená práce a (Endlicher, 2010)).

Jak jsme již zmiňovali, bobtnání mitochondrií je závislé nejen na koncentraci Ca^{2+} iontů a T_3 , ale závisí též na přítomnosti P_i v reakční směsi. Prokázali jsme, že P_i výrazně potencuje účinky T_3 a Ca^{2+} iontů. Z našich měření je zřejmé, že samotné Ca^{2+} ionty ($50 \mu M Ca^{2+}$) zvyšují rychlost bobtnání jaterních mitochondrií přibližně čtyřikrát, samotný trijodthyronin ($25 \mu M T_3$) sedmkrát a samotný $0,1 mM P_i$ nemá prakticky žádný účinek na MPT. Jako kontrola bylo použito spontánní bobtnání bez jakýchkoliv přísad. Bobtnání mitochondrií vyvolané $50 \mu M CaCl_2$ je dále potencováno přítomností P_i přibližně pětkrát, zatímco T_3 vedl pouze ke dvojnásobné aktivaci. Avšak stimulační účinek T_3 na bobtnání mitochondrií, jež byly indukované kombinací Ca^{2+} iontů a P_i , byl navýšen o dvojnásobné množství oproti mitochondriím, kde byl MPTP aktivován pouze Ca^{2+} ionty a P_i . Měření jsme doplnili o přísadu CsA, jež plně inhiboval aktivační efekt $25 \mu M T_3$. Naše výsledky tak poukazují, že T_3 je zapojen do regulace otevírání MPTP a potvrzují přímý účinek T_3 na indukci MPT.

Jako další důkaz bezprostředního působení T_3 na aktivaci MPTP jsme sledovali jeho účinek na MMP po působení Ca^{2+} iontů. Změny MMP izolovaných jaterních

mitochondrií jsme hodnotili pomocí fluorescenční sondy safraninu O. Z našich dat vyplývá, že T_3 vykazuje rovněž přímý vliv na MMP. Pokles MMP vyvolaný 50 μM CaCl_2 byl dále potencován aplikací 25 μM T_3 podobným způsobem jako v našich experimentech s indukovaným bobtnáním. Z našich záznamů je dále patrné, že 25 μM T_3 rovněž způsobil pokles MMP i v nepřítomnosti kalciových iontů. Tento pokles MMP byl přibližně shodný s poklesem indukovaným 50 μM CaCl_2 .

V našich experimentech jsme se pokusili získat další data, která by mohla pomoci lépe charakterizovat roli T_3 při aktivaci otevření MPTP. Dřívější údaje v literatuře podporují tvrzení, že aktivační účinek T_3 je nepřímý kvůli zvýšení citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům prostřednictvím mechanismu generování ROS (Castilho et al., 1998). Z našich poznatků můžeme shrnout, že samotný T_3 je schopen indukovat mitochondriální bobtnání a rychlost tohoto procesu je dále zvýšena přítomností Ca^{2+} iontů a/nebo Pi. T_3 zvyšuje maximální rychlost bobtnání, ale maximální rozsah bobtnání dosahuje během námi použité inkubační doby přibližně stejných hodnot. To naznačuje, že schopnost membrány bobtnat se přítomností T_3 nemění. Naše data tedy ukazují, že T_3 hraje důležitou roli při otevírání MPTP a potencuje účinky dvou klíčových induktorů bobtnání, kalciových iontů a anorganického fosfátu.

4. 3. 2. Vliv anorganického fosfátu a Ca^{2+} iontů na průběh MPT po aplikaci trijodtyroninu potkanům in vivo

Aktivační účinek T_3 na MPTP byl opakovaně pozorován po jeho *in vivo* aplikaci (Venditti et al., 2003b). Pomocí naší optimalizované metody jsme potvrdili předchozí poznatky (Kalderon et al., 1995, Yehuda-Shnaidman et al., 2010), že aktivaci kalcium indukovaného bobtnání trijodtyroninem lze detekovat v izolovaných mitochondriích po předešlé aplikaci T_3 potkanům *in vivo*. Potkanům byl aplikován 1x nebo 3x T_3 v dávce 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti. Izolace jaterních mitochondrií byla provedena 24 hodin po poslední dávce. Po jedné dávce T_3 dosáhla maximální rychlost bobtnání 169 % kontrolních hodnot a po třech aplikacích 198 %. Čas, při kterém došlo k maximálnímu bobtnání, se rovněž zkrátil, a to o 30 %, respektive o 75 %. Maximální rozsah bobtnání se zvýšil po jedné dávce T_3 (143 %); po třech dávkách T_3 jsme nezaznamenali žádné další významné navýšení rozsahu bobtnání.

Podrobněji viz příloha č. 5

4. 4. Pohlavní a tkáňová specifita citlivosti MPTP vůči Ca^{2+} iontům

Citlivost póru ke kalciovým iontům je ovlivněna celou řadou faktorů, z nichž jedním z nejdůležitějších jsou již zmiňované kyslíkové radikály (Kim et al., 2006, Panov et al., 2007, Tajeddine, 2016). Výsledkem mitochondriálního oxidačního stresu jsou změny v mitochondriálních funkcích. Bylo prokázáno, že v různých tkáních existuje fyziologická rozmanitost mitochondriálních procesů a odlišná schopnost odolávat oxidačnímu stresu (Benard et al., 2006). Vlastnosti mitochondriální membrány a citlivost MPTP ke kalciovým iontům se liší v závislosti nejen na typu orgánu (Drahota et al., 2012b, Endlicher et al., 2009a, Panov et al., 2007), ale i druhu organismu (Ricchelli et al., 2005), pohlaví (Milerova et al., 2016) a věku (Drahota et al., 2012b, Endlicher et al., 2021). Navíc existují rozdíly v citlivosti MPTP specifické pro vývoj a stárnutí organismu (viz. kapitola 4. 5.) a také pro různá stadia onemocnění (např. ischemicko/reperfuzní poškození srdce) (Milerova et al., 2010, Ong et al., 2015). Existují také náznaky, že proces bobtnání se může lišit mezi heterogenními mitochondriálními populacemi (Hofer et al., 2009). Saunders a spolupracovníci (2013) prokázali, že mitochondriální subpopulace s různým obsahem kardiolipinu reagovaly rozdílně na indukované změny MMP a na kalcium indukované bobtnání. Pozornost je také věnována charakterizaci mnoha faktorů, které moduluji funkci MPTP v různých orgánech, včetně výše zmiňovaných hormonů štítné žlázy (Castilho et al., 1998, Kalderon et al., 1995, Venditti et al., 2003b, Yehuda-Shnaidman et al., 2010).

4. 4. 1. Specifita MPTP vázaná na pohlaví

Většina experimentálních studií odhalila, že samičí srdce je tolerantnější k ischemicko/reperfuznímu poškození ve srovnání se samčím (Johnson et al., 2006, Murphy and Steenbergen, 2007, Ostadal et al., 2019, Ostadal et al., 2009a). Mitochondriální dysfunkce a zejména otevření MPTP hraje významnou roli v tomto procesu a ovlivňuje rozsah poškození srdce (Halestrap and Richardson, 2015, Ong et al., 2015, Ryba, 2015). Práce Milerové a spolupracovníků (2016) analyzuje, zda i kalcium indukované bobtnání srdečních mitochondrií je závislé na pohlaví. V této práci autoři testovali dvě koncentrace přidaného CaCl_2 (50 a 200 μM) k izolovaným srdečním mitochondriím potkanů obou pohlaví. Ze získaných dat je patrné, že srdeční mitochondrie izolované z pohlavně odlišných jedinců mají různou citlivost na kalciovou zátěž. Mitochondrie (MPTP) izolované ze srdce samic potkanů vykazují vyšší odolnost k Ca^{2+} iontům než mitochondrie izolované ze srdce samců. Při použití vysoké

koncentrace kalcia (200 μM) byl jak rozsah, tak rychlost bobtnání srdečních mitochondrií samců přibližně o 60 % vyšší než u samic. Při použití nízké koncentrace kalcia (50 μM) však nebyly pozorovány žádné rozdíly v citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům závislé na pohlaví. Jednou z možností, jež by vysvětlovala tento rozdíl v citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům, by mohla být změna v transportu kalcia do mitochondrií samičího srdce v období vysoké cytosolové zátěže těchto iontů (Arieli et al., 2004). Tato změna v transportu kalcia vede následně k nižší intramitochondriální hladině Ca^{2+} iontů a umožňuje tak mitochondriím se úspěšněji vyrovnávat s vysokými koncentracemi Ca^{2+} iontů. Podrobněji viz publikace (Milerova et al., 2016).

Práce Ošťádal a spolupracovníku (2019) přehledně shrnuje nejenom pohlavní, ale i ontogenetické rozdíly v toleranci srdeční tkáně vůči ischemicko/reperfuznímu poškození. Autoři ve svých původních pracích pozorovali odlišnou citlivost MPTP ke kalciovým iontům jak u mitochondrií izolovaných z novorozeneckého a dospělého myokardu, tak i z mitochondrií izolovaných ze srdce mužů a žen. Novorozenecké a ženské mitochondrie vykazují vyšší odolnost jak v rozsahu, tak v rychlosti kalcium indukovaného bobtnání mitochondrií, než bylo pozorováno u mitochondrií izolovaných ze srdce mužů a dospělých jedinců (Ostadal et al., 2019). Jejich závěry přidávají další důkazy o rozdílné citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům vázané na pohlaví a ontogenetický vývoj jedince. Další výsledky podporující nejen ontogenetické změny v citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům a účinkům ROS budou probrány v kapitole 4. 5.

4. 4. 2. Tkáňová specifita MPTP

Panov a spolupracovníci ve své práci poukazují na specifické rozdíly v toleranci kalcium indukovaného bobtnání mezi mitochondriemi izolovanými z jater a mozku. Prokázali, že mitochondrie izolované z mozku vykazují menší citlivost MPTP vůči Ca^{2+} iontům než mitochondrie jaterní. Autoři spekulují o tom, že existuje druhová a tkáňová specifita tohoto jevu, a že různé orgány v důsledku dlouhodobého vývoje se přizpůsobily v jaké míře reagovat na Ca^{2+} ionty. Různá citlivost zřejmě souvisí s tím, jak dalece je kalciový inzult nebezpečný pro funkční aktivitu daného orgánu a jak intenzivně probíhá v daném orgánu buněčná regenerace. Navrhují, že jaterní tkáň s vysokou regenerační schopností je zřejmě méně chráněna proti otevření MPTP a zahájení apoptotických a nekrotických procesů než mozek (Panov et al., 2007).

Snažili jsme se tyto nálezy rozšířit a doplnit srovnáním citlivosti MPTP mitochondrií jater a srdečního svalu vůči Ca^{2+} iontům. Naše prezentovaná data ukazují, že jaterní mitochondrie reagují na stejnou koncentraci CaCl_2 mnohem intenzivnějším bobtnáním než mitochondrie srdeční. Pokles optické denzity (*extent* - $\text{dA}_{520}/4 \text{ min}$) po aplikaci CaCl_2 byl u jaterních mitochondrií při použití nízké přidávané koncentrace ($25 \mu\text{M CaCl}_2$) sedminásobný a při aplikaci vyšší koncentrace ($100 \mu\text{M CaCl}_2$) trojnásobný oproti srdečním mitochondriím. Jak je dále patrné z našich dat, rozsah bobtnání je závislý na koncentraci přidávaného CaCl_2 . Signifikantní vzestup bobtnání lze u jaterních mitochondrií pozorovat již při $2,5 \mu\text{M}$ koncentraci CaCl_2 a maximální hodnoty rozsahu bobtnání jsou dosahovány v rozmezí $10\text{-}30 \mu\text{M}$ koncentrací CaCl_2 . Další zvyšování koncentrace CaCl_2 již nemělo na rozsah bobtnání vliv. U srdečních mitochondrií stoupá rozsah bobtnání velmi pomalu až do nejvyšší námi studované $100 \mu\text{M}$ koncentrace CaCl_2 . Můžeme tedy dojít k závěru, že zejména při nízké přidávané koncentraci CaCl_2 jsou srdeční mitochondrie odolnější vůči (postupně) rostoucí koncentraci Ca^{2+} iontů než jaterní mitochondrie. Vyšší schopnost srdečních mitochondrií odolávat kalciové zátěži má zcela logické opodstatnění, neboť srdeční mitochondrie jsou opakovaně celý život exponovány Ca^{2+} iontům.

Naše výsledky jsou v souladu s nálezy Panova a spolupracovníků (2007) a ukazují, že nejen mozkové, ale i srdeční mitochondrie, mají ve srovnání s jaterními mitochondriemi menší citlivost vůči Ca^{2+} iontům a tím i lepší protekci vůči kalcium indukovanému otevření MPTP a následné iniciaci apoptotických procesů. Tyto nálezy umocňují představu, že různé buněčné populace mají specifické strategie, jak čelit následkům peroxidačního poškození, mezi něž patří i otevření MPTP. Hepatocyty, jež mají mnohem vyšší regenerační schopnost než buňky mozku či srdečního svalu a jsou tak více schopné kompenzovat poškození vzniklé oxidačním stresem. Tuto představu však bude třeba ještě doplnit dalšími údaji o aktivitě antioxidantních enzymů případně i o rezistenci lipoproteinových struktur buňky vůči působení kyslíkových radikálů.

Kapitola 4. 4. 2. byla rovněž částečně diskutována v disertační práci autora (Endlicher, 2010). Další naše výsledky podporující tkáňově specifické, ontogenetické a věkem indukované změny v citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům a účinkům ROS budou probrány detailně v kapitole 4. 5.

Podrobněji viz příloha č. 6 a 7

4. 5. Věkem indukované změny citlivosti mitochondrií ke kalciovým iontům

Mitochondrie hrají důležitou roli v procesu stárnutí buněk a ROS jsou považovány za hlavní faktor, který se podílí na jejich poškození v průběhu stárnutí (Barja, 2014, Cedikova et al., 2016, Dai et al., 2014, Zorov et al., 2014). Změny homeostázy kalcia a zvýšená produkce ROS jsou spojené se stárnutím a vedou ke zvýšené frekvenci otevírání MPTP (Panel et al., 2018, Rottenberg and Hoek, 2017). Otevření póru vede mimo jiné k indukci apoptotických a nekrotických procesů (Desagher and Martinou, 2000, Rasola and Bernardi, 2011) a hraje tak podstatnou roli v patogenezi různých onemocnění (Endlicher et al., 2018), vývoji organismu, ale i v procesu jeho stárnutí (Drahota et al., 2012b, Endlicher et al., 2021).

4. 5. 1. Ontogenetické změny v citlivosti MPTP ke kalciovým iontům a účinkům ROS po ischemicko/reperfuzním poškození srdeční tkáně

Odolnost mladého srdce vůči nedostatku kyslíku je významně vyšší ve srovnání s dospělým myokardem, tolerance po narození ale rychle klesá (Ostadal et al., 1999, Ostadal et al., 2009b, Ostadalova et al., 1998). Mechanismy vyšší rezistence však dosud nebyly uspokojivě objasněny. Otevření MPTP a jeho následky se ale významně podílejí na molekulárních mechanismech spojených s ischemicko/reperfuzním poškozením srdce dospělého jedince (Bernardi et al., 2006, Di Lisa and Bernardi, 1998, Halestrap et al., 2004, Rasola and Bernardi, 2011). Podmínky spojené s postischemickou reperfuzí, jako je akumulace ROS, normalizace pH a zvýšení koncentrace intracelulárního kalcia, vytvářejí ideální situaci pro otevření MPTP (Griffiths and Halestrap, 1995, Halestrap, 1991, Ong et al., 2015). Bylo prokázáno, že kardiomyocyty starších jedinců vykazují nižší prahovou hodnotu MPTP k účinkům Ca^{2+} iontů a ROS. Rozsah MPT a produkce mtROS během první minuty reperfuze byly vyšší u starších jedinců, ve srovnání s mladými zvířaty. Rovněž hodnoty CRC mitochondrií izolovaných z mladších jedinců byly vyšší (Fernandez-Sanz et al., 2015).

Rozdíly v citlivosti MPTP k jeho regulačním faktorům jsou většinou sledovány u dospělých jedinců. Práce Milerové a spolupracovníků (2010) doplňuje tyto poznatky a popisuje významné ontogenetické rozdíly v roli MPTP při indukovaném ischemicko/reperfuzním poškození srdce. Data poukazují na různou citlivost ke kalciovým iontům srdečních mitochondrií izolovaných z novorozených (7denních) a dospělých (90denních) potkanů. Z výsledků práce je patrné, že mitochondrie neonatálních potkanů vykazují vyšší odolnost vůči kalciovým iontům než mitochondrie

izolované z dospělých jedinců. Nejen rozsah, ale také maximální rychlost kalcium indukovaného bobtnání mitochondrií je signifikantně vyšší u dospělých potkanů než u novorozenců. Publikovaná data tak podporují myšlenku, že novorozenecké srdeční mitochondrie jsou lépe chráněny před kalcium indukovaným otevřením MPTP, což může být součástí mechanismu vyšší tolerance novorozeneckého srdce k ischemicko/reperfuznímu poškození srdeční tkáně (Milerova et al., 2010, Ostadal et al., 2009b). Rovněž bylo prokázáno, že nejenom novorozenecké, ale i samičí mitochondrie jsou výrazně odolnější k ischemicko/reperfuzním poškození srdeční tkáně a vykazují vyšší odolnost ke kalciovému inzultu, a to jak v rozsahu, ale i rychlosti bobtnání mitochondrií (Milerova et al., 2016, Ostadal et al., 2019, Ostadal et al., 2009a).

4. 5. 2. Tkáňově specifické ontogenetické změny v citlivosti MPTP ke kalciovým iontům a účinkům ROS

Vzhledem k tomu, že tolerance myokardu k nedostatku kyslíku významně klesá během postnatální ontogeneze (Ostadal et al., 1999, Ostadalova et al., 1998), bylo zajímavé sledovat, jak se mění citlivost srdečních mitochondrií ke kalciovým iontům během této fáze vývoje a zároveň porovnat tyto změny s tkáňově odlišnými mitochondriemi. Na základě předešlých poznatků, jenž prokázaly, že mitochondrie izolované z různých tkání dospělých zvířat vykazují odlišnou citlivost MPTP ke kalciovým iontům (Endlicher et al., 2009a, Panov et al., 2007), jsme se rozhodli posoudit, do jaké míry jsou vývojové změny v citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům tkáňově specifické.

V následující studii jsme analyzovali tento parametr v průběhu ontogeneze jak v srdečních, tak v jaterních mitochondriích. Pro naše pokusy jsme použili 5, 14, 30 a 60denní potkany. Bobtnání mitochondrií jsme indukovali 200 μM CaCl_2 . Naše měření potvrdila výsledky předchozích pokusů. Rozsah i maximální rychlost kalcium indukovaného bobtnání byly u srdečních mitochondrií nižší než u jaterních, a to po celé námi studované období života potkanů. Z našich dat je dále patrné, že nízká citlivost srdečních mitochondrií na kalciovou zátěž se nemění až do 14. dne postnatálního věku. V období mezi 14. a 60. dnem se citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům ale postupně zvyšovala. Ontogenetický vývoj citlivosti MPTP jaterních mitochondrií k Ca^{2+} iontům byl výrazně odlišný. V našem experimentálním uspořádání jsme nezaznamenali změny v citlivosti jaterních mitochondrií ke kalciovým iontům, a to zejména ve sledovaném raném období. Hodnoty maximální rychlosti bobtnání (*rate*)

se do 30. dne neměnila a nárůst mezi 30. a 60. dnem po porodu byl nízký. Pokud data převedeme na procenta, tak srdeční mitochondrie izolované z 5denních potkanů vykazovaly pouze 15% *rate* oproti srdečním mitochondriím izolovaným z 60denních potkanů. Naproti tomu jaterní mitochondrie izolované z 5denních potkanů vykazovaly 80% *rate* oproti jaterním mitochondriím izolovaným z 60denních potkanů.

