

Fe²⁺-INDUCED OXIDATIVE PROCESSES IN RAT LIVER MITOCHONDRIA

TOMECKOVA V, BARNOVA E, GUZY J, CHAVKOVA Z, MAREKOVA M, DUBAYOVA K, KUSNIR J

OXIDAČNÉ PROCESY MITOCHONDRIÍ PEČENE POTKANA INDUKOVANÉ Fe²⁺

Abstract

Tomeckova V, Barnova E, Guzy J, Chavkova Z, Marekova M, Dubayova K, Kusnir J:
Fe²⁺-induced oxidative processes in rat liver mitochondria
Bratisl Lek Listy 2000; 101 (4): 213–218

The study investigated the prooxidative in vitro effect of various Fe²⁺-EDTA concentrations on biochemical parameters of the energetic metabolism of rat liver mitochondria. Fe²⁺-EDTA was added in concentrations 150, 300 and 400 mmol/mg of mitochondrial protein.

The study included the investigation of consumption of oxygen in state 4 (without ADP addition) and in state 3 (with ADP addition), and the activities of ATP-ase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase. The mitochondrial outer membrane dynamics were simultaneously monitored by the method of synchronous fluorescence fingerprint.

When compared with the control group, the results imply that in state 4, the addition of 150 mmol of Fe²⁺/mg of mitochondrial protein caused an insignificant increase in respiration to 104 %, whereas in state 3, the oxygen consumption was insignificantly inhibited to 82 %. The activity of ATPase was insignificantly raised to 105 %, whereas the superoxide dismutase activity has decreased significantly to 77 %. The activity of glutathione reductase increased significantly to 124 %. The addition of 300 mmol of Fe²⁺/mg of mitochondrial protein has caused a significant inhibition of oxygen consumption to 67 % in state 4 and to 31 % in state 3. The activity of ATPase showed an insignificant elevation to 104 %. The activity of superoxide dismutase was significantly reduced to 52 % and that of glutathione reductase dropped to 72 %. The addition of 400 Fe²⁺/mg of mitochondrial protein strongly diminished the oxygen consumption to 36 % in state 4, and similarly to 37 % in state 3. The activity of ATP-ase was significantly decreased to 39 %, the superoxide dismutase activity diminished to 17 % and glutathione reductase activity dropped to 37 %.

The monitoring of the mitochondrial outer membrane by the analysis of synchronous fluorescence fingerprint showed that the membrane is involved in these processes. (Fig. 5, Ref. 12.)

Key words: mitochondria, biological oxidation, synchronous fluorescence fingerprint.

Abstrakt

Tomečková V, Barnová E., Guzy J., Chavková Z., Mareková M., Dubayová K., Kušník J.:
Oxidačné procesy mitochondrií pečene potkana indukované Fe²⁺
Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 4, s. 213–218

Autori sledovali prooxidačný účinok rôznych koncentrácií Fe²⁺-EDTA na niektoré biochemické parametre energetického metabolizmu mitochondrií pečene potkanov in vitro. Pridanie Fe²⁺-EDTA bolo v koncentráciách 150, 300 a 400 mmol/mg mit. bielkoviny. Sledovali spotrebu kyslíka v stave 4 (bez pridania ADP) a v stave 3 (s prídavkom ADP) na substrát sukcinát, aktivitu ATPázy, superoxiddismutázy (SOD) a glutatiónereduktázy. Súčasne monitorovali dynamiku vonkajšej mitochondriálnej membrány pomocou analýzy synchronného fluorescenčného fingerprintu.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že koncentrácia Fe²⁺ 150 mmol/mg mit. bielkovín spotrebu kyslíka v stave 4 oproti kontrole len štatisticky nevýznamne zvýšila (104 %), kým spotreba kyslíka v stave 3 bola oproti kontrole znížená na 82 %. Aktivita ATPázy bola takmer nezmenená oproti kontrole (105 %), kým aktivita superoxiddismutázy bola signifikantne znížená na 77 %. Aktivita glutatiónereduktázy bola signifikantne zvýšená na 124 %. Pridanie 300 mmol Fe²⁺/mg mit. bielkoviny malo za následok inhibíciu respirácie v oboch stavoch, v stave 4 na 67 % a v stave 3 na 31 %. Aktivita ATPázy bola oproti kontrole len veľmi málo zvýšená (104 %). Aktivita superoxiddismutázy bola signifikantne znížená na 52 % a glutatiónereduktázy na 72 %. Koncentrácia 400 mmol Fe²⁺/mg mit. bielkovín vyvolala silnú inhibíciu spotreby kyslíka na 36 % v stave 4, podobne na 37 % v stave 3. Aktivita ATPázy sa štatisticky významne znížila na 39 %, aktivita superoxiddismutázy na 17 % a glutatiónereduktázy na 37 %.

S uvedenými výsledkami korešpondujú aj výsledky monitorovania vonkajšej mitochondriálnej membrány pomocou analýzy synchronného fluorescenčného fingerprintu. (Obr. 5, lit. 12.)

Kľúčové slová: mitochondria, biologické oxidácie, synchronný fluorescenčný fingerprint.

The Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical School, Pavol Joseph Safarik University, Kosice. makucho@central.medic.upjs.sk

Address for correspondence: V. Tomeckova, RND, Institute of Medical Chemistry and Biochemistry LF UPJS, Trieda SNP 1, SK-040 66 Kosice, Slovakia.

