

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra chemie

Mitochondrie a onkologická onemocnění
Bakalářská práce

Autor: Kateřina Lutonská
Studijní program: B1407 Chemie
Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin

Vedoucí práce: Mgr. Monika Schmidt, Ph.D.

Hradec Králové

Červenec 2020



Zadání bakalářské práce

Autor:	Kateřina Lutonská
Studium:	S17CH041BP
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Toxikologie a analýza škodlivin
Název bakalářské práce:	Mitochondrie a onkologická onemocnění
Název bakalářské práce AJ:	Mitochondria and cancer

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Student vypracuje teoretickou práci na zadané téma: Mitochondrie a onkologická onemocnění. Student nejprve zpracuje rešerši literatury na téma mitochondrie, popíše jejich fyziologii a metabolické pochody, které se v této organelle odehrávají. V druhé části se práce bude věnovat možnostem ovlivnění mitochondriálních procesů v léčbě onkologických onemocnění.

Při zpracování tématu student vychází z dostupné, ideálně recentní vědecké literatury a každý použitý zdroj informací řádně ocituje a uvede v seznamu použité literatury. Student se při zpracování řídí Metodickými pokyny pro vedení, vypracování a obhajoby vysokoškolských kvalifikačních prací Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové (rozhodnutí děkana č. 4 /2020) a svou práci v průběhu sepisování konzultuje se svým vedoucím práce.

Weinberg, S. E., & Chandel, N. S. (2015). Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature Chemical Biology*, 11(1), 9–15.

Liou, G. Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>

Garantující pracoviště:	Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta
Vedoucí práce:	Mgr. Monika Schmidt, Ph.D.
Oponent:	Mgr. Helena Řehulková, Ph.D.
Datum zadání závěrečné práce:	27.6.2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a s použitím uvedené literatury.

V Hradci Králové dne 23.7.2020

Kateřina Lutonská

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Monice Schmidt, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, čas a za podporu při psaní této bakalářské práce.

Anotace

Bakalářská práce se zabývá mitochondriemi, jejich patologií v kancerogenezi a jejich rolí v cílené léčbě onkologických onemocnění.

V úvodu práce je organela charakterizována z pohledu struktury, vlastností, funkcí a fyziologie, kde se čtenář seznámí se základními znalostmi o mitochondriích potřebnými pro pochopení následující problematiky. Poté se práce zaměřuje na jejich patologii, kde se podrobněji popisují a rozebírají procesy probíhající v mitochondriích vedoucí ke vzniku kancerogeneze.

Závěr práce se věnuje eventuálním mitochondriálním terapeutickým strategiím pro onkologicky nemocné pacienty. V současné době jsou klinicky testovaná nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii a v této práci jsou zmíněny některé cílené terapie, které se staly součástí komplexní protinádorové léčby.

Klíčová slova

Mitochondrie, onkologické onemocnění, apoptóza, cílená terapie

Annotation

Title: Mitochondria and cancer

This bachelor thesis deals with mitochondria, their pathology in carcinogenesis and their part in targeted therapy in oncological diseases.

In the introduction there is a characterization of the organelle from a perspective of its structure, properties and physiology. Reader becomes familiar with basic facts about mitochondria allowing him to understand following problematics which is their pathology. This part contains details about processes inside of mitochondria resulting in a carcinogenesis creation.

Conclusion of this bachelor thesis is dedicated to eventual mitochondrial therapeutic strategies for patients with diagnosed oncological disease. Currently new antitumor drugs and treatment strategies in oncology are tested so some of targeted therapies are detailedly described.

Keywords

Mitochondria, oncological disease, apoptosis, targeted therapy

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Mitochondrie.....	2
2.1	Charakteristika organely.....	2
2.2	Evoluce mitochondrií.....	3
2.3	Stavba organely.....	4
2.3.1	Vnější membrána.....	4
2.3.2	Mezimembránový prostor	4
2.3.3	Vnitřní membrána	5
2.3.4	Matrix	6
2.3.4.1	Membránové proteiny mitochondrií.....	6
2.4	Fyziologie mitochondrií.....	7
2.4.1	Buněčné dýchání.....	8
2.4.1.1	Glykolýza	8
2.4.1.2	Krebsův cyklus	9
2.4.1.3	Dýchací řetězec	9
2.4.1.4	Oxidativní fosforylace	10
2.5	Genetika mitochondrií.....	11
2.5.1	Mitochondriální DNA	11
2.5.2	Maternální dědičnost	11
2.6	Degradace mitochondrií.....	12
3	Patologie mitochondrií.....	13
3.1	Dysfunkce mitochondrií u nádorových onemocnění	13
3.1.1	Hypoxie u mitochondrií	13
3.1.2	Oxidační stres.....	14

3.1.2.1	Reaktivní formy kyslíku	15
3.1.3	Aerobní glykolýza	16
3.1.4	Apoptóza	17
3.1.4.1	Mitochondriální apoptóza	18
3.1.4.2	Receptorová apoptóza	19
3.2	Apoptóza a kancerogeneze	19
3.2.1	Narušená rovnováha pro a anti-apoptotických proteinů	20
4	Onkologická onemocnění	22
4.1	Základní rozdělení a charakteristika nádorů	23
4.2	Průběh onkologického onemocnění	24
5	Mitochondrie a potenciální terapie onkologického onemocnění	25
5.1	Cílená terapie onkologického onemocnění	26
5.1.1	Ovlivnění energetického metabolismu buňky	26
5.1.1.1	Oxidativní fosforylace	26
5.1.1.2	Ovlivnění Krebsova cyklus	28
5.1.2	Ovlivnění indukce apoptózy	29
5.1.2.1	Reaktivní kyslíkové radikály	29
5.1.2.2	Inhibice Bcl-2 proteinů	30
5.1.2.3	Útlum proteinů teplotního šoku	31
5.1.2.4	Inhibice ubikvitin E3 ligasy	32
5.1.2.5	Potlačení autofagie	33
6	Závěr	35
7	Seznam použité literatury	36

Seznam obrázků

Obrázek 1: Stavba mitochondrie	2
Obrázek 2: Evoluce mitochondrií	3
Obrázek 3: Stavba vnitřní membrány mitochondrie	6
Obrázek 4: Struktura ATPsynthasy.....	10
Obrázek 5: Proces mitofágie.....	12
Obrázek 6: Energetický zisk aerobní glykolýzy	17
Obrázek 7: Proces mitochondriální apoptózy	19
Obrázek 8: Příklad maligního tumoru-Invazivní karcinom prsu	23
Obrázek 9: Příklad benigního tumoru-Intramurální leiomyom dělohy	24
Obrázek 10: Chemický vzorec metforminu	27
Obrázek 11: Chemický vzorec phenforminu	28
Obrázek 12: Chemický vzorec enasidenibu.....	29
Obrázek 13: Chemický vzorec elesklomolu	30
Obrázek 14: Účinek ABT-737 in vivo po 4 hodinách	31
Obrázek 15: Model mechanismu BH3-mimetik.....	31
Obrázek 16: Chemický vzorec nutlinu-3.....	33
Obrázek 17: Chemický vzorec chlorochinu	34
Obrázek 18: Chemický vzorec hydrochlorochinu	34

1 Úvod

V současné době zhoubná nádorová onemocnění patří mezi závažné celosvětové a společenské problémy, které se zařadily do předních pozic zájmu populace. Dřívější medicína až do 20. století znala pouze jedinou cestu k léčbě nádorových onemocnění, a to léčbu chirurgickou, která se vyznačovala značně omezenými možnostmi. V následujících letech se protinádorové terapie rozšířily o radioterapii a o původně doplňkovou metodu chemoterapii, která jako jediná působila systémovým účinkem. Postupem času se protinádorové terapie zdokonalovaly a rozšiřovaly o imunoterapii a další metody (Klener a spol.,2013).

Na přelomu tisíciletí se úroveň znalostí v molekulární biologii a genetice natolik zvýšily, že došlo k hlubšímu poznání procesu kancerogeneze a biologie maligních buněk. To přispělo ke vzniku nové komplexní protinádorové léčbě tzv. cílené terapii, která poukázala na fakt, že růst tumoru není pouze faktorem neregulované proliferace, ale velice zásadním problémem je inhibice programované buněčné smrti, neboli apoptózy. Tento objev přispěl k syntéze chemických látek inhibujících intracelulární pochody v nádorových buňkách (Klener a spol.,2013).

Funkční změny v mitochondriálních procesech jsou typické pro nádorové onemocnění a v posledních letech se tedy výzkumy zaměřují na mitochondriální procesy pro cílené terapie onkologických onemocnění. Mitochondrie jsou buněčné orgány, které jsou centrem energetického metabolismu buňky a také hrají klíčovou roli právě v apoptóze (Klener a spol.,2013).

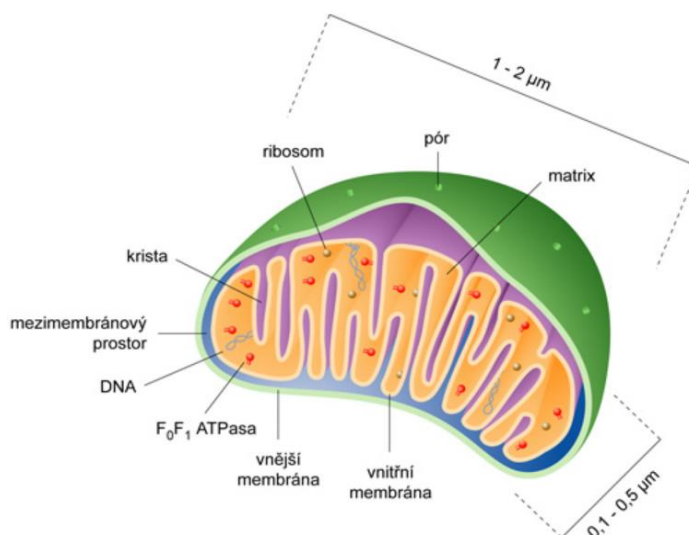
2 Mitochondrie

2.1 Charakteristika organely

Mitochondrie jsou dynamické, dvoumembránové organely s proměnlivou velikostí a tvarem, ale velmi typickou strukturou. Jsou tvořeny hladkou vnější membránou a vnitřní membránou, která je zprohýbaná. Mají protáhlý, trubicovitý tvar o šířce půl mikrometru s velmi proměnlivou délkou (do 2 μm). Mitochondrie jsou lokalizovány téměř ve všech eukaryotických buňkách (Lüllmann-Rauch, 2012).

Jedná se o semiautonómni organely obsahující vlastní DNA (mitochondriální DNA). Produkují složky nezbytné pro syntézu ATP (adenosintrifosfát) poskytující chemickou energii nezbytnou pro buněčné pochody. Molekula ATP patří mezi základní makroergní sloučeniny a je nezbytnou složkou pro pohon většiny buněčných aktivit (Lüllmann-Rauch, 2012).

Základem syntézy ATP je glykolýza, která probíhá v cytosolu. Metabolické pochody probíhající v mitochondriích končí Krebsovým cyklem vrcholící v dýchacím řetězci. Uvolněná energie se ukládá do makroergních vazeb ATP procesem nazývaným oxidativní fosforylace (OXPHOS) (Lüllmann-Rauch, 2012).