Otevření MPTP je výrazně ovlivněno oxidačním stresem. ROS jsou považovány za nejučinnější látky, které zvyšují citlivost MPTP ke kalciovým iontům (Drahota et al., 2012a, Endlicher et al., 2019, Halestrap et al., 1997, Kim et al., 2006). Zvýšená tvorba ROS a oxidační poškození lipidů a proteinů mitochondriální membrány spojených s funkcí a regulací MPTP tedy pravděpodobně podporují otevírání MPTP během stárnutí a indukují buněčnou smrt (Panel et al., 2018, Rottenberg and Hoek, 2017). Oxidační stres se v průběhu stárnutí organismu kumuluje a jeho účinky jsou dobře popsány u dospělých jedinců. V návaznosti na naše předešlé pokusy, kdy jsme pozorovali vyšší rezistenci neonatálních srdečních mitochondrií ke kalciovému zatížení, jsme se rozhodli porovnat aktivační účinek ROS na kalcium indukované bobtnání mitochondrií izolovaných ze srdce a jater novorozených potkanů (5denní). Pro tento účel jsme použili nízké koncentrace CaCl_2 ($5 \mu\text{M}$), které dávají velmi nízkou rychlost bobtnání a ponechávají prostor pro indukci dalšími látkami ($0,75 \mu\text{M}$ t-BHP). Z našich dat je patrné, že srdeční mitochondrie ve srovnání s jaterními mitochondriemi jsou odolnější také vůči účinkům oxidačního poškození indukovaného t-BHP. Jaterní mitochondrie 5denních potkanů po předchozí preinkubaci s t-BHP vykazovaly 4násobný nárůst kalcium indukované rychlosti bobtnání. Na druhou stranu u srdečních mitochondrií 5denních potkanů jsme tento nárůst maximální rychlosti bobtnání nezaznamenali.

Hlavním výsledkem našich experimentů je zjištění, že srdeční mitochondrie novorozených potkanů jsou odolnější vůči kalciové zátěži a také vůči aktivačnímu účinku oxidačního stresu ve srovnání s mitochondriemi jater novorozenců a tato rezistence během postnatální ontogeneze významně klesá. Získaná data tedy naznačují, že MPTP srdečních mitochondrií je lépe chráněn před účinky zvýšené zátěže Ca^{2+} ionty a ROS. Můžeme ale jen spekulovat, že nižší citlivost srdečních mitochondrií vůči Ca^{2+} iontům a ROS může souviset s vyšší ischemickou tolerancí novorozeneckého srdce (Ostadal et al., 2019). Pokusy s t-BHP ukázaly, že také oxidační stres má důležitou roli v aktivaci MPT, zejména při koncentracích kalcia blízkých hodnotám přítomným v cytosolu za fyziologických podmínek. Tyto změny jsou rovněž tkáňově specifické.

V této souvislosti je nutné zdůraznit, že během ontogenetického vývoje se významně mění oba hlavní aktéři popsané interakce, tj. srdeční mitochondrie a kalcium. Kromě změn v uspořádání srdečních mitochondrií lze rovněž pozorovat významné ontogenetické změny v transportu Ca^{2+} iontů v myokardu. Původní chaotické uspořádání mitochondrií a svalových vláken se mění v pravidelné uspořádání (Milerova et al., 2010). Stárnutí savčích organismů je rozsáhle studováno mnoha laboratořemi, nicméně jeho podrobný mechanismus nebyl dosud zcela objasněn. Existuje ale shoda v tom, že stárnutí je složitý proces vyvolaný mnoha endogenními a exogenními faktory a že v něm hrají zásadní roli mitochondrie (Barja, 2014, Cedikova et al., 2016, Kalous and Drahota, 1996, Rottenberg and Hoek, 2021, Son and Lee, 2019).

Jak vývojové, tak tkáňově specifické rozdíly v aktivačních účincích kalcia a oxidačního stresu závisí také na dalších činitelích. Pro indukční účinek Ca^{2+} iontů hraje důležitou roli Cyp-D, který je zodpovědný za otevření MPTP (Basso et al., 2005, Elrod and Molkentin, 2013, Gutierrez-Aguilar and Baines, 2015). Posttranslační modifikace v různých tkáních jsou rovněž závislé na věku, jak již bylo diskutováno. Nejnověji se začínají objevovat náznaky, že existuje zvýšená exprese Cyp-D ve stárnoucím organismu (Gaubá et al., 2017, Lee et al., 2010). Rovněž se předpokládá, že -SH skupiny mitochondriálních proteinů mohou být během procesu bobtnání modifikovány (Cardoso et al., 2004, Castilho et al., 1998, Halestrap et al., 1997). Kromě toho mají různé mitochondriální proteiny odlišnou citlivost k t-BHP (Cervinkova et al., 2009, Endlicher et al., 2009b, Krivakova et al., 2007) a tato vlastnost může být také vývojově a tkáňově specifická. Proto by měla být přesná analýza mechanismů zapojených do vývojové a tkáňové specifity MPTP tématem dalších experimentů.

4. 5. 3. Věkem indukované změny citlivosti MPTP ke kalciovým iontům a změny mitochondriální retenční kapacity Ca^{2+} iontů

V literatuře je zvýšená rychlost bobtnání vyvolaná Ca^{2+} ionty popsána u mitochondrií izolovaných ze srdeční tkáně 5- a 24měsíčních potkanů (Petrosillo et al., 2010) a u mitochondrií izolovaných z mozku a jater 3- a 20měsíčních myší (Mather and Rottenberg, 2000), proto jsme se v naší práci soustředili na vývojově mladší období potkanů. Studie byla zaměřena na monitorování věkem indukovaných změn citlivosti MPTP ke kalciovým iontům a na schopnost izolovaných jaterních mitochondrií akumulovat Ca^{2+} ionty. Pro tyto pokusy jsme použili mitochondrie izolované z jater potkanů ve věku 3 až 17 týdnů. Ze získaných dat je patrné, že mitochondriální retenční

kapacita pro kalcium (CRC) je významně ovlivněna věkem potkanů. Měření hodnot CRC jaterních mitochondrií navíc odhalilo dvě odlišná období. V období dospívání (od 3. do 7. týdne) docházelo ke statisticky významnému nárůstu hodnot CRC. Nejvyšší hodnoty CRC vykazovali 7týdenní potkani (období počátku pohlavní zralosti) a od 7. do 17. týdne jsme opět zaznamenali signifikantní pokles hodnot CRC. Hodnoty CRC byly u potkanů ve věku 7 týdnů v průměru $28,8 \pm 6,7$ nmol Ca^{2+} /mg mitochondriálního proteinu a použili jsme je jako 100 % hodnoty CRC pro srovnání s ostatními skupinami. Hodnoty CRC 3týdenních potkanů byly 42,1 %, 5týdenních 70,6 %, 10týdenních 70,6 %, 13týdenních 63,6 % a 17týdenních zvířat 57,7 % ve srovnání se 7týdenní skupinou.

Věkem indukované změny citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům jsme hodnotili pomocí naší optimalizované metody kalciem indukovaného bobtnání mitochondrií. Námi naměřená data ukazovala na podobné věkem indukované změny citlivosti MPTP k Ca^{2+} iontům a potvrdila tak předešlé výsledky měření hodnot CRC. Nejvyšší hodnoty maximální rychlosti bobtnání jaterních mitochondrií (*rate*) jsme zaznamenali u mitochondrií izolovaných ze 3- a 17týdenních potkanů. Naopak nejnižší *rate* byl zaznamenán u mitochondrií izolovaných z jater 7týdenních potkanů. *Rate* u potkanů ve věku 7 týdnů jsme použili opět jako 100% hodnotu pro srovnání s ostatními sledovanými skupinami. *Rate* 3týdenních potkanů byl 213 %, 5týdenních 132 %, 10týdenních 181 %, 13týdenních 158 % a 17týdenních 310 % ve srovnání se 7týdenní skupinou.

Naše data ukázala, že během postnatálního období se zvyšuje odolnost mitochondrií vůči účinkům Ca^{2+} iontů a v průběhu stárnutí se tato schopnost opět snižuje. Je z nich patrné, že jaterní mitochondrie izolované ze 7týdenních potkanů (období začátku pohlavní zralosti a dospělosti jedince) jsou schopné akumulovat nejvyšší množství kalcia a vykazují nejnižší citlivost MPTP k Ca^{2+} iontům. Mitochondrie jsou tak maximálně schopné odolávat nefyziologickému zatížení kalciovými ionty a indukci apoptotických či nekrotických procesů. Použití obou těchto metod by mohlo pomoci při hledání látek schopných chránit MPTP před nežádoucími účinky ROS a pomoci prodloužit život organismu, či nalézt účinná farmaka, jež by inhibicí MPTP byla schopná zpomalit rozvoj patologických procesů.

Podrobněji viz příloha č. 7 a 8

4. 6. Využití zavedených metod pro hodnocení funkčního stavu mitochondrií

Jak optimalizovanou metodu bobtnání mitochondrií, tak metodu stanovení retenční kapacity mitochondrií pro kalciové ionty využíváme v naší laboratoři jako prostředky hodnocení funkčního stavu mitochondrií po působení hepatotoxických či hepatoprotektivních látek. Obě metody jsou vhodné ke sledování změn citlivosti MPTP indukovaných např. oxidačním stresem, působením léčivých přípravků a potravinových doplňků. Jejich uplatnění jsme našli při charakterizaci změn mitochondriálních funkcí v důsledku nealkoholové tukové choroby jater (NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease). Práce se připravuje k publikaci. t-BHP indukovaný oxidační stres mitochondrií (aktivace MPTP) byl diskutován v kapitole 4. 2. 3. Z dosud publikovaných výsledků bych chtěl uvést využití metod při detailním studiu účinků derivátů biguanidů (metforminu a fenforminu) a epigalokatechin-3-galátu na jaterní mitochondrie.

4. 6. 1. Zhodnocení účinků biguanidů na jaterní mitochondrie

Metformin se používá k léčbě cukrovky 2. typu už od konce 50. let 20. století ve většině evropských zemí a ve Spojených státech amerických a je v současné době považovaný jako lék první volby (Caparrotta et al., 2020). Metformin patří mezi tzv. biguanidy – inzulínové senzitivátory, což jsou látky zvyšující citlivost buněk k inzulínu a je vysoce účinný při snižování hladiny glukózy v krvi (Bailey and Turner, 1996, Campbell et al., 1996, Drahotka et al., 2014, Hernández-Velázquez et al., 2023). Zpočátku bylo navrženo, že jedním z klíčových účinků metforminu je indukce transportu glukózy do svalů (Klip and Leiter, 1990, Valensi et al., 2002). V poslední době rostou důkazy, které potvrzují dřívější výsledky, že primární funkcí metforminu je tlumit produkci glukózy v játrech, zejména inhibicí glukoneogeneze (Hundal et al., 2000, Weijers and Bekedam, 2020). Nicméně se objevují důkazy, že chronické užívání metforminu má rovněž negativní účinky, např. že léčba metforminem vede k inhibici komplexu I, ke snížení syntézy ATP a ovlivňuje její rezervy v játrech (Owen et al., 2000, Argaud et al., 1993) a významně mění vlastnosti a funkce buněčných a mitochondriálních membrán (Weijers and Bekedam, 2020). I když je metformin dlouhodobě používán v klinické praxi, není jeho přesný mechanismus účinku stále znám. Je pravděpodobné, že účinek biguanidů je výsledkem kombinace řady modulací metabolických reakcí spojených s membránami v závislosti na konkrétních podmínkách.

Biguanidy se díky svému pozitivnímu náboji snadno vážou na biologické membrány. Interakce biguanidů s fosfolipidy buněčných a mitochondriálních membrán mění jejich fyziologické vlastnosti, což následně může vyvolat řadu poruch. Mezi funkční změny buněčných membrán patří: změny aktivity iontových kanálů a kinetiky membránových enzymů, dále změny konformace proteinů, ovlivnění vlastností receptorů a dochází ke změnám fluidního uspořádání fosfolipidů membrán. Přesný charakter těchto interakcí však zůstává nejasný (Weijers and Bekedam, 2020).

Fenformin je další z biguanidů, který má kvalitativně podobné účinky jako metformin (Owen et al., 2000), nicméně má závažnější vedlejší nežádoucí účinky. Je silnějším inhibitorem mitochondriální oxidace a způsobuje laktátovou acidózu, a proto byl z klinické praxe vyloučen (Bando et al., 2010, Dyatlova et al., 2023). Fenformin je však vhodný pro experimentální studie zaměřené na mechanismy působení biguanidů díky svému výraznějšímu inhibičnímu účinku při nižších koncentracích. Existují poznatky, jež naznačují, že biguanidy mohou modifikovat funkci MPTP. Tato data ukazují, že metformin v izolovaných buňkách zvyšuje hodnoty CRC a ovlivňuje otevření MPTP (Guigas et al., 2004, Demaille et al., 2005). V naší práci jsme mimo další sledované parametry hodnotili vliv fenforminu na funkční stav MPTP mitochondrií izolovaných z jater potkana. Testovali jsme účinky fenforminu na kalcium indukované bobtnání izolovaných jaterních mitochondrií. Pomocí naší optimalizované metody jsme hodnotili všechny tři parametry charakterizující kinetiku funkce MPTP, tj. *extent* – rozsah bobtnání, *rate* – maximální rychlost bobtnání a časový interval, kdy dosáhlo bobtnání maximální rychlosti (Drahota et al., 2012a).

Z našich závěrů je patrné, že fenformin zvyšuje rezistenci MPTP ke kalciovým iontům. Rozsah bobtnání mitochondrií po přidání 0,1 mM CaCl₂ se snížil v důsledku působení fenforminem o 20 %, maximální rychlost bobtnání poklesla o 44 % a časový interval maximální rychlosti bobtnání po přidání CaCl₂ byl dvojnásobně prodloužen. Všechny tyto výsledky potvrzují, že fenformin snižuje citlivost MPTP ke kalciovým iontům. Další data uvedená v naší studii naznačují, že biguanidy působí na různé procesy probíhající v mitochondriích. Všechny tyto procesy jsou spojeny s IMM. Naše data jsou v souladu s hypotézou Schäfera (1976), že vazba biguanidů na membránové fosfolipidy nesespecifickým způsobem mění vlastnosti membrán a další výsledky tyto závěry jen potvrzují (Schafer, 1976, Weijers and Bekedam, 2020).

Podrobněji viz příloha č. 9

4. 6. 2. Zhodnocení účinků epigalokatechin-3-galátu na jaterní mitochondrie

Epigalokatechin-3-galát (EGCG) je hlavní katechin obsažený v zeleném čaji s dobře popsánymi antioxidačními, protizánětlivými a protinádorovými účinky (Kim et al., 2014, Xing et al., 2019, Yoshino et al., 1994). Jeho cytoprotektivní účinky byly popsány v játrech (Kuzu et al., 2008, Moravcova et al., 2014, Tipoe et al., 2010), ledvinách (Sahin et al., 2010), srdci (Akhlaghi and Bandy, 2012), plicích (Sriram et al., 2009) a dalších orgánech. Tato protekce je zprostředkována částečně přímým antioxidačním účinkem (Raza and John, 2007) a jeho rozpráhujícími účinky (Kucera et al., 2015). Mírné rozprážení oxidativní fosforylace vede ke snížené produkci mtROS (Brand et al., 2004, Mookerjee et al., 2010). Antioxidační a prooxidační účinky EGCG nejsou ale tak jednoznačné a jsou široce diskutovány v přehledové práci Lamberta a Eliáše (2010). Rovněž bylo prokázáno, že EGCG se přímo váže na Cyp-D, důležitý regulační faktor MPT, a zlepšuje mitochondriální funkce inhibicí otevírání MPTP (Wu et al., 2022).

V poslední době se začalo hovořit o EGCG v souvislosti s hepatocyty a NAFLD. EGCG vykazuje pozitivní účinky při léčbě steatohepatitidy vyvolané stravou s vysokým obsahem tuků (Fiorini et al., 2005, Chung et al., 2012, Kuzu et al., 2008, Zhou et al., 2014) a ochranné účinky proti hepatotoxicitě vyvolané ethanolem (Arteel et al., 2002, Kaviarasan et al., 2008, Skrzydlewska et al., 2002). Na druhou stranu byly zveřejněny poznatky, že předávkování EGCG a/nebo výtažky ze zeleného čaje způsobuje poškození jater a jaterních mitochondrií (Galati et al., 2006, Jimenez-Saenz and Martinez-Sanchez Mdel, 2006, Schmidt et al., 2005). Nežádoucí účinky na jaterní tkáň jsou spojeny s prooxidačním působením vysokých dávek EGCG (Kucera et al., 2015), zvýšenou tvorbou ROS, ztrátou MMP a poklesem produkce ATP (Galati et al., 2006).

Vysoké dávky EGCG byly v našich prvních studiích zaměřených na EGCG rovněž shledány hepatotoxickými. Toxicita EGCG byla nalezena u regenerujících jater po částečné hepatektomii (Mezera et al., 2014). Podobně EGCG ve vysokých dávkách vykazoval toxické účinky na mitochondrie v permeabilizovaných hepatocytech (Kucera et al., 2015) a jsou pozorovány i v buněčných liniích hepatocytů (Li et al., 2009). Jak je patrné, existují protichůdné důkazy o vlivu EGCG na funkční stav mitochondrií. Někteří autoři uváděli ochranný účinek EGCG a snížení tvorby mtROS (Kaviarasan et al., 2007, Meng et al., 2008, Raza and John, 2007). Jiné skupiny potvrdily nežádoucí (inhibiční) účinky EGCG na respiraci mitochondrií a aktivitu oxidačních fosforylačních enzymů (Valenti et al., 2013, Weng et al., 2014, Zheng and Ramirez, 2000).

V naší, již zmíněné práci, jsme hodnotili účinky různých dávek EGCG na primární kultury hepatocytů potkana a na jaterní mitochondrie v permeabilizovaných hepatocytech. Účinek EGCG na tvorbu ROS byl dvoufázový. Zatímco nízké dávky EGCG snižovaly produkci ROS, nejvyšší testovaná dávka (200 μM) vyvolala významné zvýšení tvorby ROS. V permeabilizovaných hepatocytech způsoboval EGCG poškození OMM a rozptážením oxidativní fosforylace (Kucera et al., 2015).

V další naší práci jsme proto hodnotili, zda vhodné (nízké) dávky EGCG jsou schopné ochránit hepatocyty a jaterní mitochondrie před oxidačním poškozením vyvolaným t-BHP (Mezera et al., 2016). Měřili jsme respiraci mitochondrií, MMP a CRC. Jak je patrné z našich výsledků, mírné, netoxické dávky EGCG neovlivnily námi sledované mitochondriální parametry. EGCG v těchto koncentracích nebyl schopen ochránit jaterní mitochondrie před dysfunkcí vyvolanou t-BHP. Navíc se nám podařilo prokázat, že vysoké koncentrace EGCG dokonce zvyšují toxicitu t-BHP. Pokud se vrátíme k využití optimalizované metody hodnocení CRC, tak z našich dat je zřejmé, že samotný EGCG v koncentracích 50 μM a nižších neměl žádný účinek na CRC. Expozice 100 a 200 μM EGCG snížila retenční schopnosti mitochondrií na 70 % oproti kontrolám. Oxidační stres navozený již minimální testovanou koncentrací t-BHP (0,01 mM) způsobil statisticky významný pokles CRC (50 %) oproti kontrolním mitochondriím. Míra dalšího poklesu CRC byla závislá na koncentraci použitého t-BHP. EGCG svými antioxidačními účinky nedokázal zabránit poklesu CRC, jenž byl vyvolán působením t-BHP. Mitochondrie preinkubované s 10 μM EGCG a ovlivněné 0,01 mM t-BHP vykazovaly stejný pokles CRC jako mitochondrie inkubované pouze s t-BHP. Závěrem lze říct, že mírné netoxické dávky EGCG nejsou schopné chránit mitochondrie izolované z jater potkanů před oxidačními účinky t-BHP, naopak byl pozorován aditivní škodlivý účinek EGCG v koncentracích vyšších než 50 μM .

