

**UNIVERZITA PARDUBICE**

**FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ**

**Katedra biologických a biochemických věd**

**Optimalizace kultivačních podmínek pro zvýšení mitochondriální respirace**

Diplomová práce

**Autor:** Bc. Žaneta Padevětová

**Vedoucí práce:** Mgr. Katarína Svrčková, Ph.D.

**Odborný konzultant:** Moustafa Elkalaf, M.B.B.Ch., Ph.D.

2022

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Žaneta Padevětová**  
Osobní číslo: **C20481**  
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Optimalizace kultivačních podmínek pro zvýšení mitochondriální respirace**  
Téma práce anglicky: **Optimization Of Culture Conditions To Increase Mitochondrial Respiration**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

- mitochondriální bioenergetika a metabolismus hlavních mitochondriálních substrátů, zejména Krebsova cyklu a dýchacího řetězce,
- zásady kultivace buněk a tkání *in vitro*,
- přehled předchozích pokusů pro ovlivnění oxidativní fosforylace a Crabtreeova efektu.

### Experimentální část:

- kultivace nádorových buněk (linie A549, HepG2, atd.) v různých podmínkách a příprava vzorků pro další analýzy,
- popis růstu buněk a aktivity podle fenotypů,
- srovnání bioenergetických profilů různých buněk,
- izolace mitochondrií zajímavých fenotypů pro analýzu oxygrafem Oroboros.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Katarína Svrčková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Moustafa Elkalaf, M.B.B.Ch., Ph.D.**  
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové,  
Univerzita Karlova  
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.** v.r.  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

## **Prohlašuji:**

Tuto práci s názvem *Optimalizace kultivačních podmínek pro zvýšení mitochondriální respirace* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6.5. 2022

Bc. Žaneta Padevětová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Za vedení této diplomové práce děkuji paní Mgr. Kataríně Svrčkové, Ph.D. Ráda bych také poděkovala panu Moustafovi Elkalafovi, M.B.B.Ch. Ph.D. a dalším zaměstnancům Ústavu fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za odborné rady potřebné při experimentech. V neposlední řadě také děkuji své rodině za podporu během celého studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce s názvem Optimalizace kultivačních podmínek pro zvýšení mitochondriální respirace ve své teoretické části shrnuje základní informace o mitochondriích, včetně jejich struktury a funkce. Dále popisuje jednotlivé parametry mitochondriální bioenergetiky. Část této práce je také věnována metabolismu nádorových buněk, Crabtree efektu a zásadám kultivace buněk *in vitro*. V této práci je také zahrnuta podkapitola o mastných kyselinách s krátkým řetězcem (SCFA, Short Chain Fatty Acid), jejichž účinek na metabolismus nádorových buněčných linií HepG2 a A549 byl testován na analyzátoru Seahorse XFe96. Výsledky ukázaly vliv SCFA na metabolismus použitých buněčných linií hlavně při dlouhodobé expozici, akutní expozice SCFA nezpůsobila signifikantní změny.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Bioenergetický profil; mastné kyseliny s krátkým řetězcem; mitochondrie; HepG2; A549; nádorový metabolismus.

# **TITLE**

Optimalization of culture conditions to increase mitochondrial respiration

# **ANOTATION**

Theoretical part of this theses entitled Optimalization of culture conditions to increase mitochondrial respiration summarizes basic information about mitochondrial structure and energy production process. It also describes the different parameters of mitochondrial bioenergetic profile. Part of this work is devoted to the metabolism of tumor cells, the Crabtree effect and the principles of cell culture *in vitro*. This thesis includes a subchapter about short-chain fatty acids (SCFA) and their influence on the metabolism of tumor cell lines HepG2 and A549, which was tested with Seahorse XFe96 analyser. The results showed a significant changes of cell lines metabolism after long exposure to SCFA. Acute exposure did not cause significant changes in cellular metabolism.

# **KEY WORDS**

Bioenergetic profile; short chain fatty acids; mitochondria; HepG2; A549; cancer metabolism.

# OBSAH

ÚVOD.....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1.1 Mitochondrie .....	15
1.1.1 Struktura mitochondrií.....	15
1.1.2 Funkce mitochondrií .....	17
1.1.3 Tvorba ATP .....	17
1.1.3.1 Krebsův cyklus .....	19
1.1.3.2 Elektronový transportní řetězec a oxidativní fosforylace .....	20
1.1.4 Parametry měření mitochondriální bioenergetiky .....	22
1.1.4.1 Bazální respirace.....	23
1.1.4.2 Maximální respirační kapacita.....	23
1.1.4.3 Únik protonů.....	23
1.1.4.4 Účinnost spřažení a rezervní respirační kapacita.....	23
1.1.4.5 Respirace související s produkcí ATP .....	24
1.1.4.6 Nemitochondriální spotřeba kyslíku.....	24
1.2 Metabolismus nádorových buněk.....	25
1.3 Crabtree efekt a jeho obcházení v buněčných kulturách .....	28
1.4 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem.....	31
1.5 Zásady kultivace buněk <i>in vitro</i> .....	33
1.5.1 Buněčná linie HepG2.....	36
1.5.2 Buněčná linie A549 .....	38
2 CÍLE PRÁCE.....	39
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	40
3.1 Přístroje a pomůcky .....	40
3.2 Chemikálie.....	40



3.3	Podmínky kultivace buněčné linie HepG2 a A549 .....	42
3.4	Příprava roztoků mastných kyselin s krátkým řetězcem .....	42
3.5	Testování viability buněk metodou WST-1 po jejich ošetření SCFA .....	43
3.6	Cell mito stress test.....	44
4	VÝSLEDKY .....	46
4.1	Testování viability buněk metodou WST-1 po jejich ošetření SCFA .....	46
4.2	Cell mito stress test – dlouhodobá expozice, buněčná linie A549 .....	47
4.3	Cell mito stress test – krátkodobá expozice, buněčná linie A549 .....	49
4.4	Cell mito stress test – akutní expozice, buněčná linie A549 .....	52
4.5	Cell mito stress test – dlouhodobá expozice, buněčná linie HepG2.....	54
4.6	Cell mito stress test – krátkodobá expozice, buněčná linie HepG2.....	56
4.7	Cell mito stress test – akutní expozice, buněčná linie HepG2.....	59
5	DISKUZE .....	61
	ZÁVĚR.....	64
	SEZNAM LITERATURY.....	65

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Struktura mitochondrií.....	16
Obrázek 2	Mitochondriální dynamika.....	16
Obrázek 3	Schématické znázornění glykolýzy .....	18
Obrázek 4	Schéma Krebsova cyklu .....	20
Obrázek 5	Elektronový transportní řetězec.....	22
Obrázek 6	Schématické znázornění bioenergetických parametrů.....	25
Obrázek 7	Warburgův, Crabtree a Pasteurův efekt.....	29
Obrázek 8	Buněčná linie HepG2.....	37
Obrázek 9	Buněčná linie A549 .....	38
Obrázek 10	Schématické znázornění přeměny WST-1 na formazanové barvivo.....	43
Obrázek 11	Cell mito stress test.....	45

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1	Viabilita buněčné linie HepG2 po ošetření acetátem a propionátem.....	46
Graf 2	Parametry mit. bioenergetiky buněčné linie A549, dlouhodobá expozice SCFA .....	48
Graf 3	Resp. související s produkcí ATP a max. respirační kapacita buněčné linie A549, krátkodobá expozice SCFA.....	50
Graf 4	Rezerv. resp. kapacita a únik protonů buněčné linie A549, krátkodobá exp. SCFA....	51
Graf 5	Parametry mit. bioenergetiky buněčné linie A549, akutní expozice SCFA .....	53
Graf 6	Parametry mit. bioenergetiky buněčné linie HepG2, dlouhodobá expozice SCFA.....	55
Graf 7	Resp. související s produkcí ATP a max. respirační kapacita buněčné linie HepG2, krátkodobá expozice SCFA.....	57
Graf 8	Rezerv. resp. aktivita a únik protonů buněčné linie HepG2, krátkodobá exp. SCFA...	58
Graf 9	Parametry mit. bioenergetiky buněčné linie HepG2, akutní expozice SCFA.....	60

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Nomenklatura a základní fyzikální vlastnosti SCFA .....	32
-----------	---	----

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ASCT2	alanin, serin, cysteinový transportér 2 (Alanine, Serine, Cysteine Transporter 2)
ATCC	Americká sbírka tkáňových a buněčných kultur (American Type Culture Collection)
ATP	adenosintrifosfát
BHI	index bioenergetické zdraví (Bioenergetic Health Index)
CoQ	koenzym Q (ubichinon)
DNP	dinitrofenol
Drp1	protein podobný dynaminu 1 (Dynamin-Related Protein 1)
ECAR	míra okyselování extracelulárního prostředí (Extracellular Acidification Rate)
ETC	elektronový transportní řetězec (Electron Transport Chain)
FAD	flavinadenindinukleotid
FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid
FCCP	karbonylkyanid - <i>p</i> -trifluormethoxyfenylhydrazon
FGF	fibroblastový růstový faktor (Fibroblastic Growth Factor)
FMN	flavinmononukleotid
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát

HCC	hepatocelulární karcinom (Hepatocellular Carcinoma)
HEPA	vysoce účinný filtr částic vzduchu (High Efficiency Particulate Air)
HIF-1	hypoxií indukovatelný faktor 1 (Hypoxia Inducible Factor-1)
HK	hexokináza
HLA	lidské lymfocytární antigeny (Human Lymphocyte Antigen)
IDH	isocitrátdehydrogenáza
IGF	růstový faktor podobný inzulinu (Inzulin-like Growth Factor)
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (Long Chain Fatty Acid)
MCFA	mastné kyseliny se středním řetězcem (Medium Chain Fatty Acid)
Mff	faktor mitochondriálního štěpení (Mitochondrial Fission Factor)
Mfn1	mitofusin 1
Mfn2	mitofusin 2
MiD49 a MiD51	mitochondriální dynamické proteiny 49 a 51 kDa
mtDNA	mitochondriální DNA
NADH	nikotinamidadenin dinukleotid
OCR	míra spotřeby kyslíku (Oxygen Consumption Rate)
OPA 1	optická atrofie 1 (Optic Atrophy 1)
OXPHOS	oxidační fosforylace (Oxidative Phosphorylation)
PET	pozitronová emisní tomografie
PFK	fosfofruktokináza
PGI	fosfogluoizomeráza

PGK	fosfoglycerátkináza
PGM	fosfoglycerátmutáza
PK	pyruvátkináza
ROS	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (Short Chain Fatty Acid)
SDH	sukcinátdehydrogenáza
STR	krátké tandemové repetice (Short Tandem Repeats)
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin (Tricarboxylic Acid Cycle)
TPI	triózo-fosfátizomeráza

# ÚVOD

Mitochondrie jsou v dnešní době velmi častým předmětem nejrůznějších vědeckých publikací. Dysfunkce mitochondrií je kromě genetických poruch spojována i s neurodegenerativními onemocněními, obezitou či rakovinou. Rozvoj efektivní léčby na tyto patologické stavy je založen na pochopení fyziologie mitochondrií – jejich morfologii, dynamice a mitofagii a patogenezi dané choroby.

Studium (ne)toxicity a účinku léčiv či těžkých kovů je často prováděno na buněčné linii HepG2. V první fázi je důležité otestovat viabilitu buněk po expozici dané látky a následně je možné posoudit funkce mitochondrií a případné defekty v respiraci stanovením bioenergetického profilu buněk, který zahrnuje hned několik parametrů. Indikátorem mitochondriální respirace je mitochondriální spotřeba kyslíku, která je mimo jiné měřena po injekci specifických inhibitorů mitochondriálních komplexů a uncoupleru. Tento test se nazývá Cell mito stress test a je prováděn na analyzátoru Seahorse XF.

Je popsáno mnoho funkcí mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA, Short Chain Fatty Acid) souvisejících s lidským zdravím, včetně regulace imunitního systému, střevní integrity, metabolismu lipidů či glukózy. Velmi diskutovanou vlastností je taky jejich schopnost působit protizánětlivě a protinádorově. Předmětem této práce je studium SCFA na úrovni metabolismu nádorových linií.

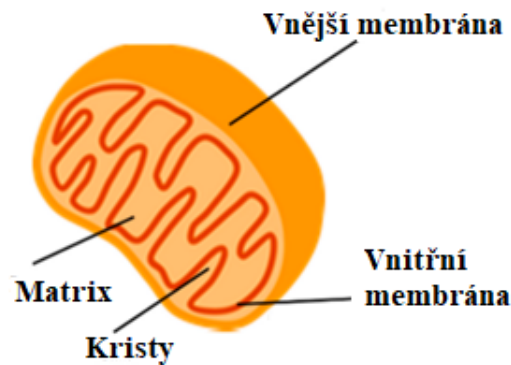
# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Mitochondrie

Mitochondrie vznikly přibližně před dvěma miliardami let pohlcením  $\alpha$ -proteobakterie prekurzorem eukaryotické buňky (Friedman a Nunnari, 2014). Jsou to organely, které jsou zkoumány již více než 100 let (Owens, Modica-Napolitano a Singh, 2009). V druhé polovině 20. století byly označeny za „elektrárny“ buňky, protože produkují většinu ATP (adenosintrifosfát), který buňka potřebuje (Annesley a Fisher, 2019; Nolfi-Donagan a Braganza, 2020). Později vědci zjistili, že mitochondrie jsou zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) tvořící se jako vedlejší produkt buněčného dýchání. Mitochondrie jsou dynamické organely přispívající k homeostáze buňky a udržováním hladiny ATP. (Nolfi-Donagan, Braganza a Shiva, 2020) Mitochondrie mají svůj genom (mtDNA mitochondriální DNA), který se replikuje nezávisle na genomu hostitele. mtDNA kóduje 13 proteinů důležitých pro oxidační fosforylaci (OXPHOS, Oxidative Phosphorylation) a všechny ostatní mitochondriální proteiny jsou kódovány jadernou DNA. Pro úspěšnou biogenezi mitochondrií musí být exprese mitochondriálních a jaderných proteinů koordinována (prostřednictvím obousměrné komunikace). (Annesley a Fisher, 2019) Geny jádra regulují mitochondriální biogenezi a při zvýšených požadavcích na energii jsou zodpovědné za vyšší tvorbu mitochondrií. Pokud jsou mitochondrie defektní, k jejich odstranění slouží proces mitofagie. (Zong, Rabinowitz a White, 2016)

### 1.1.1 Struktura mitochondrií

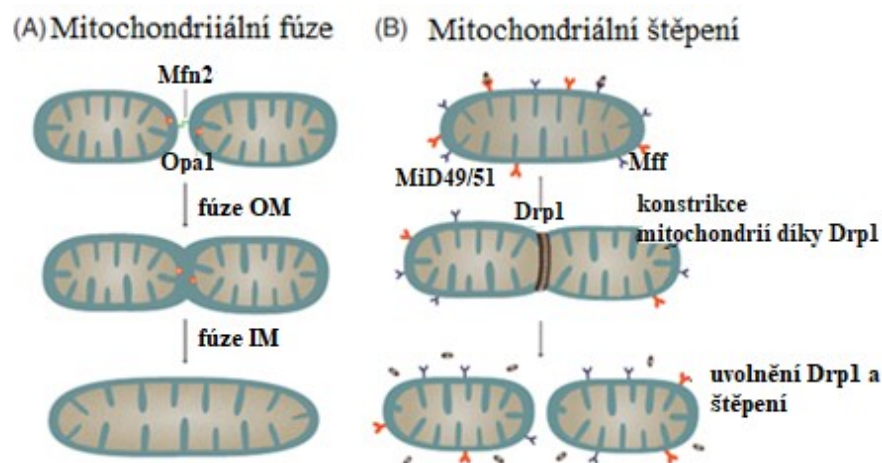
Mitochondrie jsou zhruba 2  $\mu\text{m}$  velké organely a mají 2 fosfolipidové membrány, vnější a vnitřní. Vnitřní membrána vytváří záhyby neboli kristy. Díky kristám má vnitřní membrána větší povrch a tím pádem i větší kapacitu pro děje, které se zde odehrávají. Mezi membránami se nachází mezimembránový prostor. Matrix je část mitochondrie, kterou obklopuje vnitřní membrána (obrázek 1). (Owens, Modica-Napolitano a Singh, 2009) Odlišnost vnitřní a vnější mitochondriální membrány spočívá v obsahu kardiolipinu a v jejich propustnosti. Vnější membrána je svým složením více podobná membránám eukaryotických buněk a je propustná pro ionty a malé molekuly. Vnitřní membrána obsahuje kardiolipin, podobně jako membrány bakterií a je propustná pouze pro vodu, kyslík a oxid uhličitý. Díky fosfolipidové dvojvrstvě a omezené propustnosti vnitřní membrány se vytvoří elektrochemický gradient, který je důležitý pro tvorbu ATP. (Protasoni a Zeviani, 2021)



**Obrázek 1** Struktura mitochondrií (Bartolák-Suki a kol., 2017)

Struktura mitochondrií se může lišit podle toho, v jaké tkáni jsou. Mitochondrie jsou velmi dynamickým systémem, což znamená, že jsou schopné prodlužovat se, smršťovat se, fragmentovat či spolu fúzovat. (Owens, Modica-Napolitano a Singh, 2009)

Při mitochondriální fúzi dojde ke spojení dvou mitochondrií v jednu. Fúzi vnější mitochondriální membrány zprostředkovávají proteiny mitofusiny 1 a 2 (Mfn1/2). Fúzi vnitřní membrány řídí protein OPA1 (optická atrofie 1, Optic Atrophy 1) (obrázek 2A). Opačným procesem, štěpením mitochondrií, dojde k rozdělení jedné mitochondrie na dvě. Tento proces umožní protein Drp1 (protein podobný dynaminu 1, Dynamin-Related Protein 1), Mff (faktor mitochondriálního štěpení, Mitochondrial Fission Factor), MiD49 a MiD51 (mitochondriální dynamické proteiny 49 a 51 kádr) (Obrázek 2B). (Chandhok, Lazarou a Neumann, 2017)



**Obrázek 2** Mitochondriální dynamika (Chandhok, Lazarou a Neumann, 2017)

Mitochondriální fúze (2A) – Mfn2 (mitofusin2), OPA1 (optická atrofie 1, Optic Atrophy 1), fúze OM (fúze vnější membrány), fúze IM (fúze vnitřní membrány); mitochondriální štěpení (2B) – Mff (faktor mitochondriálního štěpení, Mitochondrial Fission Factor), MiD 49/51 (mitochondriální dynamické proteiny 49 a 51 kDa), Drp1 (protein podobný dynaminu 1, Dynamin-Related Protein 1).