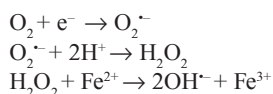
Phone/Fax: +421.95.6423 849

Ústav lekárskej chémie a biochémie Lekárskej fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Adresa: RNDr. V. Tomečková, Ústav lekárskej chémie a biochémie LF UPJŠ, Trieda SNP 1, 040 66 Košice.

Reaktívne formy kyslíka ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot-}$) sa v organizme tvoria v mnohých fyziologických procesoch. Sú vychytávané prirodzenými detoxikačnými systémami organizmu. Ak vzniká z nejakých príčin väčšie množstvo týchto reaktívnych metabolitov a detoxikačné mechanizmy ich nedokážu eliminovať, výsledkom je spustenie refazových radikálových reakcií, ktorých toxické konečné produkty poškodia biologicky dôležité molekuly, narušia integritu buniek a tkanív, čo má negatívny vplyv na celý organizmus. Výsledkom je oxidačný stres, ktorý indukuje vznik patologických stavov. Poznanie presného mechanizmu účinku reaktívnych metabolitov kyslíka, ich súvislosť s ďalšími procesmi, ktoré sa uplatňujú pri vzniku patologického stavu, je veľmi dôležité pre diagnostiku, prevenciu i liečbu ochorení, ktoré boli vyvolané oxidačným stresom.

Mitochondrie sú organely, ktoré môžu iniciovať endogénnu tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (Loschen a spol., 1971). V mitochondriách je lokalizovaný dýchací reťazec, ktorý pozostáva zo systému prenášačov elektrónov pri oxidačných reakciách. Ak je transport elektrónov inhibovaný, elektróny sa akumulujú na určitej pozícii prenášačov reťazca, odkiaľ môžu byť prenesené na kyslík a tvoriť koncové toxické metabolity oxidačnej fosforylácie: superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), ktorý vytvára peroxid vodíka H_2O_2 a v prítomnosti redukovaných prechodných kovov napr. (Fe^{2+}) sa mení na hydroxylový radikál ($OH^{\cdot-}$).



Vychádzajúc z uvedeného postavili sme si stanovili úlohu sledovať zmeny niektorých parametrov (oxidačného) energetického metabolizmu mitochondrií po pridaní rôznych koncentrácií $FeSO_4$ -EDTA (Račay a spol., 1998; Kaplán a spol., 1997) ako modelu na vyvolanie zvýšenej tvorby reaktívnych foriem kyslíka. Súčasne sme monitorovali v suspenzii mitochondrií zmeny vonkajšej mitochondriálnej membrány po vplyve Fe^{2+} -EDTA pomocou analýzy synchronného fluorescenčného fingerprintu.

Materiál a metódy

V práci sme použili potkany štandardného chovu, jednotného pohlavia — samičky rodu Wistar s hmotnosťou 200–250 g. Zvieratá sme usmrtili dekapitáciou, mitochondrie sme izolovali podľa Johnsona a Lardyho (1967) a rozdelili sme ich do dvoch skupín (kontrolnej a experimentálnej). Každú skupinu tvorilo 7 vzoriek. K experimentálnej skupine mitochondrií sme pridali roztok $FeSO_4$ -EDTA, kde koncentrácia EDTA bola 10 mmol/l a použili sme koncentrácie $FeSO_4$ 150, 300, a 400 mmol/mg mitochondriálnej bielkoviny. Sledovali sme nasledujúce parametre:

1. spotrebu kyslíka v stave 4 (bez prídavku ADP) a v stave 3 (po pridaní ADP) elektródou Clarkovho typu na substrát sukcinát, ktorý mal koncentráciu 0,5 mol/l,
2. aktivitu ATPázy (E.C.3.6.1.3) podľa Meisnera (1974),
3. aktivitu superoxidodismutázy (E.C.1.15.1.1) podľa Schaperovej a spol. (1986),
4. aktivitu glutatiónreduktázy (E.C.1.6.4.2) podľa Calberga a Mannervika (1985),
5. koncentráciu bielkovín v mitochondriách sme určili podľa Hartreeho (1972).

Získané výsledky sme vypočítali ako spotrebu kyslíka v mmol/mg bielkoviny/min v oboch stavoch respirácie (v stave 3 a v stave 4), aktivitu ATPázy v mmol Pi/mg bielkoviny/min, aktivitu superoxidodismutázy ako A/kg bielkoviny/min a aktivitu glutatiónreduktázy ako A/mol/sek/kg bielkoviny. Získané absolútne hodnoty sme štatisticky vyhodnotili Studentovým t-testom na hladine významnosti $p < 0,05$. Z takto získaných výsledkov sme vypočítali relatívne percentá zmien oproti hodnotám kontrol, ktoré sa pokladali za 100 %.

Súčasne sme monitorovali dynamiku vonkajšej mitochondriálnej membrány pomocou metódy synchronného fluorescenčného fingerprintu (Phelan, 1994; Kušník a spol., 1998; Dubayová a spol., 1998, 1999).