Podrobněji viz příloha č. 10 a 11

5. ZÁVĚRY

Mitochondrie jsou nejen častým cílem oxidačního poškození, ale jsou také považovány za hlavní buněčný zdroj ROS. V mitochondriích nicméně existují různé mechanismy, které zajišťují rovnováhu mezi tvorbou a eliminací kyslíkových radikálů. Významnou roli v ochraně, ale i v poškození mitochondrií hraje zvýšená propustnost mitochondriálních membrán, za kterou je zodpovědný MPTP. Krátké, přechodné otevření MPTP má pozitivní účinek na snížení tvorby mtROS respiračním řetězcem. Pokud však MPTP zůstává otevřený po delší dobu, např. kvůli zvýšené koncentraci kalciových iontů v matrix mitochondrií nebo zvýšené produkci mtROS, dochází ke změně MMP, k poklesu tvorby ATP a indukují se procesy vedoucí k buněčné smrti.

V průběhu dosavadního, 70 let trvajících, intenzivního výzkumu se podařilo identifikovat řadu látek, které ovlivňují funkční stav MPTP (aktivují/inhibují jeho otevření), avšak molekulární struktura tohoto membránového póru zůstává stále nejasná. Vzhledem k tomu, že přesná identita složek póru dosud nebyla objasněna, nelze vyloučit, že kromě základních známých struktur a regulačních faktorů, které jsou nezbytné pro otevření MPTP, existuje za některých podmínek nebo v některých typech buněk několik alternativních struktur, které zahrnují i další komponenty. Permeabilizace IMM tak může vyplývat z aktivace nebo tvorby více než jednoho druhu kanálu, to znamená, že je třeba mít na paměti možnou existenci více než jednoho typu MPTP.

Studium molekulárního uspořádání a funkce MPTP je přínosné pro výzkum mechanismů vzniku a rozvoje onemocnění, což může přispět k vývoji vhodných farmak a snížení mortality a morbidit pacientů. Podařilo se nám optimalizovat dvě metody pro lepší hodnocení funkčního stavu MPTP a různých faktorů, které se na jeho regulaci podílejí. Tyto metody umožňují hodnotit orgánové i druhové specifity póru za různých fyziologických i patologických stavů. Naproti tomu z literární rešerše vyplývá, že znalosti molekulární struktury póru jsou stále nejasné, a dokonce stále nejasnější. Diskuse o tom, zda je MPTP pórem nebo jen nespecifickým otvorem v mitochondriální membráně, tak dále pokračují. Jedním z posledních závěrů je představa, že MPTP není klasický pór, ale mnohostranný multifaktoriální jev bez absolutní závislosti na jediném parametru. Měli bychom si proto uvědomit, že mnohem důležitější než hledat strukturu póru, je hledat mechanismy, které by MPTP vhodně inhibovaly a pomohly při léčbě nemocí spojených s jeho otevřením. K tomu je však potřeba mít kvalitní a standardizované metody, které poskytují reprodukovatelné výsledky napříč laboratořemi.

6. LITERATURA

- AKERMAN, K. E. & WIKSTROM, M. K. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett*, 1976, **68**(2), 191-197.
- AKHLAGHI, M. & BANDY, B. Preconditioning and acute effects of flavonoids in protecting cardiomyocytes from oxidative cell death. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, **2012**782321.
- ALAVIAN, K. N., BEUTNER, G., LAZROVE, E., SACCHETTI, S., PARK, H. A., LICZNERSKI, P., LI, H., NABILI, P., HOCKENSMITH, K., GRAHAM, M., PORTER, G. A., JR. & JONAS, E. A. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**(29), 10580-10585.
- ALTIERI, D. C. Hsp90 regulation of mitochondrial protein folding: from organelle integrity to cellular homeostasis. *Cell Mol Life Sci*, 2013, **70**(14), 2463-2472.
- ALTSCHULD, R. A., HOHL, C. M., CASTILLO, L. C., GARLEB, A. A., STARLING, R. C. & BRIERLEY, G. P. Cyclosporin inhibits mitochondrial calcium efflux in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol*, 1992, **262**(6 Pt 2), H1699-1704.
- ALVES-FIGUEIREDO, H., SILVA-PLATAS, C., LOZANO, O., VAZQUEZ-GARZA, E., GUERRERO-BELTRAN, C. E., ZARAIN-HERZBERG, A. & GARCIA-RIVAS, G. A systematic review of post-translational modifications in the mitochondrial permeability transition pore complex associated with cardiac diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, **1867**(1), 165992.
- AMIGO, I., MENEZES-FILHO, S. L., LUEVANO-MARTINEZ, L. A., CHAUSSE, B. & KOWALTOWSKI, A. J. Caloric restriction increases brain mitochondrial calcium retention capacity and protects against excitotoxicity. *Aging Cell*, 2017, **16**(1), 73-81.
- ANDERSSON, D. C., BETZENHAUSER, M. J., REIKEN, S., MELI, A. C., UMANSKAYA, A., XIE, W., SHIOMI, T., ZALK, R., LACAMPAGNE, A. & MARKS, A. R. Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab*, 2011, **14**(2), 196-207.
- ANGELI, S., FOULGER, A., CHAMOLI, M., PEIRIS, T. H., GERENCSE, A., SHAHMIRZADI, A. A., ANDERSEN, J. & LITHGOW, G. The mitochondrial permeability transition pore activates the mitochondrial unfolded protein response and promotes aging. *Elife*, 2021, **10**.
- ANGELOVA, P. R. & ABRAMOV, A. Y. Alpha-synuclein and beta-amyloid - different targets, same players: calcium, free radicals and mitochondria in the mechanism of neurodegeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **483**(4), 1110-1115.
- ANSARI, A., RAHMAN, M. S., SAHA, S. K., SAIKOT, F. K., DEEP, A. & KIM, K. H. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell*, 2017, **16**(1), 4-16.
- ANTONIEL, M., JONES, K., ANTONUCCI, S., SPOLAORE, B., FOGOLARI, F., PETRONILLI, V., GIORGIO, V., CARRARO, M., DI LISA, F., FORTE, M., SZABO, I., LIPPE, G. & BERNARDI, P. The unique histidine in OSCP subunit of F-ATP synthase mediates inhibition of the permeability transition pore by acidic pH. *EMBO Rep*, 2018, **19**(2), 257-268.
- ARGAUD, D., ROTH, H., WIERNSPERGER, N. & LEVERVE, X. M. Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 1993, **213**(3), 1341-1348.
- ARIELI, Y., GURSAHANI, H., EATON, M. M., HERNANDEZ, L. A. & SCHAEFER, S. Gender modulation of Ca(2+) uptake in cardiac mitochondria. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, **37**(2), 507-513.
- ARTEEL, G. E., UESUGI, T., BEVAN, L. N., GABELE, E., WHEELER, M. D., MCKIM, S. E. & THURMAN, R. G. Green tea extract protects against early alcohol-induced liver injury in rats. *Biol Chem*, 2002, **383**(3-4), 663-670.
- AZARASHVILI, T., ODINOKOVA, I., BAKUNTS, A., TERNOVSKY, V., KRESTININA, O., TYYNELA, J. & SARIS, N. E. Potential role of subunit c of FOF1-ATPase and subunit c of storage body in the mitochondrial permeability transition. Effect of the phosphorylation status of subunit c on pore opening. *Cell Calcium*, 2014, **55**(2), 69-77.
- AZZI, A. & AZZONE, G. F. Swelling and shrinkage phenomena in liver mitochondria. I. Large amplitude swelling induced by inorganic phosphate and by ATP. *Biochim Biophys Acta*, 1965a, **105**(2), 253-264.
- AZZI, A. & AZZONE, G. F. Swelling and shrinkage phenomena in liver mitochondria. II. Low amplitude swelling-shrinkage cycles. *Biochim Biophys Acta*, 1965b, **105**(2), 265-278.
- AZZONE, G. F. & AZZI, A. Volume changes in liver mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1965a, **53**(5), 1084-1089.

- AZZONE, G. F. & AZZI, A. Volume Changes Induced by Inorganic Phosphate in Liver Mitochondria. *Biochem J*, 1965b, **94**10C-11C.
- AZZONE, G. F., BRAGADIN, M., POZZAN, T. & ANTONE, P. D. Proton electrochemical potential in steady state rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1977, **459**(1), 96-109.
- BAILEY, C. J. & TURNER, R. C. Metformin. *N Engl J Med*, 1996, **334**(9), 574-579.
- BAINES, C. P. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, **46**(6), 850-857.
- BAINES, C. P., KAISER, R. A., PURCELL, N. H., BLAIR, N. S., OSINSKA, H., HAMBLETON, M. A., BRUNSKILL, E. W., SAYEN, M. R., GOTTLIEB, R. A., DORN, G. W., ROBBINS, J. & MOLKENTIN, J. D. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 2005, **434**(7033), 658-662.
- BAINES, C. P., KAISER, R. A., SHEIKO, T., CRAIGEN, W. J. & MOLKENTIN, J. D. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*, 2007, **9**(5), 550-555.
- BAMBRICK, L. L., CHANDRASEKARAN, K., MEHRABIAN, Z., WRIGHT, C., KRUEGER, B. K. & FISKUM, G. Cyclosporin A increases mitochondrial calcium uptake capacity in cortical astrocytes but not cerebellar granule neurons. *J Bioenerg Biomembr*, 2006, **38**(1), 43-47.
- BANDO, K., OCHIAI, S., KUNIMATSU, T., DEGUCHI, J., KIMURA, J., FUNABASHI, H. & SEKI, T. Comparison of potential risks of lactic acidosis induction by biguanides in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2010, **58**(1), 155-160.
- BARJA, G. The mitochondrial free radical theory of aging. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2014, **127**1-27.
- BASSO, E., FANTE, L., FOWLKES, J., PETRONILLI, V., FORTE, M. A. & BERNARDI, P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem*, 2005, **280**(19), 18558-18561.
- BASSO, E., PETRONILLI, V., FORTE, M. A. & BERNARDI, P. Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem*, 2008, **283**(39), 26307-26311.
- BATANDIER, C., LEVERVE, X. & FONTAINE, E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*, 2004, **279**(17), 17197-17204.
- BENARD, G., FAUSTIN, B., PASSERIEUX, E., GALINIER, A., ROCHER, C., BELLANCE, N., DELAGE, J. P., CASTEILLA, L., LETELLIER, T. & ROSSIGNOL, R. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, **291**(6), C1172-1182.
- BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem*, 1992, **267**(13), 8834-8839.
- BERNARDI, P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1275**(1-2), 5-9.
- BERNARDI, P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 1999, **79**(4), 1127-1155.
- BERNARDI, P., DI LISA, F., FOGOLARI, F. & LIPPE, G. From ATP to PTP and Back: A Dual Function for the Mitochondrial ATP Synthase. *Circ Res*, 2015a, **116**(11), 1850-1862.
- BERNARDI, P., KRAUSKOPF, A., BASSO, E., PETRONILLI, V., BLACHLY-DYSON, E., DI LISA, F. & FORTE, M. A. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J*, 2006, **273**(10), 2077-2099.
- BERNARDI, P. & RASOLA, A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem*, 2007, **45**481-506.
- BERNARDI, P., RASOLA, A., FORTE, M. & LIPPE, G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev*, 2015b, **95**(4), 1111-1155.
- BERNARDI, P., VASSANELLI, S., VERONESE, P., COLONNA, R., SZABO, I. & ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem*, 1992, **267**(5), 2934-2939.
- BEUTNER, G., ALAVIAN, K. N., JONAS, E. A. & PORTER, G. A., JR. The Mitochondrial Permeability Transition Pore and ATP Synthase. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, **240**21-46.
- BEUTNER, G., RUCK, A., RIEDE, B. & BRDICZKA, D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1368**(1), 7-18.

- BIASUTTO, L., AZZOLINI, M., SZABO, I. & ZORATTI, M. The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1863**(10), 2515-2530.
- BIASUTTO, L., DONG, L. F., ZORATTI, M. & NEUZIL, J. Mitochondrially targeted anti-cancer agents. *Mitochondrion*, 2010, **10**(6), 670-681.
- BONORA, M., BONONI, A., DE MARCHI, E., GIORGI, C., LEBIEDZINSKA, M., MARCHI, S., PATERGNANI, S., RIMESSI, A., SUSKI, J. M., WOJTALA, A., WIECKOWSKI, M. R., KROEMER, G., GALLUZZI, L. & PINTON, P. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle*, 2013, **12**(4), 674-683.
- BONORA, M., GIORGI, C. & PINTON, P. Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, **23**(4), 266-285.
- BONORA, M., MORGANTI, C., MORCIANO, G., GIORGI, C., WIECKOWSKI, M. R. & PINTON, P. Comprehensive analysis of mitochondrial permeability transition pore activity in living cells using fluorescence-imaging-based techniques. *Nat Protoc*, 2016, **11**(6), 1067-1080.
- BONORA, M., MORGANTI, C., MORCIANO, G., PEDRIALI, G., LEBIEDZINSKA-ARCISZEWSKA, M., AQUILA, G., GIORGI, C., RIZZO, P., CAMPO, G., FERRARI, R., KROEMER, G., WIECKOWSKI, M. R., GALLUZZI, L. & PINTON, P. Mitochondrial permeability transition involves dissociation of F1FO ATP synthase dimers and C-ring conformation. *EMBO Rep*, 2017, **18**(7), 1077-1089.
- BONORA, M., PATERGNANI, S., RAMACCINI, D., MORCIANO, G., PEDRIALI, G., KAHSAY, A. E., BOUHAMIDA, E., GIORGI, C., WIECKOWSKI, M. R. & PINTON, P. Physiopathology of the Permeability Transition Pore: Molecular Mechanisms in Human Pathology. *Biomolecules*, 2020, **10**(7).
- BONORA, M. & PINTON, P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Front Oncol*, 2014, **4**302.
- BORNHOVD, C., VOGEL, F., NEUPERT, W. & REICHERT, A. S. Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1FO-ATP synthase supracomplexes. *J Biol Chem*, 2006, **281**(20), 13990-13998.
- BOYMAN, L., COLEMAN, A. K., ZHAO, G., WESCOTT, A. P., JOCA, H. C., GREISER, B. M., KARBOWSKI, M., WARD, C. W. & LEDERER, W. J. Dynamics of the mitochondrial permeability transition pore: Transient and permanent opening events. *Arch Biochem Biophys*, 2019, **666**31-39.
- BRAND, M. D., AFFOURTIT, C., ESTEVES, T. C., GREEN, K., LAMBERT, A. J., MIWA, S., PAKAY, J. L. & PARKER, N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*, 2004, **37**(6), 755-767.
- BRISTON, T., SELWOOD, D. L., SZABADKAI, G. & DUCHEN, M. R. Mitochondrial Permeability Transition: A Molecular Lesion with Multiple Drug Targets. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, **40**(1), 50-70.
- BROEKEMEIER, K. M., DEMPSEY, M. E. & PFEIFFER, D. R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem*, 1989, **264**(14), 7826-7830.
- BROEKEMEIER, K. M. & PFEIFFER, D. R. Cyclosporin A-sensitive and insensitive mechanisms produce the permeability transition in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **163**(1), 561-566.
- BROOKES, P. S., YOON, Y., ROBOTHAM, J. L., ANDERS, M. W. & SHEU, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, **287**(4), C817-833.
- BROWN, K., XIE, S., QIU, X., MOHRIN, M., SHIN, J., LIU, Y., ZHANG, D., SCADDEN, D. T. & CHEN, D. SIRT3 reverses aging-associated degeneration. *Cell Rep*, 2013, **3**(2), 319-327.
- BROWN, M. R., GEDDES, J. W. & SULLIVAN, P. G. Brain region-specific, age-related, alterations in mitochondrial responses to elevated calcium. *J Bioenerg Biomembr*, 2004, **36**(4), 401-406.
- BROWN, M. R., SULLIVAN, P. G. & GEDDES, J. W. Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca²⁺ overload than nonsynaptic mitochondria. *J Biol Chem*, 2006, **281**(17), 11658-11668.
- BRUSTOVETSKY, N. The Role of Adenine Nucleotide Translocase in the Mitochondrial Permeability Transition. *Cells*, 2020, **9**(12).
- BRUSTOVETSKY, N. & KLINGENBERG, M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. *Biochemistry*, 1996, **35**(26), 8483-8488.
- BRUSTOVETSKY, N., LAFRANCE, R., PURL, K. J., BRUSTOVETSKY, T., KEENE, C. D., LOW, W. C. & DUBINSKY, J. M. Age-dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of Huntington's Disease. *J Neurochem*, 2005, **93**(6), 1361-1370.

- BRUSTOVETSKY, N., TROPSCHUG, M., HEIMPEL, S., HEIDKAMPER, D. & KLINGENBERG, M. A large Ca²⁺-dependent channel formed by recombinant ADP/ATP carrier from *Neurospora crassa* resembles the mitochondrial permeability transition pore. *Biochemistry*, 2002, **41**(39), 11804-11811.
- BUCHHOLZ, J. N., BEHRINGER, E. J., POTTORF, W. J., PEARCE, W. J. & VANTERPOOL, C. K. Age-dependent changes in Ca²⁺ homeostasis in peripheral neurones: implications for changes in function. *Aging Cell*, 2007, **6**(3), 285-296.
- BYRNE, A. M., LEMASTERS, J. J. & NIEMINEN, A. L. Contribution of increased mitochondrial free Ca²⁺ to the mitochondrial permeability transition induced by tert-butylhydroperoxide in rat hepatocytes. *Hepatology*, 1999, **29**(5), 1523-1531.
- CALVO-RODRIGUEZ, M., GARCIA-DURILLO, M., VILLALOBOS, C. & NUNEZ, L. In vitro aging promotes endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria Ca(2+) cross talk and loss of store-operated Ca(2+) entry (SOCE) in rat hippocampal neurons. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1863**(11), 2637-2649.
- CAMPBELL, R. K., WHITE, J. R., JR. & SAULIE, B. A. Metformin: a new oral biguanide. *Clin Ther*, 1996, **18**(3), 360-371; discussion 359.
- CAPARROTTA, T. M., BLACKBOURN, L. A. K., MCGURNAGHAN, S. J., CHALMERS, J., LINDSAY, R., MCCRIMMON, R., MCKNIGHT, J., WILD, S., PETRIE, J. R., PHILIP, S., MCKEIGUE, P. M., WEBB, D. J., SATTAR, N., COLHOUN, H. M. & SCOTTISH DIABETES RESEARCH NETWORK-EPIDEMIOLOGY, G. Prescribing Paradigm Shift? Applying the 2019 European Society of Cardiology-Led Guidelines on Diabetes, Prediabetes, and Cardiovascular Disease to Assess Eligibility for Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors or Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists as First-Line Monotherapy (or Add-on to Metformin Monotherapy) in Type 2 Diabetes in Scotland. *Diabetes Care*, 2020, **43**(9), 2034-2041.
- CARDOSO, C. M., ALMEIDA, L. M. & CUSTODIO, J. B. Protection of tamoxifen against oxidation of mitochondrial thiols and NAD(P)H underlying the permeability transition induced by prooxidants. *Chem Biol Interact*, 2004, **148**(3), 149-161.
- CARRARO, M., GIORGIO, V., SILEIKYTE, J., SARTORI, G., FORTE, M., LIPPE, G., ZORATTI, M., SZABO, I. & BERNARDI, P. Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, 2014, **289**(23), 15980-15985.
- CARROLL, J., HE, J., DING, S., FEARNLEY, I. M. & WALKER, J. E. Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, **116**(26), 12816-12821.
- CASTILHO, R. F., KOWALTOWSKI, A. J. & VERCESI, A. E. 3,5,3'-triiodothyronine induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species and membrane protein thiol oxidation. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **354**(1), 151-157.
- CEDIKOVA, M., PITULE, P., KRIPNEROVA, M., MARKOVA, M. & KUNCOVA, J. Multiple roles of mitochondria in aging processes. *Physiol Res*, 2016, **65**(Suppl 5), S519-S531.
- CERVINKOVA, Z., KRIVAKOVA, P., LABAJOVA, A., ROUSAR, T., LOTKOVA, H., KUCERA, O., ENDLICHER, R., CERVINKA, M. & DRAHOTA, Z. Mechanisms participating in oxidative damage of isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol*, 2009, **83**(4), 363-372.
- CERVINKOVA, Z., SVATKOVA, R., KALOUS, M., RAUCHOVA, H., CERVINKA, M. & DRAHOTA, Z. Effect of triiodothyronine administration on the recovery of liver oxidative capacity after partial hepatectomy. *Eur Surg Res*, 1998, **30**(6), 371-377.
- CLARKE, S. J., MCSTAY, G. P. & HALESTRAP, A. P. Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem*, 2002, **277**(38), 34793-34799.
- CONNERN, C. P. & HALESTRAP, A. P. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochem J*, 1994, **302** (Pt 2)321-324.
- COOPER, L. L., LI, W., LU, Y., CENTRACCHIO, J., TEREITYEVA, R., KOREN, G. & TEREITYEV, D. Redox modification of ryanodine receptors by mitochondria-derived reactive oxygen species contributes to aberrant Ca²⁺ handling in ageing rabbit hearts. *J Physiol*, 2013, **591**(23), 5895-5911.
- COSTANTINI, P., BELZACQ, A. S., VIEIRA, H. L., LAROCLETTE, N., DE PABLO, M. A., ZAMZAMI, N., SUSIN, S. A., BRENNER, C. & KROEMER, G. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene*, 2000, **19**(2), 307-314.