Obrázek 1: Stavba mitochondrie

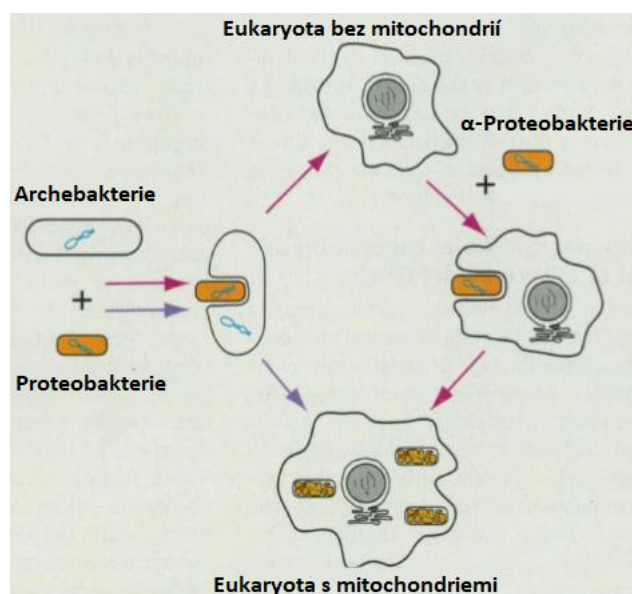
Zdroj: (Kodíček, 2015), str.249

2.2 Evoluce mitochondrií

Mitochondrie jsou orgány, které vznikly endosymbiotickou integrací alfa-proteobakteriálních endosymbiontů do proto-eukaryotních hostitelských buněk (Karnkowska et al., 2016).

Endosymbiotické modely původu mitochondrií mohou být rozděleny podle původu organely, a to zda se organela vyvinula současně se zbytkem eukaryotické buňky nebo později (Gray, 2014).

V průběhu eukaryotické evoluce byl genom a proteom mitochondriálního kompartmentu významně modifikován a značné množství funkcí bylo získáno, ztraceno nebo přemístěno. V extrémních případech se deriváty mitochondrií v anaerobních protistech tak pozměnily, že byly přehlíženy nebo nebyly dokonce uznány homologními s mitochondriemi. V 80. letech byla navržena Archezoaova hypotéza, která tvrdí, že někteří mikrobiální eukaryoti postrádali mitochondrie, peroxizomy, skládaný Golgiho aparát, spliceozomální introny a sexuální reprodukci. Avšak v následujícím desetiletí byly ve všech vyšetřovaných praprvcích nalezeny odpovídající orgány se dvěma membránami (Karnkowska et al., 2016).



Obrázek 2: Evoluce mitochondrií

Zdroj: (převzato a upraveno Gray, 2014), str. 1480

2.3 Stavba organely

Mitochondrie jsou svým tvarem a velikostí podobné bakteriím, ale je nutno podotknout, že se jedno i druhé může měnit v závislosti na typu buňky, ve které se nacházejí. Zrychlené záběry živých buněk ukazují, že mitochondrie jsou pozoruhodně dynamické organely, které se neustále pohybují. Každá mitochondrie obsahuje dvě membrány, vnitřní a vnější, které mají klíčovou roli v mitochondriálních procesech. Tyto membrány separují dva mitochondriální prostory: velký vnitřní (matrix) a mnohem menší prostor mezimembránový (Alberts, 1998).

2.3.1 Vnější membrána

Vnější membrána obsahuje velké množství molekul transportního proteinu, který se nazývá porin. Tento protein tvoří vodní kanály ve dvojně vrstvě lipidů, a proto je vnější membrána propustná pro všechny molekuly až do velikosti 5000 Da. Díky tomu je mezimembránový prostor chemicky ekvivalentní s malými molekulami, které se nacházejí v cytosolu buňky (Alberts, 1998). Vnější membrána je definována přítomností monoaminoxidas, enzymů, které prodlužují řetězce mastných kyselin a enzymů metabolizující fosfolipidy (Ledvina a spol.,2009).

2.3.2 Mezimembránový prostor

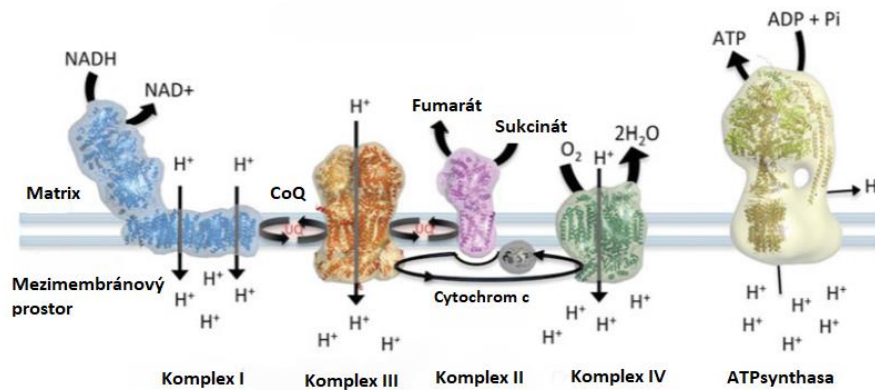
Mitochondriální mezimembránový prostor lze popsat jako viskózní koloidní roztok, u kterého nejsou přesně definovány jeho metabolické funkce. Dochází zde jen ke shromažďování nízkomolekulárních látek. (Ledvina a spol.,2009). Tento prostor se však podílí na procesech dýchacího řetězce, který je umístěn ve vnitřní mitochondriální membráně. Komplexy tohoto řetězce přenášejí H^+ ionty z mitochondriálního matrix do mezimembránového prostoru, čímž dochází ke vzniku elektrochemického gradientu a odlišného pH. Rozdílné pH je způsobené vyšší koncentrací H^+ iontů v mezimembránovém prostoru než-li v matrix mitochondrie, kdy mezimembránový prostor má pH 7,0, zatímco pH v mitochondriální matrix je 8,0. Vzniklý elektrochemický protonový gradient je následně využit v syntéze ATP (Feher, 2012).

2.3.3 Vnitřní membrána

Vnitřní membrána je oproti vnější membráně bohatší na proteiny, obsahuje až 75 % proteinů své hmotnosti. Na rozdíl od vnější membrány, je vnitřní membrána vysoce selektivní, jelikož je tvořena vysokým obsahem specifického glycerolfosfolipidu kardiolipinu, který na své fosfátové hlavě nese čtyři mastné kyseliny. Je schopná volně propustit pouze O₂, CO₂ a H₂O. Kromě proteinů dýchacího řetězce a ATPsynthasy obsahuje také četné transportní proteiny, které mají schopnost regulovat průchod některých metabolitů, jako je ATP, ADP, pyruvát, Ca²⁺ a anorganický fosfát (Voet, 1995).

Transport proteinů z cytosolu do matrix mitochondrie je zprostředkován pomocí podjednotkových proteinových komplexů, které fungují jako translokasy vnější a vnitřní membrány mitochondrie. Jedná se zejména o komplex TOM umístěný ve vnější membráně a komplexy TIM (TIM23 a TIM22) ve vnitřní mitochondriální membráně (Alberts, 2002).

Povrch vnitřní membrány je velký, protože je zvlněn do vchlípenin membrány, tzv. krist. Velikost povrchu a počet krist odpovídá respirační aktivitě dané buňky, tudíž čím více kyslíku buňka potřebuje, tím je membrána zřasena do více krist. Vnitřní membrána také ve své struktuře obsahuje soubor přenašečů, které tvoří komplexy dýchacího řetězce. Byly popsány 4 hlavní komplexy: NADH-koenzym Q reductasa (komplex I.), sukcinát dehydrogenasa (komplex II.), ubichinol cytochrom c reductasa (komplex III.) a cytochrom c oxidasa (komplex IV.), které jsou zanořeny v membráně a propojeny enzymy koenzymem Q a cytochromem c. Cytochrom c je mobilní proteinový přenašeč, který je volně navázán na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány. Ve vnitřní membráně je také lokalizován komplex enzymu ATPsynthasa (ATPasa), která pomocí protonového gradientu procesem fosforylace produkuje vysokoenergetické molekuly ATP (Ledvina a spol., 2009).



Obrázek 3: Stavba vnitřní membrány mitochondrie
Zdroj: (převzato a upraveno Davies & Daum, 2013), str.1228

2.3.4 Matrix

Matrix mitochondrie je silně metabolicky aktivní kompartment. Nacházejí se zde enzymy Krebsova cyklu a β -oxidace mastných kyselin, z čehož můžeme usoudit, že je schopný zpracovávat produkty všech potřebných živin. Najdou se zde i některé enzymy, které syntetizují hem, řetězce DNA, ribosomy a enzymy potřebné k syntéze proteinů. Všechny tyto faktory jsou základem pro mitochondriální dědičnost (Ledvina a spol., 2009).

V matrix mitochondrie je navíc uložena mitochondriální DNA (mtDNA), proteosyntetický aparát a tzv. proteiny teplotního šoku („heat shock“ proteiny), zajišťující univerzální stresovou odpověď buněk na jejich vystavení extrémním podmínkám, jako je například vysoká teplota nebo extrémní pH. Působením stresových faktorů jsou tyto proteiny zmnožovány (Kohlíková a spol., 2003).

2.3.4.1 Membránové proteiny mitochondrií

Jelikož se většina buněčných proteinů syntetizuje v cytosolu buňky, musí být proteiny určené pro lokalizaci v matrix mitochondrie převedeny přes obě mitochondriální membrány. Proteiny určené pro lokalizaci v matrix mitochondrie se syntetizují v cytosolu s tzv. presekvencí o velikosti 20 až 80 aminokyselin na N-konci daného proteinu. Dané preproteiny jsou v cytosolu vázány na cytosolické chaperony a jsou směřovány do komplexů translokas vnější mitochondriální membrány (TOM komplex), které obsahují proteinové receptory a obecný importní

pór. Transport proteinů přes vnitřní mitochondriální membránu zprostředkovává komplex translokas (TIM komplex). Import vyžaduje energii ve formě ATP i ve formě membránového potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně. Při transportu mitochondriálními membránami jsou matrixové proteiny chráněny interakcemi s molekulovými chaperony, což jsou proteiny teplotního šoku (HSP-*heat shock proteins*). HSP proteiny brání transportovaným proteinům předčasnému složení, jejich precipitaci a kontrolují správné sbalení matrixových proteinů. HSP jsou separovány do pěti skupin dle molekulární hmotnosti: 100kDa, 90kDa, 70kDa, 60kDa a tzv. malé HSP (např. HSP27). Jakmile jsou proteiny umístěny v matrixu mitochondrie, poskládají se do své přirozené konformace procesem, který je katalyzován HSP60 a HSP70. HSP mají také cytoprotektivní vlastnost, kterou organismus reaguje na stresové podněty (infekce, zánět ej.), jelikož stabilizují stresem deformované proteiny, čímž chrání buňky před strukturním a funkčním narušením. Na závěr je matrixový lokalizační signál odštěpen pomocí specifického enzymu proteasa (Voet,1995) (Pfanner & Meijer, 1997).

2.4 Fyziologie mitochondrií

V evoluci mnohobuněčných živočichů a rostlin byly mitochondrie jejich nepostradatelnou součástí. Dnešní eukaryota by bez nich byla zcela vázaná v produkci ATP na poměrně neúčinnou glykolýzu a bylo by nepravděpodobné, že by se tímto způsobem takto složité mnohobuněčné organismy udržely při životě. Při transformaci glukosy glykolytickou cestou na pyruvát se uvolní méně než 10 % veškeré dostupné volné potenciální energie. V mitochondriích se získá na jednu molekulu oxidované glukosy asi třicet šest molekul ATP, zatímco glykolýzou se na jednu molekulu glukosy vyprodukuje pouze dvě molekuly ATP. Mitochondrie mohou využít jako zdroj svého pohybu pyruvát, který pochází z glukosy nebo jiných sacharidů a mastné kyseliny pocházející z tuků, které jsou syntetizovány v cytosolu buňky. Obě molekuly jsou po translokaci přes vnitřní mitochondriální membránu transformovány pomocí enzymů v matrixu na klíčový metabolický meziprodukt acetyl-CoA. Tato dvouuhlíkatá sloučenina následně vstupuje do Krebsova cyklu, který produkuje molekuly CO₂, uvolňující se z buňky jako vedlejší produkt, a

současně tvoří vysokoenergetické redukované koenzymy NADH a FADH₂. Tyto redukované nukleotidy jsou následně přeneseny do vnitřní mitochondriální membrány a vstupují do dýchacího řetězce (ETC). Dochází zde k přenosu elektronů, k regeneraci NAD⁺ a FAD⁺ a ke tvorbě elektrochemického gradientu potřebného k syntéze ATP (Alberts, 1998).