Fúze a štěpení jsou velmi důležité procesy, které musí být v dynamické rovnováze. Štěpením mitochondrií a následnou mitofagií je možná likvidace poškozených mitochondrií. (Annesley a Fisher, 2019) Díky fúzi je možná komunikace mezi organelami a ztráta této funkce by vedla ke vzniku malých mitochondrií a ztrátě mtDNA, vedoucí k poruše OXPHOS. Ke stejnému problému by vedlo i nedostatečné mitochondriální štěpení, při kterém by vznikaly vzájemně propojené mitochondrie s prodlouženým tvarem. (Friedman a Nunnari, 2014)

### **1.1.2 Funkce mitochondrií**

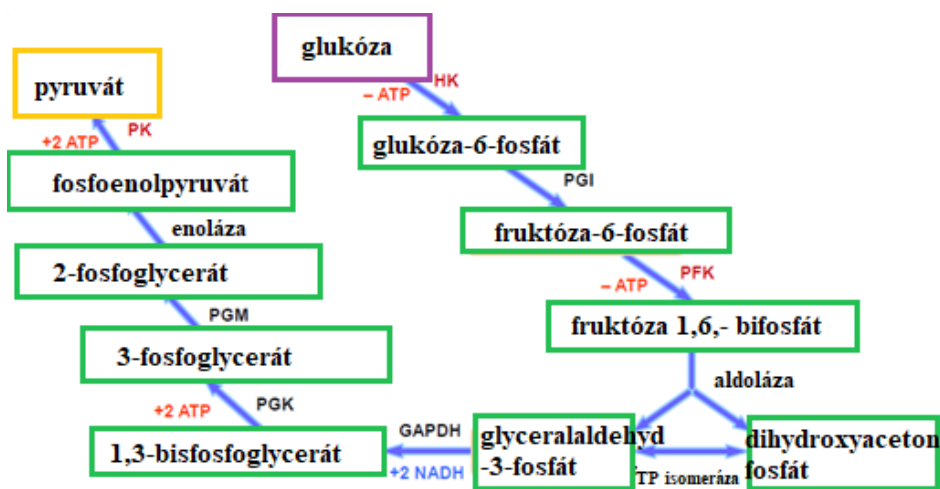
Stejně tak jako struktura mitochondrií i funkce se liší v závislosti na tom, v jaké tkáni jsou mitochondrie lokalizovány (Owens, Modica-Napolitano a Singh, 2009). Například pro kardiomyocyty jsou hlavním zdrojem ATP mitochondrie, naopak pro buňky endoteliální je více důležitá glykolýza (Nolfi- Donegan, Braganza a Shiva, 2020). S narůstajícím věkem funkce mitochondrií samozřejmě klesá a počet mutací mtDNA narůstá (Hara, Kuwano a Araya, 2018).

Mitochondrie plní řadu nezbytných funkcí, avšak tvorba ATP oxidační fosforylací je ta nejdůležitější (Guo a kol., 2018). Kromě oxidační fosforylace a dýchacího řetězce se v mitochondriích odehrává oxidace mastných kyselin a Krebsův neboli citrátový cyklus. Podílejí se také na syntéze aminokyselin, lipidů, nukleotidů, hemu, FeS klastrů a NADPH. NADPH je důležitý pro antioxidační ochranu a pro redoxní syntézy. Tvorba ROS již byla zmíněna. (Zong, Rabinowitz a White, 2016) Mitochondrie regulují množství vápenatých iontů v buňce (Hara, Kuwano a Araya, 2018). Význam mají i v regulaci programované buněčné smrti, které se účastní Bcl-2 proteiny nacházející se na vnější mitochondriální membráně. Mitochondrie mají tedy spoustu zásadních funkcí pro metabolismus a přežití buněk. (Zong, Rabinowitz a White, 2016)

### **1.1.3 Tvorba ATP**

I přes to, že glykolýza neprobíhá v mitochondriích, je zde pro úplnost informací krátce popsána. Aby mohlo dojít k vytvoření energie ve formě molekul ATP, nejprve musí dojít k přeměně živin, v tomto případě k přeměně glukózy na pyruvát. Glukóza je hlavní molekulou potřebnou pro tvorbu energie. Proces konverze glukózy na pyruvát se nazývá glykolýza a probíhá v cytoplazmě buněk. Glykolýzy se účastní 10 enzymů katalyzujících 10 reakcí. Nejdříve je přeměněna glukóza na glukózu-6-fosfát za katalýzy enzymu hexokinázy (HK) a zároveň dojde ke spotřebě 1 molekuly ATP, poté enzym fosfoglucoizomeráza (PGI) dává vzniku fruktózo-6-fosfátu. Další molekula ATP je spotřebována při přeměně fruktózo-6-fosfátu

fosfofruktokinázou (PFK) na fruktózu 1,6,- bifosfát, která je rozložena pomocí aldolázy na glyceralaldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát, který je přeměněn triózofosfátizomerázou (TPI) na glyceralaldehyd-3-fosfát. Z glyceralaldehyd-3-fosfátu díky enzymu glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáze (GAPDH) vzniká další produkt a zároveň 2 molekuly NADH (nikotinamidadenindinukleotid). V následující reakci katalyzovanou fosfoglycerátkinázou (PGK) vznikají 2 molekuly ATP. Glykolýzu ukončují enzymy fosfoglycerátmutáza (PGM), enoláza a finální pyruvátkináza (PK), která přemění fosfoenolpyruvát na pyruvát za vzniku 2 molekul ATP. Při glykolýze je tedy zisk celkem 2 molekul ATP (obrázek 3). (Li, Gu a Zhou, 2015)



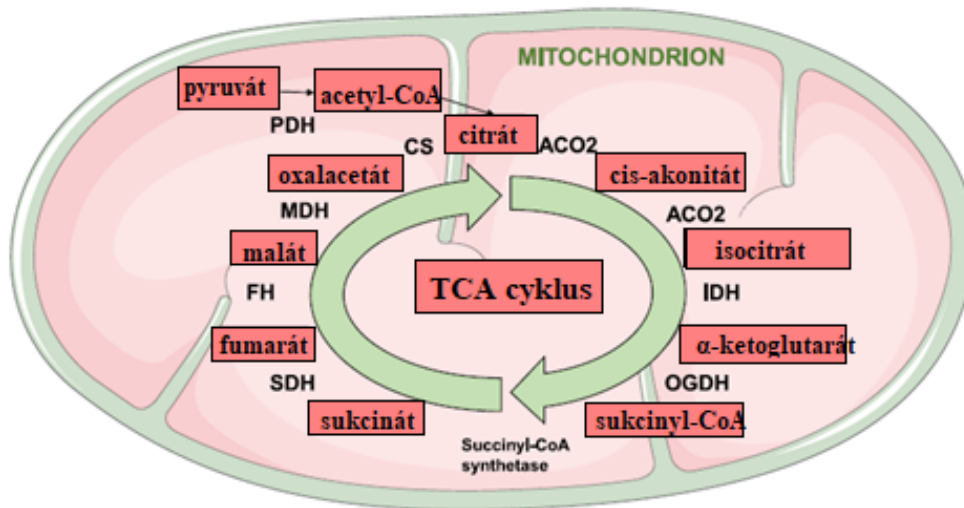
**Obrázek 3** Schématické znázornění glykolýzy (Li, Gu a Zhou, 2015)

HK (hexokináza), PGI (fosfoglukoizomeráza), PFK (fosfofruktokináza), TP izomeráza (triózofosfátizomeráza), GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza), PGK (fosfoglycerátkináza), PGM (fosfoglycerátmutáza), PK (pyruvátkináza).

### 1.1.3.1 Krebsův cyklus

Krebsův, též citrátový nebo TCA cyklus (cyklus trikarboxylových kyselin, Tricarboxylic Acid Cycle) byl popsán v roce 1937 Hansem Adolfem Krebsem (Akram, 2014). TCA cyklus je poslední metabolickou dráhou společnou pro oxidaci sacharidů, lipidů a aminokyselin (Akram, 2014), jehož reakce probíhají v uzavřené smyčce (Martínez-Reyes a Chandel, 2020) v matrix mitochondrií (Akram, 2014). Zjednodušeně řečeno dochází k cyklické oxidaci acetyl-CoA na oxid uhličitý, regeneraci oxalacetátu a vzniku redukovaných kofaktorů NADH a FADH<sub>2</sub> (flavinadenindinukleotid), které poskytují elektrony elektronovému transportnímu řetězci (ETC, Electron Transport Chain) (Raimundo, Baysal a Shadel, 2011). V Krebsově cyklu nedochází nejen ke katabolickému rozkladu acetyl-CoA, ale meziprodukty slouží také jako prekurzory anabolických reakcí – syntéza neesenciálních aminokyselin, porfyrinů či bází nukleotidů (Ryan, Frezza a O'Neill, 2021). Pro průběh Krebsova cyklu jsou tedy důležité anaplerotické reakce, které naopak odčerpané meziprodukty doplňují (Martínez-Reyes a Chandel, 2020).

Acetyl-CoA je výchozí molekulou pro Krebsův cyklus a vzniká např. dekarboxylací pyruvátu, který je produktem již zmíněné glykolýzy. Dalšími zdroji acetyl-CoA jsou mastné kyseliny nebo aminokyseliny. Krebsova cyklu se účastní 8 enzymů katalyzujících 8 reakcí. Prvním krokem je kondenzace dvouuhlíkového acetyl-CoA s oxalacetátem za vzniku citrátu, tato reakce je katalyzována citrátsyntázou. Citrát je poté izomerován přes cis-akonitát akonitázou na isocitrát. V další reakci dochází k tvorbě oxidu uhličitého a NADH při dekarboxylaci isocitrátu isocitrátdehydrogenázou na  $\alpha$ -ketoglutarát.  $\alpha$ -ketoglutarát je za účinku  $\alpha$ -ketoglutarátového dehydrogenázového komplexu přeměněn na sukcinyl-CoA a stejně jako v předešlé reakci za uvolnění CO<sub>2</sub> a NADH. Sukcinyl-CoA je konvertován sukcinyl-CoA syntetázou na sukcinát a proběhne také substrátová fosforylace, při které dojde k přeměně GDP (guanosintrifosfát) na GTP (guanosindifosfát) a pak tvorbě ATP. Produktem reakce sukcinátu a sukcinátdehydrogenázy je fumarát, přičemž z FAD (flavinadenindinukleotid) vznikají 2 molekuly FADH<sub>2</sub>. Sukcinátdehydrogenáza je také součástí ETC, který bude popsán poté. Následná hydratace fumarátu dává vzniku malátu (enzym fumaráza). Celý cyklus uzavře enzym malátdehydrogenáza za vzniku oxalacetátu a NADH. Oxalacetát pak reaguje s dalším acetyl-CoA a tím se zahájí další cyklus. (Akram, 2014; Martínez-Reyes a Chandel, 2020) Viz schématické znázornění Krebsova cyklu na obrázku 4.



**Obrázek 4** Schéma Krebsova cyklu (Ryan, Frezza, O'Neill, 2021)

Celý cyklus se skládá z 8 enzymů: citrátsyntáza (CS), akonitáza (ACO2), isocitrátdehydrogenáza (IDH), oxoglutarát ( $\alpha$ -ketoglutarát) dehydrogenázový komplex (OGDH), sukcinyl-CoA syntetáza, sukcinátdehydrogenáza (SDH), fumaráza neboli fumaráthydratáza (FH), malátdehydrogenáza (MDH).

### 1.1.3.2 Elektronový transportní řetězec a oxidativní fosforylace

Elektronový transportní řetězec je souhrn reakcí probíhajících v pěti proteinových komplexech nacházejících se ve vnitřní mitochondriální membráně. ETC a OXPHOS jsou napojeny na Krebsův cyklus, jehož produkty, NADH a  $\text{FADH}_2$  předávají řetězci elektrony nezbytné pro tvorbu ATP. Zprostředkovatelem přenosu elektronů je hydrofobní ubichinon (koenzym Q, CoQ) a hydrofilní cytochrom c. (Peña a kol., 2021; Nolfi-Donagan, Braganza a Shiva, 2020; Chaban, Boekema a Dudkina, 2014)

Donorem elektronů pro komplex I (NADH: ubichinon oxidoreduktáza) je NADH. Elektrony jsou předány kofaktoru flavinmononukleotidu (FMN) a následně Fe-S klastrům, jejichž prostřednictvím se elektron dostane na ubichinon, který se v přítomnosti elektronu redukuje na ubichinol. Energie z přenosu 2 elektronů vyvolá pumpování 4 protonů komplexem I (tedy z vnitřní mitochondriální membrány) do mezimembránového prostoru. (Peña a kol., 2021; Nolfi-Donagan, Braganza a Shiva, 2020; Chaban, Boekema a Dudkina, 2014)

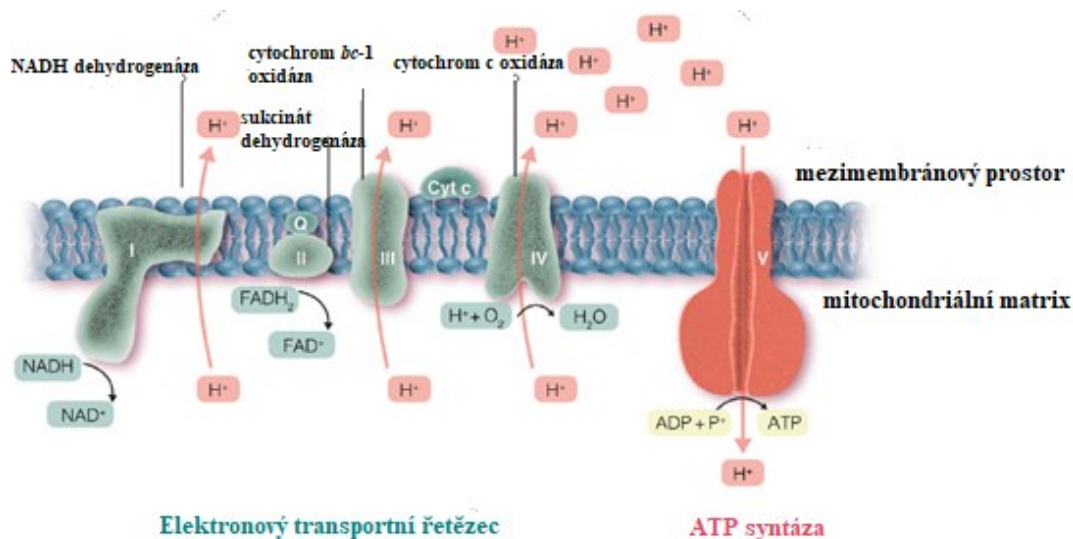
Zdrojem elektronů přenášených na komplex II (sukcinátdehydrogenáza) je  $\text{FADH}_2$  (jak již bylo zmíněno, sukcinátdehydrogenáza je součástí také TCA). Elektrony jsou přenášeny na CoQ, podobně jako v komplexu I (místo FMN je tam však FAD). Transport protonů do mezimembránového komplexu se zde však neděje. Následuje přenos elektronů z komplexu I a