Synchronné fluorescenčné spektrá sme snímali s konštantne nastaveným rozdielom vlnových dĺžok medzi excitačným a emisným monochromátorom $\Delta\lambda = 15, 30, 45, 60, 90$ nm. Vrstevnice boli vytvorené počítačovým spracovaním grafických záznamov synchronných spektier usporiadaných v priestore za sebou ako kolmý priemet trojrozmerného útvaru. Jedna vrstevnica predstavuje hodnotu relatívnej fluorescencie 100. Vrstevnica je čiara, ktorá spája body s rovnakou hodnotou fluorescencie.

Výsledky a diskusia

V súčasnosti je známe, že oxidačný stres sa zúčastňuje na vzniku mnohých patologických neurodegeneratívnych procesov, ako je Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, ako aj na fyziologických procesoch starnutia (Cardoso a spol., 1999). Je známe, že pri týchto procesoch majú dôležitú úlohu reaktívne formy kyslíka (Taylor a spol., 1995). Postupným výsledkom molekulového mechanizmu oxidačného stresu je inhibícia terminálneho respiračného reťazca, inhibícia aktivity ATPázy (Bohme a spol., 1980), poškodenie mitochondriálnej membrány — „swelling“, nevratná repolarizácia mitochondriálnej membrány, strata membránového potenciálu (Reinheckel a spol., 1998), zánik mitochondrií a aktivácia apoptózy (Masini a spol., 1985; Robb a spol., 1999). Ióny prechodných kovov, napr. železo a iné zvyšujú proces tvorby reaktívnych foriem kyslíka (Cavallini a spol., 1979; Ďuračková a spol., 1993; Dean a Nicholson, 1994; Kakkar, 1996).

Z výsledkov mnohých autorov vyplýva, že molekulovým mechanizmom niektorých pečenejých chorôb pri nadmernom zvýšení hladiny železa je porucha antioxidantnej schopnosti mitochondrií (Hermes-Lima a spol., 1995; Britton, 1996; Treem a Sokol, 1998; Jakus a Lopuchová, 1999). Antioxidačná schopnosť je schopnosť mitochondrií detoxikovať reaktívne formy kyslíka, závislá od aktivity superoxidodismutázy (SOD), glutatiónperoxidázy (GPx), glutatiónreduktázy (GR) a katalázy (Magálová, 1994; Volková a spol., 1996; Ďuračková, 1998).

Železo Fe^{2+} je jedným z iniciačných stresových faktorov vonkajšieho prostredia (Morimito a spol., 1997), ktorý interaguje s intaktnými pečenejými mitochondriami so sukcinátom ako substrátom (Taylor a spol., 1995), čo potvrdili aj naše výsledky. Pridanie Fe^{2+} -EDTA v koncentracii 150 mmol/mg mitochondriálnej bielkoviny (obr. 1) oproti kontrole (100 %) takmer nezmenilo — iba štatisticky nevýznamne zvýšilo na 104 % spotrebu kyslíka v stave 4 (bez prídavku ADP). Naproti tomu, respiráciu v stave 3 (s prídavkom ADP) oproti kontrole, znížil na 82 %, čo je v zhode s výsledkami publikovanými v prácach Cavalliniho a spol. (1979) aj

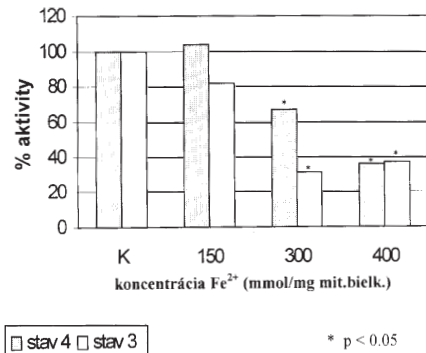


Fig. 1. Changes in oxygen consumption in rat liver mitochondria (% activity) in dependence on Fe²⁺-EDTA concentration. Oxygen consumption absolute values determined in mmol/mg protein/min were statistically evaluated by Student t-test on the level of significance $p < 0.05$, in the figures marked by asterisk. From these results relative percentage have been calculated for comparison with control values (100 %). The K — control group (mitochondria without addition Fe²⁺-EDTA), contained 7 samples. Every experimental group (mitochondria after addition Fe²⁺-EDTA) contained 7 samples.

Obr. 1. Zmeny spotreby kyslíka pečienových mitochondrií potkana (v %) v závislosti od koncentrácie Fe²⁺-EDTA. Absolútne hodnoty spotreby kyslíka boli vypočítané v mmol/mg bielkoviny/min. Boli štatisticky vyhodnotené Studentovým t-testom na hladine významnosti $p < 0,05$, na obrázkoch označené hviezdčičkou. Z takto získaných výsledkov boli vypočítané relatívne percentá oproti hodnotám kontrol, ktoré sa pokladali za 100 %. K — kontrolná skupina (mitochondrie bez prídavku Fe²⁺-EDTA) obsahovala 7 vzoriek. Každá experimentálna skupina (mitochondrie s prídavkom Fe²⁺-EDTA) obsahovala 7 vzoriek.