2.4.1 Buněčné dýchání

Dýchání, neboli respirace, je proces probíhající v eukaryotických buňkách skládající ze dvou částí. Vnější respirace je mechanismus, při kterém je kyslík rozváděn oběhovým systémem ke všem buňkám v organismu. Nefunkční vnější respirací by došlo k ireverzibilnímu poškození buněk už v průběhu několika minut. Vnější respirace zprostředkovává vnitřní respiraci, která je označována jako buněčné dýchání. Je složena z reakcí ukončující energetické odbourávání sacharidů, lipidů a bílkovin. Výsledkem je získání energie, kyslík a finální produkty s nejnižším obsahem energie (CO₂ a H₂O) (Voet, 2011).

2.4.1.1 Glykolýza

Hlavním zdrojem buněčné energie je glukosa, která je metabolizována procesem glykolýzy na pyruvát (Lunt & Vander Heiden, 2011).

Glykolýza je souhrn reakcí, pomocí kterých se v těle téměř všech organismů katabolizuje většina molekul glukosy. Jedná se o fylogeneticky velice starý děj, který neprobíhá jen v naprosté výjimce organismů (např. methanogenní anaerobní archebakterie). V lidském těle probíhá ve všech buňkách. Glykolýza neprobíhá v mitochondriích, ale v buněčném cytosolu, ale je s mitochondriemi úzce spjata a je součástí energetického metabolismu buňky. Pro tuto cestu je charakteristické, že zúčastněné enzymy se nacházejí v cytosolu. Transformace glukosy na pyruvát je souhrnem několika reakcí, které se uskutečňují za aerobních i anaerobních podmínek. Velice významným krokem pro buňku je přeměna pyruvátu na acetyl-CoA pomocí složitých dekarboxylačních a oxidačních reakcí. Tento proces probíhá zásadně jen za aerobních podmínek. Pokud nastanou anaerobní podmínky, dojde k reverzibilní přeměně pyruvátu na laktát procesem zvaným fermentace (Ledvina a spol., 2009).

2.4.1.2 Krebsův cyklus

Krebsův cyklus zvaný také citrátový cyklus nebo cyklus trikarboxylových kyselin je cyklicky se opakující sled reakcí, který zaujímá centrální postavení v metabolismu buněk. Jedná se o vývojově velmi starý děj, který je lokalizován v mitochondriální matrix. Jelikož zde dochází k degradaci živin, ale také k četným syntetickým drahám, jedná se o amfibolický děj. Probíhá zde utilizace meziproductů všech tří základních druhů živin (lipidů, sacharidů a z největší části proteinů). Schéma citrátového cyklu lze připodobit „otáčivému mlýnskému kolu“, kde zdrojem pohybu je již zmíněný acetyl-CoA. Zásadním regulačním krokem jsou dostupnosti dalších substrátů, které zajišťují tzv. doplňující, anaplerotické reakce. Konečnými produkty Krebsova cyklu jsou oxid uhličitý a redukované kofaktory (NADH a FADH₂), které jsou transportovány do ETC. Důležitými kroky jsou dekarboxylace, které produkují oxid uhličitý a dehydrogenace, které poskytují atomy vodíku pro ETC. Energetický zisk Krebsova cyklu izolovaného od následujících procesů na vnitřní mitochondriální membráně by byl zanedbatelný (pouze GTP). Finální energetický zisk Krebsova cyklu spolu s ETC je zhruba 12 molekul ATP na 1 molekulu acetyl-CoA (Ledvina a spol., 2009).

2.4.1.3 Dýchací řetězec

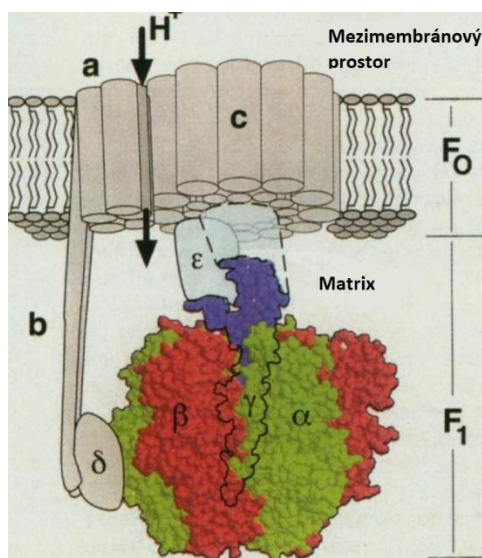
Dýchací řetězec označovaný také jako elektrontransportní řetězec nebo terminální řetězec (electron transport chain, ETC) je souhrn po sobě jdoucích přeměn na redoxních systémech lokalizovaných ve vnitřní mitochondriální membráně nebo na její vnější straně. Je tvořen čtyřmi komplexy a dále koenzymem Q a cytochromem c. Komplex I (NADH-koenzymQ reduktasa) přenáší elektrony z redukovaných koenzymů NADH na koenzym Q (ubichinon), který je tím redukován na ubichinol. Komplex II (sukcinát dehydrogenasa) transportuje elektrony ze sukcinátu na koenzym Q a redukuje ho. Dochází k oxidaci sukcinátu na fumarát, uvolnění FADH₂ a k propojení dýchacího řetězce s Krebsovým cyklem. Komplex III (ubichinol cytochrom c reduktasa) přenáší elektrony z redukovaného koenzymu Q na cytochrom c. Komplex IV (cytochrom c oxidasa) dochází k oxidaci čtyř po sobě redukovaných molekul cytochromu c za probíhající redukce molekuly O₂ a produkci H₂O. Pojem „respirační řetězec“ je považovaný za téměř synonymum s biologickým

výrazem „buněčné dýchání“. Během sledu reakcí respiračního řetězce dochází k uvolnění značného množství volné Gibbsovy energie, která by deformovala buňku, a proto proces oxidace v mitochondriích probíhá stupňovitě a kontrolovaně. Postupně uvolňovaná energie se pomocí napojené OXPHOS transformuje do molekul ATP (Ledvina a spol.,2009).

2.4.1.4 Oxidativní fosforylace

Oxidativní fosforylace (OXPHOS) je endergonická syntéza ATP z adenosindifosfátu (ADP) a anorganického fosfátu P_i , která probíhá na vnitřní mitochondriální membráně. Tato reakce je katalyzována pomocí ATPsynthasy, která pracuje na základě vyrovnání elektrochemického gradientu propouštěním H^+ iontů zpět z mezimembránového prostoru do matrix mitochondrie (Voet,1995).

ATPsynthasa patří k nejsložitější struktuře vnitřní membrány mitochondrie. Je složena ze dvou větších sektorů F_0 a F_1 . Sektor F_0 je ve vodě nerozpustný transmembránový protein, který je složený ze čtyř až pěti podjednotek obsahující protonové translokační kanály a je zasazený do vnitřní mitochondriální membrány. Sektor F_1 je ve vodě rozpustný periferní membránový protein tvořený pěti podjednotkami směřující do matrix mitochondrie (Voet,1995).



Obrázek 4: Struktura ATPsynthasy

Zdroj: (převzato a upraveno Saraste, 1999), str.1491

2.5 Genetika mitochondrií

2.5.1 Mitochondriální DNA

Mitochondrie patří k semiautonomním buněčným organelám, které se rozmnožují dělením. Obsahují dvouřetězcovou kruhovou DNA, která je dlouhá 16 569 párů bazí a zahrnuje 37 genů kódujících 22 tRNA, 2 rRNA a 13 podjednotek dýchacího řetězce. Mitochondriální DNA se liší ve velikosti závisle na druhu organismu. Mitochondriální DNA bývá často superspiralizovaná a může být často pomocí zlomů vrácena do normální kruhové formy. Mitochondriální DNA se liší od jaderné rozdílným obsahem GC párů a tím i rychlostí renaturace (Böhmová, 1992).

Mitochondrie nejsou samostatné orgány v buňce. Procesy replikace a transkripce jsou závislé na faktorech kódovaných jadernou DNA. Vlákna dvoušroubovice se liší skladbou GC bazí, což způsobuje odlišnou hustotu každého řetězce. Vlákna jsou označována jako H-vlákna (těžká vlákna), které jsou bohaté na purinové báze (adenin a guanin) a je zde lokalizováno 28 mitochondriálních genů, a zbylých devět je lokalizovaných na L-vláknech (lehká vlákna), ve kterých dominují pyrimidinové báze (cytosin a thymin). Replikace mitochondriální DNA začíná na H-vláknech, kde je přepsáno 28 genů a na L-vláknech, kde je transkribováno devět genů pro tRNA (Taanman, 2003).

2.5.2 Maternální dědičnost

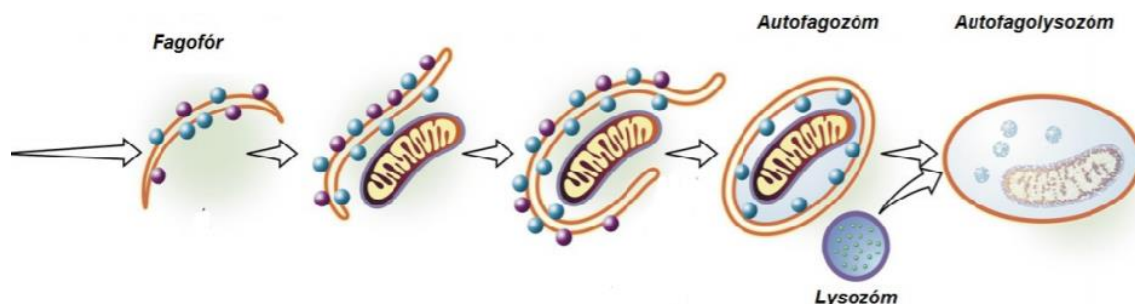
Během evoluce dochází v řadě orgánů ke zmnožování mitochondrií, čímž dochází ke zintenzivnění aerobního metabolismu. Frekvence mutací u mitochondriální DNA je 10-20x vyšší než u jaderné DNA, což má za následek heteroplasmii. Tento stav se vyznačuje přítomnými různými variantami mitochondriální DNA, což znamená, že u některých kopií mtDNA k mutaci dojde a u některých nikoliv. Nedostatečnost v systému vzniká při překročení určitého mezního poměru (prahový efekt) mutované a nemutované DNA a vznikem dysfunkční mitochondrie. Některé poruchy mtDNA mohou být způsobeny defektem nadřazené jaderné DNA. Jelikož většina mitochondrií pochází z vajíčka, u primárních poruch mtDNA jde o maternální (mateřskou) dědičnost (Kohlíková a spol., 2003). Vzhledem k fyziologické funkci mitochondrií vyplývá, že dědičná

mitochondriální onemocnění z velké většiny postihují tkáně, které mají vysoké nároky na přísun energie. Mezi tkáně s vysokými energetickými nároky řadíme neuromuskulární tkáň nebo centrální nervový systém (Otová a spol.,2013).

2.6 Degradace mitochondrií

Odstraňování nefunkčních a poškozených mitochondrií je zprostředkováváno pomocí mitofágie. Mitofágie je jeden z procesů makroautofágie, což je proces odstraňování buněčných organel za tvorby fagofóru, který obklíčí degradující obsah a vytvoří dvoumembránový autofagozóm splývající s lysozomem za tvorby autofagolysozomu. Mitofágie je specifický typ makroautofágie pro odstraňování mitochondrií (Mizushima et al, 2008).