II ubichinolem na komplex III. (Peña a kol., 2021; Nolfi-Donagan, Braganza a Shiva, 2020; Chaban, Boekema a Dudkina, 2014)

Na komplexu III (koenzym Q: cytochrom c oxidoreduktáza) je jeden elektron ubichinolu translokován na FeS klastr Rieskeho komplexu a druhý elektron je přenesen na cytochrom b a poté na chinon za vzniku volného radikálu ubisemichinoninu. Zároveň je elektron z FeS klastru přenesen na cytochrom  $c_1$ , ze kterého je transportován na cytochrom c, který je redukován. Stejně jako na komplexu II dochází k čerpání protonů do mezimembránového prostoru, tentokrát však dvou. (Peña a kol., 2021; Nolfi-Donagan, Braganza a Shiva, 2020; Chaban, Boekema a Dudkina, 2014)

Molekula kyslíku vázaná na komplex IV (cytochrom c oxidáza) přijímá elektrony od redukováného cytochromu c za vzniku dvou molekul vody. Dochází ke spotřebě kyslíku, tedy k mitochondriálnímu dýchání. Během této reakce jsou pumpovány 4 protony do mezimembránového prostoru. (Peña a kol., 2021; Nolfi-Donagan, Braganza a Shiva, 2020; Chaban, Boekema a Dudkina, 2014)

Jak již bylo zmíněno, vnitřní membrána mitochondrií není propustná pro protony. Pumpování protonů je však možné, a to díky energii, která je získána z transportu elektronů. Proteinové transportéry potřebné k pumpování protonů jsou součástí komplexu I, II a IV. (Protasoni a Zeviani, 2021) V mezimembránovém prostoru se tedy během ETC nahromadí celkem 10 protonů, které tvoří protonový gradient. Protonový gradient tvoří protonmotivní sílu ( $\Delta p$ ), jejíž součástí je membránový potenciál ( $\Delta \Psi$ ) a chemický potenciál ( $\Delta pH$ ). Díky protonmotivní síle ( $\Delta p$ ), je možné vrácení protonů z mezimembránového prostoru zpět do matrix mitochondrie. Tyto protony projdou komplexem V (ATP syntáza) a díky energii uložené v protonovém gradientu probíhá syntéza ATP. Jedná se o komplex o velikosti 600 kDa složený až z 18 podjednotek a domén  $F_1$  a  $F_0$ . (Peña a kol., 2021; Nolfi-Donagan, Braganza a Shiva, 2020; Chaban, Boekema a Dudkina, 2014) Doména  $F_1$  (extramembránová) směřuje k mitochondriální matrix a  $F_0$  (transmembránová) doména je lokalizována ve vnitřní mitochondriální membráně.  $F_0$  doména se skládá z kruhu c podjednotek. Každá c podjednotka je schopna navázat jeden proton pocházející z mezimembránového prostoru. Po navázání protonu následuje rotace c kruhu  $F_0$  domény, která je přenesena do katalytické části a umožní syntézu a uvolnění ATP z  $F_1$  domény. (Protasoni a Zeviani, 2021) Obrázek 5 zobrazuje schéma ETC.



**Obrázek 5** Elektronový transportní řetězec (Aerts a Morais, 2017)

Elektronový transportní řetězec přenáší elektrony ve vnitřní mitochondriální membráně pomocí 2 přenašečů – Q (koenzym Q, ubichinon) a cyt c (cytochrom c) a skrz 4 komplexy - komplex I (NADH dehydrogenáza, také známý jako NADH: ubichinon oxidoreduktáza); komplex II (sukcinátdehydrogenáza), komplex III (cytochrom bc-1 oxidáza, také známý jako koenzym Q: cytochrom c oxidoreduktáza); komplex IV (cytochrom c oxidáza), na kterém vznikají 2 molekuly vody; a na komplexu V (ATP syntáza) dochází k fosforylaci ADP za vzniku ATP. Zároveň na komplexu I, III a IV dochází k pumpování celkem 10 protonů do mezimembránového prostoru vytvářející elektrochemický potenciál, díky jehož energii je možná tvorba ATP.

#### 1.1.4 Parametry měření mitochondriální bioenergetiky

Energie transformovaná mitochondriemi může kvantifikována pomocí souboru parametrů, které byly nazvány jako index bioenergetické zdraví (BHI, Bioenergetic Health Index). Parametry bioenergetiky jsou citlivými ukazateli, které slouží k posouzení správné funkce mitochondrií. Predikce vzniku chorob, jejich diagnóza a odpověď na léčbu by mohla být určována na základě BHI intaktních buněk jedince (např. v cirkulujících leukocytech či trombocytech). BHI by se mohl považovat za biomarker chorob, protože různé specifické choroby jsou spojovány se zhoršením mitochondriálních parametrů u různých typů buněk, včetně leukocytů a krevních destiček. Stanovení bioenergetických parametrů je možné díky analyzátorům měřící respiraci (analyzátor Seahorse XF96) a dostupnosti specifických mitochondriálních inhibitorů. Mezi měřené parametry BHI patří bazální respirace, únik protonů, účinnost spřažení, rezervní respirační kapacita, nemitochondriální spotřeba kyslíku, maximální respirační kapacita a respirace související s produkcí ATP. (Chelimski a kol., 2021; Das, Ray a Raunt, 2020; Chacko a kol., 2014) Tyto parametry jsou popsány níže.

#### **1.1.4.1 Bazální respirace**

Bazální respirace neboli bazální míra spotřeby kyslíku je minimální množství energie potřebné k udržení fyziologické funkce buněk. Měření spotřeby kyslíku se provádí bez přidání mitochondriálních inhibitorů a hodnocení probíhá po odečtení nemitochondriální spotřeby kyslíku. Bazální respirace je řízena respirací související s produkcí ATP a únikem protonů. Hodnota bazální respirace je proměnlivá na základě (ne)přítomnosti různých substrátů v médiu (např. mastné kyseliny, pyruvát, laktát nebo adrenalin mohou zvýšit bazální respiraci hepatocytů). Změna v bazální respiraci buněk může být interpretována až po změření všech parametrů bioenergetického profilu. (Das, Ray a Raunt, 2020; Chacko a kol., 2014; Brand a Nicholls, 2011)

#### **1.1.4.2 Maximální respirační kapacita**

Ke zjištění hodnoty maximální respirační kapacity se využívá protonoforů, neboli uncouplerů (rozpojovačů), které umožní vrácení protonů do matrix mitochondrie, odpojení dýchacího řetězce od syntézy ATP a maximálně zvýší kapacitu ETC. Odráží tedy schopnost mitochondrií reagovat na zvýšenou potřebu tvorby ATP. Mezi používané uncouplery patří DNP (dinitrofenol) a FCCP (karbonylkyanid-*p*-trifluormethoxyfenylhydrazon). Pokles maximální respirační kapacity výrazně naznačuje mitochondriální dysfunkci. (Chacko a kol., 2014; Divakaruni a kol., 2014; Brand a Nicholls, 2011)

#### **1.1.4.3 Únik protonů**

Při měření toho parametru je používán oligomycin, který je specifickým inhibitorem ATP syntázy. Nedochází tedy k toku protonů tímto enzymem, což má za následek vysoký protonový gradient napříč vnitřní mitochondriální membránou, který inhibuje tok protonů přes komplexy I – IV. Spotřeba kyslíku tedy klesá a zbývající míra respirace mitochondrií je umožněna únikem protonů vnitřní mitochondriální membránou. K syntéze ATP však nedochází. Únik protonů ve vysoké míře může naznačovat poruchu mitochondrií. (vlivem uncouplerů; Das, Ray a Raunt, 2020; Chacko a kol., 2014; Brand a Nicholls, 2011)

#### **1.1.4.4 Účinnost spřažení a rezervní respirační kapacita**

Účinnost spřažení udává, kolik procent mitochondriální respirace odpovídá produkci ATP při určitém membránovém potenciálu. Účinnost spřažení lze určit ze změny v bazální respiraci po přidání oligomycinu. Jedná se o zlomek bazální mitochondriální spotřeby kyslíku potřebný pro syntézu ATP. Tento parametr je závislý na poptávce tvorby ATP, většinou je jeho

hodnota poměrně vysoká, např. u hepatocytů šplhá až k 70 %. Naproti tomu buňky se specializovanou funkcí ( $\beta$ -buňky pankreatu) mají účinnost spřažení výrazně nižší, a to okolo 30 %. Hnědá tuková tkáň vzhledem k její funkci má účinnost spřažení nulovou. Výhodou tohoto parametru je interní normalizace, protože se jedná o poměr. (Das a kol., 2020; Brand a Nicholls, 2011)

Rezervní respirační kapacita je mitochondriemi využívána, pokud jsou vyšší nároky na ATP při stresových podmínkách. Představuje rozdíl mezi bazální a maximální respirací. Její hodnota je nižší při působení oxidačního stresu a při vyčerpání této „rezervy“ je zdrojem ATP glykolýza. Jako příklad je možno uvést mitochondrie buněk srdeční tkáně, které mají fyziologicky při zvýšené fyzické zátěži dostatečnou rezervní respirační kapacitu, která je pak využita během stresových podmínek (př. ischemie). Snížená rezervní respirační kapacita sama o sobě se však nerovná dysfunkci. (Das, Ray a Raunt, 2020; Chacko a kol., 2014; Divakaruni a kol., 2014)

#### **1.1.4.5 Respirace související s produkcí ATP**

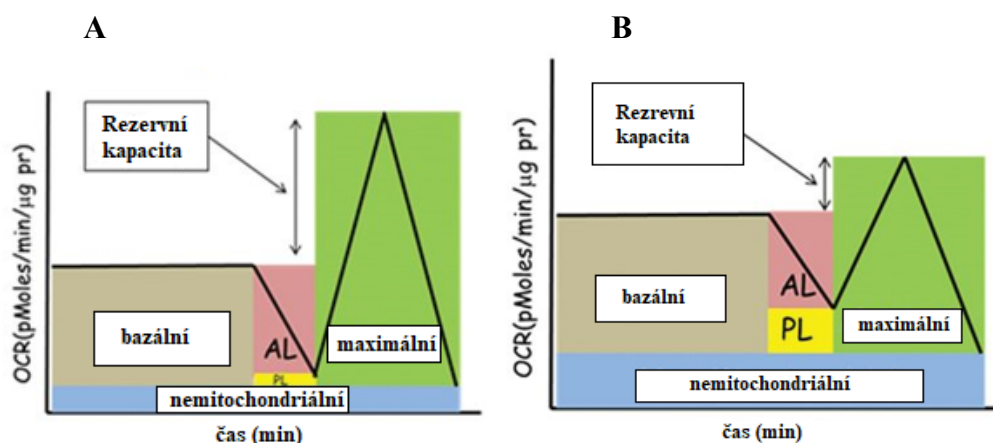
Míru syntézy ATP v bazálním stavu lze odhadnout při snížené respiraci, která byla navozena inhibicí ATP syntázy oligomycinem. Snížená mitochondriální tvorba ATP navozená oligomycinem aktivuje glykolýzu, která je pak hlavním zdrojem ATP. I přesto, že většina buněk je vybavena dostatečnou glykolytickou kapacitou, u některých buněk je po přidání oligomycinu pozorován kritický nedostatek ATP. Tato krize následně vede až ke selhání glykolýzy (která ve dvou svých reakcích ATP vyžaduje) a selhání aktivace a katabolismu mastných kyselin, vedoucí k nedostatečnému dodávání substrátu pro OXPHOS a poklesu v respiraci. (Chacko a kol., 2014; Brand a Nicholls, 2011) Zmíněné parametry jsou znázorněny na obrázku 6.

#### **1.1.4.6 Nemitochondriální spotřeba kyslíku**

Při měření nemitochondriální spotřeby kyslíku je inhibován celý ETC. Respirační komplex I je inhibován rotenonem a komplex II antimycinem A. Kyanid se pro inhibici komplexu IV nevyužívá, protože by inhiboval i ostatní enzymy obsahující hem. Nemitochondriální konzumpce kyslíku ve většině buněk představuje zhruba 10 % spotřeby kyslíku. V makrofázích je nemitochondriální spotřeba kyslíku připisována nemitochondriálním NADPH oxidázám. K posouzení přesné mitochondriální respirační kapacity se hodnota nemitochondriální spotřeby kyslíku odečítá od mitochondriální spotřeby kyslíku. (Das a kol.,



2020; Divakaruni a kol., 2014; Brand a Nicholls, 2011) Zmíněné parametry jsou znázorněny na obrázku 6.



**Obrázek 6** Schématické znázornění bioenergetických parametrů hodnocených na základě měření míry spotřeby kyslíku (OCR, Oxygen Consumption Rate; Das, Ray a Raunt, 2020)

Na grafu A je zobrazeno bioenergetické zdraví – vysoká rezervní kapacita, vysoká respirace související s produkcí ATP (AL, ATP-linked respiration), nízký únik protonů (PL, proton leak) a nízká nemitochondriální spotřeba kyslíku. Schéma B zobrazuje bioenergetickou dysfunkci - nízká rezervní kapacita, nízká respirace související s produkcí ATP (AL, ATP-linked respiration), vysoký únik protonů (PL, proton leak) a vysoká nemitochondriální spotřeba kyslíku.

## 1.2 Metabolismus nádorových buněk

S metabolismem nádorových buněk je spojován Warburgův efekt, který byl popsán Ottem Warburgem ve 20. letech 20. století. Principem tohoto fenoménu je přednostní získávání energie nádorových buněk anaerobní glykolýzou místo OXPHOS i za aerobních podmínek. Při masivní glykolýze je glukóza konvertována na velké množství pyruvátu, který není z důvodu překročení kapacity Krebsova cyklu rychle oxidován. Pyruvát je proto fermentován na laktát za katalýzy enzymu laktátdehydrogenázy. Fyziologicky je glykolýza hlavním zdrojem energie pouze v prostředí se sníženým množstvím kyslíku. Warburg se tedy domníval, že nádorové buňky využívají k získání energie pouze aerobní glykolýzu, protože mají zcela dysfunkční proces oxidační fosforylace. Tyto informace vedly k domněnce, že hlavní příčinou vzniku nádorového procesu jsou dysfunkční mitochondrie, a tudíž nemožnost mitochondrií produkovat ATP efektivněji OXPHOS. S dalším výzkumem se ale zjistilo, že většina nádorových buněk má funkční OXPHOS, proto je třeba dívat se na tento efekt v širším kontextu s ohledem na všechny změny metabolismu nádorových buněk. I přesto je však aerobní glykolýza u nádorových buněk typickým znakem, proto preparáty, které by specificky cílily na enzymy glykolýzy, mohly

představovat naději v léčbě nádorových onemocnění. (Zong, Rabinowitz a White, 2016; Krejčíř, Valík a Vojtěšek, 2018) Jak již bylo zmíněno v podkapitole glykolýza, nenádorové buňky získají glykolýzou 2 molekuly ATP, vzniklý pyruvát je oxidován v Krebsově cyklu za vzniku 36 molekul ATP. Celkem je získáno z jedné molekuly glukózy 38 molekul ATP. U nádorově zvrhlých buněk pyruvát z velké části nepodléhá oxidaci v Krebsově cyklu, tudíž celkovým ziskem jsou 2 molekuly ATP glykolýzou. (Li, Gu a Zhou, 2015) Proč nádorové buňky přecházejí na tento méně efektivní zisk energie není přesně známo. Je však popsáno několik onkogenů (*c-myc* a *HIF1* neboli hypoxií indukovatelný faktor 1, Hypoxia Inducible Factor 1) nebo tumor supresorových genů (*TP53*), které regulují enzymy glykolýzy a tím pádem energetický metabolismus nádorových buněk. (Chen a Russo 2012)

Onkogen *c-myc* kóduje protein c-Myc. Tento protein má funkci transkripčního faktoru a podílí se na proliferaci, diferenciaci, regulaci buněčného cyklu, angiogenezi aj. HIF-1 se skládá z podjednotky HIF-1 $\alpha$  a HIF-1 $\beta$ . Už z názvu vypovídá, že tento transkripční faktor (hlavně podjednotka HIF-1 $\alpha$ ) je vysoce exprimován za hypoxických podmínek, tedy i v solidní nádorové tkáni. Podílí se na řízení exprese genů GLUT, glykolýzy, Krebsova cyklu či glutaminolýzy. Bylo dokázáno, že HIF-1 $\alpha$  vyvolaný hypoxií zvýší expresi GLUT-1. Onkogenní mutace specifických drah způsobí zvýšení aktivity c-Myc a HIF-1 $\alpha$ , což zajistí dostatečné množství glykolytických enzymů. Dalším důsledkem onkogenní mutace je dostatečná syntéza glukózových transportérů (GLUT-1), které dopraví glukózu do buněk. Dysfunkce protoonkogenu *c-myc* je velmi častou příčinou vzniku maligního procesu, proto by mohl být *c-myc* terčem ve vývoji protinádorových léčiv. Kromě těchto funkcí studie objevily jeho význam při stimulaci rozkladu glutaminu, viz níže. (Chen a Russo 2012)