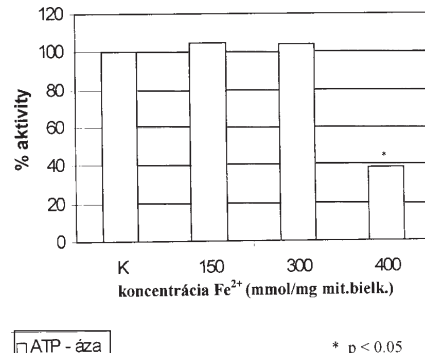


Fig. 2. Changes in ATPase activity in rat liver mitochondria (% activity) in dependence on Fe²⁺-EDTA concentration. Absolute values of activity ATPase determined in mmol P/mg protein/min were statistically evaluated by Student t-test on the level of significance $p < 0.05$, in the figures marked by asterisk. From these results relative percentage have been calculated for comparison with control values (100 %). The K — control group (mitochondria without addition Fe²⁺-EDTA), contained 7 samples. Every experimental group (mitochondria after addition Fe²⁺-EDTA) contained 7 samples.

Obr. 2. Zmeny aktivity ATPázy pečienových mitochondrií potkana (v %) v závislosti od koncentrácie Fe²⁺-EDTA. Absolútne hodnoty aktivity ATPázy boli vypočítané v mmol P/mg bielkoviny/min. Boli štatisticky vyhodnotené Studentovým t-testom na hladine významnosti $p < 0,05$, na obrázkoch označené hviezdčičkou. Z takto získaných výsledkov boli vypočítané relatívne percentá oproti hodnotám kontrol, ktoré sa pokladali za 100 %. K — kontrolná skupina (mitochondrie bez prídavku Fe²⁺-EDTA) obsahovala 7 vzoriek. Každá experimentálna skupina (mitochondrie s prídavkom Fe²⁺-EDTA) obsahovala 7 vzoriek.

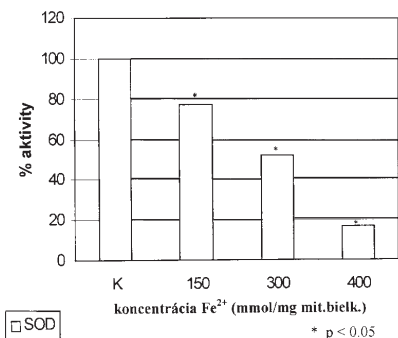


Fig. 3. Changes in superoxididismutase (SOD) activity in rat liver mitochondria (% activity) in dependence on Fe²⁺-EDTA concentration. Absolute values of activity SOD determined in A/kg protein/min were statistically evaluated by Student t-test on the level of significance $p < 0.05$, in the figures marked by asterisk. From these results relative percentage have been calculated for comparison with control values (100 %). The K — control group (mitochondria without addition Fe²⁺-EDTA), contained 7 samples. Every experimental group (mitochondria after addition Fe²⁺-EDTA) contained 7 samples.

Obr. 3. Zmeny aktivity superoxididismutázy (SOD) pečienových mitochondrií potkana (v %) v závislosti od koncentrácie Fe²⁺-EDTA. Absolútne hodnoty aktivity SOD boli vypočítané ako A/kg bielkoviny/min. Boli štatisticky vyhodnotené Studentovým t-testom na hladine významnosti $p < 0,05$, na obrázkoch označené hviezdčičkou. Z takto získaných výsledkov boli vypočítané relatívne percentá oproti hodnotám kontrol, ktoré sa pokladali za 100 %. K — kontrolná skupina (mitochondrie bez prídavku Fe²⁺-EDTA) obsahovala 7 vzoriek. Každá experimentálna skupina (mitochondrie s prídavkom Fe²⁺-EDTA) obsahovala 7 vzoriek.

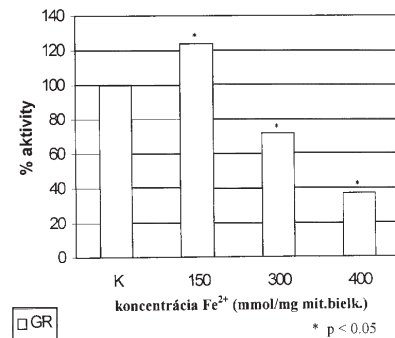


Fig. 4. Changes in glutathione reductase (GR) activity in rat liver mitochondria (% activity) in dependence on Fe²⁺-EDTA concentration. Absolute values of activity SOD determined in A_i/mol/sec/kg protein were statistically evaluated by Student t-test on the level of significance $p < 0.05$, in the figures marked by asterisk. From these results relative percentage have been calculated for comparison with control values (100 %). The K — control group (mitochondria without addition Fe²⁺-EDTA), contained 7 samples. Every experimental group (mitochondria after addition Fe²⁺-EDTA) contained 7 samples.

Obr. 4. Zmeny aktivity glutatiónu reductázy (GR) pečienových mitochondrií potkana (v %) v závislosti od koncentrácie Fe²⁺-EDTA. Absolútne hodnoty aktivity GR boli vypočítané ako A_i/mol/s/kg bielkoviny. Boli štatisticky vyhodnotené Studentovým t-testom na hladine významnosti $p < 0,05$, na obrázkoch označené hviezdčičkou. Z takto získaných výsledkov boli vypočítané relatívne percentá oproti hodnotám kontrol, ktoré sa pokladali za 100 %. K — kontrolná skupina (mitochondrie bez prídavku Fe²⁺-EDTA) obsahovala 7 vzoriek. Každá experimentálna skupina (mitochondrie s prídavkom Fe²⁺-EDTA) obsahovala 7 vzoriek.