K degradačním procesům také částečně dochází v mitochondriální matrix. Proteiny, které se nacházejí v mitochondriích mají také rozdílný poločas života a jejich délka se pohybuje od několika hodin až po několik dnů (Kohlíková a spol.,2003).



Obrázek 5: Proces mitofágie

Zdroj: (převzato a upraveno Pattingre et al., 2008), str.314

3 Patologie mitochondrií

Změny v mitochondriální struktuře mohou být jak získané, tak dědičně podmíněné. Značně běžným jevem, který se vyskytuje v hypertrofovaném kosterním nebo srdečním svalu, je zmnožení mitochondrií, mitochondriáza. Tento jev je typický i u mnoha dysfunkcí aerobního metabolismu. Mitochondriázu lze chápat, jako snahu buňky kompenzovat nefunkční enzymové aktivity (Kohlíková a spol.,2003).

K největšímu zmnožení mitochondrií dochází v nádorových buňkách, kde je cytosol téměř zcela zaplněn právě mitochondriemi. Jedná se o tzv. onkocytární přeměnu buněk, při které dochází k poruše rovnováhy mezi tvorbou a degradací mitochondriálních bílkovin. Tyto buňky obsahují excentrické jádro a eozynofilní cytoplazmu (Kohlíková a spol.,2003).

3.1 Dysfunkce mitochondrií u nádorových onemocnění

Mitochondriální defekty jsou již dlouho podezřelé z účasti při vývoji a progresi maligního bujení. Před více než 70 lety Otto Warburg propagoval svůj výzkum o změnách v mitochondriích, které mají spojitost právě s rozvojem maligních procesů. Navrhl hypotézu mechanismu, který měl objasnit, jak se mitochondrie vyvíjejí během kancerogenního procesu. Předpokládal, že klíčovou událostí v kancerogenezi je vývojové „poranění“ dýchacího ústrojí, což má za následek kompenzační zvýšení produkce ATP nevýhodnou glykolýzou. Maligní buňky ve výsledku získají pro svoji energetickou potřebu ATP spíše prostřednictvím glykolytických mechanismů než OXPHOS, jako je běžné u normálních buněk. Jelikož rozdíly v energetickém metabolismu mezi normálními a rakovinnými buňkami tvoří biochemický základ pro navrhování a kompletaci terapeutických strategií v léčbě maligních procesů/onemocnění, je tento mechanismus jedním z klíčových faktorů při navrhování léčebných strategií (Carew & Huang, 2002).

3.1.1 Hypoxie u mitochondrií

Hypoxie, neboli nedostatek kyslíku, způsobuje stres buňkám a organismům, a může k němu docházet jak za patologických, tak i nepatologických podmínek. Nedostatek kyslíku souvisí s nemocemi, jako je rakovina, cukrovka nebo zánět, ale

představuje také výzvu pro lidi žijících ve vysoké nadmořské výšce. Hypoxii se buňky v organismu přizpůsobují transformací svého metabolismu. Tento proces je usnadněn změnami v expresi genů, ke kterým dochází na úrovni transkripce nebo translace, ale také změnami enzymatických aktivit určitých proteinů. Buněčnými senzory a adaptéry na detekci sníženého množství kyslíku jsou prolylhydroxylasy. Inaktivita zmíněných prolylhydroxylas stabilizuje hypoxií indukované faktory (HIF), které detekují hladinu kyslíku a v případě hypoxie vstupují do jádra buňky a zvyšují transkripci různých cílových genů, včetně mitochondriálních složek (Fuhrmann & Brüne, 2017).

Mitochondrie spotřebují nejvíce kyslíku v buňce a ovlivněním hladiny kyslíku mění fúzi (splynutí) a štěpení, mitofázi a OXPHOS (Fuhrmann & Brüne, 2017).

Adaptivní reakcí na hypoxii je snížení hmoty mitochondrií specializovanou formou makroautofázie tzv. mitofázií, která již byla popsána v kapitole degradace mitochondrií. Některé proteiny, jako je například protein BNIP3 (Bcl-2 adenovirus E1B-19 kDa-interacting protein 3), který je schopný indukovat autofázi a aktivovat tvorbu autofagosomů, je regulovaný již zmíněnými HIF. Nastane-li hypoxie, autofázie bude řízena pomocí HIF (Fuhrmann & Brüne, 2017).

3.1.2 Oxidační stres

Díky vysoké reaktivitě se může kyslík zúčastnit vysoce energeticky náročného elektronového transferu, a tím umožňuje tvorbu velkého množství ATP oxidativní fosforylací. To je nezbytné pro vývoj mnohobuněčných organismů, ale zároveň činí tyto organismy náchylnými k atakům na jakoukoli biologickou molekulu, ať už je to protein, lipid nebo DNA. V důsledku toho je naše tělo pod neustálým oxidativním útokem reaktivních forem kyslíku (ROS) (Burton & Jauniaux, 2011).

K ochraně buněk se evolučně vyvinul komplexní antioxidační systém, působící proti vysoké reaktivitě samotného kyslíku nebo kyslíkových metabolitů. Antioxidační systém působí za normálních okolností v každém organismu rovnovážně s prooxidačním systémem, tzn. proti vzniku nadbytku volných radikálů, a udržuje tím „zdravou rovnováhu organismu“ (Burton & Jauniaux, 2011).

V některých případech může být tato rovnováha narušena, což vede k tvorbě oxidačního stresu. Oxidační stres je v širším slova smyslu nejlépe definován, jako změna rovnováhy prooxidant a antioxidant ve prospěch prooxidantů, který vede k potenciálnímu poškození buňky. Oxidační stres je nyní považován za ústřední roli v patofyziologii mnoha různých nemocí (Burton & Jauniaux, 2011).

Existuje mnoho potenciálních zdrojů ROS a jejich reakce jsou často omezeny difúzí. Účinky ROS cílené na buňky do značné míry závisí na biomolekulách v její těsné blízkosti (Burton & Jauniaux, 2011).

3.1.2.1 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou radikály, ionty nebo molekuly, které mají volný nepárový elektron v nejvzdálenější vrstvě elektronového obalu. Jsou vysoce reaktivní. Lze je rozdělit do dvou skupin: volné kyslíkové radikály a neradikální ROS. K nejlépe studovaným ROS ve spojení s rakovinou patří superoxid, peroxid vodíku a hydroxylové radikály. V rakovinných buňkách se nachází vyšší koncentrace ROS (Liou & Storz, 2010).

Kyslíkové radikály, superoxid a peroxid vodíku, jsou produkovány v mitochondriích během OXPHOS a jsou známými mutageny. Superoxid se vytváří v komplexech I a III v ETC a uvolňuje se do mezimembránového prostoru (až 80 %) nebo do matrix mitochondrie. Mitochondriální permeační přechodový pór ve vnější mitochondriální membráně umožňuje únik superoxidu do cytosolu. Superoxid se transformuje na peroxid vodíku buď v matrix mitochondrie nebo cytosolu buňky. Peroxid vodíku je druhý posel, molekula účastní se signálních drah, jejíž koncentrace roste po vazbě prvního posla na membránový receptor. Peroxid vodíku je vysoce difúzní látka, která má schopnost procházet buněčnými membránami prostřednictvím aquaporinů (Liou & Storz, 2010).

V průběhu různých stresových situací může docházet ke kumulaci ROS, což má za následek přímé poškození proteinů lokalizovaných v buněčných strukturách a v indukci apoptózy nebo nekrózy (Klener a spol., 2013).

Vyšší produkce ROS může také spustit protoonkogenní signalizační dráhy. Tento proces funguje obráceně, tudíž onkoproteiny Myc a Kras mohou zvýšit produkci ROS. Extrémně vysoká produkce a následná kumulace ROS je však pro

buňky smrtící, a proto je v nádorech udržována oxidačně redukční rovnováha. Antiapoptotický protein Bcl-2 má schopnost nejen inhibovat apoptózu, ale také regulovat koncentrace ROS v buňkách (Radovan et al., 2018).

Produkci ROS v nádorových buňkách stimulují růstové faktory a cytokiny. Cytokiny patří do malé skupiny signálních proteinů buněčné imunitní odpovědi, jejichž produkci zajišťují makrofágové (Liou & Storz, 2010).

Většina tumorů vzniká z míst chronického podráždění, infekce nebo zánětu. Zánět je kritickou součástí nádorové progresse. Jednou ze složek imunitní odpovědi je infiltrace fagocytujících buněk, makrofágů, kteří vyvolávají generování ROS v nádorových buňkách prostřednictvím exkrece různých podnětů, jako jsou například faktory nádorové nekrózy (TNF α) patřící do skupiny cytokinů. V těchto buňkách dochází k rychlé produkci superoxidu, která vede k následné produkci peroxidu vodíku (Liou & Storz, 2010).

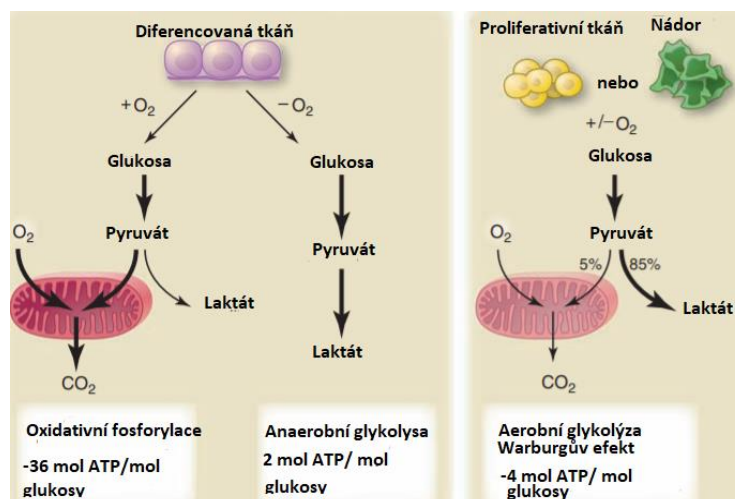
3.1.3 Aerobní glykolýza

Schopnost přeprogramování energetického metabolismu buňky je nyní považováno za jeden z hlavních aspektů v kancerogenezi naprosté většiny maligních nádorů. Nádorové buňky přijímají několikanásobně více glukosy než buňky zdravé. Většinu molekul ATP syntetizují pomocí glykolýzy. Produkce ATP OXPHOS v mitochondriích je naopak pozastavena. Nádorové buňky pracují mechanismem anaerobní glykolýzy a to i za aerobních podmínek tzv. aerobní glykolýzy (Zámečník a spol.,2019).

Nejdříve byla předpokládána skutečnost, že aerobní glykolýza je pouze reakce na deformované mitochondrie, které bývají u nádorových buněk běžné. Experimenty ale ukázaly, že pokud dojde v nádorových buňkách k inhibici glykolýzy, funkce metabolismu v mitochondriích je obnovena (Zámečník a spol.,2019).

- Glykolýza je až 100x rychlejší než OXPHOS, nádorová buňka si tak vyprodukuje více molekul ATP za daný čas. Nádorová buňka je však závislá na dostatečném množství glukosy.
- Během procesu aerobní glykolýzy se generuje velké množství laktátu, který je uvolněn do extracelulárního prostředí buňky, čímž je

nádorová buňka ochráněna před snížením vnitřního pH. Další výhodou sekrece laktátu do okolí je ten, že laktát okyseluje extracelulární prostředí buňky, což může způsobovat ochranu nádorových buněk před imunitním systémem. Může také oslabovat buněčnou adhezi a tím usnadnit šíření nádorových buněk (Zámečník a spol.,2019).