- CROFTS, A. R. & CHAPPELL, J. B. Calcium Ion Accumulation and Volume Changes of Isolated Liver Mitochondria. Reversal of Calcium Ion-Induced Swelling. *Biochem J*, 1965, **95**387-392.
- CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 1999, **341** (Pt 2)233-249.
- CROMPTON, M. Mitochondria and aging: a role for the permeability transition? *Aging Cell*, 2004, **3**(1), 3-6.
- CROMPTON, M., BARKSBY, E., JOHNSON, N. & CAPANO, M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie*, 2002, **84**(2-3), 143-152.
- CROMPTON, M. & COSTI, A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *Eur J Biochem*, 1988, **178**(2), 489-501.
- CROMPTON, M., COSTI, A. & HAYAT, L. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J*, 1987, **245**(3), 915-918.
- CROMPTON, M., ELLINGER, H. & COSTI, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*, 1988, **255**(1), 357-360.
- CROMPTON, M., VIRJI, S. & WARD, J. 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*, 1998, **258**(2), 729-735.
- ČERVENKA, S. (2003) Syndrom suchého oka. IN KOMÍNEK, P., ČERVENKA, S. & MÜLLNER, K. (Eds.) *Nemoci slzných cest: diagnostika a léčba*. Praha, Maxdorf.
- DAI, D. F., CHIAO, Y. A., MARCINEK, D. J., SZETO, H. H. & RABINOVITCH, P. S. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Healthspan*, 2014, **36**.
- DAS, A. M. & HARRIS, D. A. Control of mitochondrial ATP synthase in heart cells: inactive to active transitions caused by beating or positive inotropic agents. *Cardiovasc Res*, 1990, **24**(5), 411-417.
- DAUM, B., WALTER, A., HORST, A., OSIEWACZ, H. D. & KUHLBRANDT, W. Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(38), 15301-15306.
- DAVIDSON, A. M. & HALESTRAP, A. P. Partial inhibition by cyclosporin A of the swelling of liver mitochondria in vivo and in vitro induced by sub-micromolar [Ca²⁺], but not by butyrate. Evidence for two distinct swelling mechanisms. *Biochem J*, 1990, **268**(1), 147-152.
- DAVIES, K. M., ANSELMINI, C., WITTIG, I., FARALDO-GOMEZ, J. D. & KUHLBRANDT, W. Structure of the yeast F₁F_o-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109**(34), 13602-13607.
- DESAGHER, S. & MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 2000, **10**(9), 369-377.
- DESJARDINS, D., CACHO-VALADEZ, B., LIU, J. L., WANG, Y., YEE, C., BERNARD, K., KHAKI, A., BRETON, L. & HEKIMI, S. Antioxidants reveal an inverted U-shaped dose-response relationship between reactive oxygen species levels and the rate of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 2017, **16**(1), 104-112.
- DETAILLE, D., GUIGAS, B., CHAUVIN, C., BATANDIER, C., FONTAINE, E., WIERNSPERGER, N. & LEVERVE, X. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes*, 2005, **54**(7), 2179-2187.
- DI LISA, F. & BERNARDI, P. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. *Mol Cell Biochem*, 1998, **184**(1-2), 379-391.
- DONG, Z., SHANMUGHAPRIYA, S., TOMAR, D., SIDDIQUI, N., LYNCH, S., NEMANI, N., BREVES, S. L., ZHANG, X., TRIPATHI, A., PALANIAPPAN, P., RIITANO, M. F., WORTH, A. M., SEELAM, A., CARVALHO, E., SUBBIAH, R., JANA, F., SOBOLOFF, J., PENG, Y., CHEUNG, J. Y., JOSEPH, S. K., CAPLAN, J., RAJAN, S., STATHOPULOS, P. B. & MADESH, M. Mitochondrial Ca(2+) Uniporter Is a Mitochondrial Luminal Redox Sensor that Augments MCU Channel Activity. *Mol Cell*, 2017, **65**(6), 1014-1028 e1017.
- DOUL, J. & CHARVÁTOVÁ, Z. Kardioprotektivní intervence a stavy zvýšené odolnosti myokardu k ischemii. *Československá fyziologie*, 2017, **66**(1), 4-17.
- DRAHOTA, Z., ENDLICHER, R., KUCERA, O., RYCHTRMOC, D. & CERVINKOVA, Z. Factors affecting the function of the mitochondrial membrane permeability transition pore and their role in evaluation of calcium retention capacity values. *Physiol Res*, 2020, **69**(3), 491-499.
- DRAHOTA, Z., ENDLICHER, R., STANKOVA, P., RYCHTRMOC, D., MILEROVA, M. & CERVINKOVA, Z. Characterization of calcium, phosphate and peroxide interactions in activation of mitochondrial swelling using derivative of the swelling curves. *J Bioenerg Biomembr*, 2012a, **44**(3), 309-315.

- DRAHOTA, Z. & LEHNINGER, A. L. Movements of H⁺, K⁺, and Na⁺ during Energy-Dependent Uptake and Retention of Ca⁺⁺ in Rat Liver Mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 1965, **193**51-356.
- DRAHOTA, Z., MILEROVÁ, M., ENDLICHER, R., RYCHTRMOC, D., ČERVINKOVÁ, Z. & OŠTÁDAL, B. Developmental changes of the sensitivity of cardiac and liver mitochondrial permeability transition pore to calcium load and oxidative stress. *Physiol Res*, 2012b, **61** Suppl 1S165-172.
- DRAHOTA, Z., PALENICKOVA, E., ENDLICHER, R., MILEROVA, M., BREJCHOVA, J., VOSAHLIKOVA, M., SVOBODA, P., KAZDOVA, L., KALOUS, M., CERVINKOVA, Z. & CAHOVA, M. Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties. *Physiol Res*, 2014, **63**(1), 1-11.
- DRAHOTA, Z., RAUCHOVA, H., SEDLAK, V., KOCI, J. & CERVINKOVA, Z. The effect of triiodothyronine on changes of membrane fluidity in regenerating rat liver. *Physiol Res*, 1999, **48**(2), 167-170.
- DU, H. & YAN, S. S. Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: cyclophilin D and amyloid beta. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1802**(1), 198-204.
- DUBININ, M. V., TALANOV, E. Y., TENKOV, K. S., STARINETS, V. S., MIKHEEVA, I. B., SHARAPOV, M. G. & BELOSLUDTSEV, K. N. Duchenne muscular dystrophy is associated with the inhibition of calcium uniport in mitochondria and an increased sensitivity of the organelles to the calcium-induced permeability transition. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, **1866**(5), 165674.
- DYATLOVA, N., TOBARRAN, N. V., KANNAN, L., NORTH, R. & WILLS, B. K. (2023) Metformin Associated Lactic Acidosis (MALA). *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
- EIRIN, A., LI, Z., ZHANG, X., KRIER, J. D., WOOLLARD, J. R., ZHU, X. Y., TANG, H., HERRMANN, S. M., LERMAN, A., TEXTOR, S. C. & LERMAN, L. O. A mitochondrial permeability transition pore inhibitor improves renal outcomes after revascularization in experimental atherosclerotic renal artery stenosis. *Hypertension*, 2012, **60**(5), 1242-1249.
- ELROD, J. W. & MOLKENTIN, J. D. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ J*, 2013, **77**(5), 1111-1122.
- ENDLICHER, R. (2010) Studium změn energetického metabolismu hepatocytů: působení oxidačního stresu a trijodtyroninu. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové.
- ENDLICHER, R., DRAHOTA, Z. & CERVINKOVA, Z. Modification of calcium retention capacity of rat liver mitochondria by phosphate and tert-butyl hydroperoxide. *Physiol Res*, 2019, **68**(1), 59-65.
- ENDLICHER, R., DRAHOTA, Z. & ČERVINKOVÁ, Z. In vitro and in vivo activation of mitochondrial membrane permeability transition pore using triiodothyronine. *Physiol Res*, 2016, **65**(2), 321-331.
- ENDLICHER, R., DRAHOTA, Z., KUCERA, O. & CERVINKOVA, Z. Age-Dependent Changes in the Function of Mitochondrial Membrane Permeability Transition Pore in Rat Liver Mitochondria. *Physiol Res*, 2021, **70**(6), 905-911.
- ENDLICHER, R., DRAHOTA, Z., STEJSKALOVÁ, M., KALOUS, M., RYBA, L., RYCHTRMOC, D. & ČERVINKOVÁ, Z. Mitochondriální pór přechodné propustnosti a jeho podíl na rozvoji patologických procesů. *Československá fyziologie*, 2018, **67**(1), 13-21.
- ENDLICHER, R., DRAHOTA, Z., ŠTEFKOVÁ, K., ČERVINKOVÁ, Z. & KUČERA, O. The Mitochondrial Permeability Transition Pore-Current Knowledge of Its Structure, Function, and Regulation, and Optimized Methods for Evaluating Its Functional State. *Cells*, 2023, **12**(9), Art. No. 1273, 1-17
- ENDLICHER, R., KRIVAKOVA, P., LOTKOVA, H., MILEROVA, M., DRAHOTA, Z. & CERVINKOVA, Z. Tissue specific sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺ ions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2009a, **52**(2), 69-72.
- ENDLICHER, R., KRIVAKOVA, P., RAUCHOVA, H., NUSKOVA, H., CERVINKOVA, Z. & DRAHOTA, Z. Peroxidative damage of mitochondrial respiration is substrate-dependent. *Physiol Res*, 2009b, **58**(5), 685-692.
- ENDO, M. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev*, 2009, **89**(4), 1153-1176.
- ESCOBALES, N., NUNEZ, R. E., JANG, S., PARODI-RULLAN, R., AYALA-PENA, S., SACHER, J. R., SKODA, E. M., WIPF, P., FRONTERA, W. & JAVADOV, S. Mitochondria-targeted ROS scavenger improves post-ischemic recovery of cardiac function and attenuates mitochondrial abnormalities in aged rats. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, **77**136-146.
- FANG, E. F., SCHEIBYE-KNUDSEN, M., CHUA, K. F., MATTSON, M. P., CROTEAU, D. L. & BOHR, V. A. Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, **17**(5), 308-321.

- FENG, G., LIU, B., HOU, T., WANG, X. & CHENG, H. Mitochondrial Flashes: Elemental Signaling Events in Eukaryotic Cells. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, **240**403-422.
- FERNANDEZ-SANZ, C., RUIZ-MEANA, M., CASTELLANO, J., MIRO-CASAS, E., NUNEZ, E., INSERTE, J., VAZQUEZ, J. & GARCIA-DORADO, D. Altered FoF1 ATP synthase and susceptibility to mitochondrial permeability transition pore during ischaemia and reperfusion in aging cardiomyocytes. *Thromb Haemost*, 2015, **113**(3), 441-451.
- FERNANDEZ-SANZ, C., RUIZ-MEANA, M., MIRO-CASAS, E., NUNEZ, E., CASTELLANO, J., LOUREIRO, M., BARBA, I., PONCELAS, M., RODRIGUEZ-SINOVAS, A., VAZQUEZ, J. & GARCIA-DORADO, D. Defective sarcoplasmic reticulum-mitochondria calcium exchange in aged mouse myocardium. *Cell Death Dis*, 2014, **5**e1573.
- FERRARA, N., RINALDI, B., CORBI, G., CONTI, V., STIUSO, P., BOCCUTI, S., RENGO, G., ROSSI, F. & FILIPPELLI, A. Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. *Rejuvenation Res*, 2008, **11**(1), 139-150.
- FIORINI, R. N., DONOVAN, J. L., RODWELL, D., EVANS, Z., CHENG, G., MAY, H. D., MILLIKEN, C. E., MARKOWITZ, J. S., CAMPBELL, C., HAINES, J. K., SCHMIDT, M. G. & CHAVIN, K. D. Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl*, 2005, **11**(3), 298-308.
- FOLDA, A., CITTA, A., SCALCON, V., CALI, T., ZONTA, F., SCUTARI, G., BINDOLI, A. & RIGOBELLO, M. P. Mitochondrial Thioredoxin System as a Modulator of Cyclophilin D Redox State. *Sci Rep*, 2016, **6**23071.
- FONTAINE, E., ERIKSSON, O., ICHAS, F. & BERNARDI, P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem*, 1998a, **273**(20), 12662-12668.
- FONTAINE, E., ICHAS, F. & BERNARDI, P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 1998b, **273**(40), 25734-25740.
- FORKINK, M., BASIT, F., TEIXEIRA, J., SWARTS, H. G., KOOPMAN, W. J. H. & WILLEMS, P. Complex I and complex III inhibition specifically increase cytosolic hydrogen peroxide levels without inducing oxidative stress in HEK293 cells. *Redox Biol*, 2015, **6**607-616.
- FOURNIER, N., DUCET, G. & CREVAT, A. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr*, 1987, **19**(3), 297-303.
- FRENZEL, M., ROMMELSPACHER, H., SUGAWA, M. D. & DENCHER, N. A. Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex. *Exp Gerontol*, 2010, **45**(7-8), 563-572.
- FRIBERG, H. & WIELOCH, T. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochimie*, 2002, **84**(2-3), 241-250.
- GALATI, G., LIN, A., SULTAN, A. M. & O'BRIEN, P. J. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med*, 2006, **40**(4), 570-580.
- GÁLL, J., ŠKRHA, J., JR., BUCHAL, R., SEDLÁČKOVÁ, E., VERÉBOVA, K. & PLÁTENÍK, J. Induction of the mitochondrial permeability transition (MPT) by micromolar iron: liberation of calcium is more important than NAD(P)H oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1817**(9), 1537-1549.
- GALLUZZI, L., ZAMZAMI, N., DE LA MOTTE ROUGE, T., LEMAIRE, C., BRENNER, C. & KROEMER, G. Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis*, 2007, **12**(5), 803-813.
- GANDHI, S., WOOD-KACZMAR, A., YAO, Z., PLUN-FAVREAU, H., DEAS, E., KLUPSCH, K., DOWNWARD, J., LATCHMAN, D. S., TABRIZI, S. J., WOOD, N. W., DUCHEN, M. R. & ABRAMOV, A. Y. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell*, 2009, **33**(5), 627-638.
- GAO, J., SANA, R., CALDER, V., CALONGE, M., LEE, W., WHEELER, L. A. & STERN, M. E. Mitochondrial permeability transition pore in inflammatory apoptosis of human conjunctival epithelial cells and T cells: effect of cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, **54**(7), 4717-4733.
- GARBINCIUS, J. F. & ELROD, J. W. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. *Physiol Rev*, 2022, **102**(2), 893-992.
- GARCIA, N., ZAZUETA, C., MARTINEZ-ABUNDIS, E., PAVON, N. & CHAVEZ, E. Cyclosporin A is unable to inhibit carboxyatractyloside-induced permeability transition in aged mitochondria. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2009, **149**(3), 374-381.

- GARNOL, T., ENDLICHER, R., KUČERA, O., DRAHOTA, Z. & ČERVINKOVÁ, Z. Impairment of mitochondrial function of rat hepatocytes by high fat diet and oxidative stress. *Physiological research*, 2014, **63**(2), 271-274.
- GAUBA, E., GUO, L. & DU, H. Cyclophilin D Promotes Brain Mitochondrial F1FO ATP Synthase Dysfunction in Aging Mice. *J Alzheimers Dis*, 2017, **55**(4), 1351-1362.
- GERLE, C. On the structural possibility of pore-forming mitochondrial FoF1 ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1857**(8), 1191-1196.
- GIORGI, C., ROMAGNOLI, A., PINTON, P. & RIZZUTO, R. Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr Mol Med*, 2008, **8**(2), 119-130.
- GIORGIO, V., BISETTO, E., SORIANO, M. E., DABBENI-SALA, F., BASSO, E., PETRONILLI, V., FORTE, M. A., BERNARDI, P. & LIPPE, G. Cyclophilin D modulates mitochondrial FOF1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem*, 2009, **284**(49), 33982-33988.
- GIORGIO, V., BURCHELL, V., SCHIAVONE, M., BASSOT, C., MINERVINI, G., PETRONILLI, V., ARGENTON, F., FORTE, M., TOSATTO, S., LIPPE, G. & BERNARDI, P. Ca²⁺ binding to F-ATP synthase beta subunit triggers the mitochondrial permeability transition. *EMBO Rep*, 2017, **18**(7), 1065-1076.
- GIORGIO, V., GUO, L., BASSOT, C., PETRONILLI, V. & BERNARDI, P. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium*, 2018, **70**56-63.
- GIORGIO, V., VON STOCKUM, S., ANTONIEL, M., FABBRO, A., FOGOLARI, F., FORTE, M., GLICK, G. D., PETRONILLI, V., ZORATTI, M., SZABO, I., LIPPE, G. & BERNARDI, P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(15), 5887-5892.
- GIZATULLINA, Z. Z., CHEN, Y., ZIERZ, S. & GELLERICH, F. N. Effects of extramitochondrial ADP on permeability transition of mouse liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1706**(1-2), 98-104.
- GNAIGER, E., STEINLECHNER-MARAN, R., MENDEZ, G., EBERL, T. & MARGREITER, R. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr*, 1995, **27**(6), 583-596.
- GO, Y. M. & JONES, D. P. Redox theory of aging: implications for health and disease. *Clin Sci (Lond)*, 2017, **131**(14), 1669-1688.
- GODOY, J. A., RIOS, J. A., PICON-PAGES, P., HERRERA-FERNANDEZ, V., SWABY, B., CREPIN, G., VICENTE, R., FERNANDEZ-FERNANDEZ, J. M. & MUNOZ, F. J. Mitostasis, Calcium and Free Radicals in Health, Aging and Neurodegeneration. *Biomolecules*, 2021, **11**(7).
- GOGLIA, F., MORENO, M. & LANNI, A. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett*, 1999, **452**(3), 115-120.
- GOGVADZE, V., WALTER, P. B. & AMES, B. N. The role of Fe²⁺-induced lipid peroxidation in the initiation of the mitochondrial permeability transition. *Arch Biochem Biophys*, 2003, **414**(2), 255-260.
- GOLIA, B., SINGH, H. R. & TIMINSZKY, G. Poly-ADP-ribosylation signaling during DNA damage repair. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2015, **20**440-457.
- GOMES, A. P., PRICE, N. L., LING, A. J., MOSLEHI, J. J., MONTGOMERY, M. K., RAJMAN, L., WHITE, J. P., TEODORO, J. S., WRANN, C. D., HUBBARD, B. P., MERCKEN, E. M., PALMEIRA, C. M., DE CABO, R., ROLO, A. P., TURNER, N., BELL, E. L. & SINCLAIR, D. A. Declining NAD⁺ induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*, 2013, **155**(7), 1624-1638.
- GONCALVES, I. O., PASSOS, E., DIOGO, C. V., ROCHA-RODRIGUES, S., SANTOS-ALVES, E., OLIVEIRA, P. J., ASCENSAO, A. & MAGALHAES, J. Exercise mitigates mitochondrial permeability transition pore and quality control mechanisms alterations in nonalcoholic steatohepatitis. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2016, **41**(3), 298-306.
- GONZALEZ-FREIRE, M., DE CABO, R., BERNIER, M., SOLLOTT, S. J., FABBRI, E., NAVAS, P. & FERRUCCI, L. Reconsidering the Role of Mitochondria in Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2015, **70**(11), 1334-1342.
- GOODELL, S. & CORTOPASSI, G. Analysis of oxygen consumption and mitochondrial permeability with age in mice. *Mech Ageing Dev*, 1998, **101**(3), 245-256.
- GORDAN, R., FEFELOVA, N., GWATHMEY, J. K. & XIE, L. H. Involvement of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in cardiac arrhythmias: Evidence from cyclophilin D knockout mice. *Cell Calcium*, 2016, **60**(6), 363-372.
- GORLACH, A., BERTRAM, K., HUDECOVA, S. & KRIZANOVA, O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol*, 2015, **6**260-271.