Tumorový supresor *TP53* je známý v regulaci apoptózy či buněčného cyklu. V poslední době vědci zjistili, že také hraje významnou roli v regulaci metabolismu glukózy. Za fyziologických podmínek se podílí na snižování aktivity genů glukózových transportérů. Mutace DNA vazebné domény genu *TP53* má opačný efekt, zvyšuje se aktivita genů pro GLUT-1 a GLUT-4 vedoucí ke zvýšenému využívání glukózy. Exprese GLUT-1 a GLUT-3 je také ovlivňována prostřednictvím HIF-1 $\alpha$ , a to tak, že HIF-1 $\alpha$  aktivuje transkripci genů kódující GLUT a glykolytické enzymy. Obecně vyšší exprese GLUT-1 je spojována s nepříznivým vývojem solidních tumorů, proto by tyto transportéry mohly spolu s enzymy glykolýzy představovat cíl protinádorové terapie. (Chen a Russo 2012) Změny metabolismu a funkce mitochondrií jsou pozorovány nejen u solidních nádorů, ale i u krevních malignit. Mitochondrie

tedy hrají hlavní roli v nádorovém procesu, ať už v přítomnosti kyslíku, či bez. (Solaini, Sgarbi a Baracca, 2011)

Vlastnosti nádorových buněk ve vyšší míře využívat glukózu se využívá v onkologické diagnostice pomocí metody pozitronové emisní tomografie (PET). Tato technika využívá analog glukózy-radioaktivně značenou <sup>18</sup>-fluorodeoxyglukózu (FDG), která je vychytávána buňkami nádorové tkáně. Zvýšená exprese GLUT-1 tedy koreluje se zvýšeným vychytáváním FDG u některých onkologických chorob. Tímto způsobem je tedy možné určit lokaci nádoru pacienta. (Ristow a Schulz, 2009; Chen a Russo 2012)

Příčinou vzniku malignit také může být mutace genů kódující enzymy TCA cyklu včetně isocitrátdehydrogenázy (IDH), sukcinátdehydrogenázy a fumaráthydratázy. Cytoplazmatický izoenzym IDH1 za normálních okolností katalyzuje přeměnu isocitrátu na  $\alpha$ -ketoglutarát. Pokud je gen pro IDH mutovaný, konečným produktem enzymu IDH není  $\alpha$ -ketoglutarát, ale onkometabolit 2-hydroxyglutarát. Mutace genů kódující IDH je pozorována u akutní myeloidní leukemie nebo gliomů. Sukcinátdehydrogenáza (SDH) je součástí TCA cyklu i ETC a mutace jeho podjednotek B, C, nebo D se nachází např. u feochromocytomu a papilárního karcinomu štítné žlázy. Důsledkem mutace genu pro SDH je hromadění sukcinátu, který je nedostatečně přeměňován, což způsobí inhibici enzymu HIF-1 $\alpha$  prolylhydroxylázy vedoucí k indukci hypoxie za normoxických podmínek. HIF-1 $\alpha$  je v běžném aerobním prostředí nestabilní a je degradován proteazomem, před samotnou degradací ale musí dojít k hydroxylaci dvou prolinových zbytků HIF-1 $\alpha$  prolylhydroxylázou. Po inhibici toho enzymu nahromaděným sukcinátem nedojde k hydroxylaci, a tím pádem ani k degradaci. Podjednotka  $\alpha$  a  $\beta$  se spojí za vzniku aktivního komplexu, který zvyšuje expresi genů glykolýzy a angiogeneze. Nahromaděný sukcinát se tedy podílí na zvýšení exprese genů regulující glykolýzu. (Bardella, Pollard, Tomlinson, 2011; Chen a Russo, 2012; Krejčíř, Valík a Vojtěšek, 2018) Dalším metabolitem, který se může akumulovat při jeho nedostatečné konverzi, je fumarát. Mutace genu fumaráthydratázy je přítomna u kožního a děložního leiomyomu a podílí se na hypermetylaci genomu (stejně tak i velké množství sukcinátu). (Chen a Russo, 2012; Krejčíř, Valík a Vojtěšek, 2018) Akumulace sukcinátu i fumarátu tedy stabilizuje HIF-1 $\alpha$  inhibicí prolylhydroxylázy, a tím dochází k posílení Warburgova efektu (Vyas, Zaganjor a Haigis, 2016).

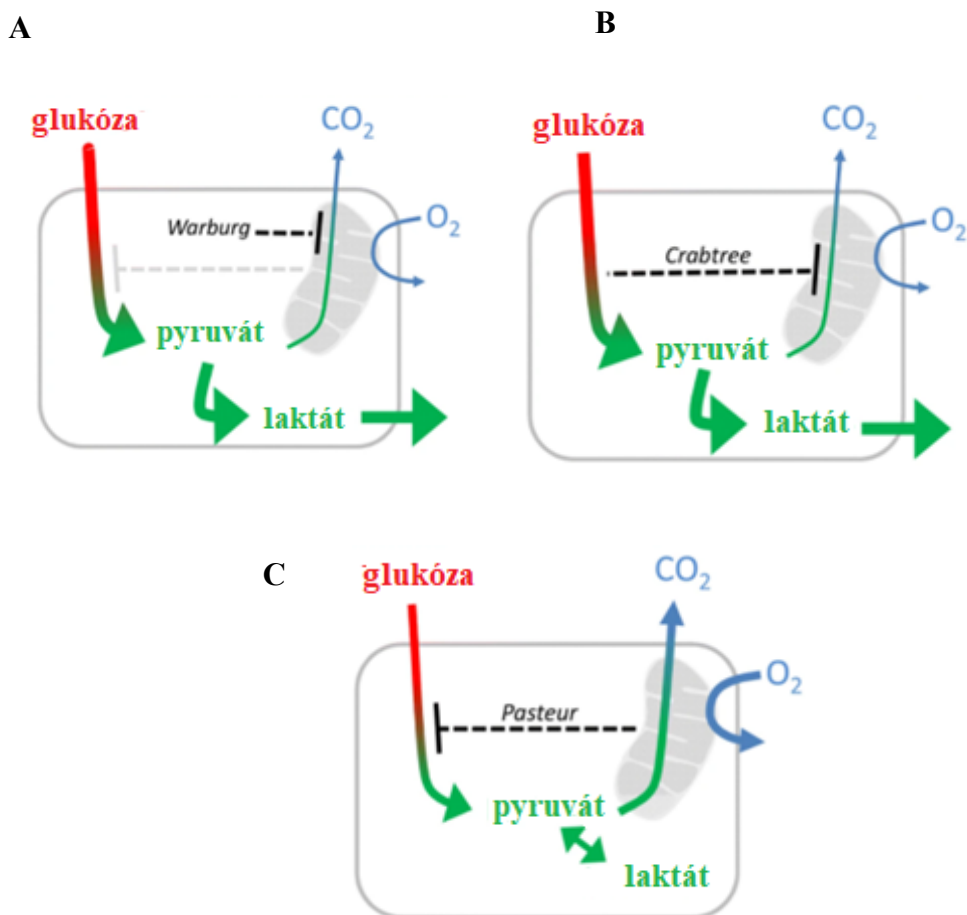
Nádorové buňky ke svému nekontrolovatelnému růstu potřebují velké množství výchozích látek ke stavbě biomakromolekul, které získávají z meziproductů TCA cyklu.

Nádorové buňky by však těchto meziproduktů spotřebovali hodně, proto jako náhradní zdroj využívají glutamin, aby byl udržen funkční chod TCA cyklu. Glutamin je metabolizmem nádorově transformovaných buněk využíván hojně, protože jeho koncentrace v krvi jsou nejvyšší ze všech volných aminokyselin. Glutamin je výchozí látkou pro syntézu aminokyselin, proteinů a nukleotidů, účastní se i různých regulačních mechanismů a je základní živinou pro růst rakovinných buněk. Aby mohl být glutamin využit, podléhá rozpadu na glutamát, aspartát, CO<sub>2</sub>, pyruvát, laktát, alanin a citrát souborem biochemických reakcí zvaných glutaminolýza. Glutamin se z krevního oběhu do intracelulárního prostředí dostane pomocí alanin, serin, cysteinových transportérů 2 (ASCT2, Alanine, Serine, Cysteine Transporter 2), v buňce je deaminován glutaminázami na glutamát. Glutamát je buď přeměněn na antioxidant glutathion nebo po odstranění dusíku glutamátdehydrogenázami vzniká  $\alpha$ -ketoglutarát, který tak doplní TCA cyklus. Již zmíněný c-Myc podporuje glutaminolýzu, a to tak, že zvyšuje expresi specifických transportérů a glutaminázy. Glutamináza, glutamátdehydrogenáza a glutaminové transportéry by mohly opět představovat cíl terapie nádorů. (Chen a Russo, 2012; Krejčíř, Valík a Vojtěšek, 2018)

Mezi další změny v projevu metabolismu nádorových buněk patří např. zvýšená produkce ROS, mutace mtDNA, změny v regulaci apoptózy, narušená struktura komplexů dýchacího řetězce a ATP syntázy (Solaini, Sgarbi a Baracca, 2011).

### **1.3 Crabtree efekt a jeho obcházení v buněčných kulturách**

Jev pozorovaný u buněk kultivovaných *in vitro* je podle Herberta Crabtreeho pojmenován jako Crabtree efekt. Dalo by se říci, že Crabtree efekt je opakem Pasteurova efektu, protože Pasteurův efekt popisuje tlumení glykolýzy mitochondriální respirací a Crabtree efekt je charakterizován inhibicí mitochondriální respirace díky zvýšené glykolýze. Warburgův jev je selháním Pasteurova efektu. Crabtree a Warburgův efekt tak mají společné rysy, a to zvýšenou konzumpci glukózy a produkci laktátu. Crabtree efekt je tedy jev, při kterém buňky kultivované v médiu obohaceném glukózou začnou využívat se vysoké míře glykolýzu ke tvorbě ATP i za přítomnosti kyslíku a funkčním dýchacím řetězcem mitochondrií. K tomuto jevu nedochází pouze pokud je koncentrace glukózy v médiu vysoká, ale dochází k němu i při nižších koncentracích. Přesný mechanismus tohoto fenoménu není zcela vysvětlen, ale na jeho vzniku se podílí vnější i vnitřní faktory. (Barros a kol., 2021; de Kok a kol., 2021; Mot a kol., 2016) Schématické znázornění těchto tří jevů je zobrazeno na obrázku 7.



**Obrázek 7** Warburgův, Crabtree a Pasteurův efekt (Barros a kol.,2021)

Warburgův efekt (7A) představuje inhibici Pasteurova efektu, tzn. stimulaci glykolýzy a produkci laktátu i v přítomnosti kyslíku. Crabtree efekt (7B) je inhibicí mitochondriální respirace z důvodu zvýšené glykolýzy. Pasteurův efekt (7C) reprezentuje inhibici glykolýzy mitochondriálním dýcháním.

Taková změna metabolismu mitochondrií pak ovlivní výzkumy mitochondriálních procesů, mitochondriálních chorob či mitochondriálních toxinů, při kterých se využívají buněčné kultury. Z tohoto důvodu je nutné k získání validních výsledků experimentů Crabtree efekt obejít a odvrátit metabolismus od glykolýzy zpět k OXPHOS. Je známo několik přístupů, jak toho dosáhnout. (Barros a kol., 2021; de Kok a kol., 2021; Mot a kol., 2016)

První možností, která zasahuje do vlivů vnějších, je úprava použitého kultivačního média, a to např. snížením množství glukózy, než je obvyklé (pod 10-25 mM glukózy). Bylo prokázáno, že až koncentrace 0,1- 5 mM glukózy dokáže posunout metabolismus směrem k OXPHOS. Úplnou inhibici Crabtree efektu však autoři popisují až při úplné absenci glukózy v médiu. Dalším způsobem je substituce glukózy jinými složkami, např. galaktózou nebo látkami metabolizovanými Krebsovým cyklem-glutaminem, pyruvát, mastnými kyselinami či acetoacetátem. Nejčastěji byla hodnocena náhrada glukózy galaktózou v koncentraci 5-10

mM, protože její přeměna na pyruvát probíhá z důvodu méně aktivní galaktokinázy pomalu, což nutí buňky využívat OXPHOS k pokrytí jejich nároků na energii (de Kok a kol., 2021). Strategii s galaktokinázou však lze aplikovat pouze na buňky schopné metabolizovat galaktózu. Dalším omezením je zvýšený metabolický stres buněk a zrychlené stárnutí. (de Kok a kol., 2021; Mot a kol., 2016) Experiment na mikrogliálních buňkách dokázal, že při kultivaci těchto buněk v bezglukózovém médiu s přidávkou pyruvátu došlo ke zvýšení aktivity mitochondriální respirace. Kultivace za použití bezglukózového média s obsahem mastných kyselin u kardiomyocytů pocházejících s lidských pluripotentních kmenových buněk potlačuje glykolýzu, a naopak stimuluje OXPHOS. Podobný efekt mělo médium s obsahem 5 mM glukózy a acetoacetátu na buněčnou linii LLC-PK<sub>1</sub>. (de Kok a kol., 2021)

Druhou strategií, jak zabránit Crabtree efektu je použití inhibitorů glykolýzy. Mezi tyto inhibitory se řadí 2-deoxyglukóza v koncentraci 20-50 mM, která inhibuje účinek enzymu hexokinázy. Glyceralaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu je možno inhibovat 0,03 -1 mM kyselinou jodoctovou nebo 5 μM kyselinou koningovou. (de Kok a kol., 2021)

Třetí možností je použití uncouplerů, jako je karbonylkyanid-*p*-chlorfenylhydrazon (4 μM), který posunul tvorbu energie od glykolýzy k OXPHOS v buňkách ledvin potkana. Jiné studie zkoumaly efekt DNP (0,025-0,25 mM) na buňky plic a srdce potkana a jejich závěr byl podobný jako při použití karbonylkyanid-*p*-chlorfenylhydrazonu. (de Kok a kol., 2021)

Do poslední kategorie se řadí různé přístupy či ostatní látky, které nespádají do výše zmíněných. 2-fosfát kyseliny L-askorbové inhiboval glykolýzu u králíčích renálních proximálních tubulárních buněk. Stejně buňky stejní autoři ošetřili anti-TGF- $\beta$  protilátkami, které opět snížili aktivitu glykolýzy. V neposlední řadě je třeba připomenout inhibici HIF-1 $\alpha$ . (de Kok a kol., 2021)

## 1.4 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA, Short Chain Fatty Acid) jsou tvořeny v tlustém střevě anaerobními bakteriemi fermentací nestrávitelné vlákniny a sacharidů (škrob, celulóza, xylany, pektiny, arabinogalaktany). Mohou být formovány i z proteinů, peptidů či glykoproteinů, avšak polysacharidové a oligosacharidové zdroje jsou u lidí a savců těmi nejdůležitějšími. (S. Macfarlane a G. T. Macfarlane, 2003) Nejvýznamnějšími produkty jsou acetát, propionát a butyrát, které jsou ve střevě tvořeny v poměru 3:1:1 (Schönfeld a Wojtczak, 2016). Tento poměr je většinou stálý, ale změny stravovacích návyků mohou způsobit odchylky v produkci a absorpci SCFA (Wong a kol., 2006). Za jeden den střevní bakterie vyprodukují zhruba 500-600 mM SCFA (He a kol., 2020). Acetát vzniká procesem redukční methylace  $\text{CO}_2$ , propionát může vznikat z laktátu a kondenzací 2 molekul acetyl-CoA vzniká acetoacetyl-CoA, který se poté konvertuje na butyryl-CoA (butyrát; Schönfeld a Wojtczak, 2016). Bakterie *Akkermansia muciphilla* dominují v produkci propionátu. Ze škrobu je tvořen butyrát hlavně díky mikroorganismům *Ruminococcus bromii*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium hallii* a *Eubacterium rectale*. (Morrison a Preston, 2016) Nejvyšší koncentrace (70-140 mM) SCFA nalezneme v proximálním tračníku (Schönfeld a Wojtczak, 2016). V periferní krvi jsou koncentrace velmi nízké – butyrát a propionát (4-10  $\mu\text{M}$ ) a acetát (zhruba 100  $\mu\text{M}$ ), což indikuje, že působí přímo na střevní epitel a imunitní buňky (Sivaprakasam, Prasad a Singh, 2016). SCFA jsou obsaženy ve formě triglyceridů a fosfolipidů v mateřském mléce a mohou se tvořit v játrech (Schönfeld a Wojtczak, 2016).