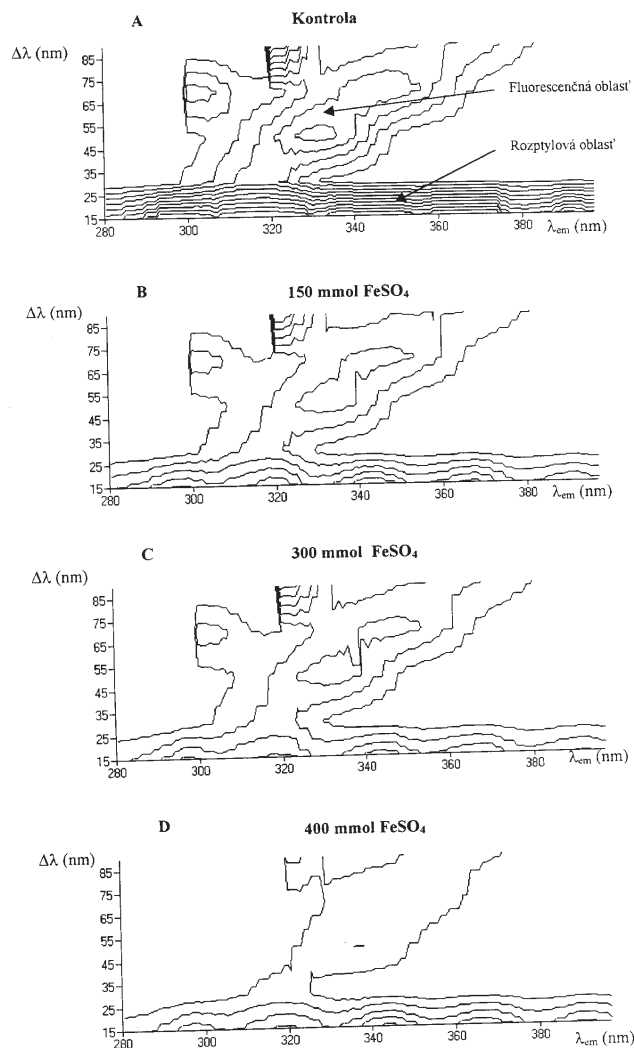


Fig. 5. The 3-D synchronous fluorescence spectrum of diluted mixture of isolated rat liver mitochondria (10 μ l/10 ml of respiration medium). Spectral changes indicate the participation of outer mitochondrial membrane in the Fe^{2+} -EDTA ions effects. Natural fluorophores of membrane are hidden more due to supposed membrane folding. A — control group, B — after addition 150 mmol Fe^{2+} -EDTA, C — after addition 300 mmol Fe^{2+} -EDTA, D — after addition 400 mmol Fe^{2+} -EDTA. Obr. 5. Synchronne fluorescenčné spektrum zriedenej zmesi izolovaných pečeňových mitochondrií potkana (10 μ l/10 ml dýchacieho média). Zmeny v spektre indikujú účasť vonkajšej mitochondriálnej membrány pri účinku iónov Fe^{2+} -EDTA. Prírodné fluorofóry membrány sú pravdepodobne viac skryté z dôvodu priestorových zmien membrány. A — kontrola, B — po prídavku 150 mmol Fe^{2+} -EDTA, C — po prídavku 300 mmol Fe^{2+} -EDTA, D — po prídavku 400 mmol Fe^{2+} -EDTA).

Deana a Nicholsona z roku 1994, ktorí ukázali, že EDTA chelatuje železo. Naše výsledky korešponujú aj so závermi Kakkara (1996), ktorý ukázal, že EDTA redukuje iniciačný oxidačný stres a „swelling“ mitochondrií spôsobený prídavkom železa. Aktivita ATPázy (obr. 2) zodpovedá za tvorbu energie ATP sa štatisticky nevýznamne zvýšila na 105 %, čo je v dobrej zhode s výsledkami

Trumpera (1989), ktorý zistil, že v iniciačnej fáze peroxidácie, je kontrola fluxu Pi, ADP a ATP nezávislá od rýchlosti respirácie mitochondrií, ale závisí len od funkcie translokátora ATP/ADP. Aktivita superoxidodismutázy, ktorá sa považuje za prvú líniu anti-oxidačnej obrany (obr. 3), sa významne znížila na 77 %, čo zodpovedá skorým štádiám oxidačného stresu, ako ho opisujú vo svojich prácach Balzan a spol. (1999) a Guanhua a spol. (1998). Aktivita glutatiónereduktázy (obr. 4) sa významne zvýšila na 124 %, pravdepodobne v dôsledku zvýšenia hladiny peroxidu vodíka a následnej zvýšenej koncentrácie oxidovaného glutatiónu. Zvýšená hladina oxidovaného glutatiónu zvyšuje aktivitu enzýmu glutatiónereduktázy, ktorý ho premieňa na redukovaný glutatión, s cieľom zastaviť oxidačný stres (Magálová, 1994).