Obrázek 6: Energetický zisk aerobní glykolýzy
Zdroj: (převzato a upraveno Heiden et al., 2009), str.1030

3.1.4 Apoptóza

Apoptóza je fyziologický mechanismus buněčné smrti. Jde o přirozený degradační jev využívaný fyziologickými potřebami buněk, ale může být také indukován za podmínek patologických. Pro apoptózu je typická kontrolovaná a koordinovaná aktivace enzymatické buněčné výbavy, která má za následek štěpení DNA, jaderných a cytoplazmatických proteinů a degradaci buňky. Díky těmto znakům, je apoptóza často označována, jako programovaná buněčná smrt, která je za fyziologických podmínek velice striktně regulována (Zámečník a spol.,2019).

Důležitým znakem v procesu apoptózy je zachování buněčných membrán. V průběhu tohoto mechanismu buňka nejdříve prochází zmenšováním, cytoplazma se zahušťuje a jádro se může rozpadnout na několik částic. Dochází ke štěpení aktinu, kondenzaci jaderného chromatinu a k přeměně buněk v cytoplazmatické výchlípky, které se zaškrucují, a tím vznikají tzv. apoptotická tělíska. Jejich obsah je

stále obalen buněčnou membránou. Následně dochází k rychlé fagocytóze, díky které nedochází k vytvoření zánětlivé odpovědi (Zámečník a spol.,2019).

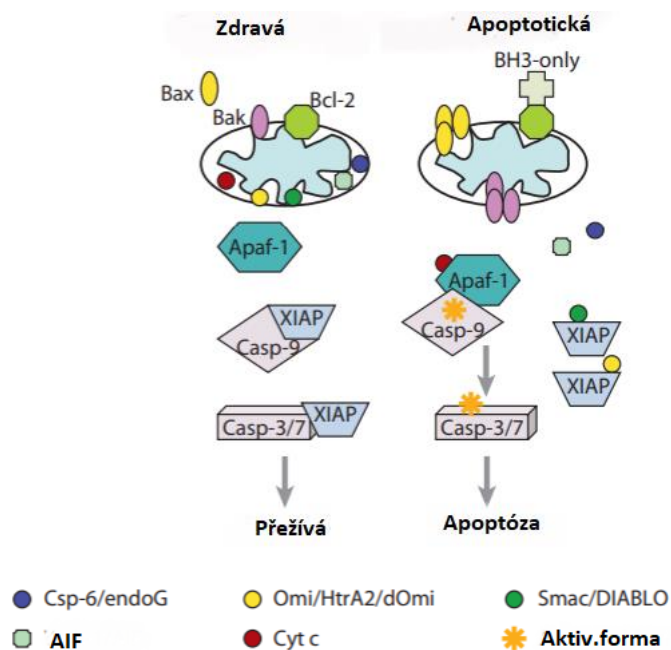
Apoptóza je proces vyžadující molekuly ATP, který vede k regulované eliminaci přestárých, nefunkčních, mutovaných, nepotřebných, infikovaných nebo transformovaných buněk. Tento proces je potřebný k udržení homeostázy v buňce. Deregulace apoptózy vede ke vzniku patologických stavů a je významným rysem většiny nádorových onemocnění (Klener a spol.,2013).

Apoptóza je rozdělována na dvě hlavní dráhy označované jako vnější receptorová (extrinzická,) dráha a vnitřní mitochondriální (intrinzická,) dráha, během které dochází k regulované degradaci buněčných komponent aktivovanými kaspázami a jinými enzymy (proteázy, endonukleázy). Probíhá štěpení aktinu, kondenzace chromatinu a dochází k transformaci buněk v apoptotická tělíska (Klener a spol.,2013)

3.1.4.1 Mitochondriální apoptóza

Tato dráha je hlavním mechanismem apoptotického zániku buněk a je způsobena zvýšením propustnosti vnější mitochondriální membrány. Následně dochází k uvolnění pro-apoptotických molekul (cytochrom c) a kyslíkových radikálů do cytosolu (Zámečník a spol.,2019).

Při procesu se tvoří multiproteinový efektorový komplex tzv. apoptozom, který autoaktivuje kaspázu 9 (CASP9) a následně spouští společnou apoptotickou dráhu (CASP3, CASP7) (Klener a spol.,2013).



Obrázek 7: Proces mitochondriální apoptózy
 Zdroj: (převzato a upraveno Palmer et al., 2000), str.97

3.1.4.2 Receptorová apoptóza

Vnější (zevní) cesta apoptózy začíná pomocí tzv. smrtících receptorů, které jsou lokalizovány v buněčných membránách různých buněk. Zmiňované receptory smrti obsahují některé proteiny z rodiny receptorů TNF. Jedná se například o receptor TNF typu 1- TNFR1 nebo protein FasR (*First apoptosis signal receptor, CD95*). Tyto proteiny obsahují cytoplazmatickou doménu tzv. doménu smrti a aktivují apoptotické dráhy (Zámečník a spol.,2019).

Spojováním smrtících receptorů vede ke vzniku multiproteinového efektorového komplexu DISC (*death inducing signaling complex*), kde probíhá autoaktivace apikálních kaspáz (CASP8, CASP10). Následkem je štěpení efektorových kaspáz (CASP3, CASP7) (Klener a spol.,2013).

3.2 Apoptóza a kancerogeneze

Kancerogeneze může být brána jako výsledek posloupnosti genetické změny, během které se normální buňka transformuje na maligní, zatímco se vyhýbá buněčné smrti. Zásadní roli v kancerogenezi hraje především snížená schopnost buňky podstoupit apoptózu. Existuje mnoho způsobů, jak může maligní buňka opět získat tyto schopnosti. Mechanismy, které se vyhýbají apoptóze mohou být

způsobeny narušenou rovnováhou pro- a anti-apoptotických proteinů (Li et al., 2007).

3.2.1 Narušená rovnováha pro a anti-apoptotických proteinů

Mnoho proteinů v buňce vykazuje buď pro- nebo anti-apoptotickou aktivitu. Důležité není celkové množství proteinů, ale spíše jejich poměr, který hraje zásadní roli v regulaci buněčné smrti. Existuje důkaz, že nadměrná nebo nedostatečná exprese určitých genů (a tedy množství výsledných regulačních proteinů) snižuje apoptózu v rakovinných buňkách a přispívá tak ke kancerogenezi (Li et al., 2007).

Jednu z klíčových rolí v regulaci apoptózy hraje rodina Bcl-2 proteinů, která se skládá z pro-apoptotických a anti-apoptotických proteinů, které působí především na mitochondriální úrovni. Všechny členy rodiny Bcl-2 proteinů jsou lokalizovány na vnější mitochondriální membráně, kde zodpovídají za permeabilitu membrány buď ve formě iontového kanálu, nebo vytvořením pórů. Bcl-2 proteiny jsou na základě funkce separovány do 3 skupin. Do první skupiny patří anti-apoptotické proteiny, jako jsou například Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w a Bcl-B/Bcl2L10, které jsou tvořeny třemi až čtyřmi BH doménami. Tyto domény umožňují interakci s proteiny a molekulami vnější mitochondriální membrány, endoplazmatického retikula a jaderné membrány. Druhá skupina se skládá z pro-apoptotických proteinů BH3-only, jako jsou například Bad, Bim, Noxa a Bid, které jsou tvořeny pouze BH3 doménou. Tyto proteiny reagují na příchozí apoptotické stimuly a apoptózu aktivují interakcemi s proteiny Bax a Bak. Poslední třetí skupina je také pro-apoptotická a patří sem právě například Bax a Bak, které mají schopnost vytvářet póry na vnější membráně mitochondrie, čímž dochází k uvolnění kyslíkových radikálů a dalších pro-apoptotických molekul do cytosolu a ke spuštění apoptózy. Pokud dojde k narušení rovnováhy rodiny Bcl-2 proteinů, dojde v postižených buňkách k deregulaci apoptózy (Li et al., 2007).

Jedním z nejznámějších nádorových supresorových proteinů je protein p53, který není zapojen pouze do indukce apoptózy, ale je také pro buňku důležitý k regulaci buněčného cyklu, vývoje a v buněčného stárnutí. Bývá nazýván jako strážce genomu, který v případě poškození DNA zastaví buněčný cyklus na konci

fáze G1, a tím dá buňce čas na opravu DNA. Pokud jsou však škody příliš velké, nasměruje buňku k podstoupení programované buněčné smrti (Li et al., 2007).

4 Onkologická onemocnění

Mezi základní znaky nádorového onemocnění patří zvýšená proliferace, omezená apoptóza anebo kombinace obou znaků. Příčinou vzniku a rozvoje nádoru je iniciační neletální mutace genů tzv. aktivační nebo inhibiční mutace. Jednou z možností, jak mohou být tyto mutace kódovány, jsou proteiny aktivující dělení a růst buněk tzv. protoonkogeny, které jsou transformovány v onkogeny. Druhou možností kódování mutací jsou proteiny, které inhibují buněčný růst a podporují apoptózu tzv. tumor supresorové geny. Poslední variantou jsou proteiny, které mají schopnost opravovat mutace v DNA tzv. DNA-reparační geny. Mutace mohou být buď vrozené nebo získané, které vznikají během života spontánně nebo působením rizikových vlivů ,tzv. kancerogenů. Vznik nádorového onemocnění může být také způsoben selháním imunitního systému organismu (Vokurka a spol.,2018).

Jsou známy dvě hlavní skupiny genů, které se uplatňují v kancerogenezi: onkogeny a nádorové supresory. Skupinu genů tzv. DNA-reparační geny lze ze systematického hlediska zařadit mezi zmíněné dvě skupiny (Büchler a spol.,2019).

Onkogen je patologicky aktivovaný gen, který prošel mutací vedoucí buď ke zvýšení hladin proteinového produktu tzv. onkoproteinu, nebo ke kvalitativní změně se zvýšenou aktivitou. Nemutovaná forma onkogenu se nazývá protoonkogen. K nejčastějším mutacím onkogenů dochází v somatických buňkách. Protoonkogeny jsou důležité k regulaci procesů, jako je buněčný růst a dělení (proliferace). Proces přeměny protoonkogenu na onkogen se nazývá aktivace protoonkogenu. Onkogeny se rozdělují do svých kategorií podle funkce příslušného onkoproteinu. Mezi významné onkogeny patří například, v-Abl, c-Myc nebo K-Ras (Büchler a spol.,2019).

Nádorový supresor, tzv. antionkogen je gen jehož proteinový produkt zabraňuje vzniku a vývoji nádoru a jehož inaktivace přispívá k maligní transformaci. Nádorové supresory jsou podstatné hlavně v regulaci buněčného cyklu, apoptózy nebo opravných mechanismech DNA. Mezi důležité příklady nádorových supresorů patří BRCA1, BRCA2 nebo TP53 (Büchler a spol.,2019).

4.1 Základní rozdělení a charakteristika nádorů

Nádor je definován jako lokalizovaná autonomní proliferace buněk vymknutých z regulačních mechanismů organismu. Autonomní povaha je vlastnost tumoru, kdy nedochází k zastavení růstu ani po odstranění příčiny (Büchler a spol.,2019).

Z pohledu biologických vlastností lze tumory rozdělit na tzv. nezhoubné (benigní) a na tzv. zhoubné (maligní) (Vokurka a spol.,2018).

- Maligní nádory rostou spíše rychleji, agresivněji, invazivně nebo infiltrativně do okolí a mají schopnost metastázovat (Vokurka a spol.,2018).



Obrázek 8: Příklad maligního tumoru-Invazivní karcinom prsu

Zdroj: (Zámečník a spol.,2019), online

- Benigní nádory rostou spíše pomaleji, ohraničeně a nemetastazují (Vokurka a spol.,2018).