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou monokarboxylové kyseliny mající maximálně 6 atomů uhlíku. V rostlinách a živočiších se vyskytují v menší míře než mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LCFA, Long Chain Fatty Acid). SCFA mají žluklý nebo štiplavý zápach. Jejich lipofilita je tím vyšší, čím je delší uhlíkový řetězec. SCFA tedy netvoří micely, tudíž nejsou součástí buněčných membrán. Jedná se o slabé kyseliny ( $\text{pK}_A \sim 3,8 - 4,9$ ; viz tabulka). (Schönfeld a Wojtczak, 2016).

**Tabulka 1** Nomenklatura a základní fyzikální vlastnosti SCFA

Počet atomů uhlíku	Systematický název	Běžný název	Vzorec	Teplota tání (°C)	Teplota varu (°C)	pK <sub>A</sub>
1	Kyselina methanová	Kyselina mravenčí	HCOOH	8,6	100,8	3,75
2	Kyselina ethanová	Kyselina octová	CH <sub>3</sub> COOH	16,5	118,1	4,75
3	Kyselina propanová	Kyselina propionová	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH	-22,0	140,9	4,88
4	Kyselina butanová	Kyselina máselná	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	-7,9	162,5	4,81
5	Kyselina pentanová	Kyselina valerová	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	-34,5	186,4	4,80
6	Kyselina hexanová	Kyselina kapronová	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	-3,9	205	4,84

Mastné kyseliny dodávají redukované kofaktory (NADH, FADH<sub>2</sub>) dýchacímu řetězci mitochondrií a tím pádem zvyšují spotřebu kyslíku (Schönfeld a Wojtczak, 2016). SCFA na rozdíl od LCFA aktivují ATPázu pouze v omezené míře (Wojtczak a Schönfeld 1993).

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem mají klíčovou funkci v rámci lidského zdraví. Bylo prokázáno, že dieta chudá na již zmíněnou vlákninu, je spojována se zvýšeným rizikem vzniku onemocnění trávicího traktu, včetně ulcerózní kolitidy, Crohnovi choroby či kolorektálnímu karcinomu. Hlavním protizánětlivým a protirakovinným účinkem na střeva disponuje butyrát, který je schopen indukovat apoptózu nebo zastavit buněčný cyklus nádorových buněk. (Sivaprakasam, Prasad a Singh, 2016) Butyrát tedy ovlivňuje proliferaci a diferenciaci buněk a epitelální buňky tlustého střeva ho upřednostňují před ostatními zdroji energie (Wong a kol., 2006). SCFA se dále podílejí na regulaci metabolismu lipidů, glukózy, imunitních funkcí a na udržování integrity střev. Ovlivňují také chuť k jídlu, a tím pádem i tělesnou hmotnost.



(Wojtczak a Schönfeld 1993; Schönfeld a Wojtczak, 2016; Morrison a Preston, 2016) Konkrétně propionát reguluje glukoneogenezi a inhibuje syntézu cholesterolu a acetát je výchozí látkou pro tvorbu cholesterolu. Přemnožení patogenních bakterií je znemožněno nižším pH, které vytvářejí právě SCFA. Dále snižují rozpustnost žlučových solí a nepřímo zvyšují absorpci minerálů. (Wong a kol., 2006) SCFA vytvořené ve střevě slouží jako zdroj energie, a pro člověka představují 10 % denní potřeby kalorií. Jejich účinek také ovlivňuje spánek. (He a kol., 2020)

## 1.5 Zásady kultivace buněk *in vitro*

Výroba vakcín, testování cytotoxicity, studie funkce genů, výroba biologických léčiv či vytvoření umělé tkáně je v dnešní době možné díky immortalizovaným buněčným liniím, které jsou více etickým nástrojem výzkumu nežli buňky primární, získané z tkání pokusných zvířat nebo tkání lidských. Jejich dalším benefitem kromě podobnosti s primárními buněčnými liniemi je jejich finanční dostupnost a snadná kultivace. (Arzumian, Kiseleva a Poverennaya, 2021) Mají ale i své nevýhody. Imortalizace buněčných linií má vliv na jejich genetický materiál, což může vést ke změně fenotypu nebo jejich běžných funkcí, proto za některých okolností nemusí poskytovat stejné výsledky jako primární buňky. Další potíží immortalizovaných buněčných linií bývá kontaminace jinými buněčnými liniemi nebo mykoplazmaty. (Kaur a Dufour, 2012) Mykoplazmata jsou intracelulární parazité, kteří nejsou při kultivaci snadno vizuálně detekovatelné, protože nemění pH média. Zdrojem kontaminace mohou být činidla, infikované buňky nebo aerosol vznikající během pipetování infikovaných kultur. (Phelan a May, 2015)

Při práci s buňkami je nutné pracovat za aseptických podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci používaných buněčných linií a k přenosu infekce na laboratorního pracovníka. To umožní nejen použití jednorázových sterilních pipet, kultivačních lahví a dalších pomůcek, ale také laminární box. Laminární box umožňuje laminární (nesměšovací) proudění vzduchu, které chrání pracovní plochu před různými kontaminanty a taktéž chrání daného pracovníka. (Phelan a May, 2015) Laminární boxy jsou opatřeny vysoce účinnými filtry částic vzduchu (HEPA, High Efficiency Particulate Air), které zachycují částice nečistot vzduchu (Coté, 1998). Po každém použití laminárního boxu by měly být jeho povrchy zbaveny bakterií, virů a plísní 70 % alkoholem a UV zářením, kterým jsou některé boxy opatřené. Kontaminující mikroorganismy vyčerpávají živiny v médiu a mohou produkovat nebezpečné metabolity, inhibovat buněčný

růst či kultivované buňky zabít. Z těchto důvodů se kultivační media mohou suplementovat antibiotiky (např. penicilin, streptomycin, gentamycin). Nejčastěji využívanou kombinací je penicilin a streptomycin. (Phelan a May, 2015)

Kultivační média, kultivační nádoby a inkubátor vytvářejí prostředí *in vitro*, které by mělo co nejlépe imitovat přirozené *in vivo* prostředí buněk. Inkubátor poskytuje vhodnou teplotu pro kultivaci kultur (37 °C), vlhkost a také dostatečné množství CO<sub>2</sub> (5 %). Kultivační nádoby poskytují patřičný povrch k uchycení buněk. Dostatek živin, vitamínů, hormonů, růstových faktorů a optimální pH zajišťují kultivační média. (Mather a Roberts, 1998; Phelan a May, 2015) Mezi základní média patří MEM (Minimum Essential Medium Eagle), jeho modifikovaná verze DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) a RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Phelan a May, 2015; Jedrzejczak-Silicka, 2017), která obsahují aminokyseliny, glukózu, soli a vitamíny. Tato základní média jsou navíc obohacována již zmíněnými antibiotiky, L-glutaminem a séry. Nejvíce používaným sérem je fetální bovinní sérum (FBS), možností je však i kultivace bez séra. Alternativou FBS je telecí, koňské či lidské sérum. (Phelan a May, 2015) Séra jsou zdrojem lipidů, proteinů, minerálů, hormonů, růstových a adhezních faktorů. Do bezsérových médií jsou proto často přidávány hormony (nejčastěji inzulin) a růstové faktory - fibroblastový růstový faktor (FGF, Fibroblastic Growth Factor) a růstový faktor podobný inzulinu (IGF, Inzulin-like Growth Factor), aj. (Jedrzejczak-Silicka, 2017) FBS je skladováno v mrazu a kultivační média jsou uchovávány v ledničkových teplotách, okolo 4 °C. Optimální pH média je v rozmezí 7,2 - 7,4. (Phelan a May, 2015)

Ke zjištění počtu buněk dané kultury a následnému pasážování je v případě buněk adherentních třeba použít trypsin, který rozvolní přisedlé buňky z povrchu kultivační nádoby. Dlouhá expozice tryptinem by mohla buňky poškodit, proto je nutné přidat k vytvořené suspenzi buněk médium obsahující sérum či samotné sérum, které zastaví aktivitu tohoto enzymu. Suspenzi buňky jsou rozptýlené v médiu, proto je není nutné ošetřit tryptinem. Po obarvení buněk 0,4 % trypanovou modří je možné je spočítat v počítací komůrce. Buňky se pasážují při dosažení konfluence zhruba 75-100 %. (Phelan a May, 2015)

Buňky v kultuře procházejí čtyřmi růstovými fázemi. V první lag fázi se buňky adaptují na *in vitro* prostředí. V následující log fázi buňky exponenciálně rostou, a to po dobu třiceti pasáží. (Phelan a May, 2015) Pro experimenty je vhodné použití buněk právě v této fázi (Ravi a kol., 2015). Ve třetí stacionární fázi se rychlost růstu buněk zpomaluje a po 40 až 50 pasáží buňky stárnou a umírají (Phelan a May, 2015).

Uchování buněčných linií pro případný další výzkum je možné jejich zamrazením. Aby při procesu zmrazování nedošlo k poškození buněk krystalkami ledu, je nutné použít kryoprotektivum, např. dimethylsulfoxid. Kryoprotektiva snižují bod tuhnutí a tím zpomalují proces zmrazování, což snižuje riziko vzniku ledových krystalků. Snižování teploty musí probíhat velmi pomalu, zhruba o 1°C za minutu. Buňky před kryokonzervací by neměly být kontaminované a měly by se nacházet v log fázi. Další ochranou před vznikem krystalků je naopak rychlé rozmrazování. (Phelan a May, 2015) Běžným postupem při rozmrazování je vyjmutí vialky z mrazáku či Dewarovy nádoby a následné vložení do vodní lázně, ve které se s vialkou lehce pohybuje až do úplného rozmrazení. Celý proces trvá zhruba 3-5 minut. (Baust, Campbell a Harbell, 2017) Krátkodobé skladování zmrazených buněk po dobu několika měsíců je možné při -80°C. Ke skladování buněk dlouhodobě je však zapotřebí zařízení s tekutým dusíkem. (Mather a Roberts, 1998) Pokud byly buňky před zamražením vystaveny stresovým podmínkám (nedostatek živin, vysoká konfluence), ovlivní to jejich kvalitu po rozmrazení (Baust a kol., 2017). Množství zamrazených buněk by mělo být 10<sup>6</sup> buněk/ml (Phelan a May, 2015).

Za určitých okolností je vhodné ověřit identitu buněčných linií. Ověření neboli autentizace představuje jistotu, že daná buněčná linie je stejného živočišného druhu a buněčného typu jako buňky z původního organismu či buněčné sbírky. Metodami sloužící k ověření buněčných linií je také možno zjistit fenotyp či křížovou kontaminaci. Prvním krokem ověření identity je pozorování morfologie buněk, která by se neměla měnit po celou dobu kultivace za daných podmínek. Pokud je zaznamenána změna morfologie buněk, je nutné ověřit jejich původ. Změny v morfologii buněk mohou naznačovat nesprávně připravené kultivační médium nebo mikrobiální či křížovou kontaminaci. Identita buněčných linií se v minulosti zjišťovala stanovením karyotypu, izoenzymovou analýzou nebo HLA (lidské lymfocytární antigeny, Human Lymphocyte Antigen) typizací. V dnešní době jsou již vyvinuté sofistikovanější molekulární metody, které jsou navíc cenově dostupné a snadno proveditelné. (Nims a Reid, 2017) U buněk lidského původu se provádí profilování DNA metodou krátkých tandemových repetitiv (STR, Short Tandem Repeats), identita buněk zvířecího původu je určována metodou DNA barcoding. Dalším důvodem k ověření identity je kromě morfologických změn také pokud buněčné linie přijaté laboratoří nepochází ze sbírek, které zaručují dodání certifikovaných buněčných linií. (Baust a kol., 2017; Nims a Reid, 2017)

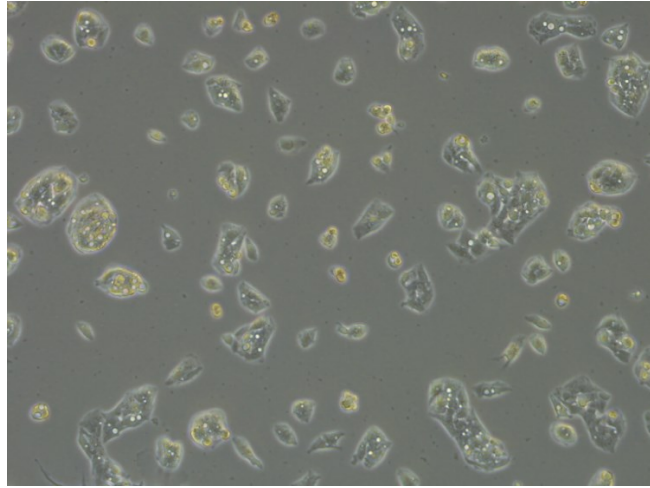
Buněčné linie je možné zakoupit u různých organizací, ve Spojených státech je to American Type Culture Collection (ATCC, Americká sbírka tkáňových a buněčných kultur)

nebo Corriell Cell Repository (CCR). Pro Evropu existuje sbírka s názvem European Collection of Cell Cultures (ECACC). (Phelan a May, 2015)

### 1.5.1 Buněčná linie HepG2

Buněčná linie HepG2 patří spolu s HepaRG, Huh7, SK-Hep-1 a Hep3B mezi nejčastěji používané nádorové buněčné linie jater různého původu. Buněčné linie HepG2 a Huh7 v minulosti sloužily např. k objasnění replikace virového původce hepatitidy B a D. Buněčná linie HepG2 byla izolována v roce 1975 z jater patnáctiletého chlapce, který měl diagnostikovaný dobře diferencovaný hepatocelulární karcinom (HCC, Hepatocellular Carcinoma). Na již zmíněné sbírce ATCC je k dostání od roku 1980 pod názvem HB 8065. (Arzumanian, Kiseleva a Poverennaya, 2021) V roce 2009 však López-Terrada a kol. zjistili, že tato buněčná linie pochází z epiteliálního hepatoblastomu. Hepatoblastom je nejčastější nádor jater vyskytující se u dětí a je méně agresivní nežli vzácnější dětský hepatocelulární karcinom. Rozlišení těchto dvou nádorů není snadné, proto autoři vyvíjí metody sloužící k jejich identifikaci. Molekulárně genetickou metodou – komparativní genomovou hybridizací odhalili ztráty chromozomu v oblasti 4q3, které byly spojovány s translokací t (1;4) častou právě u hepatoblastomu. Detekovali navíc trizomie 2 a 20, které jsou také vlastností hepatoblastomu. U více než 85 % hepatoblastomů je přítomna delece exonu 3 genu *CTNNB1* kódující  $\beta$ -katenin Wnt signalizační dráhy, která byla pozorována i u HepG2. (López-Terrada a kol., 2009) Buněčná linie SK-Hep-1 pochází z adenokarcinomu a ostatní zmíněné jsou původem buňky hepatocelulárního karcinomu. Buněčná linie HepG2 je vědci využívána ke studiu toxicity těžkých kovů, nanočástic a léčiv, protože disponují skoro stejným metabolismem jako fyziologické hepatocyty. Nádorová linie HepG2 však na rozdíl od normálních hepatocytů vykazuje nižší až nulovou expresi cytochromu P450, který se účastní metabolismu xenobiotik. Ke zvýšení aktivity cytochromů je možné využít 3D kultivační systémy za vzniku sferoidů, které více připomínají *in vivo* prostředí. Při 3D kultivaci HepG2 tedy vykazují vyšší aktivitu daného enzymu než při 2D kultivaci. (Arzumanian, Kiseleva a Poverennaya, 2021)

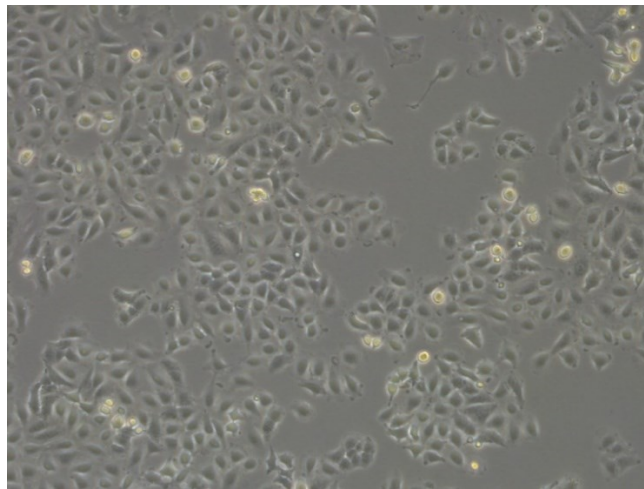
Buňky HepG2 jsou velké zhruba 10-20  $\mu$ M, mají jedno jádro a většinou obsahují tři až sedm velkých jadérek. Hladké plazmatické retikulum nemají dostatečně vyvinuté a počet mitochondrií oproti normálním hepatocytům mají pouze poloviční. Obsahují 50 až 60 chromozomů a vykazují nestabilní genom. (Arzumanian, Kiseleva a Poverennaya, 2021) Obrázek 9 ukazuje morfologii linie HepG2.