Aplikácia Fe^{2+} -EDTA v koncentrácii 300 mmol/mg mitochondriálnej bielkoviny mala za následok štatisticky významnú inhibíciu spotreby kyslíka v oboch stavoch respirácie, v stave 4 na 67 % a v stave 3 na 31 %, pravdepodobne v dôsledku inhibície respirácie mitochondrií, čo je v súlade s výsledkami Taylora a spol. (1995). Aktivita ATPázy bola takmer nezmenená (104 %), akoby sa nezmenil transport adenínových nukleotidov a sukcinátu cez vnútornú mitochondriálnu membránu, kým aktivita SOD bola štatisticky významne znížená na 52 %, rovnako ako v práci Kuratka (1999), ktorý tento výsledok opisuje ako pokročilé štádium oxidačného stresu. Signifikantné zníženie GR oproti kontrole na 72 %, je v zhode s výsledkami Trumpera a spol. (1989), podľa ktorých spôsobuje inhibíciu enzýmu GR pravdepodobne vysoká koncentrácia vlastného substrátu — oxidovaného glutatiónu. Uvedené výsledky korešponujú aj so závermi Brittona (1996), ktorého experimentálne výsledky ukázali, že zvýšená koncentrácia iónov železa, ale aj medi (toxické prooxidanty, ktoré indukujú hepatotoxicitu) inhibuje oxidačnú fosforyláciu a respiráciu mitochondrií, znižuje aktivitu prirodzených antioxidantov, ktorých výsledkom je oxidačný stres.

Koncentrácia Fe^{2+} -EDTA 400 mmol/mg mitochondriálnej bielkoviny vyvolala veľmi výraznú štatisticky významnú inhibíciu všetkých sledovaných parametrov. Spotreba kyslíka sa významne znížila v stave 4 na 36 %, podobne v stave 3 sa významne inhibovala na 37 % v dôsledku inhibície respirácie. Aktivita ATPázy sa významne inhibovala na 39 %, čo je v zhode s výsledkami Bohmeho a spol. (1980) a môže byť výsledkom poškodenia transportu sukcinátu, anorganického fosfátu a adenínových nukleotidov cez vnútornú mitochondriálnu membránu. Podľa autorov Robba a spol. (1999) a Veritih (1999) vedie inhibícia aktivity ATPázy k nedostatku energie a k aktivácii apoptózy. Aktivita SOD významne klesla na 17 %, čo podľa výsledkov Kuratka (1999) predstavuje pokročilé štádium oxidačného stresu. Signifikantné zníženie aktivity GR na 37 % je pravdepodobne spôsobené neprimerane zvýšenou koncentráciou peroxidu vodíka a oxidovaného glutatiónu (substrátu je viac ako enzýmu).

S týmito výsledkami korešponuje aj monitorovanie vonkajšej mitochondriálnej membrány pomocou analýzy synchronného fluorescenčného fingerprintu (obr. 5).

Vrstevnicová mapa vytvorená zo série synchronných fluorescenčných spektier graficky definuje zložitý biologický materiál ako celok (Phelan, 1994; Kušnir a spol., 1998; Dubayová a spol., 1998).

Vzájomné porovnanie vrstevnicových máp v rozptyľovej a fluorescenčnej oblasti umožňuje odhaliť rozdiely medzi skúmanými

materiálmi (Dubayová a spol., 1999). Obrázok 5a graficky charakterizuje suspenziu mitochondrií pečene potkana v dýchacom médiu bez prídavku Fe²⁺-EDTA. Graficky definuje stav vonkajšej mitochondriálnej membrány. Oblasť $\Delta\lambda = 15\text{--}30$ nm zachytáva rozptyľové javy (rozptyľ svetla na povrchu mitochondrií). Hustota vrstevníc v tejto oblasti je vysoká, čo predstavuje vysokú intenzitu fluorescencie, takže mitochondrie sú nezmene- né, správajú sa na fluorescenčnom spektre (obr. 5a) ako veľké častice. Rozdiel vlnových dĺžok v oblasti >30 nm zaznamenáva natívnu fluorescenciu jednotlivých zložiek povrchu mitochondrií. Vrstevnice sú husté, fluorescencia je veľmi charakteristická pre mitochondrie po izolácii. Tento záznam (obr. 5a) považujeme za štandard, s ktorým porovnávame ostatné vrstevnicové mapy zmenené v dôsledku prídavku FeSO₄-EDTA (obr. 5b, 5c, 5d). Zvyšovaním koncentrácie FeSO₄ dochádza k zmene vrstevnicovej mapy v oboch oblastiach — rozptyľovej aj fluorescenčnej, čo znamená zmenu povrchu vonkajšej mitochondriálnej membrány. Zaznamenali sme postupný pokles intenzity fluorescencie v rozptyľovej i fluorescenčnej oblasti záznamu (obr. 5b, 5c, 5d), čo indikuje zmeny na povrchu mitochondrií až ich prípadný rozpad. Najvýraznejšie zmeny v rozptyľovej i fluorescenčnej oblasti sme zaznamenali na (obr. 5d), výrazné zníženie rozptyľu aj fluorescencie je pravdepodobne dôkazom straty integrity mitochondrií a rozrušenia vonkajšej mitochondriálnej membrány. Môže to byť dôsledok oxidačného stresu a možnej iniciácie apoptózy, čo podporuje naše výsledky, pri ktorých sme zistili, že koncentrácia Fe²⁺-EDTA 400 mmol/mg mit. bielkovín významne inhibovala aktivity všetkých enzýmov, ktoré sme v tejto práci sledovali.