Obrázek 9: Příklad benigního tumoru-Intramurální leiomyom dělohy

Zdroj: (Zámečník a spol.,2019), online

4.2 Průběh onkologického onemocnění

Vznik nádorů je vícestupňový proces. Základním krokem kancerogeneze je vznik mutace v DNA. K výraznému ovlivnění v časném stádiu kancerogeneze dochází díky imunitnímu systému, který může léta kontrolovat růst nádoru. Další mutace v nádoru nebo oslabení organismu (stárnutí nebo další onemocnění) může zlomit tuto ochranou bariéru. Metastatická kaskáda je stupňovitý proces, při kterém dochází k šíření primárních nádorových buněk z místa vzniku do dalších částí organismu a k tvorbě sekundárních ložisek tzv. metastáz. Nejdříve nádor roste zcela asymptomaticky a doba prvních symptomů závisí na jeho místě a rychlosti růstu. Ložiska o velikosti cca 0,5 – 1 cm je možnost diagnostikovat pomocí zobrazovacích metod, avšak 1cm³ nádoru obsahuje 10⁹ buněk a proto je velmi důležitá prevence a zachycení nádorového onemocnění v ranném stádiu. Přirozený průběh onkologického onemocnění může probíhat od několika dnů až po několik let podle charakteru malignity a její agresivity (Vokurka a spol.,2018).

5 Mitochondrie a potenciální terapie onkologického onemocnění

Nádorové buňky jsou závislé na glykolýze a metabolismu mitochondrií z důvodu potřebné syntézy makromolekul ATP a NADPH, které jsou nezbytné pro buněčnou proliferaci. Bioenergetické potřeby rakovinné buňky jsou plněny glykolýzou, ale biosyntetické požadavky a produkce ROS důležité pro buněčnou proliferaci plní procesy, které probíhají v mitochondriích. Vysoká aktivita glykolýzy v nádorových buňkách má za následek deregulaci signálních drah PI3K (fosfatidylinositol-3-kinasa) a aktivaci onkoproteinů MYC a KRAS. Aktivace těchto onkoproteinů umožňuje produkci meziproductů glykolýzy potřebných pro buněčnou proliferaci. Důležitým příkladem je tvorba NADPH v pentosovém cyklu, která je nepostradatelná pro syntézu nukleotidů (GTP). V důsledku toho jsou nádorové buňky závislé na glukose. Onkogenní aktivace způsobuje zintenzivnění mitochondriálního metabolismu z důvodu vyšší potřeby energie ve formě ATP. Také Krebsův cyklus zvýší svoji intenzitu kvůli vyšší potřebě meziproductů makromolekulárních sloučenin. Nádorové buňky mají schopnost obnovovat meziproducty Krebsova cyklu. Využívají k tomu aminokyselinu glutamin, která patří mezi nejvíce zastoupenou volnou aminokyselinu v krevním řečišti. Procesem glutaminolýza uskutečňuje postupnou oxidaci glutaminu za vzniku 2-oxoglutarátu, který je dále metabolizován v Krebsově cyklu za produkce oxalacetátu, který reaguje s acetyl-CoA za produkce citrátu. Tento pochod má za následek závislost rakovinných buněk na glutaminu. Zmíněné metabolické procesy produkují vyšší koncentrace ROS aktivující signální dráhy v mitochondriích, které podporují proliferaci rakovinných buněk a tumorogenezi. Naopak extrémní vysoké množství vyprodukovaných ROS se akumuluje v nádorových buňkách a způsobuje jejich degradaci (Weinberg & Chandel, 2015).

U center nádorových buněk je běžné, že jsou nedostatečně prokrvené oksyločenou krví (perfundované) a jsou lokalizovány v prostředí s nízkým obsahem živin, glukosy a kyslíku. Tyto nádory nejsou schopny proliferovat, ale nadále přežívají. Špatně perfundované nádorové buňky obsahují tolik glukosy a kyslíku dostačující pouze na produkci glykolytického ATP, tudíž léčiva se schopností

blokovat tuto produkci ATP jsou u nich schopny indukovat buněčnou smrt (Weinberg & Chandel, 2015).

Problémem potenciální terapie potlačující aktivitu glykolýzy je spojení s OXPHOS, která produkuje ATP zdravým buňkám. Potenciální léčivo, které by inhibovalo glykolýzu, by mohlo ohrozit přežití zdravých buněk. Úspěchem by bylo zajištění selektivního přijímání daných inhibitorů pouze nádorovými buňkami (Weinberg & Chandel, 2015).

5.1 Cílená terapie onkologického onemocnění

Typickým znakem nádorových buněk je porucha regulace klíčových buněčných procesů, mezi které patří hlavně proliferace a apoptóza. Klíčovou podstatou těchto dysfunkcí bývají mutace nebo změny exprese (zvýšení nebo snížení) onkogenů a tumor supresorových genů. Výsledky těchto transformací mají zásadní význam v procesu kancerogeneze, ale současně mohou být významné pro biologickou cílenou léčbu (Büchler a spol., 2019).

Cílená léčiva, na rozdíl od běžných cytostatik, mají schopnost inhibovat konkrétní molekulární signální dráhy nebo pouze určité molekuly. Daleko větší selektivita cílených terapeutik vůči nádorovým buňkám snižuje toxicitu vůči buňkám zdravým, čímž se liší od konvenčních cytostatik. Mezi nejdříve klinicky používaná cílená terapeutika patří tamoxifen, rituximab a imatinib. Tamoxifen byl vyvinut k blokádě estrogenních receptorů u HR+ (*Hormone receptor positive*) buněk rakovin prsu. (Klener a spol., 2013).

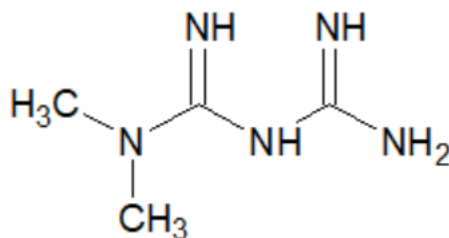
5.1.1 Ovlivnění energetického metabolismu buňky

5.1.1.1 Oxidativní fosforylace

Jako inhibitory komplexu I v dýchacím řetězci s následnou inhibicí OXPHOS jsou považovány látky metformin a phenformin (Radovan et al., 2018). Tyto látky se řadí mezi biguanidy, léčiva určené pro terapii hyperglykémie a diabetu 2. typu. Biguanidy jsou součástí rostliny jestřabiny lékařské a jeho vývary byly používány už ve starém Egyptě a ve středověku pro terapii diabetické polyurie (Witters, 2001).

Metformin je zařazen mezi terapeutika s protinádorovým mechanismem a nyní je jeho imunomodulační účinek klinicky zkoumán (De & Kuppusamy, 2020). Preklinické i klinické studie podporují používání metforminu jako budoucí terapeutikum karcinomu prsu. Po testování metforminu v kombinované terapii s dalšími chemoterapeutiky se zvýšila jejich účinnost, snížila se chemorezistence nádorových buněk a došlo také ke snížení podávané dávky daných chemoterapeutik. Protinádorové účinky metforminu byly popsány dvěma mechanismy:

- Snižuje hladinu glukosy v krvi a následně hladinu cirkulujícího inzulínu, známého mitogenu mnoha rakovinných buněk. Inzulín a inzulínově růstové faktory (IGF) stimulují protumorogenní signální dráhy PI3K v nádorových buňkách, které jsou pozitivní na inzulínový nebo IGF receptor. Ne však všechny nádorové buňky jsou senzitivní na hladinu inzulínu (Weinberg & Chandel, 2015).
- Jako antitumorogenní činidlo působí inhibicí v ETC v komplexu I (NADH-koenzymQ reduktasa), a tím snižuje proliferaci nádorových buněk. Protirakovinové účinky metforminu však inhibují mitochondriální produkci ATP a indukují buněčnou smrt. Ne však všechny mitochondriální geny v tumorech jsou senzitivní na působení metforminu (Weinberg & Chandel, 2015).

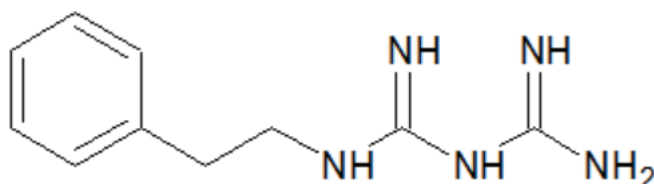


Obrázek 10: Chemický vzorec metforminu

Zdroj: vlastní

Phenformin patří také mezi biguanidy, léčiva inhibující komplex I v ETC. V porovnání s metforminem je phenformin méně polární, lépe rozpustný v tucích a

vykazuje vyšší afinitu k mitochondriálním membránám. Phenformin je také lépe transportován do nádorových buněk (Weinberg & Chandel, 2015). Phenformin působí stejným mechanismem jako metformin, ale během 70.let se přestal pro svoji toxicitu používat, jelikož vykazoval zvyšování laktátové acidózy (Witters, 2001).



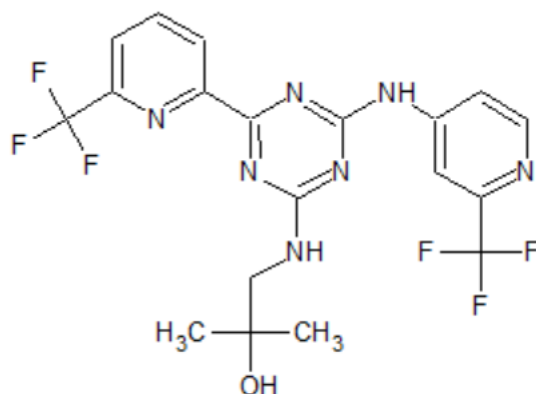
Obrázek 11: Chemický vzorec phenforminu

Zdroj: vlastní

5.1.1.2 Ovlivnění Krebsova cyklus

Jak již bylo popsáno v předchozích kapitolách, u nádorových buněk vlivem mutací v protoonkogenech vznikají nádorově specifické mutované enzymy produkující tzv. onkometabolity. Jsou to látky vyskytující se pouze v nádorových buňkách, kde se kumulují a kvůli své podobnosti s přirozenými metabolity ovlivňují funkci ostatních enzymů. Inhibice těchto enzymů představuje další potenciální terapii onkologických onemocnění (Radovan et al., 2018).

Mezi nejznámější onkometabolit patří 2-hydroxyglutarát, což je mutovaný produkt enzymu Krebsova cyklu isocitrát dehydrogenasy (IDH). Tento enzym se vyskytuje ve dvou formách, cytoplazmatický izoenzym IDH1 a mitochondriální IDH2. Produkce 2-hydroxyglutarátu způsobuje v nádorových buňkách hypermetylaci genomu, což je jeden ze způsobů, kterým nádory překonávají aktivitu nádorových supresorů. Prvním klinicky testovaným inhibitorem isocitrát dehydrogenasy (IDH2) se stala látka enasidenib, která je jeho velmi specifickým inhibitorem. V klinických testech enasidenib vykazoval pozitivní reakce u pacientů s onemocněním akutní myeloidní leukemie, u kterých se prokázala mutace genu pro tento enzym (Radovan et al., 2018).



Obrázek 12: Chemický vzorec enasidenibu
Zdroj: vlastní

5.1.2 Ovlivnění indukce apoptózy

Většina maligních onemocnění poskytují deregulované odpovědi nádorových buněk na některé proapoptotické stimuly. Výsledkem konkrétních cytogenetických aberací (zvýšená exprese Bcl-2, delece p53 aj.) jsou snížené reakce nádorových buněk na některé aktivátory apoptózy (některá cytostatika) nebo zvýšená reakce na proapoptotické látky, tumor nekrotizující látky (TNF). Nádorové buňky také vykazují vyšší citlivost na cílenou inhibici konkrétních a životně důležitých antiapoptotických proteinů, než je tomu u buňky nenádorové. Potlačení apoptózy je finální odpověď nádorových buněk, kde hraje hlavní roli porucha klíčových regulačních proteinů procesu apoptózy. Deregulace apoptózy u nádorů není aktivována pouze zvýšenou expresí antiapoptotických molekul (Bcl-2), ale také sníženou expresí nebo mutací proapoptotických proteinů (p53, BAX) (Klener a spol., 2013).