**Obrázek 8** Buněčná linie HepG2 (invertovaný mikroskop, zvětšení 100x)

### 1.5.2 Buněčná linie A549

Adhezní buněčná linie A549 pochází z plicního karcinomu 58-letého muže (Giard a kol., 1973; Foster a kol., 1998), která byla založena v roce 1972 a charakterizována jako buněčná linie mající charakteristické vlastnosti jako buňky plicního epitelu typu II (Foster a kol., 1998). Proto byla tato buněčná linie považována za model pneumocytů II. typu. Podobnost spočívá v přítomnosti lamelárních tělísek u buněčné linie A549 i pneumocytů II. typu (Shapiro a kol., 1978). Buňky syntetizují lecitin s velkým množstvím nenasycených mastných kyselin, což indikuje skutečnost, že se podílejí na syntéze plicních surfaktantů. Buněčná linie A549 by měla sloužit ke studiu syntézy lidských surfaktantů a případně sloužit jako zdroj těchto surfaktantů pro terapii patologických stavů způsobených jejich nedostatkem. (Lieber a kol., 1976). Později však bylo zjištěno, že architektura a bariérové vlastnosti buněk A549 se liší od pneumocytů II. typu, proto je tedy třeba zvážit použití A549 jako model pneumocytů II. typu (Swain a kol., 2010). Tato linie byla vědci také použita při studiu tvorby chemokinů po infekci buněk *Mycobacterium tuberculosis* (Lin, Zhang a Barnes, 1998). Obrázek 9 ukazuje morfologii linie A549.



**Obrázek 9** Buněčná linie A549 (invertovaný mikroskop, zvětšení 100x)

## 2 CÍLE PRÁCE

- Otestovat vliv acetátu sodného a propionátu sodného na metabolismus nádorové buněčné linie A549.
- Otestovat vliv acetátu sodného a propionátu sodného na metabolismus nádorové buněčné linie HepG2.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístroje a pomůcky

- Automatické pipety Finnpiquette® (ThermoFisher Scientific, Německo)
- Automatický pipetor aaccujet pro® (Brand, Německo)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (Schoeller instruments s.r.o., Japonsko)
- Dewarova nádoba LS 750 (Worthington industries)
- Invertovaný mikroskop Leica Dmi1 (Leica microsystems, Německo)
- Krycí sklíčka (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG)
- Kultivační lahve a další plastové pomůcky (SARSTEDT AG & Co. KG, Německo)
- Laboratorní odsávací stanice (Gilson, USA)
- Laminární box (Schoeller instruments s.r.o., Japonsko)
- Lednice s mrazákem (Liebherr)
- Manuální počítadlo (Carl Roth, Německo)
- Mikrotitrační destičky 96 jamkové (ThermoFisher Scientific, Německo)
- Počítací komůrka Neubauer (Assistent, Německo)
- Seahorse XFe96 analyzátor
- Tecan Infinite M200
- Vodní lázeň Julabo TW 12 (Německo)

### 3.2 Chemikálie

- Acetát sodný (Sigma Aldrich, USA)
- Cell Proliferation reagent WST-1 (Roche, Německo)
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco|ThermoFisher Scientific)
- DPBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Gibco|ThermoFisher Scientific)
- FBS (fetální bovinní sérum; Sigma Aldrich, USA)
- L-Glutamin (PAN-Biotech, Německo)
- MEM - Minimum Essential Medium Eagle (Sigma Aldrich, USA)
- MEM roztok neesenciálních aminokyselin (Sigma Aldrich, USA)
- Penicillin-Streptomycin (PAN-Biotech, Německo)
- Propionát sodný  $\geq 99\%$  (Sigma Aldrich, USA)
- Roztok D-(+)-glukózy (Sigma Aldrich, USA)



- Roztok pyruvátu sodného (Sigma Aldrich, USA)
- Trypanová modř (Sigma Aldrich, USA)
- Trypsin

### 3.3 Podmínky kultivace buněčné linie HepG2 a A549

Pro potřeby experimentů byly buněčné linie rozmrazeny, protože byly skladovány v tekutém dusíku v Dewarových nádobách. Ke kultivaci bylo používáno médium MEM, které bylo obohaceno níže zmíněnými suplementy. Pro WST-1 test bylo používáno médium DMEM bez fenolové červeně, složení je opět zmíněno níže. Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích s plochou dna 75 cm<sup>2</sup> či 25 cm<sup>2</sup>. Inkubace vždy probíhala při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Výměna média či pasážování (po předchozím uvolnění buněk ze dna kultivační lahve trypsinem) bylo prováděno 3x týdně. Pokud bylo prováděno pasážování, buňky byly počítány manuálně v počítací komůrce pod světelným mikroskopem při celkovém zvětšení 100x.

**Složení kultivačního média:** MEM obohacené 10 % FBS, 1 % penicillin-streptomycin, 1% MEM roztok neesenciálních aminokyselin a 1% roztok pyruvátu sodného.

**Složení kultivačního média bez fenolové červeně:** DMEM bez fenolové červeně obohacené 45 % roztokem glukózy, glutaminem o koncentraci 0,292 g/l, 1 % MEM roztok neesenciálních aminokyselin a 1 % roztok pyruvátu sodného.

### 3.4 Příprava roztoků mastných kyselin s krátkým řetězcem

#### Acetát sodný (AS)

Bylo naváženo 8,203 g acetátu sodného (molární hmotnost 82,03 g/mol), který byl rozpuštěn ve 100 ml vody za vzniku 1 M roztoku acetátu sodného.

#### Propionát sodný (PS)

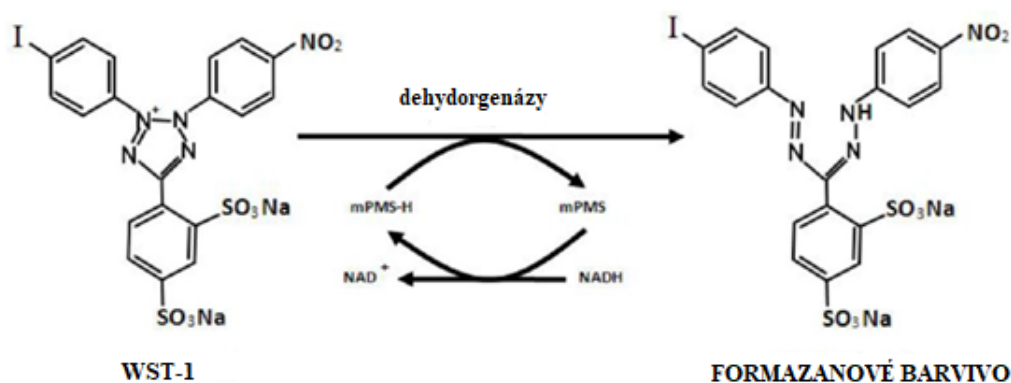
Bylo naváženo 9,606 g propionátu sodného (molární hmotnost 96,06 g/mol), který byl rozpuštěn ve 100 ml vody za vzniku 1 M roztoku propionátu sodného.

pH všech roztoků byla upravena na 7,4. Všechny takto připravené roztoky SCFA byly v laminárním boxu přefiltrovány, rozděleny do 5 ml zkumavek a skladovány v mrazáku.

### 3.5 Testování viability buněk metodou WST-1 po jejich ošetření SCFA

Účinek SCFA na buněčnou linii HepG2 byl nejprve testován metodou WST-1, která měří viabilitu buněk.

Metoda WST-1 slouží k testování viability buněk, ale také k měření buněčné proliferace, a to pomocí tetrazoliové soli WST-1. Buněčná proliferace může být hodnocena po přidání např. růstových faktorů, cytokinů či živin. Tato metoda umožňuje hodnocení cytotoxicity protirakovinných či jiných léčiv. Principem testu je štěpení stabilní tetrazoliové soli metabolicky aktivními buňkami na oranžový formazan (obrázek 10). Čím je ve vzorku více viabilních buněk, tím je přítomno více aktivních dehydrogenáz mitochondrií, což způsobuje masivnější tvorbu formazanového barviva. Absorbance vzniklého formazanu je měřena spektrofotometricky. Výhodou testu WST-1 oproti ostatním formazanovým testům (XTT, MTS) je vyšší rozpustnost WST-1 reagentu, což poskytuje vyšší citlivost metody.



**Obrázek 10** Schématické znázornění přeměny WST-1 na formazanové barvivo (Yin a kol., 2013).

Reagencie WST-1 je mitochondriálními dehydrogenázami redukována na formazan, přičemž akceptorem elektronů je mPMS (1-methoxy-5-methyl-fenazinium-methyl sulfát).

Připravené roztoky SCFA byly naředěny kultivačním médiem na požadované koncentrace (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM a 10 mM) a k takto připravenému médiu byla napipetována buněčná linie HepG2. 100  $\mu$ l suspenze buněk v kultivačním médiu s přídatkem dané koncentrace SCFA byla vždy pipetována do jamek 96 jamkové mikrotitrační destičky o koncentraci  $\approx$  5 000 buněk/jamku. Takto připravená destička byla inkubována 24 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaci bylo původní médium nahrazeno médiem bez fenolové červeně, aby nedošlo k ovlivnění naměřené absorbance a na závěr bylo připipetováno 10  $\mu$ l reagentu

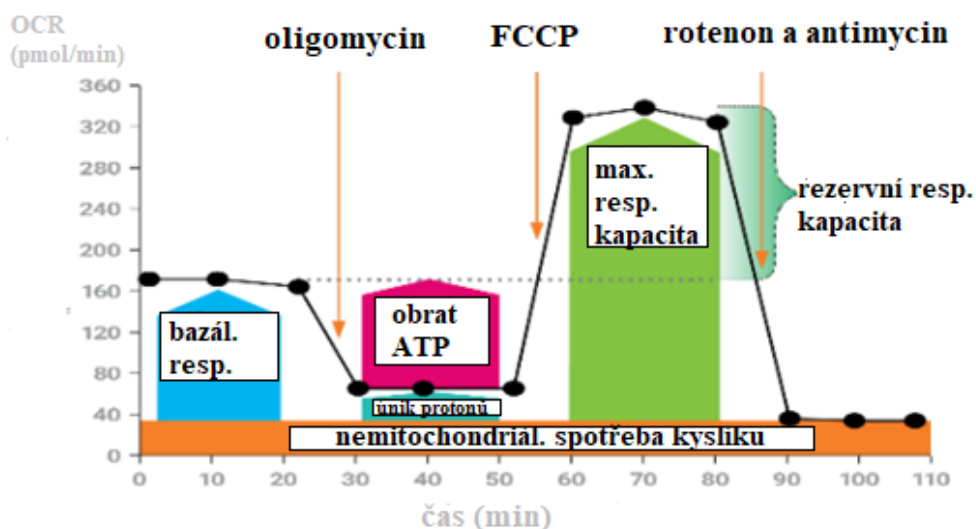
WST-1. Následovala 4-hodinová inkubace za stejných podmínek. Na přístroji Tecan Infinite M200 byla spektrofotometricky měřena absorbance vzniklého formazanu při 450 nm. Navíc byla použita referenční vlnová délka 600 nm. Kontrolou byly buňky neošetřené SCFA.

### 3.6 Cell mito stress test

Analyzátor Seahorse XF umožňuje kinetické měření mitochondriální respirace měřením míry spotřeby kyslíku (OCR, Oxygen Consumption Rate) z kultivačního média. Dále kineticky měří míru okyselování extracelulárního prostředí (ECAR, Extracellular Acidification Rate), které koreluje s koncentrací protonů při procesu glykolýzy. Primárním zdrojem protonů v kultivačním médiu je laktát, který vzniká při tvorbě ATP z glukózy bez přítomnosti kyslíku. Měření zároveň respirace i glykolýzy v reálném čase umožňuje analýzu metabolického fenotypu buněk. Analýza extracelulárního toku kyslíku a protonů umožní určení bioenergetického profilu buňky bez použití značek, které mohou pozměnit chování buněk.

Přímým měřením OCR poskytuje cell mito stress komplexní metodu pro stanovení důležitých parametrů, díky kterým je možné hodnotit funkci mitochondrií v živých neporušených buňkách i v izolovaných mitochondriích. Metoda využívá postupné přidávání specifických inhibitorů a uncoupleru.

Nejprve je analyzátozem změřena bazální spotřeba kyslíku. Poté je přidán specifický inhibitor ATP syntázy oligomycin, který způsobí pokles OCR. Dalším krokem je aplikace uncoupleru FCCP, po které dojde ihned ke zvýšení OCR. Díky uncoupleru se vnitřní mitochondriální membrána stává propustnou pro protonu a přenos elektronů již není řízen protonovým gradientem. Rezervní respirační aktivitu je pak možné vypočítat odečtením bazální OCR od hodnoty spotřeby kyslíku po stimulaci uncouplerem. V poslední fázi je přidán rotenon a antimycin A, které inhibují většinu spotřeby kyslíku v buňce a zbývající spotřeba kyslíku je přisuzována nemitochondriálním oxidázám buňky. Hodnota nemitochondriální spotřeby kyslíku je odečítána od nejvyšší hodnoty OCR a tímto výpočtem je možné získat maximální respirační kapacitu. Hodnota nemitochondriální spotřeby kyslíku je také odečítána od hodnot OCR po přidavku oligomycinu za účelem výpočtu úniku protonů. Parametr respirace související s produkcí ATP je vypočítán jako rozdíl mezi bazální OCR a OCR po přidání oligomycinu. Jednotlivé parametry byly podrobněji popsány v kapitole 1.1.4. Schéma cell mito stress testu je znázorněno na obrázku 11.



**Obrázek 11** Cell mito stress test (www.agilent.com)

Cell mito stress test umožňuje měřit ukazatele mitochondriální funkce v neporušených buňkách v reálném čase. Nejprve je měřena bazální spotřeba kyslíku, poté je postupně přidáván oligomycin, uncoupler FCCP a na závěr je aplikován antimycin A a rotenon. Mezi parametry získané z tohoto měření patří nemitochondriální spotřeba kyslíku, maximální respirační kapacita, respirace související s produkcí ATP, rezervní respirační kapacita a bazální OCR.

Buněčné linie HepG2 a A549 byly podrobeny dlouhodobé, krátkodobé a akutní expozici mastnými kyselinami s krátkým řetězcem (acetát a propionát sodný).

Při krátkodobé expozici byly k buňkám nasazeným do 96 jamkové mikrotitrační destičky přidány SCFA v koncentracích 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM a 10 mM. Následovala 24-hodinová inkubace a poté byl u takto ošetřených buněk proveden cell mito stress test na analyzátoru Seahorse XFe96.

Při dlouhodobé expozici byly SCFA o koncentraci 1 mM přidány přímo do kultivačních lahví. Pasážování ošetřených buněk proběhlo třikrát, při každé kultivaci bylo vždy ke kultivačnímu médiu přidáno vypočítané množství dané SCFA o koncentraci 1 mM. Dlouhodobá expozice tedy trvala týden.

Akutní expozice spočívala v ošetření buněk 1mM SCFA těsně před samotným cell mito stress testem.

Buňky byly pro experimenty měřené na přístroji Seahorse XFe96 nasazovány na 96 jamkové mikrotitrační destičky, s množstvím  $\approx$  20 000 buněk/jamku. Každá jamka obsahovala objem 100  $\mu$ l.

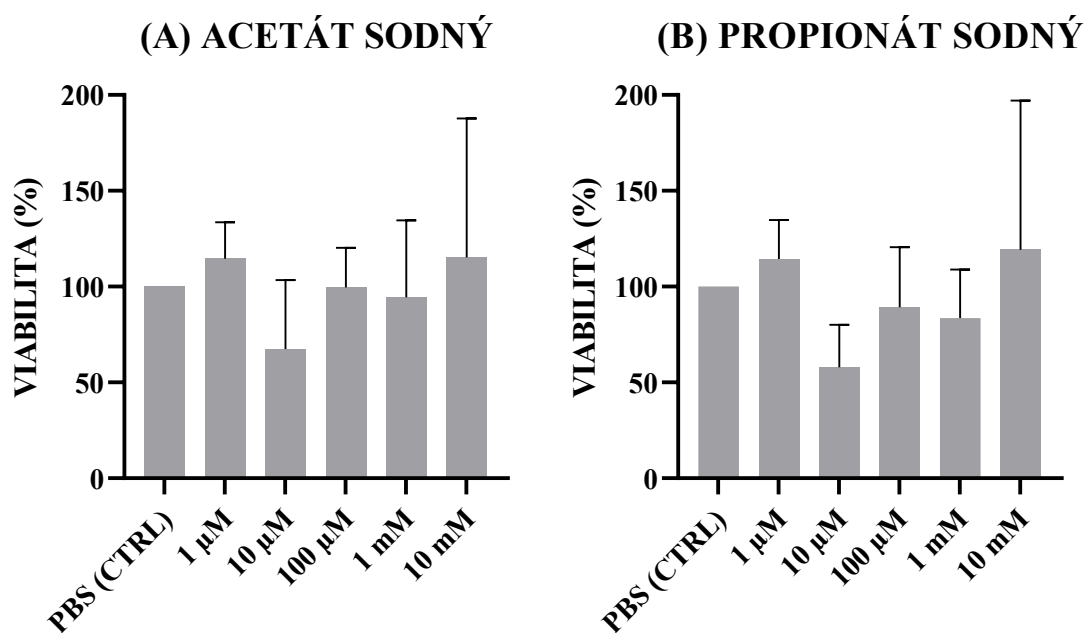
## 4 VÝSLEDKY

Všechny výsledky byly hodnoceny statisticky testem jednosměrná ANOVA.