- GOUSPILLOU, G., SGARIOTO, N., KAPCHINSKY, S., PURVES-SMITH, F., NORRIS, B., PION, C. H., BARBAT-ARTIGAS, S., LEMIEUX, F., TAIVASSALO, T., MORAIS, J. A., AUBERTIN-LEHEUDRE, M. & HEPPLER, R. T. Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans. *FASEB J*, 2014, **28**(4), 1621-1633.
- GRANGER, D. N. & KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*, 2015, **6**524-551.
- GREEN, D. R., GALLUZZI, L. & KROEMER, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 2011, **333**(6046), 1109-1112.
- GREK, C. L. & TEW, K. D. Redox metabolism and malignancy. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, **10**(4), 362-368.
- GRIFFITHS, E. J. & HALESTRAP, A. P. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, **25**(12), 1461-1469.
- GRIFFITHS, E. J. & HALESTRAP, A. P. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*, 1995, **307** (Pt 1)93-98.
- GRUNDMANOVÁ, M., JARKOVSKÁ, D., SÜß, A., TŮMA, Z., MARKOVÁ, M., GRUNDMAN, Z., EL-KADI, A., ČEDÍKOVÁ, M., ŠTENGL, M. & KUNCOVÁ, J. Propofol-induced mitochondrial and contractile dysfunction of the rat ventricular myocardium. *Physiol Res*, 2016, **65**(Suppl 5), S601-s609.
- GUERRIERI, F., VENDEMIALE, G., TURTURRO, N., FRATELLO, A., FURIO, A., MUOLO, L., GRATTAGLIANO, I. & PAPA, S. Alteration of mitochondrial F0F1 ATP synthase during aging. Possible involvement of oxygen free radicals. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, **786**62-71.
- GUIGAS, B., DETAILLE, D., CHAUVIN, C., BATANDIER, C., DE OLIVEIRA, F., FONTAINE, E. & LEVERVE, X. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J*, 2004, **382**(Pt 3), 877-884.
- GUNTER, T. E. & PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, 1990, **258**(5 Pt 1), C755-786.
- GUNTER, T. E., YULE, D. I., GUNTER, K. K., ELISEEV, R. A. & SALTER, J. D. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*, 2004, **567**(1), 96-102.
- GUTIERREZ-AGUILAR, M. & BAINES, C. P. Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1850**(10), 2041-2047.
- GUTIERREZ-AGUILAR, M., DOUGLAS, D. L., GIBSON, A. K., DOMEIER, T. L., MOLKENTIN, J. D. & BAINES, C. P. Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, **72**316-325.
- HACKENBROCK, C. R. & CAPLAN, A. I. Ion-induced ultrastructural transformations in isolated mitochondria. The energized uptake of calcium. *J Cell Biol*, 1969, **42**(1), 221-234.
- HAFNER, A. V., DAI, J., GOMES, A. P., XIAO, C. Y., PALMEIRA, C. M., ROSENZWEIG, A. & SINCLAIR, D. A. Regulation of the mPTP by SIRT3-mediated deacetylation of CypD at lysine 166 suppresses age-related cardiac hypertrophy. *Aging (Albany NY)*, 2010, **2**(12), 914-923.
- HALECKOVA, A., BENEK, O., ZEMANOVA, L., DOLEZAL, R. & MUSILEK, K. Small-molecule inhibitors of cyclophilin D as potential therapeutics in mitochondria-related diseases. *Med Res Rev*, 2022, **42**(5), 1822-1855.
- HALESTRAP, A. P. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J*, 1991, **278** (Pt 3)715-719.
- HALESTRAP, A. P. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans*, 2010, **38**(4), 841-860.
- HALESTRAP, A. P. The C Ring of the F1Fo ATP Synthase Forms the Mitochondrial Permeability Transition Pore: A Critical Appraisal. *Front Oncol*, 2014, **4**234.
- HALESTRAP, A. P., CLARKE, S. J. & JAVADOV, S. A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 2004, **61**(3), 372-385.
- HALESTRAP, A. P. & DAVIDSON, A. M. Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J*, 1990, **268**(1), 153-160.
- HALESTRAP, A. P. & RICHARDSON, A. P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, **78**129-141.

- HALESTRAP, A. P., WOODFIELD, K. Y. & CONNERN, C. P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem*, 1997, **272**(6), 3346-3354.
- HAUSENLOY, D., WYNNE, A., DUCHEN, M. & YELLON, D. Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation*, 2004, **109**(14), 1714-1717.
- HAUSENLOY, D. J., DUCHEN, M. R. & YELLON, D. M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2003, **60**(3), 617-625.
- HAWORTH, R. A. & HUNTER, D. R. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys*, 1979, **195**(2), 460-467.
- HAYNES, V., TRAASETH, N. J., ELFERING, S., FUJISAWA, Y. & GIULIVI, C. Nitration of specific tyrosines in FoF1 ATP synthase and activity loss in aging. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, **298**(5), E978-987.
- HE, J., CARROLL, J., DING, S., FEARNLEY, I. M. & WALKER, J. E. Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017a, **114**(34), 9086-9091.
- HE, J., FORD, H. C., CARROLL, J., DING, S., FEARNLEY, I. M. & WALKER, J. E. Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017b, **114**(13), 3409-3414.
- HEPPLER, R. T. Impact of aging on mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 2016, **98**177-186.
- HERICK, K., KRAMER, R. & LUHRING, H. Patch clamp investigation into the phosphate carrier from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1997, **1321**(3), 207-220.
- HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, E. D., ALBA-BETANCOURT, C., ALONSO-CASTRO Á, J., ORTIZ-ALVARADO, R., LÓPEZ, J. A., MEZA-CARMEN, V. & SOLORIO-ALVARADO, C. R. Metformin, a biological and synthetic overview. *Bioorg Med Chem Lett*, 2023, **86**129241.
- HOFER, T., SERVAIS, S., SEO, A. Y., MARZETTI, E., HIONA, A., UPADHYAY, S. J., WOHLGEMUTH, S. E. & LEEUWENBURGH, C. Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: effects of aging and lifelong calorie restriction. *Mech Ageing Dev*, 2009, **130**(5), 297-307.
- HOFFMANN, B., STOCKL, A., SCHLAME, M., BEYER, K. & KLINGENBERG, M. The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *J Biol Chem*, 1994, **269**(3), 1940-1944.
- HOU, T., WANG, X., MA, Q. & CHENG, H. Mitochondrial flashes: new insights into mitochondrial ROS signalling and beyond. *J Physiol*, 2014, **592**(17), 3703-3713.
- HUNDAL, R. S., KRSSAK, M., DUFOUR, S., LAURENT, D., LEBON, V., CHANDRAMOULI, V., INZUCCHI, S. E., SCHUMANN, W. C., PETERSEN, K. F., LANDAU, B. R. & SHULMAN, G. I. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2000, **49**(12), 2063-2069.
- HUNTER, D. R. & HAWORTH, R. A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 1979a, **195**(2), 453-459.
- HUNTER, D. R. & HAWORTH, R. A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch Biochem Biophys*, 1979b, **195**(2), 468-477.
- HUNTER, D. R., HAWORTH, R. A. & SOUTHWARD, J. H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem*, 1976, **251**(16), 5069-5077.
- HUNTER, F. E., JR. & FORD, L. Inactivation of oxidative and phosphorylative systems in mitochondria by preincubation with phosphate and other ions. *J Biol Chem*, 1955, **216**(1), 357-369.
- HURST, S., HOEK, J. & SHEU, S. S. Mitochondrial Ca(2+) and regulation of the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr*, 2017, **49**(1), 27-47.
- CHABI, B., LJUBICIC, V., MENZIES, K. J., HUANG, J. H., SALEEM, A. & HOOD, D. A. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Ageing Cell*, 2008, **7**(1), 2-12.
- CHALMERS, S. & NICHOLLS, D. G. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J Biol Chem*, 2003, **278**(21), 19062-19070.
- CHAPPELL, J. B. & CROFTS, A. R. Calcium Ion Accumulation and Volume Changes of Isolated Liver Mitochondria. Calcium Ion-Induced Swelling. *Biochem J*, 1965, **95**378-386.
- CHEN, C., KO, Y., DELANNOY, M., LUDTKE, S. J., CHIU, W. & PEDERSEN, P. L. Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*, 2004, **279**(30), 31761-31768.

- CHEN, D. F. & WANG, C. H. [The relationship between the opening of mitochondrial permeability transition pores of cultured hepatocytes with their apoptoses in a non-alcoholic fatty liver disease model]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2007, **15**(11), 837-839.
- CHEN, Q., WANG, K., JIANG, D., WANG, Y., XIAO, X., ZHU, N., LI, M., JIA, S. & WANG, Y. Blocking mPTP on Neural Stem Cells and Activating the Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha7 Subunit on Microglia Attenuate Abeta-Induced Neurotoxicity on Neural Stem Cells. *Neurochem Res*, 2016, **41**(6), 1483-1495.
- CHERNYAK, B. V. & BERNARDI, P. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem*, 1996, **238**(3), 623-630.
- CHINOPOULOS, C. & ADAM-VIZI, V. Modulation of the mitochondrial permeability transition by cyclophilin D: moving closer to F(0)-F(1) ATP synthase? *Mitochondrion*, 2012, **12**(1), 41-45.
- CHOUCHANI, E. T., METHNER, C., NADTOCHIY, S. M., LOGAN, A., PELL, V. R., DING, S., JAMES, A. M., COCHEME, H. M., REINHOLD, J., LILLEY, K. S., PARTRIDGE, L., FEARNLEY, I. M., ROBINSON, A. J., HARTLEY, R. C., SMITH, R. A., KRIEG, T., BROOKES, P. S. & MURPHY, M. P. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med*, 2013, **19**(6), 753-759.
- CHOUCHANI, E. T., PELL, V. R., GAUDE, E., AKSENTIJEVIC, D., SUNDIER, S. Y., ROBB, E. L., LOGAN, A., NADTOCHIY, S. M., ORD, E. N. J., SMITH, A. C., EYASSU, F., SHIRLEY, R., HU, C. H., DARE, A. J., JAMES, A. M., ROGATTI, S., HARTLEY, R. C., EATON, S., COSTA, A. S. H., BROOKES, P. S., DAVIDSON, S. M., DUCHEN, M. R., SAEB-PARSY, K., SHATTOCK, M. J., ROBINSON, A. J., WORK, L. M., FREZZA, C., KRIEG, T. & MURPHY, M. P. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 2014, **515**(7527), 431-435.
- CHUNG, M. Y., PARK, H. J., MANAUTOU, J. E., KOO, S. I. & BRUNO, R. S. Green tea extract protects against nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice by decreasing oxidative and nitrate stress responses induced by proinflammatory enzymes. *J Nutr Biochem*, 2012, **23**(4), 361-367.
- ICHAS, F., JOUAVILLE, L. S. & MAZAT, J. P. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*, 1997, **89**(7), 1145-1153.
- ICHAS, F. & MAZAT, J. P. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1366**(1-2), 33-50.
- IMAI, S. & GUARENTE, L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol*, 2014, **24**(8), 464-471.
- IZZO, V., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., SICA, V., KROEMER, G. & GALLUZZI, L. Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol*, 2016, **26**(9), 655-667.
- JACOBSON, J. & DUCHEN, M. R. Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes--requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of the permeability transition pore. *J Cell Sci*, 2002, **115**(Pt 6), 1175-1188.
- JAESCHKE, H., MCGILL, M. R. & RAMACHANDRAN, A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*, 2012, **44**(1), 88-106.
- JAHANGIR, A., OZCAN, C., HOLMUHAMEDOV, E. L. & TERZIC, A. Increased calcium vulnerability of senescent cardiac mitochondria: protective role for a mitochondrial potassium channel opener. *Mech Ageing Dev*, 2001, **122**(10), 1073-1086.
- JANG, S., LEWIS, T. S., POWERS, C., KHUCHUA, Z., BAINES, C. P., WIPF, P. & JAVADOV, S. Elucidating Mitochondrial Electron Transport Chain Supercomplexes in the Heart During Ischemia-Reperfusion. *Antioxid Redox Signal*, 2017, **27**(1), 57-69.
- JAVADOV, S., HUNTER, J. C., BARRETO-TORRES, G. & PARODI-RULLAN, R. Targeting the mitochondrial permeability transition: cardiac ischemia-reperfusion versus carcinogenesis. *Cell Physiol Biochem*, 2011, **27**(3-4), 179-190.
- JAVADOV, S. & KARMAZYN, M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem*, 2007, **20**(1-4), 1-22.
- JAVADOV, S. A., LIM, K. H., KERR, P. M., SULEIMAN, M. S., ANGELINI, G. D. & HALESTRAP, A. P. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res*, 2000, **45**(2), 360-369.
- JIMENEZ-SAENZ, M. & MARTINEZ-SANCHEZ MDEL, C. Acute hepatitis associated with the use of green tea infusions. *J Hepatol*, 2006, **44**(3), 616-617.

- JOHNSON, M. S., MOORE, R. L. & BROWN, D. A. Sex differences in myocardial infarct size are abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **290**(6), H2644-2647.
- KALDERON, B., HERMESH, O. & BAR-TANA, J. Mitochondrial permeability transition is induced by in vivo thyroid hormone treatment. *Endocrinology*, 1995, **136**(8), 3552-3556.
- KALE, J., OSTERLUND, E. J. & ANDREWS, D. W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*, 2018, **25**(1), 65-80.
- KALOUS, M. & DRAHOTA, Z. The role of mitochondria in aging. *Physiol Res*, 1996, **45**(5), 351-359.
- KANG, M., LI, S., ZHONG, D., YANG, Z. & LI, P. [Hepatocyte apoptosis and mitochondrial permeability transition pore opening in rats with nonalcoholic fatty liver]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2013, **33**(7), 1062-1066.
- KARCH, J., BROUND, M. J., KHALIL, H., SARGENT, M. A., LATCHMAN, N., TERADA, N., PEIXOTO, P. M. & MOLKENTIN, J. D. Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD. *Sci Adv*, 2019, **5**(8), eaaw4597.
- KARCH, J. & MOLKENTIN, J. D. Identity of the elusive mitochondrial permeability transition pore: what it might be, what it was, and what it still could be. *Current Opinion in Physiology*, 2018, (3), 57-62.
- KASPARINSKY, F. O. & VINOGRADOV, A. D. Slow Ca²⁺-induced inactive/active transition of the energy-dependent Ca²⁺ transporting system of rat liver mitochondria: clue for Ca²⁺ influx cooperativity. *FEBS Lett*, 1996, **389**(3), 293-296.
- KAVIARASAN, S., RAMAMURTHY, N., GUNASEKARAN, P., VARALAKSHMI, E. & ANURADHA, C. V. Epigallocatechin-3-gallate(-)protects Chang liver cells against ethanol-induced cytotoxicity and apoptosis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007, **100**(3), 151-156.
- KAVIARASAN, S., SUNDARAPANDIYAN, R. & ANURADHA, C. V. Epigallocatechin gallate, a green tea phytochemical, attenuates alcohol-induced hepatic protein and lipid damage. *Toxicol Mech Methods*, 2008, **18**(8), 645-652.
- KAWAMATA, H. & MANFREDI, G. Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech Ageing Dev*, 2010, **131**(7-8), 517-526.
- KEEP, M., ELMER, E., FONG, K. S. & CSISZAR, K. Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. *Brain Res*, 2001, **894**(2), 327-331.
- KIM, H. S., QUON, M. J. & KIM, J. A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol*, 2014, 2187-195.
- KIM, J. S., HE, L., QIAN, T. & LEMASTERS, J. J. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med*, 2003, **3**(6), 527-535.
- KIM, J. S., JIN, Y. & LEMASTERS, J. J. Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **290**(5), H2024-2034.
- KINCAID, B. & BOSSY-WETZEL, E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*, 2013, **5**, 48.
- KINNALLY, K. W., CAMPO, M. L. & TEDESCHI, H. Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts. *J Bioenerg Biomembr*, 1989, **21**(4), 497-506.
- KLINGENBERG, M. Cardiolipin and mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1788**(10), 2048-2058.
- KLIP, A. & LEITER, L. A. Cellular mechanism of action of metformin. *Diabetes Care*, 1990, **13**(6), 696-704.
- KNOBLOCH, J. J., NELSON, A. R., KOPER, I., JAMES, M. & MCGILLIVRAY, D. J. Oxidative Damage to Biomimetic Membrane Systems: In Situ Fe(II)/Ascorbate Initiated Oxidation and Incorporation of Synthetic Oxidized Phospholipids. *Langmuir*, 2015, **31**(46), 12679-12687.
- KO, Y. H., DELANNOY, M., HULLIHEN, J., CHIU, W. & PEDERSEN, P. L. Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*, 2003, **278**(14), 12305-12309.
- 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*, 2004, **427**(6973), 461-465.
- KOWALTOWSKI, A. J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Braz J Med Biol Res*, 2000, **33**(2), 241-250.