Uvedené experimentálne výsledky predstavujú model pôsobenia reaktívnych foriem kyslíka na tvorbu energie v mitochondriách pečene. Tieto výsledky sú v zhode s teoretickými výsledkami opísanými v práci Wallaceho (1999). Na základe hodnôt jednotlivých parametrov možno konštatovať, že aplikované koncentrácie Fe²⁺-EDTA pôsobili ako prooxidanty. V prvej fáze ióny Fe²⁺-EDTA vyvolávajú mierne odpojenie respirácie od fosforylácie. Výsledkom je znížená tvorba ATP, tvorba reaktívnych foriem kyslíka a zvýšená aktivita antioxidantného systému mitochondrie. Pri vyšších koncentráciách Fe²⁺-EDTA je inhibovaný prirodzený antioxidantný systém a prejavuje sa veľmi nízka respirácia i fosforylácia. Vysoká koncentrácia reaktívnych foriem kyslíka a nízka produkcia energie vyvolávajú oxidačné poškodenie proteínov, lipidov mitochondrií, porušenie výmeny ADP/ATP a stratu membránového potenciálu. Výsledkom je zvýšená priepustnosť vonkajšej membrány mitochondrií, pre látky z vonkajšieho prostredia aj pre dôležité zložky oxidačnej fosforylácie, ktorých únik z mitochondrie aktivuje produkciu faktorov, ktoré prispievajú k apoptóze bunky.

Záver

V práci bol demonštrovaný modelový pokus oxidačného poškodenia mitochondrií potkana prídavkom Fe²⁺-EDTA v stúpajúcich koncentráciách. Rôzne druhy reaktívnych foriem kyslíka (superoxidový radikál, peroxid vodíka a hydroxylový radikál) a pravdepodobne stopové množstvá endogénneho trojmocného železa sa zúčastňujú na reakciách peroxidácie (Mimnauch a spol., 1985). Zo súboru výsledkov vyplýva, že medzi koncentráciou Fe²⁺-EDTA a poškodením energetiky mitochondrií je jednoznačná súvislosť. Potvr-

dil sa predpokladá, že soli železa majú in vitro silný prooxidatívny účinok, ako kovy sú pre bunku toxické. Redukované Fe²⁺ môže mať v bunke úlohu katalyzátora v reakciách, ktoré indukujú v bunke tvorbu voľných radikálov. Voľné radikály kyslíka poškodia bunkové lipidy, nukleové kyseliny, proteíny, a sacharidy, čo poškodí funkciu a integritu bunky. Z našich výsledkov vyplýva, že koncentrácia Fe²⁺ 400 mmol/mg bielkoviny pravdepodobne vyvoláva už veľmi vážne poškodenie ako výsledok oxidačného stresu, s následkom vyradenia prirodzených antioxidantných systémov mitochondrií, vyvolávajú zmeny na povrchu mitochondrií, až ich prípadný rozpad, ktorý môže byť sprevádzaný aj ďalšími nešpecifickými deštruktívnymi procesmi. Tomu zodpovedajú aj zmeny zachytené metódou analýzy synchronného fluorescenčného fingerprintu.

Literatúra

- Balzan R., Agius D.R., Bannister W.H.:** Cloned prokaryotic iron superoxide dismutase protects yeast cells against oxidative stress depending on mitochondrial location. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Mar. 5, 256, 1999, č. 1, s. 63—67.
- Bohme G., Schonfeld P., Kuster U., Kunz W., Lyr H.:** The multifunctional actions of beta-thujaplicin on the oxidative energy transformations as a consequence of its lipophilic and chelating properties. *Acta Biol. Med. Ger.*, 39, 1980, č. 11—12, s. 1153—1163.
- Britton R.S.:** Metal-induced hepatotoxicity. *Semin. Liver Dis.*, 16, 1996, č. 1? s. 3—12.
- Cardoso S.M., Pereira C., Oliviera R.:** Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, Jan 26, 1999, č. 1—2, s. 3—13.
- Carlberg I., Mannervik, B.:** Glutathione reductase. *Method. Enzymology*, 113, 1985, s. 484—485.
- Cavallini L., Bindoli A., Macri F., Vianello A.:** Lipid peroxidation induced by cercosporin as a possible determinant of its toxicity. *Chem. Biol. Interact.*, Dec 28, 1979, č. 2—3, s. 139—146.
- Dean R.T., Nicholson P.:** The action of nine chelators on iron-dependent radical damage. *Free Radic. Res.*, Feb 20, 1994, č. 2, s. 83—101.
- Dubayová K., Kušník J., Makuchová V.:** Synchronous Fluorescence Fingerprint as the Identity Card of Food Products. *Chem. Papers*, 52, 1998, s. 797.
- Dubayová K., Lešková L., Kušník J.:** Hodnotenie prípravkov prírodnej medicíny pomocou špeciálnej fluorescenčnej techniky. *Čes. a Slov. Farm.*, 48, 1999, s. 77—79.
- Đuračková Z., Bergendi Z., Liptáková L., Muchová J.:** Voľné radikály odvodené od kyslíka a medicína. *Bratisl. lek. Listy*, 94, 1993, č. 8, s. 419-439.
- Đuračková Z.:** Ochranné systémy proti toxickému účinku voľných radikálov a radikálov a reaktívnych metabolitov kyslíka. S. 173—279. In: *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne*. Bratislava, SAP 1998.
- Guanhua D.U., Mouithys-Mickalad A., Sluse F.E.:** Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 1998, č. 9, s. 1066—1074.
- Hartree E.F.:** Determination of protein: A modification of lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.*, 48, č.2, 1972, s. 422—427.