### 4.1 Testování viability buněk metodou WST-1 po jejich ošetření SCFA

Metodou WST-1 byla stanovena viabilita buněčné linie HepG2 po ošetření mastnými kyselinami s krátkým řetězcem –acetátem a propionátem sodným ve vybraných koncentracích 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM a 10 mM.

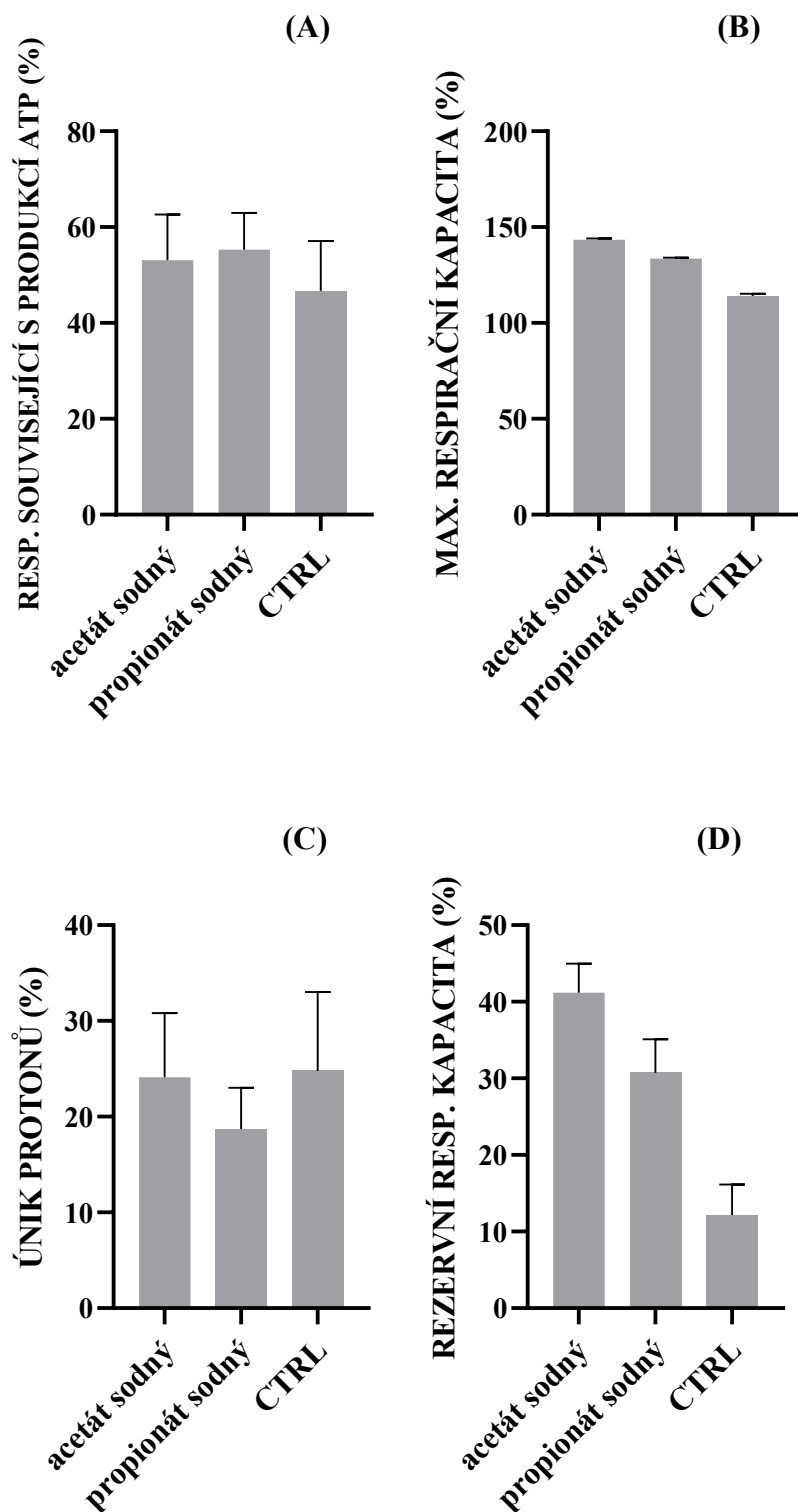
Grafy 1(A) – 1 (B) zobrazují působení jednotlivých SCFA na buněčnou linii HepG2. Ze všech grafů je patrné, že koncentrace 10  $\mu$ M obou SCFA způsobila pokles ve viabilitě buněk. Acetát sodný ve zmíněné koncentraci způsobil snížení ve viabilitě buněk o  $32,67 \pm 36,06$  %, propionát sodný o  $42,17 \pm 22,32$  %.



**Graf 1** Viabilita buněčné linie HepG2 – po ošetření (A) acetátem sodným, (B) propionátem sodným. Kontrolou (CTRL) byly buňky ošetřené puftrem (PBS)=100 %. Metoda WST-1 (450 nm), průměr  $\pm$  SD.

## 4.2 Cell mito stress test – dlouhodobá expozice, buněčná linie A549

Grafy 2 (A) – 2 (D) znázorňují parametry mitochondriální bioenergetiky buněčné linie A549 po dlouhodobém (týdenním) působení acetátu a propionátu sodného. Graf 2 (A) – nedošlo k statisticky významné změně parametru respirace související s produkcí ATP. Signifikantní změny taktéž nenastaly v úniku protonů – graf 2 (C). K modulaci však došlo u maximální respirační kapacity a rezervní respirační kapacity. Maximální respirační kapacita – graf 2 (B) - byla navýšena po expozici acetátem sodným o  $29,22 \pm 0,72$  % a propionátem sodným o  $19,42 \pm 0,61$  %. Zvýšení rezervní respirační kapacity lze pozorovat u acetátu sodného o  $29 \pm 3,81$  % a propionátu sodného o  $18,6 \pm 4,38$  % - graf 2 (D).



**Graf 2** Parametry mitochondriální bioenergetiky buněčné linie A549, dlouhodobá expozice SCFA.

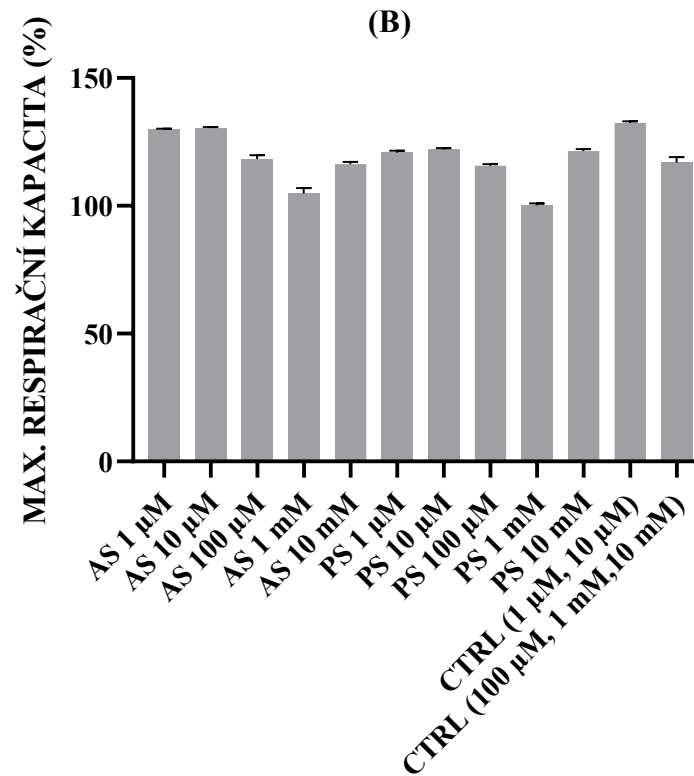
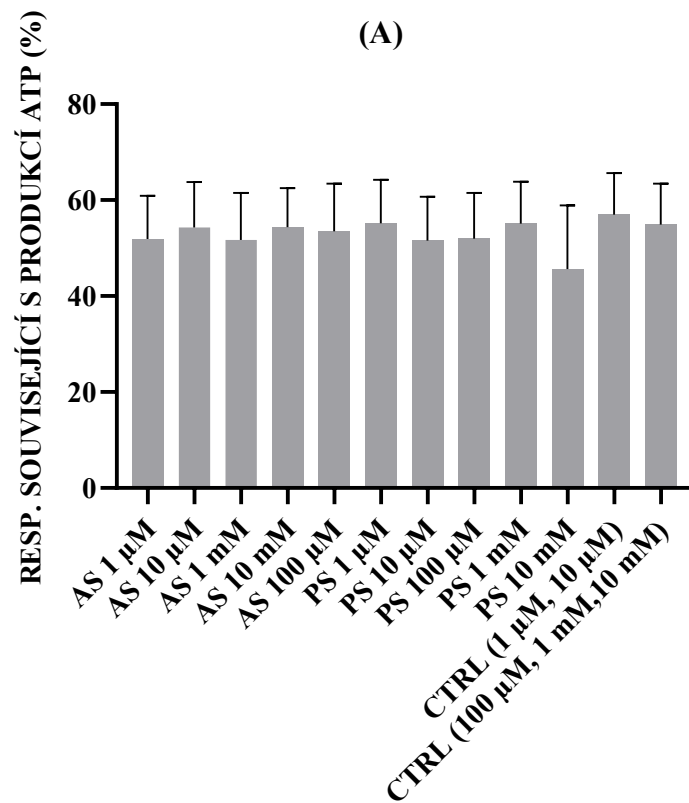
**(A)** respirace související s produkcí ATP (%), **(B)** maximální respirační kapacita (%), **(C)** únik protonů (%), **(D)** rezervní respirační kapacita (%). Cell mito stress test. Kontrolou (CTRL) byly buňky ničím neošetřené, průměr ± SD.



### 4.3 Cell mito stress test – krátkodobá expozice, buněčná linie A549

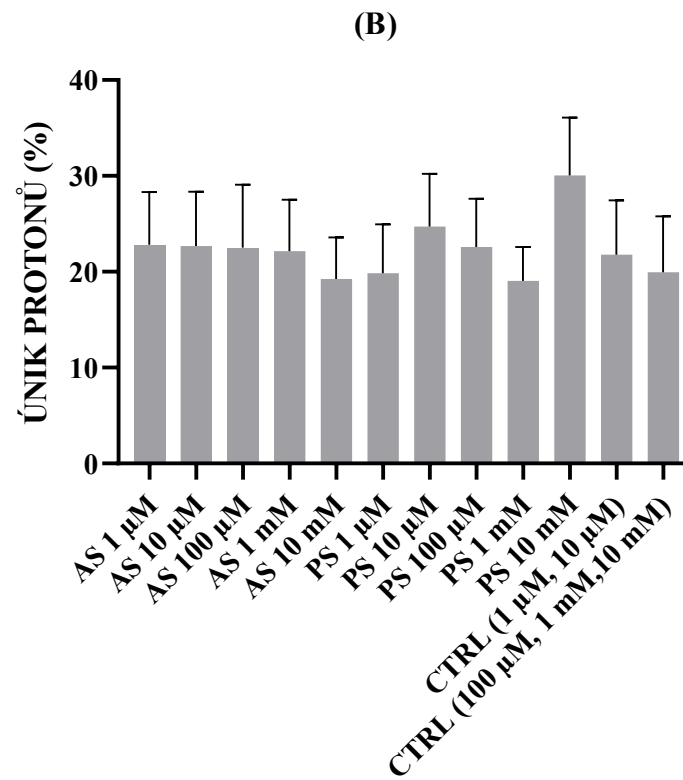
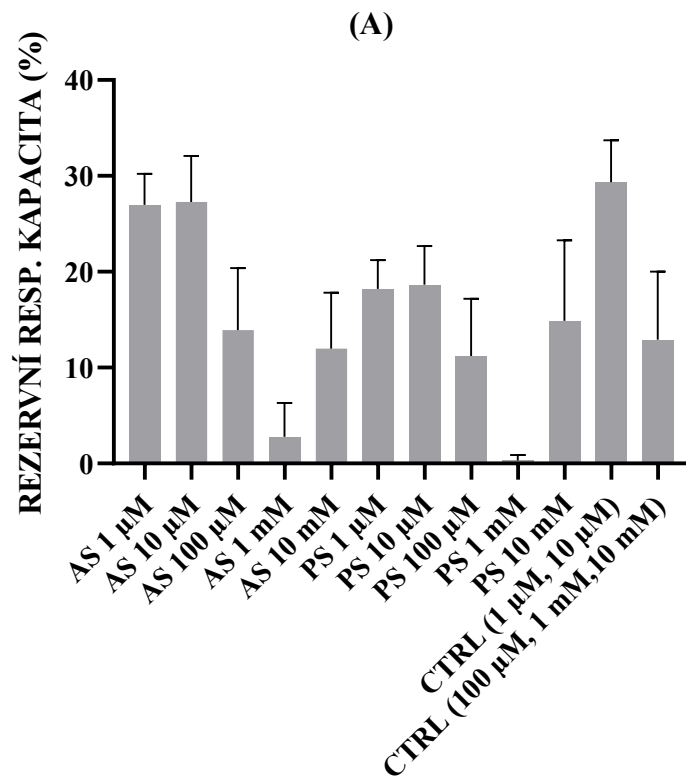
Při krátkodobé expozici buněk A549 se SCFA nedošlo ke statisticky významné změně v respiraci související s tvorbou ATP - graf 3 (A). Maximální respirační kapacita byla ovlivněna všemi koncentracemi SCFA. Pokles maximální respirační kapacity nastal díky 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 1 mM acetátu a propionátu sodnému. Naopak k navýšení maximální respirační kapacity došlo díky 10 mM propionátu sodnému. Maximální respirační kapacita však nikdy nebyla změněna více než o 17 % – graf 3 (B).

Rezervní respirační kapacita je snížena vlivem 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 1 mM propionátu sodného – graf 4 (A). Snížení tohoto parametru nikdy nepřesáhlo 13 %. Naopak k navýšení rezervní respirační kapacity nedošlo. Signifikantní změna v úniku protonů nenastala - graf 4 (B).



**Graf 3** Respirace související s produkcí ATP (%) a maximální respirační kapacita (%) buněčné linie A549, krátkodobá expozice SCFA.

(A) respirace související s produkcí ATP po ošetření buněk acetátem (AS) a propionátem sodným (PS) (%), (B) maximální respirační kapacita po ošetření buněk acetátem (PS) a propionátem sodným (PS) (%). Cell mito stress test. Kontrolou (CTRL) byly buňky ničím neošetřené, průměr ± SD.