- 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*, 1996a, **271**(6), 2929-2934.
- 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*, 1996b, **378**(2), 150-152.
- KOWALTOWSKI, A. J., CASTILHO, R. F. & VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*, 2001, **495**(1-2), 12-15.
- KOWALTOWSKI, A. J., DE SOUZA-PINTO, N. C., CASTILHO, R. F. & VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 2009, **47**(4), 333-343.
- KOWALTOWSKI, A. J. & VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 1999, **26**(3-4), 463-471.
- KRAJCOVA, A., WALDAUF, P., ANDEL, M. & DUSKA, F. Propofol infusion syndrome: a structured review of experimental studies and 153 published case reports. *Crit Care*, 2015, **19**398.
- KRESTININA, O., AZARASHVILI, T., BABURINA, Y., GALVITA, A., GRACHEV, D., STRICKER, R. & REISER, G. In aging, the vulnerability of rat brain mitochondria is enhanced due to reduced level of 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase (CNP) and subsequently increased permeability transition in brain mitochondria in old animals. *Neurochem Int*, 2015, **80**41-50.
- KRISTAL, B. S. & YU, B. P. Dietary restriction augments protection against induction of the mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med*, 1998, **24**(7-8), 1269-1277.
- KRIVAKOVA, P., LABAJOVA, A., CERVINKOVA, Z. & DRAHOTA, Z. Inhibitory effect of t-butyl hydroperoxide on mitochondrial oxidative phosphorylation in isolated rat hepatocytes. *Physiol Res*, 2007, **56**(1), 137-140.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. & BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 2007, **87**(1), 99-163.
- KROEMER, G. & REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, 2000, **6**(5), 513-519.
- KRONER, H. Ca²⁺ ions, an allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 1986, **251**(2), 525-535.
- KUCERA, O., MEZERA, V., MORAVCOVA, A., ENDLICHER, R., LOTKOVA, H., DRAHOTA, Z. & CERVINKOVA, Z. In vitro toxicity of epigallocatechin gallate in rat liver mitochondria and hepatocytes. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, **2015**476180.
- KUČERA, O., LOTKOVÁ, H., KŘIVÁKOVÁ, P., KOTRAŠ, T., GARNOL, T., ENDLICHER, R., MAZUROVÁ, Y., ROUŠAR, T. & ČERVINKOVÁ, Z. Zavedení modelu nealkoholického ztukovatění jater na potkanech. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie*, 2008, **62**(2), 123-123.
- KUMAR, P. & KUMAR, A. Neuroprotective effect of cyclosporine and FK506 against 3-nitropropionic acid induced cognitive dysfunction and glutathione redox in rat: possible role of nitric oxide. *Neurosci Res*, 2009, **63**(4), 302-314.
- KUZU, N., BAHCECIOGLU, I. H., DAGLI, A. F., OZERCAN, I. H., USTUNDAG, B. & SAHIN, K. Epigallocatechin gallate attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by high fat diet. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, **23**(8 Pt 2), e465-470.
- KWAK, H. B., SONG, W. & LAWLER, J. M. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEB J*, 2006, **20**(6), 791-793.
- KWON, Y., KIM, J., LEE, C. Y. & KIM, H. Expression of SIRT1 and SIRT3 varies according to age in mice. *Anat Cell Biol*, 2015, **48**(1), 54-61.
- LAFRANCE, R., BRUSTOVETSKY, N., SHERBURNE, C., DELONG, D. & DUBINSKY, J. M. Age-related changes in regional brain mitochondria from Fischer 344 rats. *Aging Cell*, 2005, **4**(3), 139-145.
- LAM, C. K., ZHAO, W., LIU, G. S., CAI, W. F., GARDNER, G., ADLY, G. & KRANIAS, E. G. HAX-1 regulates cyclophilin-D levels and mitochondria permeability transition pore in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, **112**(47), E6466-6475.
- LAMBERT, J. D. & ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys*, 2010, **501**(1), 65-72.
- LE BRAS, M., CLEMENT, M. V., PERVAIZ, S. & BRENNER, C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol*, 2005, **20**(1), 205-219.
- LE QUOC, D., LE QUOC, K. & GAUDEMER, Y. Energy-dependent variation of thiol groups reactivity or accessibility in rat liver mitochondria, revealed by measurements of labelled thiol reagents incorporation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976, **68**(1), 106-113.

- LE QUOC, D., LE QUOC, K. & GAUDEMER, Y. Influence of the energetic state of rat liver mitochondria on the sensitivity of the phosphate carrier towards SH reagents. *Biochim Biophys Acta*, 1977, **462**(1), 131-140.
- LEBEDEV, I., NEMAJEROVA, A., FODA, Z. H., KORNAJ, M., TONG, M., MOLL, U. M. & SEELIGER, M. A. A Novel In Vitro CypD-Mediated p53 Aggregation Assay Suggests a Model for Mitochondrial Permeability Transition by Chaperone Systems. *J Mol Biol*, 2016, **428**(20), 4154-4167.
- LEE, E. K., JUNG, K. J., CHOI, J., KIM, H. J., HAN, Y. K., JEONG, K. S., JI, A. R., PARK, J. K., YU, B. P. & CHUNG, H. Y. Molecular basis for age-related changes in ileum: involvement of Bax/caspase-dependent mitochondrial apoptotic signaling. *Exp Gerontol*, 2010, **45**(12), 970-976.
- LEHNINGER, A. L. Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. *J Biol Chem*, 1959, **234**2465-2471.
- LEHNINGER, A. L. Stimulating effect of thyroxine in contraction of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1960a, **37**387-388.
- LEHNINGER, A. L. Thyroxine and the swelling and contraction cycle in mitochondria. *Ann N Y Acad Sci*, 1960b, **86**484-493.
- LEHNINGER, A. L. Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation. *Physiol Rev*, 1962, **42**467-517.
- LEHNINGER, A. L. & REMMERT, L. F. An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation. *J Biol Chem*, 1959, **234**2459-2464.
- LEIST, M., SINGLE, B., CASTOLDI, A. F., KUHNLE, S. & NICOTERA, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*, 1997, **185**(8), 1481-1486.
- LEMASTERS, J. J., NIEMINEN, A. L., QIAN, T., TROST, L. C., ELMORE, S. P., NISHIMURA, Y., CROWE, R. A., CASCIO, W. E., BRADHAM, C. A., BRENNER, D. A. & HERMAN, B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1366**(1-2), 177-196.
- LEMASTERS, J. J., QIAN, T., HE, L., KIM, J. S., ELMORE, S. P., CASCIO, W. E. & BRENNER, D. A. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 2002, **4**(5), 769-781.
- LEMOINE, S., PILLOT, B., ROGNANT, N., AUGEUL, L., RAYBERIN, M., VARENNE, A., LAVILLE, M., OVIZE, M. & JUILLARD, L. Postconditioning with cyclosporine a reduces early renal dysfunction by inhibiting mitochondrial permeability transition. *Transplantation*, 2015, **99**(4), 717-723.
- LEUNG, A. W. & HALESTRAP, A. P. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1777**(7-8), 946-952.
- LEUNG, A. W., VARANYUWATANA, P. & HALESTRAP, A. P. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem*, 2008, **283**(39), 26312-26323.
- LI, B., CHAUVIN, C., DE PAULIS, D., DE OLIVEIRA, F., GHARIB, A., VIAL, G., LABLANCHE, S., LEVERVE, X., BERNARDI, P., OVIZE, M. & FONTAINE, E. Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1817**(9), 1628-1634.
- LI, W., NIE, S., YU, Q. & XIE, M. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of human hepatoma cells by mitochondrial pathways related to reactive oxygen species. *J Agric Food Chem*, 2009, **57**(15), 6685-6691.
- LIN, M. T. & BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006, **443**(7113), 787-795.
- LIU, L., ZHU, J., BRINK, P. R., GLASS, P. S. & REBECCHI, M. J. Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2011, **55**(5), 622-630.
- LJUBICIC, V., MENZIES, K. J. & HOOD, D. A. Mitochondrial dysfunction is associated with a pro-apoptotic cellular environment in senescent cardiac muscle. *Mech Ageing Dev*, 2010, **131**(2), 79-88.
- LORES-ARNAIZ, S., LOMBARDI, P., KARADAYIAN, A. G., ORGAMBIDE, F., CICERCHIA, D. & BUSTAMANTE, J. Brain cortex mitochondrial bioenergetics in synaptosomes and non-synaptic mitochondria during aging. *Neurochem Res*, 2016, **41**(1-2), 353-363.
- MAMMUCARI, C., RAFFAELLO, A., VECCELLIO REANE, D., GHERARDI, G., DE MARIO, A. & RIZZUTO, R. Mitochondrial calcium uptake in organ physiology: from molecular mechanism to animal models. *Pflugers Arch*, 2018, **470**(8), 1165-1179.

- MARCIL, M., BOURDUAS, K., ASCAH, A. & BURELLE, Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca²⁺-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **290**(4), H1549-1557.
- MARQUES-ALEIXO, I., ROCHA-RODRIGUES, S., SANTOS-ALVES, E., COXITO, P. M., PASSOS, E., OLIVEIRA, P. J., MAGALHAES, J. & ASCENSAO, A. In vitro salicylate does not further impair aging-induced brain mitochondrial dysfunction. *Toxicology*, 2012, **302**(1), 51-59.
- MARTIN, L. J. Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012, **107**355-415.
- MARTIN, L. J., FANCELLI, D., WONG, M., NIEDZWIECKI, M., BALLARINI, M., PLYTE, S. & CHANG, Q. GNX-4728, a novel small molecule drug inhibitor of mitochondrial permeability transition, is therapeutic in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci*, 2014a, **8**433.
- MARTIN, L. J., SEMENKOW, S., HANAFORD, A. & WONG, M. Mitochondrial permeability transition pore regulates Parkinson's disease development in mutant alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 2014b, **35**(5), 1132-1152.
- MARTINIS, P., ZAGO, L., MARITATI, M., BATTAGLIA, V., GRANCARA, S., RIZZOLI, V., AGOSTINELLI, E., BRAGADIN, M. & TONINELLO, A. Interactions of melatonin with mammalian mitochondria. Reducer of energy capacity and amplifier of permeability transition. *Amino Acids*, 2012, **42**(5), 1827-1837.
- MARZETTI, E., WOHLGEMUTH, S. E., LEES, H. A., CHUNG, H. Y., GIOVANNINI, S. & LEEUWENBURGH, C. Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mech Ageing Dev*, 2008, **129**(9), 542-549.
- MARZO, I., BRENNER, C., ZAMZAMI, N., SUSIN, S. A., BEUTNER, G., BRDICZKA, D., REMY, R., XIE, Z. H., REED, J. C. & KROEMER, G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*, 1998, **187**(8), 1261-1271.
- MASSARI, S. & AZZONE, G. F. The equivalent pore radius of intact and damaged mitochondria and the mechanism of active shrinkage. *Biochim Biophys Acta*, 1972, **283**(1), 23-29.
- MATHER, M. & ROTTENBERG, H. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **273**(2), 603-608.
- MATHER, M. W. & ROTTENBERG, H. The inhibition of calcium signaling in T lymphocytes from old mice results from enhanced activation of the mitochondrial permeability transition pore. *Mech Ageing Dev*, 2002, **123**(6), 707-724.
- MATHUPALA, S. P., KO, Y. H. & PEDERSEN, P. L. The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1797**(6-7), 1225-1230.
- MATTSON, M. P. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*, 2007, **6**(3), 337-350.
- MCCORMACK, J. G. & DENTON, R. M. The role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism and energy production in rat heart. *Mol Cell Biochem*, 1989, **89**(2), 121-125.
- MCCORMACK, J. G., HALESTRAP, A. P. & DENTON, R. M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev*, 1990, **70**(2), 391-425.
- MCENERY, M. W., SNOWMAN, A. M., TRIFILETTI, R. R. & SNYDER, S. H. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, **89**(8), 3170-3174.
- MCSTAY, G. P., CLARKE, S. J. & HALESTRAP, A. P. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J*, 2002, **367**(Pt 2), 541-548.
- MENEZES-FILHO, S. L., AMIGO, I., PRADO, F. M., FERREIRA, N. C., KOIKE, M. K., PINTO, I. F. D., MIYAMOTO, S., MONTERO, E. F. S., MEDEIROS, M. H. G. & KOWALTOWSKI, A. J. Caloric restriction protects livers from ischemia/reperfusion damage by preventing Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med*, 2017, **110**219-227.
- MENG, Q., VELALAR, C. N. & RUAN, R. Regulating the age-related oxidative damage, mitochondrial integrity, and antioxidative enzyme activity in Fischer 344 rats by supplementation of the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. *Rejuvenation Res*, 2008, **11**(3), 649-660.
- MEZERA, V., ENDLICHER, R., KUCERA, O., SOBOTKA, O., DRAHOTA, Z. & CERVINKOVA, Z. Effects of Epigallocatechin Gallate on Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Mitochondrial Dysfunction in Rat Liver Mitochondria and Hepatocytes. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, **2016**7573131.
- MEZERA, V., KUCERA, O., MORAVCOVA, A., PETEROVA, E. & CERVINKOVA, Z. The effect of epigallocatechin gallate on hepatocytes isolated from normal and partially hepatectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, **92**(6), 512-517.

- MILEROVA, M., DRAHOTA, Z., CHYTILOVA, A., TAUCHMANNOVA, K., HOUSTEK, J. & OSTADAL, B. Sex difference in the sensitivity of cardiac mitochondrial permeability transition pore to calcium load. *Mol Cell Biochem*, 2016, **412**(1-2), 147-154.
- MILEROVA, M., CHARVATOVA, Z., SKARKA, L., OSTADALOVA, I., DRAHOTA, Z., FIALOVA, M. & OSTADAL, B. Neonatal cardiac mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*, 2010, **335**(1-2), 147-153.
- MILLER, R. J. Mitochondria - the Kraken wakes! *Trends Neurosci*, 1998, **21**(3), 95-97.
- MNATSAKANYAN, N., LLAGUNO, M. C., YANG, Y., YAN, Y., WEBER, J., SIGWORTH, F. J. & JONAS, E. A. A mitochondrial megachannel resides in monomeric F1FO ATP synthase. *Nat Commun*, 2019, **10**(1), 5823.
- MOOKERJEE, S. A., DIVAKARUNI, A. S., JASTROCH, M. & BRAND, M. D. Mitochondrial uncoupling and lifespan. *Mech Ageing Dev*, 2010, **131**(7-8), 463-472.
- MORAVKOVA, A., CERVINKOVA, Z., KUCERA, O., MEZERA, V. & LOTKOVA, H. Antioxidative effect of epigallocatechin gallate against D-galactosamine-induced injury in primary culture of rat hepatocytes. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2014, **57**(1), 3-8.
- MORCIANO, G., BONORA, M., CAMPO, G., AQUILA, G., RIZZO, P., GIORGI, C., WIECKOWSKI, M. R. & PINTON, P. Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. *Adv Exp Med Biol*, 2017, **982**169-189.
- MRACEK, T., JESINA, P., KRIVAKOVA, P., BOLEHOVSKA, R., CERVINKOVA, Z., DRAHOTA, Z. & HOUSTEK, J. Time-course of hormonal induction of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase biogenesis in rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1726**(2), 217-223.
- MUKHERJEE, R., MARENINOVA, O. A., ODINOKOVA, I. V., HUANG, W., MURPHY, J., CHVANOV, M., JAVED, M. A., WEN, L., BOOTH, D. M., CANE, M. C., AWAIS, M., GAVILLET, B., PRUSS, R. M., SCHALLER, S., MOLKENTIN, J. D., TEPIKIN, A. V., PETERSEN, O. H., PANDOL, S. J., GUKOVSKY, I., CRIDDLE, D. N., GUKOVSKAYA, A. S., SUTTON, R. & UNIT, N. P. B. R. Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. *Gut*, 2016, **65**(8), 1333-1346.
- MUNOZ-PINEDO, C., GUIO-CARRION, A., GOLDSTEIN, J. C., FITZGERALD, P., NEWMAYER, D. D. & GREEN, D. R. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(31), 11573-11578.
- MURPHY, E. & STEENBERGEN, C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2007, **75**(3), 478-486.
- NEGINSKAYA, M. A., SOLESIO, M. E., BEREZHNYAYA, E. V., AMODEO, G. F., MNATSAKANYAN, N., JONAS, E. A. & PAVLOV, E. V. ATP Synthase C-Subunit-Deficient Mitochondria Have a Small Cyclosporine A-Sensitive Channel, but Lack the Permeability Transition Pore. *Cell Rep*, 2019, **26**(1), 11-17 e12.
- NESSI, S., VENTRELLA, V., TROMBETTI, F., PIRINI, M. & PAGLIARANI, A. Mini-review. Nitrite as novel pore-shutter: hints from the preferential inhibition of the mitochondrial ATP-ase when activated by Ca²⁺. *Biochimica*, 2017, **44**57-63.
- NGUYEN, T. T., STEVENS, M. V., KOHR, M., STEENBERGEN, C., SACK, M. N. & MURPHY, E. Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 2011, **286**(46), 40184-40192.
- NICOLAI, S., ROSSI, A., DI DANIELE, N., MELINO, G., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M. & RASCHELLA, G. DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging (Albany NY)*, 2015, **7**(12), 1050-1065.
- NICOLLI, A., BASSO, E., PETRONILLI, V., WENGER, R. M. & BERNARDI, P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem*, 1996, **271**(4), 2185-2192.
- 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*, 1993, **32**(16), 4461-4465.
- NICHOLLS, D. G. & FERGUSON, S. J. *Bioenergetics 4*. Amsterdam: Academic Press, 2013.
- NORENBERG, M. D. & RAO, K. V. The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochem Int*, 2007, **50**(7-8), 983-997.
- NOVGORODOV, S. A., GUDZ, T. I., MILGROM, Y. M. & BRIERLEY, G. P. The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A. *J Biol Chem*, 1992, **267**(23), 16274-16282.

- OHLENDIECK, K., RIESINGER, I., ADAMS, V., KRAUSE, J. & BRDICZKA, D. Enrichment and biochemical characterization of boundary membrane contact sites from rat-liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1986, **860**(3), 672-689.
- ONG, S. B., DONGWORTH, R. K., CABRERA-FUENTES, H. A. & HAUSENLOY, D. J. Role of the MPTP in conditioning the heart - translatability and mechanism. *Br J Pharmacol*, 2015, **172**(8), 2074-2084.
- ONG, S. B., SUBRAYAN, S., LIM, S. Y., YELLON, D. M., DAVIDSON, S. M. & HAUSENLOY, D. J. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 2010, **121**(18), 2012-2022.
- ORRENIUS, S., GOGVADZE, V. & ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **460**(1), 72-81.
- OSTADAL, B., DRAHOTA, Z., HOUSTEK, J., MILEROVA, M., OSTADALOVA, I., HLAVACKOVA, M. & KOLAR, F. Developmental and sex differences in cardiac tolerance to ischemia-reperfusion injury: the role of mitochondria (1). *Can J Physiol Pharmacol*, 2019, **97**(9), 808-814.
- OSTADAL, B., NETUKA, I., MALY, J., BESIK, J. & OSTADALOVA, I. Gender differences in cardiac ischemic injury and protection--experimental aspects. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009a, **234**(9), 1011-1019.
- OSTADAL, B., OSTADALOVA, I. & DHALLA, N. S. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev*, 1999, **79**(3), 635-659.
- OSTADAL, B., OSTADALOVA, I., KOLAR, F., CHARVATOVA, Z. & NETUKA, I. Ontogenetic development of cardiac tolerance to oxygen deprivation - possible mechanisms. *Physiol Res*, 2009b, **58 Suppl 2**S1-12.
- OSTADALOVA, I., OSTADAL, B., KOLAR, F., PARRATT, J. R. & WILSON, S. Tolerance to ischaemia and ischaemic preconditioning in neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, **30**(4), 857-865.
- OWEN, M. R., DORAN, E. & HALESTRAP, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*, 2000, **348 Pt 3**607-614.
- PAMPLONA, R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1777**(10), 1249-1262.
- PANDYA, J. D., GRONDIN, R., YONUTAS, H. M., HAGHNAZAR, H., GASH, D. M., ZHANG, Z. & SULLIVAN, P. G. Decreased mitochondrial bioenergetics and calcium buffering capacity in the basal ganglia correlates with motor deficits in a nonhuman primate model of aging. *Neurobiol Aging*, 2015, **36**(5), 1903-1913.
- PANEL, M. (2018) Étude de l'effet de nouveaux ligands de la cyclophiline D sur le pore de transition de perméabilité mitochondriale et de leur effet protecteur. Paris.
- PANEL, M., GHALEH, B. & MORIN, D. Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore? *Aging Cell*, 2018, **17**(4), e12793.
- PANOV, A., DIKALOV, S., SHALBUYEVA, N., HEMENDINGER, R., GREENAMYRE, J. T. & ROSENFELD, J. Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, **292**(2), C708-718.
- PANTIC, B., TREVISAN, E., CITTA, A., RIGOBELLO, M. P., MARIN, O., BERNARDI, P., SALVATORI, S. & RASOLA, A. Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) prevents ROS-induced cell death by assembling a hexokinase II-Src complex on the mitochondrial surface. *Cell Death Dis*, 2013, **4**e858.
- PARADIES, G., PARADIES, V., RUGGIERO, F. M. & PETROSILLO, G. Changes in the mitochondrial permeability transition pore in aging and age-associated diseases. *Mech Ageing Dev*, 2013, **134**(1-2), 1-9.
- PARADIES, G., PARADIES, V., RUGGIERO, F. M. & PETROSILLO, G. Cardiolipin and mitochondrial function in health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 2014, **20**(12), 1925-1953.
- PARADIES, G., PARADIES, V., RUGGIERO, F. M. & PETROSILLO, G. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells*, 2019, **8**(7).
- PARDO, A. C., RINALDI, G. J. & MOSCA, S. M. Mitochondrial calcium handling in normotensive and spontaneously hypertensive rats: correlation with systolic blood pressure levels. *Mitochondrion*, 2015, **20**75-81.
- PARK, S. H., OZDEN, O., JIANG, H., CHA, Y. I., PENNINGTON, J. D., AYKIN-BURNS, N., SPITZ, D. R., GIUS, D. & KIM, H. S. Sirt3, mitochondrial ROS, ageing, and carcinogenesis. *Int J Mol Sci*, 2011, **12**(9), 6226-6239.