- Hermes-Lima M., Castilho R.F., Meinicke A.R., Vercesi A.E.:** Characteristics of Fe(II)ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biochem.*, Apr. 12, 145, 1995, č. 1, s. 53–60.
- Jakus V., Lopuchová M.:** Role of free radicals, oxidative stress and anti-oxidant systems in liver diseases. *Bratisl. lek. Listy*, 100, 1999, č. 10, s. 548–559.
- Johnson D., Lardy H.:** Isolation of liver or kidney mitochondria. *Method. Enzymology*, 10, 1967, s. 94–96.
- Kakkar P., Mehrotra S., Viswanathan P.N.:** tBHP induced in vitro swelling of rat liver mitochondria. *Mol. Cell Biochem.*, Jan 12, 154, 1996, č. 1, s. 39–45.
- Kaplán P., Matejovičová M., Mézešová V.:** Iron-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺-exchanger in synaptosomes: Protection by the pyridoinole stobadine. *Neuroch. Res.*, 12, 1997, s. 1523–1529.
- Kuratko C.N.:** Iron increases manganese superoxid dismutase activity in intestinal epithelial cells. *Toxicol. Lett.*, Jan 11, 104, 1999, č. 1–2, s. 151–158.
- Kušnír J., Dubayová K., Makuchová V.:** The reference library of synchronous fluorescence spectra – medicine and industrial application. *Chem. Papers*, 52, 1998, s. 291.
- Loschen G., Flohe L., Chance B.:** Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.*, 18, 1971, s. 261–264.
- Magálova T.:** Antioxidačné obranné systémy a stopové prvky. *Bratisl. lek. Listy*, 95, 1994, č. 12, s. 562–565.
- Masini A., Trenti T., Ceccarelli-Stanzani D., Ventura E.:** The effect of ferric iron complex on isolated rat liver mitochondria. II. Ion movements. *Biochim. Biophys. Acta*, Oct 29, 810, 1985, č. 1, s. 27–32.
- Meisner J.:** Isolation of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. Measurement of calcium-stimulated ATPase activity. *Method. Enzymology*, 3, 1974, s. 238–246.
- Morimito, R.I., Kline, M.P., Bimston, D.M., Cotto, J.J.:** The heat shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochemistry*, 32, 1997, s. 17–29.
- Mimnaugh E.G., Trush M.A., Bhatnagar M., Gram T.E.:** Enhancement of reactive oxygen-dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin. *Biochem. Pharmacol.*, Mar 15, 34, 1985, č. 6, s. 847–856.
- Phelan V.:** Adding a new dimension to fluorescence analysis. *Int. Lab. News*, 12, 1994, s. 7.
- Račay P., Qteishat A.W.A., El Kamberg H.M., Mézešová V., Lehotský J.:** Fe²⁺-induced inhibition of gebril forebrain microsomal Ca²⁺-ATPase: Effect of stobadine, glutathione and combination of both antioxidants. *Biophys. Acta*, 370, 1998, s. 119–126.
- Reinheckel T., Noack H., Lorenz S., Wiswedel I., Augustin W.:** Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. *Free Radic. Res.*, Oct 29, 1998, č. 4, s. 297–305.
- Robb S.J., Robb-Gaspers L.D., Scaduto R.C. Jr, Thomas A.P., Connor J.R.:** Influence of calcium and iron on cell death and mitochondrial function in oxidatively stressed astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, Mar 15, 55, 1999, č. 6, s. 674–686.
- Schaper U., Kämpf A., Scheuch D.W.:** Zur Bestimmung der Superoxid-dismutase in Blut und anderen gewebe. *Z. Med. Lab. Diagn.*, 27, 1986, s. 105–108.
- Taylor D.E., Ghio A.J., Piantadosi C.A.:** Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch. Biochem. Biophys.*, Jan 10, 316, 1995, č. 1, s. 70–76.
- Treem W. R., Sokol R.J.:** Disorders of the mitochondria. *Semin. Liver Dis.*, 18, 1998, č. 3.
- Trumper L., Noack H., Augustin W.:** The role of mitochondrial glutathione in the defence against Fe²⁺/ascorbate induced peroxidation of rat liver mitochondria. *Biomed. Biochem. Acta*, 48, 1989, č. 10, s. 743–750.
- Verity M.A.:** Manganese neurotoxicity: a mechanistic hypothesis. *Neurotoxicology*. Apr-Jun, 20, 1999, č. 2–3, s. 489–497.
- Volková K., Beňo I., Staruchová M., Bobek P., Mekiňová D., Tatara M.:** Antioxidant enzymes activity in healthy persons blood. *Bratisl. lek. Listy*, 97, 1996, č. 3, s. 134–138.
- Wallace D.C.:** Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283, 1999, s. 1482–1488.

Received November 4, 1999.

Accepted March 10, 2000.