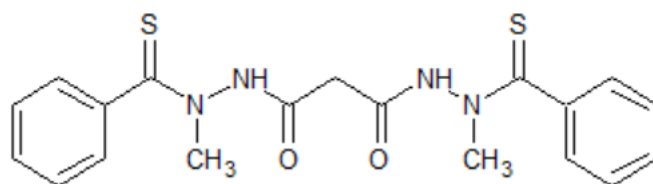
5.1.2.1 Reaktivní kyslíkové radikály

Paklitaxel patřící do skupiny taxanů je klinicky používané cytostatikum indukující apoptózu. Mezi hlavní vedlejší účinky se řadí hematotoxicita, alergické reakce a neurotoxicita (Büchler a spol., 2019).

Obecně se taxany řadí mezi cytostatika způsobující depolymerizaci mikrotubulů, vedoucí k narušení průběhu mitózy nebo jiných buněčných funkcí lokalizovaných na mikrotubulech. Mitóza je druh buněčného dělení, jehož výsledkem je produkce dvou dceřiných buněk s identickou předanou genetickou

informací. Taxany jsou také schopny blokovat G2-M kontrolní bod. Jedná se o kontrolní bod buněčného cyklu, který spustí průběh mitózy až po kontrole DNA. Buňky, jejichž G2-M kontrolní bod je poškozený, spustí mitózu i v případě poškozené DNA, což vede k jejich smrti (Mekhail & Markman, 2002).

Chemická látka elesklomol se řadí mezi protirakovinná činidla se silnou proapoptotickou aktivitou. Proapoptotická aktivita elesklomolu je založená na již zmíněné extrémně vysoké produkci ROS v rakovinových buňkách, která u nich způsobuje vyvolání apoptózy a oxidačního stresu. Klinické zkoušky, které testovaly kombinaci elesklomolu s paklitaxelem byly pozastaveny po zjištění, že přídavek elesklomolu k paklitaxelu nevykazuje jeho žádné zvyšující účinky (Kirshner et al., 2008).



Obrázek 13: Chemický vzorec elesklomolu

Zdroj: vlastní

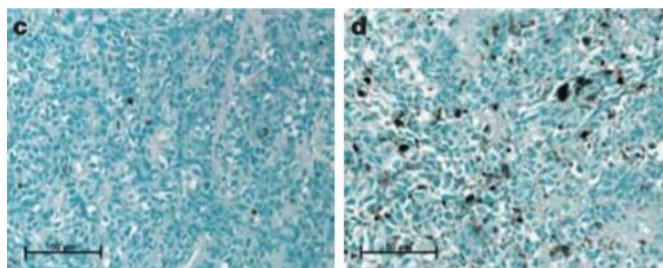
5.1.2.2 Inhibice Bcl-2 proteinů

Proteiny rodiny Bcl-2 se řadí do skupiny centrálních regulátorů programované buněčné smrti. Mezi členy inhibující apoptózu patří například Bcl-2 a Bcl-XL, které v mnoha případech přispívají k zahájení růstu tumoru jejich nadměrnou expresí. Exprese Bcl-XL koreluje s chemorezistencí nádorových buněk a snížení Bcl-2 zvyšuje senzitivitu na protirakovinná terapeutika. Inhibice těchto proteinů patří mezi potenciální strategie léčby rakoviny (Oltersdorf et al., 2005).

Díky strukturním a funkčním znalostem byla syntetizována řada nízkomolekulárních sloučenin funkčně se podobajících proapoptotickým proteinům ze skupiny BH3 only, tzv. BH3-mimetika. BH3-mimetika se vážou na antiapoptotické Bcl-2 proteiny, které obsahují BH3-vazebná místa, a touto vazbou dojde k odpoutání efektorových proapoptotických proteinů Bak a Bax, které indukují přímý apoptotický účinek. Do skupiny „specifických“ BH3-mimetik se řadí ABT-737, jehož perorální forma navitoklax má vysokou afinitu k Bcl-2 i Bcl-X. Účinek ABT-737 je

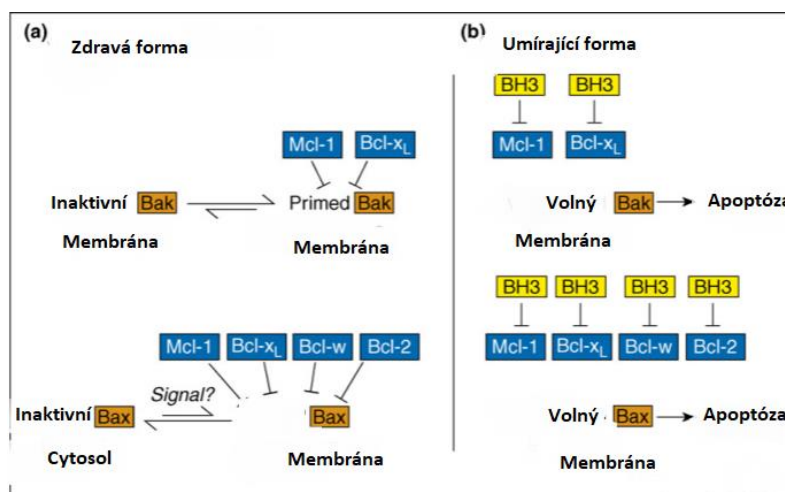
plně závislý na uvolnění proapoptotických proteinů Bak a Bax, a proto se řadí mezi první „specifická“ BH3-mimetika. Kvůli nízké toxicitě byl testován v kombinaci s jinými protirakovinovými léčivými a nežádoucím účinkem se ukázala být trombocytopenie. Mezi nově testované BH3-only mimetika patří ABT-199 (venetoklax), který selektivně inhibuje antiapoptotický protein Bcl-2. Narozdíl od ABT-737 vykazuje tato látka neobyčejně nízkou toxicitu (Klener a spol., 2013).

Kombinace venetoklaxu s jinými chemoterapeutiky jsou klinicky testované v různých fázích klinických zkoušek. Mezi časté nežádoucí účinky patří trombocytopenie a neutropenie (Suvarna et al., 2019).



Obrázek 14: Účinek ABT-737 in vivo po 4 hodinách

Zdroj: (Oltersdorf et al., 2005), str.680



Obrázek 15: Model mechanismu BH3-mimetik

Zdroj:(převzato a upraveno Adams & Cory, 2007), str.490

5.1.2.3 Útlum proteinů teplotního šoku

Zvýšená exprese HSP je součástí antiapoptotického efektu a byla identifikována u řady malignit. HSP v rakovinných buňkách chrání patologicky

exprimované proteiny před jejich rozkladem, čímž udržují až zvyšují agresivní fenotyp nádoru. Inhibice HSP představuje potenciální alternativu protinádorové terapie. Mezi proteiny HSP90 se řadí regulátory buněčného růstu, proliferace a apoptózy. Navíc HSP90 také stabilizuje mnohé onkogeny. Inhibitory HSP90 mají za následek uvolnění vazeb patologických proteinů na HSP90, což vede v jejich rozkladu v proteazomu. Tyto inhibitory také zvyšují citlivost rezistentních rakovinných buněk na působení různých cytotoxických látek, čímž prokazují protinádorový mechanismus. Mezi současně klinicky testované inhibitory HSP90 patří geldanamycin a jeho deriváty tanespimycin a ve vodě lépe rozpustný retaspimycin (Klener a spol., 2013).

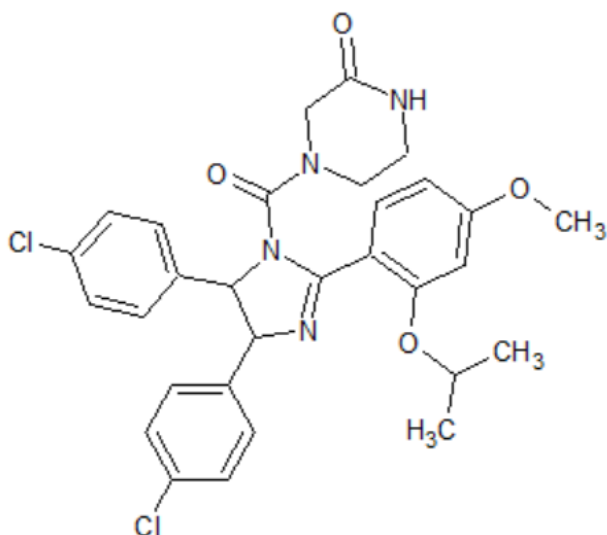
Retaspimycin je inhibitor HSP90 s antiproliferačními účinky. Váže se na chaperony v cytosolu HSP90, které udržují stabilitu a funkčnost onkogenních signalizačních proteinů. Následně podporuje jejich degradaci v proteinovém komplexu pro degradaci poškozených a nefunkčních proteinů, proteazomu. Studie prokázala kombinaci inhibice HSP90 s imunoterapií jako slibnou strategii pro onkologickou terapii. Preklinické studie zkoumající kombinaci imunoterapie s retaspimycinem poskytly důkazy o zvýšení citlivosti nádorových buněk na imunoterapii (Mbofung et al., 2017).

5.1.2.4 Inhibice ubikvitin E3 ligasy

MDM2 (*mouse double minute 2*) je enzym, ubikvitin E3 ligasa, který stimuluje ubikvitin-proteozomální rozklad proteinu p53. Tento protein patří mezi hlavní proapoptotické mediátory genotoxického stresu a onkogenní signalizace a v normálních buňkách je z důvodu vazby na MDM2 inaktivní. Konvenční cytostatika se řadí mezi hlavní induktory genotoxického stresu, které blokují replikaci DNA způsobenou přímým poškozením nukleových kyselin a tím aktivaci proteinu p53 přerušením vazby s MDM2 (Klener a spol., 2013).

Nízkomolekulární inhibitory MDM2 tzv. nutliny (nutlin-3) jsou látky blokuující vazbu MDM2 na protein p53. Tato inhibice vazby vede k negenotoxické indukci signální dráhy p53, která je v porovnání s genotoxickou indukcí p53 vyvolanou cytostatikou mnohem méně doprovázena toxickými nežádoucími vedlejšími účinky. Mezi benefity nutlinů nepatří pouze schopnost přímé indukce

apoptózy u nádorových buněk, ale také schopnost zvýšit senzitivitu nádorových buněk vůči různým genotoxickým látkám a radioterapii. Mechanismus působení nutlinů by se nejvíce mohla uplatnit u hematologických malignit (Klener a spol., 2013).