- PATTERSON, H. C., GERBETH, C., THIRU, P., VOGTLE, N. F., KNOLL, M., SHAHSAFAEI, A., SAMOCHA, K. E., HUANG, C. X., HARDEN, M. M., SONG, R., CHEN, C., KAO, J., SHI, J., SALMON, W., SHAUL, Y. D., STOKES, M. P., SILVA, J. C., BELL, G. W., MACARTHUR, D. G., RULAND, J., MEISINGER, C. & LODISH, H. F. A respiratory chain controlled signal transduction cascade in the mitochondrial intermembrane space mediates hydrogen peroxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, **112**(42), E5679-5688.
- PAUL, M. K., MUKHOPADHYAY, R. K. & MUKHOPADHYAY, A. K. (2008) Characterization of rat liver mitochondrial permeability transition pore by using mitochondrial swelling assay. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Academic Journals.
- PEDERSEN, P. L., MATHUPALA, S., REMPEL, A., GESCHWIND, J. F. & KO, Y. H. Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1555**(1-3), 14-20.
- PESTANA, C. R., SILVA, C. H., PARDO-ANDREU, G. L., RODRIGUES, F. P., SANTOS, A. C., UYEMURA, S. A. & CURTI, C. Ca²⁺ binding to c-state of adenine nucleotide translocase (ANT)-surrounding cardiolipins enhances (ANT)-Cys(56) relative mobility: a computational-based mitochondrial permeability transition study. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1787**(3), 176-182.
- PETRONILLI, V., COSTANTINI, P., SCORRANO, L., COLONNA, R., PASSAMONTI, S. & BERNARDI, P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J Biol Chem*, 1994, **269**(24), 16638-16642.
- PETRONILLI, V., MIOTTO, G., CANTON, M., BRINI, M., COLONNA, R., BERNARDI, P. & DI LISA, F. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J*, 1999, **76**(2), 725-734.
- PETRONILLI, V., MIOTTO, G., CANTON, M., COLONNA, R., BERNARDI, P. & DI LISA, F. Imaging the mitochondrial permeability transition pore in intact cells. *Biofactors*, 1998, **8**(3-4), 263-272.
- PETRONILLI, V., SZABO, I. & ZORATTI, M. The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria. *FEBS Lett*, 1989, **259**(1), 137-143.
- PETROSILLO, G., CASANOVA, G., MATERA, M., RUGGIERO, F. M. & PARADIES, G. Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS Lett*, 2006, **580**(27), 6311-6316.
- PETROSILLO, G., MORO, N., PARADIES, V., RUGGIERO, F. M. & PARADIES, G. Increased susceptibility to Ca²⁺-induced permeability transition and to cytochrome c release in rat heart mitochondria with aging: effect of melatonin. *J Pineal Res*, 2010, **48**(4), 340-346.
- PETROSILLO, G., MORO, N., RUGGIERO, F. M. & PARADIES, G. Melatonin inhibits cardiolipin peroxidation in mitochondria and prevents the mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *Free Radic Biol Med*, 2009, **47**(7), 969-974.
- PFEIFFER, D. R., SCHMID, P. C., BEATRICE, M. C. & SCHMID, H. H. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca²⁺ plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. *J Biol Chem*, 1979, **254**(22), 11485-11494.
- PICARD, M., RITCHIE, D., THOMAS, M. M., WRIGHT, K. J. & HEPPLER, R. T. Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging Cell*, 2011, **10**(6), 1047-1055.
- PICARD, M., RITCHIE, D., WRIGHT, K. J., ROMESTAING, C., THOMAS, M. M., ROWAN, S. L., TAIVASSALO, T. & HEPPLER, R. T. Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers. *Aging Cell*, 2010, **9**(6), 1032-1046.
- PIOT, C., CROISILLE, P., STAAT, P., THIBAUT, H., RIOUFOL, G., MEWTON, N., ELBELGHITI, R., CUNG, T. T., BONNEFOY, E., ANGOULVANT, D., MACIA, C., RACZKA, F., SPORTOUCH, C., GAHIDE, G., FINET, G., ANDRE-FOUET, X., REVEL, D., KIRKORIAN, G., MONASSIER, J. P., DERUMEAUX, G. & OVIIZE, M. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2008, **359**(5), 473-481.
- PRASUN, P., GINEVIC, I. & OISHI, K. Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease and alcohol related liver disease. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2021, **64**.
- PRIAMI, C., DE MICHELE, G., COTELLI, F., CELLERINO, A., GIORGIO, M., PELICCI, P. G. & MIGLIACCIO, E. Modelling the p53/p66Shc Aging Pathway in the Shortest Living Vertebrate *Nothobranchius Furzeri*. *Aging Dis*, 2015, **6**(2), 95-108.
- QUINTANILLA, R. A., JIN, Y. N., VON BERNHARDI, R. & JOHNSON, G. V. Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. *Mol Neurodegener*, 2013, **845**.

- QUINTANILLA, R. A., TAPIA, C. & PEREZ, M. J. Possible role of mitochondrial permeability transition pore in the pathogenesis of Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **483**(4), 1078-1083.
- RAAFLAUB, J. Die Schwellung isolierter Leberzellmitochondrien und ihre physikalisch-chemische Beeinflussbarkeit. *Helv Physiol Pharmacol Acta*, 1953, **11**(2), 142-156.
- RAO, V. K., CARLSON, E. A. & YAN, S. S. Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, 2014, **1842**(8), 1267-1272.
- RASHEED, M. Z., TABASSUM, H. & PARVEZ, S. Mitochondrial permeability transition pore: a promising target for the treatment of Parkinson's disease. *Protoplasma*, 2017, **254**(1), 33-42.
- RASOLA, A. & BERNARDI, P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*, 2007, **12**(5), 815-833.
- RASOLA, A. & BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, 2011, **50**(3), 222-233.
- RASOLA, A. & BERNARDI, P. The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells. *Cell Calcium*, 2014, **56**(6), 437-445.
- RAUEN, U., KERKWEIG, U., WEISHEIT, D., PETRAT, F., SUSTMANN, R. & DE GROOT, H. Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic Biol Med*, 2003, **35**(12), 1664-1678.
- RAUEN, U., PETRAT, F., SUSTMANN, R. & DE GROOT, H. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J Hepatol*, 2004, **40**(4), 607-615.
- RAZA, H. & JOHN, A. In vitro protection of reactive oxygen species-induced degradation of lipids, proteins and 2-deoxyribose by tea catechins. *Food Chem Toxicol*, 2007, **45**(10), 1814-1820.
- RECZEK, C. R. & CHANDEL, N. S. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, **33**8-13.
- REYNAFARJE, B. & LEHNINGER, A. L. Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, **77**(4), 1273-1279.
- RICCI, J. E., MUNOZ-PINEDO, C., FITZGERALD, P., BAILLY-MAITRE, B., PERKINS, G. A., YADAVA, N., SCHEFFLER, I. E., ELLISMAN, M. H. & GREEN, D. R. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*, 2004, **117**(6), 773-786.
- RICCHELLI, F., DABBENI-SALA, F., PETRONILLI, V., BERNARDI, P., HOPKINS, B. & BOVA, S. Species-specific modulation of the mitochondrial permeability transition by norbormide. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1708**(2), 178-186.
- RIOJAS-HERNANDEZ, A., BERNAL-RAMIREZ, J., RODRIGUEZ-MIER, D., MORALES-MARROQUIN, F. E., DOMINGUEZ-BARRAGAN, E. M., BORJA-VILLA, C., RIVERA-ALVAREZ, I., GARCIA-RIVAS, G., ALTAMIRANO, J. & GARCIA, N. Enhanced oxidative stress sensitizes the mitochondrial permeability transition pore to opening in heart from Zucker Fa/fa rats with type 2 diabetes. *Life Sci*, 2015, **141**32-43.
- ROCHA-RODRIGUES, S., SANTOS-ALVES, E., COXITO, P. M., MARQUES-ALEIXO, I., PASSOS, E., GUIMARAES, J. T., MARTINS, M. J., OLIVEIRA, P. J., MAGALHAES, J. & ASCENSAO, A. Combined effects of aging and in vitro non-steroid anti-inflammatory drugs on kidney and liver mitochondrial physiology. *Life Sci*, 2013, **93**(8), 329-337.
- ROTTENBERG, H. & HOEK, J. B. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore. *Aging Cell*, 2017, **16**(5), 943-955.
- ROTTENBERG, H. & HOEK, J. B. The Mitochondrial Permeability Transition: Nexus of Aging, Disease and Longevity. *Cells*, 2021, **10**(1).
- ROTTENBERG, H. & MARBACH, M. Regulation of Ca²⁺ transport in brain mitochondria. II. The mechanism of the adenine nucleotides enhancement of Ca²⁺ uptake and retention. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1016**(1), 87-98.
- ROTTENBERG, H. & WU, S. Mitochondrial dysfunction in lymphocytes from old mice: enhanced activation of the permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **240**(1), 68-74.
- RUNAS, K. A. & MALMSTADT, N. Low levels of lipid oxidation radically increase the passive permeability of lipid bilayers. *Soft Matter*, 2015, **11**(3), 499-505.
- RYBA, L. (2015) Mitochondriální pór přechodné propustnosti a jeho role v kardioprotekci. Praha, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- SAHIN, K., TUZCU, M., GENCOGLU, H., DOGUKAN, A., TIMURKAN, M., SAHIN, N., ASLAN, A. & KUCUK, O. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci*, 2010, **87**(7-8), 240-245.
- SARIS, N. E. & KRONER, H. Regulation of Ca²⁺ fluxes in rat liver mitochondria by Ca²⁺. Effects on Ca²⁺ distribution. *J Bioenerg Biomembr*, 1990, **22**(1), 81-90.

- SARTORI, M. R., NAVARRO, C. D. C., CASTILHO, R. F. & VERCESI, A. E. Enhanced resistance to Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition in the long-lived red-footed tortoise *Chelonoidis carbonaria*. *J Exp Biol*, 2022, **225**(1).
- SASTRE, J., PALLARDO, F. V., PLA, R., PELLIN, A., JUAN, G., O'CONNOR, J. E., ESTRELA, J. M., MIQUEL, J. & VINA, J. Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology*, 1996, **24**(5), 1199-1205.
- SAUNDERS, J. E., BEESON, C. C. & SCHNELLMANN, R. G. Characterization of functionally distinct mitochondrial subpopulations. *J Bioenerg Biomembr*, 2013, **45**(1-2), 87-99.
- SAUTCHUK, R., JR., YU, C., MCARTHUR, M., MASSIE, C., BROOKES, P. S., PORTER, G. A., JR., AWAD, H. & ELISEEV, R. A. Role of the Mitochondrial Permeability Transition in Bone Metabolism and Aging. *J Bone Miner Res*, 2023.
- SAVINO, C., PELICCI, P. & GIORGIO, M. The P66Shc/mitochondrial permeability transition pore pathway determines neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, **2013**19407.
- SCARLETT, J. L., PACKER, M. A., PORTEOUS, C. M. & MURPHY, M. P. Alterations to glutathione and nicotinamide nucleotides during the mitochondrial permeability transition induced by peroxynitrite. *Biochem Pharmacol*, 1996, **52**(7), 1047-1055.
- SCARPA, A. & LINDSAY, J. G. Maintenance of energy-linked functions in rat-liver mitochondria aged in the presence of nupercaine. *Eur J Biochem*, 1972, **27**(3), 401-407.
- SCORRANO, L., PETRONILLI, V. & BERNARDI, P. On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal. *J Biol Chem*, 1997, **272**(19), 12295-12299.
- SHALBUEVA, N., MARENINOVA, O. A., GERLOFF, A., YUAN, J., WALDRON, R. T., PANDOL, S. J. & GUKOVSKAYA, A. S. Effects of oxidative alcohol metabolism on the mitochondrial permeability transition pore and necrosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *Gastroenterology*, 2013, **144**(2), 437-446.
- SHAO, H., LI, J., ZHOU, Y., GE, Z., FAN, J., SHAO, Z. & ZENG, Y. Dose-dependent protective effect of propofol against mitochondrial dysfunction in ischaemic/reperfused rat heart: role of cardiolipin. *Br J Pharmacol*, 2008, **153**(8), 1641-1649.
- SHUM, L. C., WHITE, N. S., NADTOCHIY, S. M., BENTLEY, K. L., BROOKES, P. S., JONASON, J. H. & ELISEEV, R. A. Cyclophilin D Knock-Out Mice Show Enhanced Resistance to Osteoporosis and to Metabolic Changes Observed in Aging Bone. *PLoS One*, 2016, **11**(5), e0155709.
- SCHAFER, G. Some new aspects on the interaction of hypoglycemia-producing biguanides with biological membranes. *Biochem Pharmacol*, 1976, **25**(18), 2015-2024.
- SCHLAME, M. & GREENBERG, M. L. Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, **1862**(1), 3-7.
- SCHMIDT, M., SCHMITZ, H. J., BAUMGART, A., GUEDON, D., NETSCH, M. I., KREUTER, M. H., SCHMIDLIN, C. B. & SCHRENK, D. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. *Food Chem Toxicol*, 2005, **43**(2), 307-314.
- SCHWARTZ, H. L. & OPPENHEIMER, J. H. Physiologic and biochemical actions of thyroid hormone. *Pharmacol Ther B*, 1978, **3**(3), 349-376.
- SCHWARZLÄNDER, M., LOGAN, D. C., FRICKER, M. D. & SWEETLOVE, L. J. The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: implications for the existence of superoxide 'flashes'. *Biochem J*, 2011, **437**(3), 381-387.
- SILEIKYTE, J., BLACHLY-DYSON, E., SEWELL, R., CARPI, A., MENABO, R., DI LISA, F., RICCHELLI, F., BERNARDI, P. & FORTE, M. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (Translocator Protein of 18 kDa (TSPO)). *J Biol Chem*, 2014, **289**(20), 13769-13781.
- SINGH, A., FACCENDA, D. & CAMPANELLA, M. Pharmacological advances in mitochondrial therapy. *EBioMedicine*, 2021, **65**103244.
- SKRZYDLEWSKA, E., OSTROWSKA, J., STANKIEWICZ, A. & FARBISZEWSKI, R. Green tea as a potent antioxidant in alcohol intoxication. *Addict Biol*, 2002, **7**(3), 307-314.
- SKULACHEV, V. P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*, 1991, **294**(3), 158-162.
- SKULACHEV, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1363**(2), 100-124.
- SON, J. M. & LEE, C. Mitochondria: multifaceted regulators of aging. *BMB Rep*, 2019, **52**(1), 13-23.
- SORGATO, M. C., KELLER, B. U. & STUHMER, W. Patch-clamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel. *Nature*, 1987, **330**(6147), 498-500.

- SRIRAM, N., KALAYARASAN, S. & SUDHANDIRAN, G. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf2-Keap1 signaling. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, **22**(3), 221-236.
- STARKOV, A. A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, **1147**, 37-52.
- SUGRUE, M. M. & TATTON, W. G. Mitochondrial membrane potential in aging cells. *Biol Signals Recept*, 2001, **10**(3-4), 176-188.
- SUN, N., YOULE, R. J. & FINKEL, T. The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell*, 2016, **61**(5), 654-666.
- SZABO, I., BERNARDI, P. & ZORATTI, M. Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J Biol Chem*, 1992, **267**(5), 2940-2946.
- SZABO, I., DE PINTO, V. & ZORATTI, M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS Lett*, 1993, **330**(2), 206-210.
- SZABO, I. & ZORATTI, M. The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J Biol Chem*, 1991, **266**(6), 3376-3379.
- SZABO, I. & ZORATTI, M. The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr*, 1992, **24**(1), 111-117.
- SZABO, I. & ZORATTI, M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett*, 1993, **330**(2), 201-205.
- SZABO, I. & ZORATTI, M. Mitochondrial Channels: Ion Fluxes and More. *Physiological Reviews*, 2014, **94**(2), 519-608.
- SZALAI, G., CSORDAS, G., HANTASH, B. M., THOMAS, A. P. & HAJNOCZKY, G. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J Biol Chem*, 2000, **275**(20), 15305-15313.
- SZTARK, F., ICHAS, F., MAZAT, J. P. & DABADIE, P. Propofol and cellular calcium homeostasis. *Anesthesiology*, 1995a, **83**(6), 1386.
- SZTARK, F., ICHAS, F., OUHABI, R., DABADIE, P. & MAZAT, J. P. Effects of the anaesthetic propofol on the calcium-induced permeability transition of rat heart mitochondria: direct pore inhibition and shift of the gating potential. *FEBS Lett*, 1995b, **368**(1), 101-104.
- TADDEO, E. P., LAKER, R. C., BREEN, D. S., AKHTAR, Y. N., KENWOOD, B. M., LIAO, J. A., ZHANG, M., FAZAKERLEY, D. J., TOMSIG, J. L., HARRIS, T. E., KELLER, S. R., CHOW, J. D., LYNCH, K. R., CHOKKI, M., MOLKENTIN, J. D., TURNER, N., JAMES, D. E., YAN, Z. & HOEHN, K. L. Opening of the mitochondrial permeability transition pore links mitochondrial dysfunction to insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Metab*, 2014, **3**(2), 124-134.
- TAIT, S. W. & GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, **11**(9), 621-632.
- TAIT, S. W. & GREEN, D. R. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, **5**(9).
- TAJEDDINE, N. How do reactive oxygen species and calcium trigger mitochondrial membrane permeabilisation? *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1860**(6), 1079-1088.
- TANVEER, A., VIRJI, S., ANDREEVA, L., TOTTY, N. F., HSUAN, J. J., WARD, J. M. & CROMPTON, M. Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Eur J Biochem*, 1996, **238**(1), 166-172.
- TAPLEY, D. F. The effect of thyroxine and other substances on the swelling of isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 1956, **222**(1), 325-339.
- TEDESCHI, H. & HARRIS, D. L. Some observations on the photometric estimation of mitochondrial volume. *Biochim Biophys Acta*, 1958, **28**(2), 392-402.
- TEDESCHI, H. & HEGARTY, H. J. Osmotic Reversal of Ca²⁺ Induced Mitochondrial Swelling. *Biochem Biophys Res Commun*, 1965, **19**, 558-564.
- TEDESCHI, H., HEGARTY, H. J. & JAMES, J. M. Osmotic reversal of phosphate-induced mitochondrial swelling. *Biochim Biophys Acta*, 1965, **104**(2), 612-615.
- TEODORO, J. S., ROLO, A. P., DUARTE, F. V., SIMOES, A. M. & PALMEIRA, C. M. Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression. *Mitochondrion*, 2008, **8**(5-6), 367-376.
- TERRITO, P. R., FRENCH, S. A., DUNLEAVY, M. C., EVANS, F. J. & BALABAN, R. S. Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mVO₂, NADH, AND light scattering. *J Biol Chem*, 2001, **276**(4), 2586-2599.