Obrázek 16: Chemický vzorec nutlinu-3

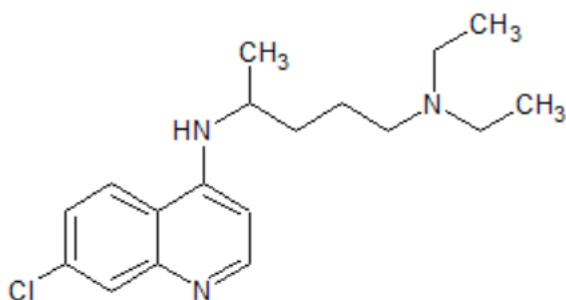
Zdroj: vlastní

5.1.2.5 Potlačení autofágie

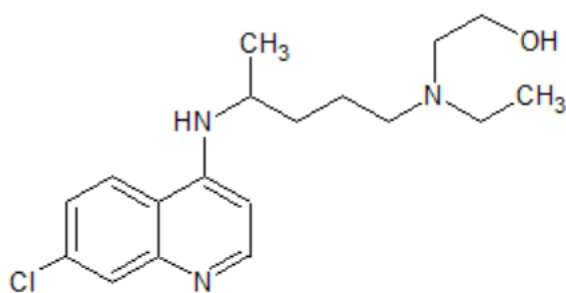
Autofágie je vysoce kontrolovaný lysozomální proces potřebný k degradaci a renovaci proteinů nebo deformovaných a nepotřebných organel v cytosolu. Nejprve dochází ke spojení dané organely s částí cytosolu za vzniku tzv. autofagické vakuoly. Následnou fúzí s lysozomem vytváří autofagolizosom, ve kterém proběhne enzymatický rozklad. K tomuto mechanismu dochází ve zdravých buňkách zcela spontánně, avšak existuje i tzv. dysfunkční autofágie, která je běžná u řady nemocí. Dysfunkční vnitřní zpracování autofagosomů vystavuje postiženou buňku autofagickému stresu, během kterého dochází k akumulaci autofagických meziproduktů (vakuol s částečně nebo zcela nerozpadlým obsahem) v cytosolu. Dysfunkční autofagie hraje roli v kancerogenezi některých nádorů (Zámečník a spol., 2019).

Inhibice autofágie se řadí mezi eventuální terapeutické strategie zlepšující klinické výsledky u pacientů s nádorovým onemocněním. Mezi jediné klinicky dostupné a testované inhibitory autofágie patří antimalarika chlorochin a

hydroxychlorochin, které se používají v kombinaci se standardními cytostatiky. Tato terapeutika odkyselují lysozom a inhibují fúzi lysozomů s autofagosomy, čímž zabraňují jejich degradaci. Chlorochin je také schopen zvyšovat citlivost nádorových buněk na chemoterapeutika nezávisle na mechanismu autofágie (Levy et al., 2017).



Obrázek 17: Chemický vzorec chlorochinu
Zdroj: vlastní



Obrázek 18: Chemický vzorec hydrochlorochinu
Zdroj: vlastní

6 Závěr

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejčastějších onemocnění nejen v České republice, ale i na celém světě. Každým rokem incidence narůstá, mortalita mírně klesá, ale prevalence, množství žijících osob s prodělaným nádorovým onemocněním, rychle roste. Mezi faktory zvyšující počty onkologicky nemocných pacientů patří jak stárnutí populace, ale také jejich životní styl. Tento internacionální problém se nachází na předních příčkách vědeckých zájmů. Ačkoli dochází k pokrokům v diagnóze i terapii onkologických onemocnění, klíčem k úspěšné terapii je stále pravidelná osobní prevence a v naší zemi vysoká účast na screeningových programech umožňující záchyt malignit v jejich časném stádiu pojící se s lepší prognózou pacienta. Současné terapeutické metody zatím nedokáží zcela inhibovat vznik nádoru, ale většina typů nádorů je preventabilních. Pouze kolem 5 % nádorů je genetického původu.

Cílené terapie neboli biologické léčby se využívají u velkého množství maligních onemocnění a počet diagnóz a potenciálních léků se neustále zvyšuje. Biologické léčby se snaží o vysoce selektivní onkologickou léčbu, zasahující pouze buňky nádorové a naopak buňky zdravé se snaží nijak neovlivnit.

Cílené terapie onkologických onemocnění zaměřené na mitochondrie jsou stále v preklinických nebo klinických stádiích a některé stále vykazují nežádoucí vedlejší účinky. Mitochondriální apoptotická dráha je aktivována genotoxickým stresem, způsobeným například chemoterapií, radioterapií nebo jinými faktory. Z toho lze usoudit, že terapeutika indukující apoptózu se zatím využívají v kombinaci s dalšími klinickými terapiemi. I přesto, že jsou vědci stále blíže k efektivnější terapii onkologických onemocnění, biologická léčba stále čeká na léčiva, která by 100% selektivně napadala pouze nádorové buňky a vykazovala především potřebné účinky před účinky nežádoucími.

7 Seznam použité literatury

- ADAMS, Jerry M., & CORY, Suzanne.** Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*. 2007, 19(5), 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.05.004>
- ALBERTS, Bruce.** *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero. 1998. ISBN 80-902906-2-0.
- ALBERTS, Bruce.** *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science. 2002. ISBN 0-8153-4072-9.
- BÖHMOVÁ, Blanka.** *Molekulárna genetika* (2.vydání). Univerzita Komenského v Bratislavě. 1992. ISBN 80-223-0515-4.
- BURTON, Graham J., & JAUNIAUX, Eric.** Oxidative stress. Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology. 2011, 25(3), 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
- BÜCHLER, Tomáš.** *Obecná onkologie*. Praha: Maxdorf. Jessenius. 2019. 14-18, 46-47 s. ISBN 978-80-7345-617-7.
- CAREW, Jennifer S., & HUANG, Peng.** Mitochondrial defects in cancer. *Molecular Cancer*. 2002, 1, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-1-9>
- DAVIES, Karen M., & DAUM, Bertram.** Role of cryo-ET in membrane bioenergetics research. *Biochemical Society Transactions*. 2013, 41(5), 1227–1234. <https://doi.org/10.1042/BST20130029>
- DE, Anindita, & KUPPUSAMY, Gowthamarajan.** Metformin in breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Current Problems in Cancer*. 2020, 44(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2019.06.003>
- FEHER, Joseph.** ATP Production II. *Quantitative Human Physiology*. 2012, 180–190. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382163-8.00021-9>
- FUHRMANN, Dominik C., & BRÜNE, Bernhard.** Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biology*. 2017, 12(February), 208–215 <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.012>
- GRAY, Michael W.** The pre-endosymbiont hypothesis: A new perspective on the origin and evolution of mitochondria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014, 6(3), 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016097>

HEIDEN, Matthew G. V., CANTLEY, Lewis C., & THOMPSON, Craig B.

Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009, 324(5930), 1029–1033.

<https://doi.org/10.1126/science.1160809>

KARNKOWSKA, Anna., Vacek, Vojtěch, Zubáčová, Zuzana, et al. A eukaryote without a mitochondrial organelle. *Current Biology*. 2016, 26(10), 1274–1284.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.053>

KIRSHNER, Jessica R., HE, Suqin, BALASUBRAMANYAM, Vishwasenani, KEPROS, Jane, YANG, Chin Y., ZHANG, Mei, DU, Zhenjian, BARSOUM, James, & BERTIN, John. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008, 7(8), 2319–2327. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0298>

KLENER, Pavel, KLENER, Pavel. Principy systémové protinádorové léčby. Praha: Grada. 2013, ISBN 978-80-247-4171-0.

KODÍČEK, Milan, VALENTOVÁ, Olga a HYNEK, Radovan. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 2015. 249 s. ISBN 9788070809273.

KOHLÍKOVÁ, Eva. *Cytopatologie, patobiochemie a patofyziologie: všeobecná část*. Praha: Karolinum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. 2003. ISBN 80-246-0717-4.

KREJČÍŘ, Radovan, VALÍK, Dalibor, & VOJTĚŠEK, Bořivoj. Využití mitochondriálních procesů v cílené terapii nádorových onemocnění. *Klinická Onkologie: Časopis České a Slovenské Onkologické Společnosti*. 2018, 31(2), 14–20. <https://doi.org/10.14735/amko20182S14>

LEDVINA, Miroslav, STOKLASOVÁ, Alena, CERMAN, Jaroslav. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum. 2009. ISBN 978-80-246-1416-8.

LEVY, Jean, Mulcahy M., TOWERS, Christina G., & THORBURN, Andrew. Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2017, 17(9), 528–542. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>

LI, Xiaohua, FAN, Rui, ZOU, Xue, GAO, Lin, JIN, Haifeng, DU, Rui, XIA, Lin, & FAN, Daiming. Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying immunocaspase-3 on hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, 358(2), 489–494.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.134>

LIU, Geou, Y., & STORZ, Peter. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*. 2010, 44(5), 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>

LUNT, Sophia, Y., & VANDER HEIDEN, Matthew, G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011, 27(1), 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>

LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada. 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.

MBOFUNG, Rina, M., MCKENZIE, Jodi, A., MALU, Shruti, ZHANG, Min, PENG, Weiyi, LIU, Chengwen, KUIATSE, Isire, TIEU, Trang, WILLIAMS, Leila, DEVI, Seram, ASHKIN, Emily, XU, Chunyu, HUANG, Lu, ZHANG, Minying, TALUKDER, Amjad, H., TRIPATHI, Satyendra, C., KHONG, Hiep, SATANI, Nikunj, MULLER, Florian, L., et al. HSP90 inhibition enhances cancer immunotherapy by upregulating interferon response genes. *Nature Communications*. 2017, 8(1).

<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00449-z>

MEKHAIL, Tarek, M., & MARKMAN, Maurie. Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2002, 3(6), 755–766. <https://doi.org/10.1517/14656566.3.6.755>

MIZUSHIMA, N., LEVINE, B., CUERVO AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008, 451: 1069-1075

OLTERS DORF, Tilman, ELMORE, Steven, W., SHOEMAKER, Alexander, R., ARMSTRONG, Robert, C., AUGERI, David, J., BELLI, Barbara, A., BRUNCKO, Milan, DECKWERTH, Thomas L., DINGES, Jurgen, HAJDUK, Philip, J., JOSEPH, Mary, K., KITADA, Shinichi, KORSMEYER, Stanley, J., KUNZER, Aaron, R., LETAI, Anthony, LI, Chi, MITTEN, Michael, J., NETTESHEIM, David, G., Ng, SchiChung., et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 2005, 435(7042), 677–681. <https://doi.org/10.1038/nature03579>

- OTOVÁ, Berta**, KOHOUTOVÁ, Milada, PANCZAK, Aleš. *Lékařská biologie a genetika*. Praha: Karolinum. 2013. ISBN 978-80-246-1594-3.
- PALMER, A. M.**, GREENGRASS, P. M., & CAVALLA, D. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News and Perspectives*. 2000, 13(6), 378–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134850>
- PATTINGRE, Sophie**, ESPERT, Lucile, BIARD-PIECHACZYK, Martine, & CODOGNO, Patrice. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie*. 2008, 90(2), 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.08.014>
- PFANNER, Nikolaus, & MEIJER, Michiel**. Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Current Biology*. 1997, 7(2), 100–103. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00048-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00048-0)
- SARASTE, Matti**. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*. 1999, 283(5407), 1488–1493. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1488>
- SUVARNA, Vasanti**, SINGH, Vikas, & MURAHARI, Manikanta. Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*. 2019, 862(September), 172655. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172655>
- TAANMAN, Jan-Willem**, MUDDLE, John, R., MUNTAU, Ania, C. Mitochondrial DNA depletion can be prevented by dGMP and dAMP supplementation in a resting culture of deoxyguanosine kinase-deficient fibroblasts. *Human Molecular Genetics*. 2003, Volume 12, Issue 15, 1 Pages 1839–1845, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg192>
- VOET, Donald, J.**, VOET, Judith, G. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing. 1995. ISBN 80-85605-44-9.
- VOET, Donald, J.**, VOET, Judith, G. *Biochemistry*, 4th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: United States of America. 2011. ISBN 9780470570951.
- VOKURKA, Samuel**, TESARŮVÁ, Petra. *Onkologie v kostce*. Praha: Current Media. Medicus. 2018. ISBN 978-80-88129-37-0.
- WEINBERG, Samuel, E., & CHANDEL, Navdeep, S.** Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature Chemical Biology*. 2015, 11(1), 9–15. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1712>
- WITTERS, Lee, A.** The blooming of the French lilac. *Journal of Clinical Investigation*. 2001, 108(8), 1105–1107. <https://doi.org/10.1172/JCI14178>

ZÁMEČNÍK, Josef, et al. *Patologie*. Praha: LD Prager Publishing. 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.