- THOMAS, B., BANERJEE, R., STARKOVA, N. N., ZHANG, S. F., CALINGASAN, N. Y., YANG, L., WILLE, E., LORENZO, B. J., HO, D. J., BEAL, M. F. & STARKOV, A. Mitochondrial permeability transition pore component cyclophilin D distinguishes nigrostriatal dopaminergic death paradigms in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 2012, **16**(9), 855-868.
- TICHÝ, L. (2006) Posouzení energetického metabolismu izolovaných hepatocytů a mitochondrií v průběhu oxidačního stresu. Pardubice, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
- TIPOE, G. L., LEUNG, T. M., LIONG, E. C., LAU, T. Y., FUNG, M. L. & NANJI, A. A. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in mice. *Toxicology*, 2010, **273**(1-3), 45-52.
- TOMAN, J. & FISKUM, G. Influence of aging on membrane permeability transition in brain mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 2011, **43**(1), 3-10.
- TRACHOOTHAM, D., ALEXANDRE, J. & HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, 2009, **8**(7), 579-591.
- TSAI, H., HEWITT, C. W., BUCHHOLZ, J. N. & DUCKLES, S. P. Intracellular calcium buffering declines in aging adrenergic nerves. *Neurobiol Aging*, 1997, **18**(2), 229-233.
- UCHIYAMA, A., KIM, J. S., KON, K., JAESCHKE, H., IKEJIMA, K., WATANABE, S. & LEMASTERS, J. J. Translocation of iron from lysosomes into mitochondria is a key event during oxidative stress-induced hepatocellular injury. *Hepatology*, 2008, **48**(5), 1644-1654.
- URBANI, A., GIORGIO, V., CARRER, A., FRANCHIN, C., ARRIGONI, G., JIKO, C., ABE, K., MAEDA, S., SHINZAWA-ITOH, K., BOGERS, J. F. M., MCMILLAN, D. G. G., GERLE, C., SZABO, I. & BERNARDI, P. Purified F-ATP synthase forms a Ca(2+)-dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore. *Nat Commun*, 2019, **10**(1), 4341.
- VALASANI, K. R., SUN, Q., FANG, D., ZHANG, Z., YU, Q., GUO, Y., LI, J., ROY, A. & SHIDU YAN, S. Identification of a Small Molecule Cyclophilin D Inhibitor for Rescuing Abeta-Mediated Mitochondrial Dysfunction. *ACS Med Chem Lett*, 2016, **7**(3), 294-299.
- VALENSI, P., BEHAR, A., COHEN-BOULAKIA, F., VALENSI, J., WIERNSPERGER, N. & ATTALI, J. R. In vivo kinetics of 123 iodine-labelled insulin in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. Effect of metformin. *Diabetes Metab*, 2002, **28**(2), 95-103.
- VALENTI, D., DE BARI, L., MANENTE, G. A., ROSSI, L., MUTTI, L., MORO, L. & VACCA, R. A. Negative modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation by epigallocatechin-3 gallate leads to growth arrest and apoptosis in human malignant pleural mesothelioma cells. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1832**(12), 2085-2096.
- VAN DE VEN, R. A. H., SANTOS, D. & HAIGIS, M. C. Mitochondrial Sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging. *Trends Mol Med*, 2017, **23**(4), 320-331.
- VARANYUWATANA, P. & HALESTRAP, A. P. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*, 2012, **12**(1), 120-125.
- VASEVA, A. V., MARCHENKO, N. D., JI, K., TSIRKA, S. E., HOLZMANN, S. & MOLL, U. M. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 2012, **149**(7), 1536-1548.
- VENDITTI, P., DE ROSA, R. & DI MEO, S. Effect of thyroid state on H₂O₂ production by rat liver mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*, 2003a, **205**(1-2), 185-192.
- VENDITTI, P., DE ROSA, R. & DI MEO, S. Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues. *Free Radic Biol Med*, 2003b, **35**(5), 485-494.
- VENDITTI, P. & DI MEO, S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*, 2006, **63**(4), 414-434.
- VIDELA, L. A. Energy metabolism, thyroid calorigenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences. *Redox Rep*, 2000, **5**(5), 265-275.
- VINOGRADOV, A., SCARPA, A. & CHANCE, B. Calcium and pyridine nucleotide interaction in mitochondrial membranes. *Arch Biochem Biophys*, 1972, **152**(2), 646-654.
- VYSSOKIKH, M. Y., GONCHAROVA, N. Y., ZHURAVLYOVA, A. V., ZOROVA, L. D., KIRICHENKO, V. V., KRASNIKOV, B. F., KUZMINOVA, A. E., MELIKOV, K. C., MELIK-NUBAROV, N. S., SAMSONOV, A. V., BELOUSOV, V. V., PRISCHEPOVA, A. E. & ZOROV, D. B. Proteinaceous complexes from mitochondrial contact sites. *Biochemistry (Mosc)*, 1999, **64**(4), 390-398.

- VYSSOKIKH, M. Y., HOLTZE, S., AVERINA, O. A., LYAMZAEV, K. G., PANTELEEVA, A. A., MAREY, M. V., ZINOVKIN, R. A., SEVERIN, F. F., SKULACHEV, M. V., FASEL, N., HILDEBRANDT, T. B. & SKULACHEV, V. P. Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, **117**(12), 6491-6501.
- WANG, S. B., MURRAY, C. I., CHUNG, H. S. & VAN EYK, J. E. Redox regulation of mitochondrial ATP synthase. *Trends Cardiovasc Med*, 2013, **23**(1), 14-18.
- WANG, W., FANG, H., GROOM, L., CHENG, A., ZHANG, W., LIU, J., WANG, X., LI, K., HAN, P., ZHENG, M., YIN, J., WANG, W., MATTSON, M. P., KAO, J. P., LAKATTA, E. G., SHEU, S. S., OUYANG, K., CHEN, J., DIRKSEN, R. T. & CHENG, H. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell*, 2008, **134**(2), 279-290.
- WANG, W., GONG, G., WANG, X., WEI-LAPIERRE, L., CHENG, H., DIRKSEN, R. & SHEU, S. S. Mitochondrial Flash: Integrative Reactive Oxygen Species and pH Signals in Cell and Organelle Biology. *Antioxid Redox Signal*, 2016, **25**(9), 534-549.
- WARNE, J., PRYCE, G., HILL, J. M., SHI, X., LENNERAS, F., PUENTES, F., KIP, M., HILDITCH, L., WALKER, P., SIMONE, M. I., CHAN, A. W., TOWERS, G. J., COKER, A. R., DUCHEN, M. R., SZABADKAI, G., BAKER, D. & SELWOOD, D. L. Selective Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Protects against Neurodegeneration in Experimental Multiple Sclerosis. *J Biol Chem*, 2016, **291**(9), 4356-4373.
- WATANABE, Y., HIMEDA, T. & ARAKI, T. Mechanisms of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. *Med Sci Monit*, 2005, **11**(1), RA17-23.
- WATERHOUSE, N. J., GOLDSTEIN, J. C., VON AHSEN, O., SCHULER, M., NEWMAYER, D. D. & GREEN, D. R. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol*, 2001, **153**(2), 319-328.
- WEI, M. C., ZONG, W. X., CHENG, E. H., LINDSTEN, T., PANOUTSAKOPOULOU, V., ROSS, A. J., ROTH, K. A., MACGREGOR, G. R., THOMPSON, C. B. & KORSMEYER, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 2001, **292**(5517), 727-730.
- WEI, Y. & KENYON, C. Roles for ROS and hydrogen sulfide in the longevity response to germline loss in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, **113**(20), E2832-2841.
- WEIJERS, R. N. M. & BEKEDAM, D. J. The Metformin Paradox. *Curr Diabetes Rev*, 2020, **16**(2), 143-147.
- WEISS, J. N., KORGE, P., HONDA, H. M. & PING, P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res*, 2003, **93**(4), 292-301.
- WEITZEL, J. M., IWEN, K. A. & SEITZ, H. J. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp Physiol*, 2003, **88**(1), 121-128.
- WENG, Z., ZHOU, P., SALMINEN, W. F., YANG, X., HARRILL, A. H., CAO, Z., MATTES, W. B., MENDRICK, D. L. & SHI, Q. Green tea epigallocatechin gallate binds to and inhibits respiratory complexes in swelling but not normal rat hepatic mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, **443**(3), 1097-1104.
- WITTIG, I. & SCHAGGER, H. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1777**(7-8), 592-598.
- WOODFIELD, K., RUCK, 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*, 1998, **336** (Pt 2)287-290.
- WU, A., ZHANG, J., LI, Q., LIAO, X., WANG, C. & ZHAO, J. (-)-Epigallocatechin-3-gallate Directly Binds Cyclophilin D: A Potential Mechanism for Mitochondrial Protection. *Molecules*, 2022, **27**(24).
- WU, Y., SHAMOTO-NAGAI, M., MARUYAMA, W., OSAWA, T. & NAOI, M. Rasagiline prevents cyclosporine A-sensitive superoxide flashes induced by PK11195, the initial signal of mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *J Neural Transm (Vienna)*, 2016, **123**(5), 491-494.
- XING, L., ZHANG, H., QI, R., TSAO, R. & MINE, Y. Recent Advances in the Understanding of the Health Benefits and Molecular Mechanisms Associated with Green Tea Polyphenols. *J Agric Food Chem*, 2019, **67**(4), 1029-1043.
- YAN, L. J. & SOHAL, R. S. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95**(22), 12896-12901.

- YAN, S., DU, F., WU, L., ZHANG, Z., ZHONG, C., YU, Q., WANG, Y., LUE, L. F., WALKER, D. G., DOUGLAS, J. T. & YAN, S. S. F1F0 ATP Synthase-Cyclophilin D Interaction Contributes to Diabetes-Induced Synaptic Dysfunction and Cognitive Decline. *Diabetes*, 2016, **65**(11), 3482-3494.
- YEHUDA-SHNAIDMAN, E., KALDERON, B., AZAZMEH, N. & BAR-TANA, J. Gating of the mitochondrial permeability transition pore by thyroid hormone. *FASEB J*, 2010, **24**(1), 93-104.
- YOSHIBA, M., SEKIYAMA, K., INOUE, K. & FUJITA, R. Interferon and cyclosporin A in the treatment of fulminant viral hepatitis. *J Gastroenterol*, 1995, **30**(1), 67-73.
- YOSHINO, K., HARA, Y., SANO, M. & TOMITA, I. Antioxidative effects of black tea theaflavins and thearubigin on lipid peroxidation of rat liver homogenates induced by tert-butyl hydroperoxide. *Biol Pharm Bull*, 1994, **17**(1), 146-149.
- YOUNOSSI, Z. M., KOENIG, A. B., ABDELATIF, D., FAZEL, Y., HENRY, L. & WYMER, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 2016, **64**(1), 73-84.
- ZAMZAMI, N. & KROEMER, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**(1), 67-71.
- ZBOROWSKI, J. & WOJTCZAK, L. Induction of Swelling of Liver Mitochondria by Fatty Acids of Various Chain Length. *Biochim Biophys Acta*, 1963, **70**596-598.
- ZHEN, Y. F., WANG, G. D., ZHU, L. Q., TAN, S. P., ZHANG, F. Y., ZHOU, X. Z. & WANG, X. D. P53 dependent mitochondrial permeability transition pore opening is required for dexamethasone-induced death of osteoblasts. *J Cell Physiol*, 2014, **229**(10), 1475-1483.
- ZHENG, J. & RAMIREZ, V. D. Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br J Pharmacol*, 2000, **130**(5), 1115-1123.
- ZHOU, B., KREUZER, J., KUMSTA, C., WU, L., KAMER, K. J., CEDILLO, L., ZHANG, Y., LI, S., KACERGIS, M. C., WEBSTER, C. M., FEJES-TOTH, G., NARAY-FEJES-TOTH, A., DAS, S., HANSEN, M., HAAS, W. & SOUKAS, A. A. Mitochondrial Permeability Uncouples Elevated Autophagy and Lifespan Extension. *Cell*, 2019, **177**(2), 299-314 e216.
- ZHOU, J., FARAH, B. L., SINHA, R. A., WU, Y., SINGH, B. K., BAY, B. H., YANG, C. S. & YEN, P. M. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, stimulates hepatic autophagy and lipid clearance. *PLoS One*, 2014, **9**(1), e87161.
- ZOROV, D. B., FILBURN, C. R., KLOTZ, L. O., ZWEIER, J. L. & SOLLLOTT, S. J. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*, 2000, **192**(7), 1001-1014.
- ZOROV, D. B., JUHASZOVA, M. & SOLLLOTT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*, 2014, **94**(3), 909-950.
- ZOROV, D. B., JUHASZOVA, M., YANIV, Y., NUSS, H. B., WANG, S. & SOLLLOTT, S. J. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*, 2009, **83**(2), 213-225.
- ZOROV, D. B., KINNALLY, K. W., PERINI, S. & TEDESCHI, H. Multiple conductance levels in rat heart inner mitochondrial membranes studied by patch clamping. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1105**(2), 263-270.
- ZULIAN, A., SCHIAVONE, M., GIORGIO, V. & BERNARDI, P. Forty years later: Mitochondria as therapeutic targets in muscle diseases. *Pharmacol Res*, 2016, **113**(Pt A), 563-573.

7. SOUBOR PŘEDKLÁDANÝCH PRACÍ

1. Drahota Z, **Endlicher R**, Staňková P, Rychtrmoc D, Milerová M, Červinková Z. Characterization of calcium, phosphate and peroxide interactions in activation of mitochondrial swelling using derivative of the swelling curves. *J Bioenerg Biomembr.* 2012; 44: 309-315. (IF 1,604)
2. **Endlicher R**, Drahota Z, Štefková K, Červinková Z, Kučera O. The Mitochondrial Permeability Transition Pore-Current Knowledge of Its Structure, Function, and Regulation, and Optimized Methods for Evaluating Its Functional State. *Cells.* 2023; 12(9)1273: 1-17. (IF 7,666)
3. **Endlicher R**, Drahota Z, Červinková Z. Modification of calcium retention capacity of rat liver mitochondria by phosphate and tert-butyl hydroperoxide. *Physiol Res.* 2019; 68: 59-65. (IF 1,655)
4. Drahota Z, **Endlicher R**, Kučera O, Rychtrmoc D, Červinková Z. Factors affecting the function of the mitochondrial membrane permeability transition pore and their role in evaluation of calcium retention capacity values. *Physiol Res.* 2020; 69: 491-499. (IF 1,881)
5. **Endlicher R**, Drahota Z, Červinková Z. *In vitro* and *in vivo* activation of mitochondrial membrane permeability transition pore using triiodothyronine. *Physiol Res.* 2016; 65: 321-331. (IF 1,461)
6. **Endlicher R**, Křiváková P, Lotková H, Milerová M, Drahota Z, Červinková Z. Tissue specific sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺ ions. *Acta Medica (Hradec Kralové).* 2009; 52: 69-72. (bez IF)
7. Drahota Z, Milerová M, **Endlicher R**, Rychtrmoc D, Červinková Z, Ošťádal B. Developmental changes of the sensitivity of cardiac and liver mitochondrial permeability transition pore to calcium load and oxidative stress. *Physiol Res. Suppl.* 2012; 61: 165-172. (IF 1,531)

8. **Endlicher R**, Drahota Z, Kučera O, Červinková Z. Age-Dependent Changes in the Function of Mitochondrial Membrane Permeability Transition Pore in Rat Liver Mitochondria. *Physiol Res*. 2021; 70: 905-911. (IF 2,139)
9. Drahota Z, Páleníčková E, **Endlicher R**, Milerová M, Břejchová J, Vošahlíková M, Svoboda P, Kazdová L, Kalous M, Červinková Z, Cahová M. Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties. *Physiol Res*. 2014; 63: 1-11. (IF 1,293)
10. Mezera V, **Endlicher R**, Kučera O, Sobotka O, Drahota Z, Červinková Z. Effects of Epigallocatechin Gallate on Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Mitochondrial Dysfunction in Rat Liver Mitochondria and Hepatocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:7573131: 1-8. (IF 4,593)
11. Kučera O, Mezera V, Moravcová A, **Endlicher R**, Lotková H, Drahota Z, Červinková Z. *In vitro* toxicity of epigallocatechin gallate in rat liver mitochondria and hepatocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015:476180: 1-10. (IF 4,492)

7. 1. Příloha č. 1

Drahota Z, **Endlicher R**, Staňková P, Rychtrmoc D, Milerová M, Červinková Z. Characterization of calcium, phosphate and peroxide interactions in activation of mitochondrial swelling using derivative of the swelling curves. *J Bioenerg Biomembr.* 2012; 44: 309-315. (IF 1,604)

7. 2. Příloha č. 2

Endlicher R, Drahotka Z, Štefková K, Červinková Z, Kučera O. The Mitochondrial Permeability Transition Pore-Current Knowledge of Its Structure, Function, and Regulation, and Optimized Methods for Evaluating Its Functional State. *Cells*. 2023; 12(9)1273: 1-17. **(IF 7,666)**

7. 3. Příloha č. 3

Endlicher R, Drahotka Z, Červinková Z. Modification of calcium retention capacity of rat liver mitochondria by phosphate and tert-butyl hydroperoxide. *Physiol Res.* 2019; 68: 59-65. (IF 1,655)

7. 4. Příloha č. 4

Drahota Z, **Endlicher R**, Kučera O, Rychtmoc D, Červinková Z. Factors affecting the function of the mitochondrial membrane permeability transition pore and their role in evaluation of calcium retention capacity values. *Physiol Res.* 2020; 69: 491-499. **(IF 1,881)**

7. 5. Příloha č. 5

Endlicher R, Drahotka Z, Červinková Z. *In vitro* and *in vivo* activation of mitochondrial membrane permeability transition pore using triiodothyronine. *Physiol Res.* 2016; 65: 321-331. (IF 1,461)

7. 6. Příloha č. 6

Endlicher R, Křiváková P, Lotková H, Milerová M, Drahotka Z, Červinková Z. Tissue specific sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺ ions. *Acta Medica* (Hradec Kralové). 2009; 52: 69-72. **(bez IF)**

7. 7. Příloha č. 7

Drahota Z, Milerová M, **Endlicher R**, Rychtrmoc D, Červinková Z, Ošťádal B. Developmental changes of the sensitivity of cardiac and liver mitochondrial permeability transition pore to calcium load and oxidative stress. *Physiol Res. Suppl.* 2012; 61: 165-172. (IF 1,531)

7. 8. Příloha č. 8

Endlicher R, Drahota Z, Kučera O, Červinková Z. Age-Dependent Changes in the Function of Mitochondrial Membrane Permeability Transition Pore in Rat Liver Mitochondria. *Physiol Res.* 2021; 70: 905-911. (IF 2,139)

7. 9. Příloha č. 9

Drahota Z, Páleníčková E, **Endlicher R**, Milerová M, Brejchová J, Vošahlíková M, Svoboda P, Kazdová L, Kalous M, Červinková Z, Cahová M. Biguanides inhibit complex I, II and IV of rat liver mitochondria and modify their functional properties. *Physiol Res.* 2014; 63: 1-11. (IF 1,293)

7. 10. Příloha č. 10

Mezera V, **Endlicher R**, Kučera O, Sobotka O, Drahotka Z, Červinková Z. Effects of Epigallocatechin Gallate on Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Mitochondrial Dysfunction in Rat Liver Mitochondria and Hepatocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:7573131: 1-8. **(IF 4,593)**

7. 11. Příloha č. 11

Kučera O, Mezera V, Moravcová A, **Endlicher R**, Lotková H, Drahotka Z, Červinková Z.
In vitro toxicity of epigallocatechin gallate in rat liver mitochondria and hepatocytes.
Oxid Med Cell Longev. 2015; 2015:476180: 1-10. (IF 4,492)