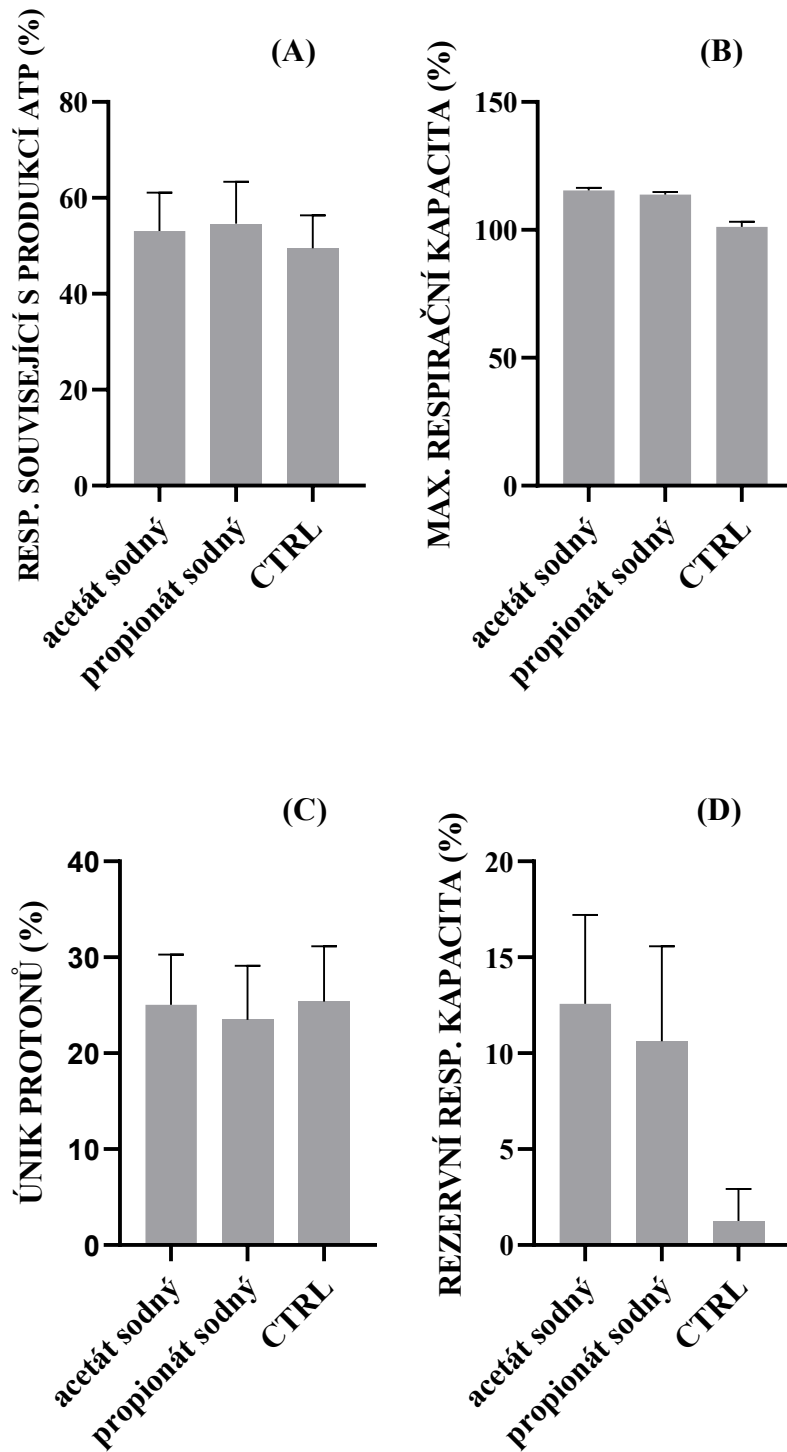


**Graf 4** Rezervní respirační kapacita (%) a únik protonů (%) buněčné linie A549, krátkodobá expozice SCFA.

(A) rezervní respirační kapacita po ošetření buněk acetátem (AS) a propionátem sodným (PS) (%), (B) únik protonů po ošetření buněk acetátem (AS) a propionátem sodným (PS) (%). Cell mito stress test. Kontrolou (CTRL) byly buňky ničím neošetřené, průměr ± SD.

#### **4.4 Cell mito stress test – akutní expozice, buněčná linie A549**

Akutní ošetření linie A549 acetátem a propionátem sodným nezpůsobilo významné změny v respiraci související s ATP – graf 5 (A) a úniku protonů – graf 5 (C), podobně jako u dlouhodobé expozice. Graf 5 (B) zobrazuje zvýšení maximální respirační kapacity po ošetření buněk acetátem sodným o  $14,24 \pm 1\%$ , propionátem sodným o  $12,56 \pm 0,98\%$ . Rezervní respirační kapacita v grafu 5 (D) poukazuje na zvýšení tohoto parametru díky acetátu sodnému o  $11,32 \pm 4,62\%$  a propionátu sodnému o  $9,37 \pm 5\%$ .

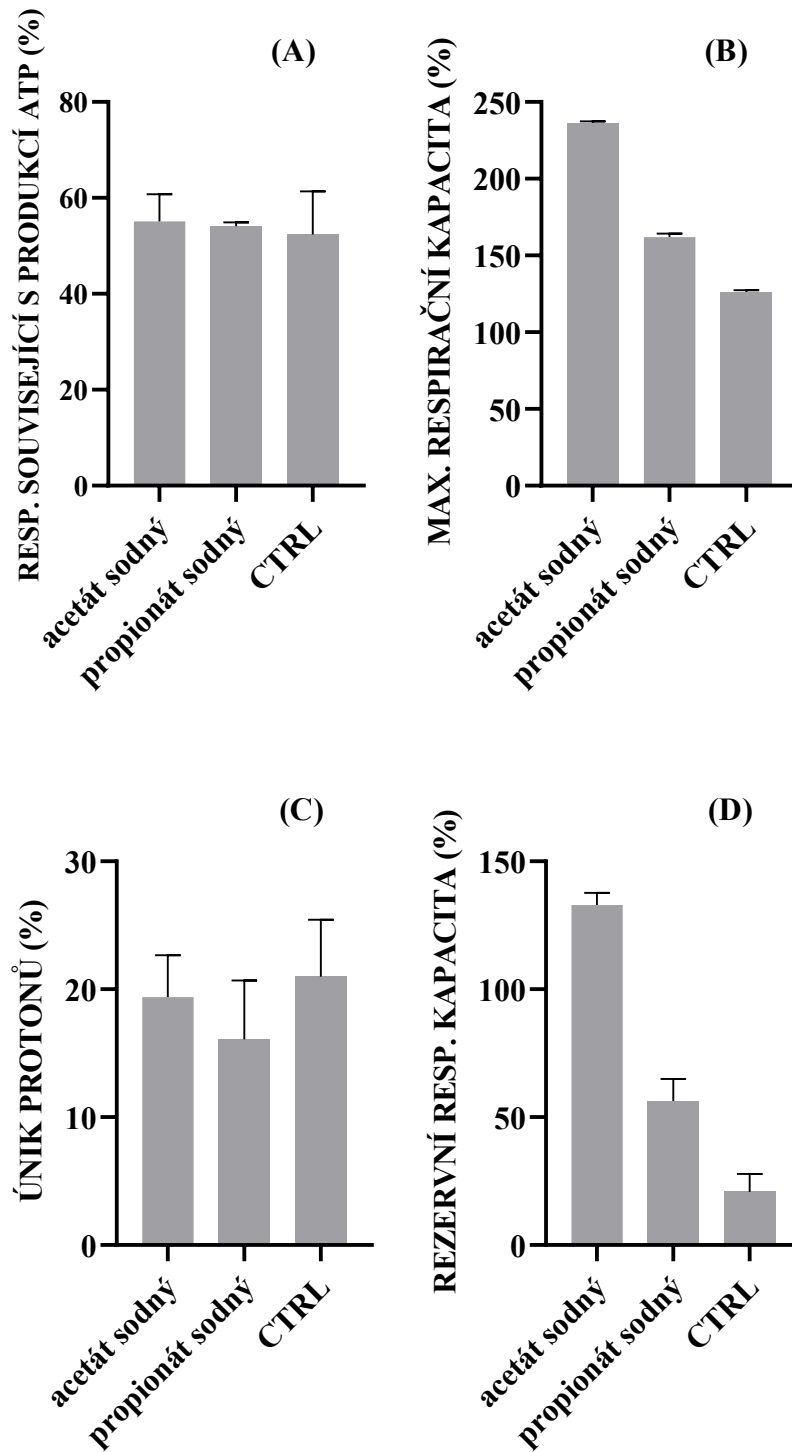


**Graf 5** Parametry mitochondriální bioenergetiky buněčné linie A549, akutní expozice SCFA.

**(A)** respirace související s produkcí ATP (%), **(B)** maximální respirační kapacita (%), **(C)** únik protonů (%), **(D)** rezervní respirační kapacita (%). Cell mito stress test. Kontrolou (CTRL) byly buňky ničím neošetřené, průměr  $\pm$  SD.

#### **4.5 Cell mito stress test – dlouhodobá expozice, buněčná linie HepG2**

Dlouhodobá expozice buněčné linie HepG2 acetátem a propionátem sodným nezpůsobila statisticky významné změny v respiraci související s tvorbou ATP a úniku protonů. Markantní změny nastaly hlavně u maximální respirační kapacity, konkrétně došlo k navýšení tohoto parametru po ošetření acetátem sodným o  $110,1 \pm 0,94$  % a propionátem sodným o  $35,61 \pm 2,29$  % - graf 6 (B). Stejně SCFA způsobily navýšení rezervní respirační kapacity, ve stejném pořadí o  $112,1 \pm 4,82$  % a  $35,59 \pm 8,51$  % – graf 6(D).



**Graf 6** Parametry mitochondriální bioenergetiky buněčné linie HepG2, dlouhodobá expozice SCFA.

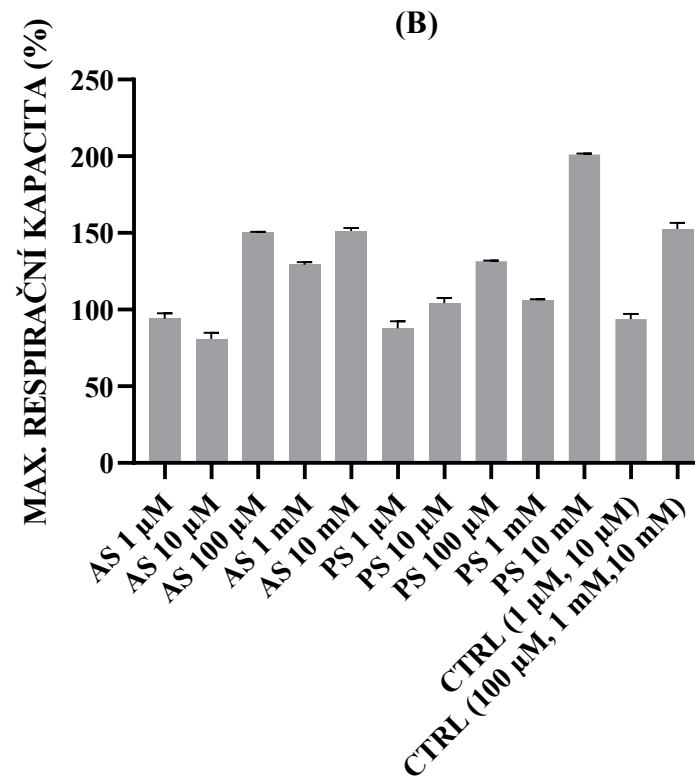
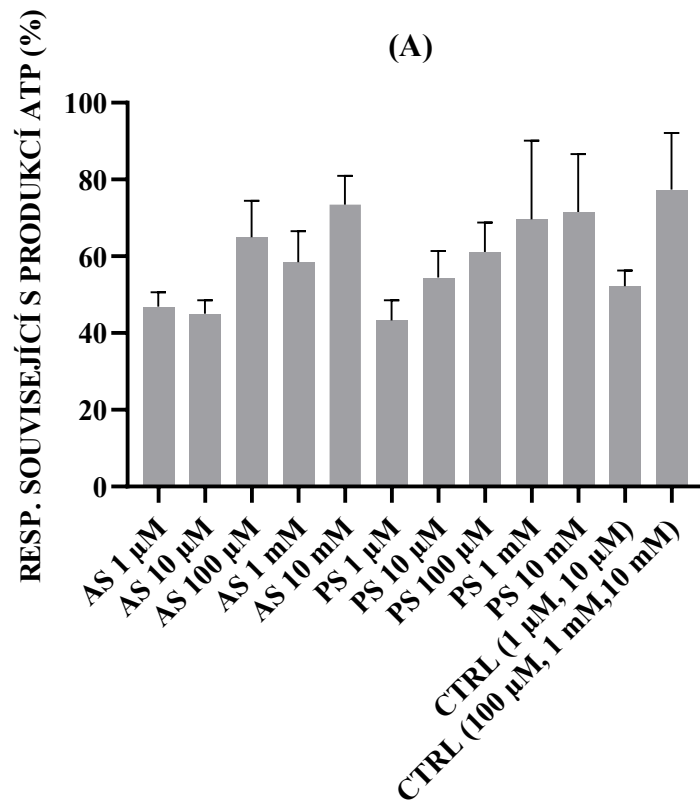
(A) respirace související s produkcí ATP (%), (B) maximální respirační kapacita (%), (C) únik protonů (%), (D) rezervní respirační kapacita (%). Cell mito stress test. Kontrolou (CTRL) byly buňky ničím neošetřené, průměr  $\pm$  SD.

#### 4.6 Cell mito stress test – krátkodobá expozice, buněčná linie HepG2

Při krátkodobé expozici buněk HepG2 nedošlo k výrazné změně v respiraci související s produkcí ATP - graf 7 (A). Maximální respirační kapacita byla ovlivněna všemi koncentracemi SCFA. Pokles maximální respirační kapacity nastal díky 10  $\mu$ M a 1 mM acetátu sodnému. Pokles maximální respirační kapacity nastal také díky 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M a 1 mM propionátu sodnému. Maximální respirační kapacita však nejvíce klesla díky 1 mM propionátu sodnému, a to o  $46,29 \pm 0,47$  %. Naopak k navýšení maximální respirační kapacity došlo díky 10 mM propionátu, a to o  $48,61 \pm 0,69$  % - graf 7 (B).

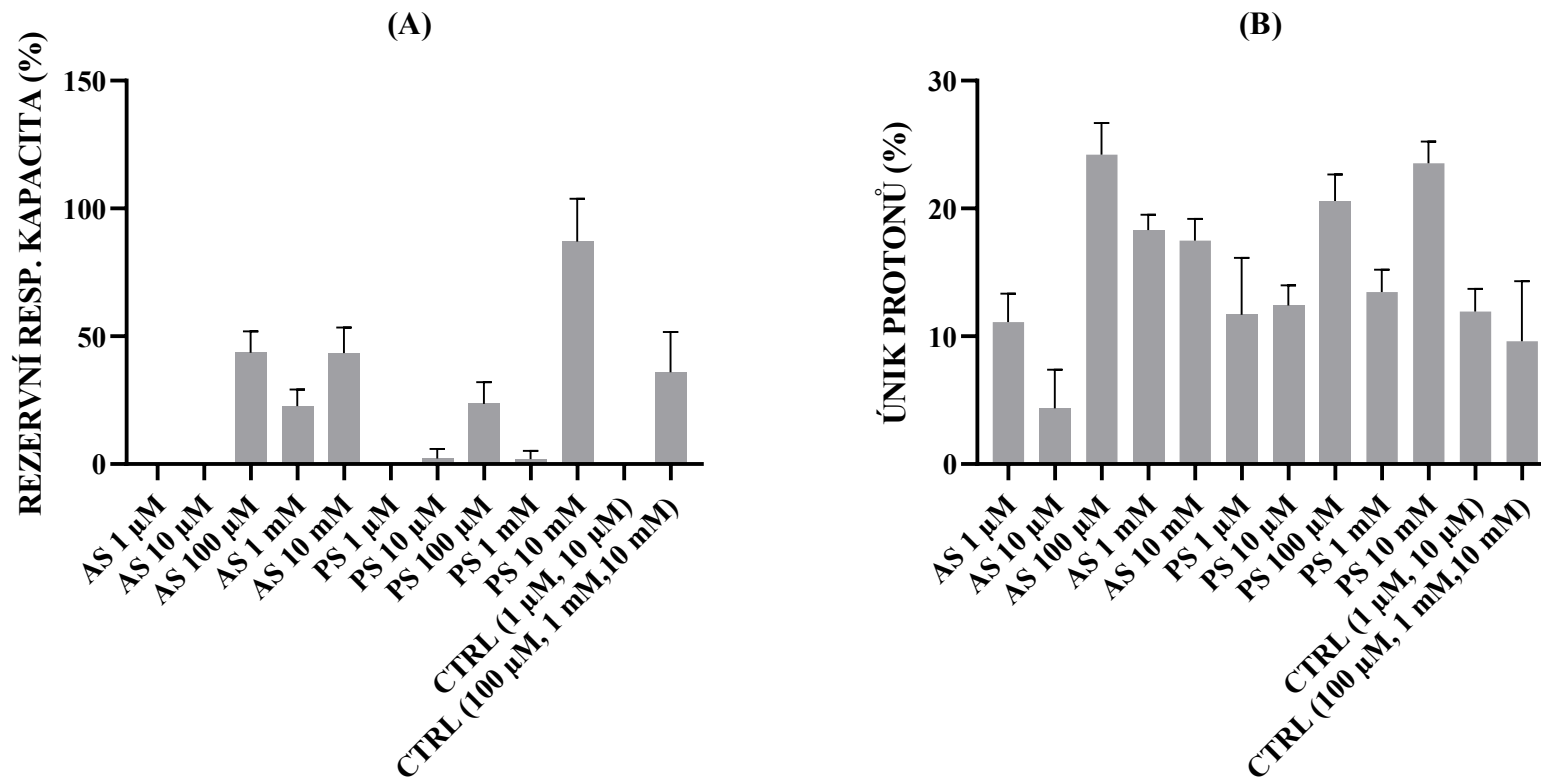
Rezervní respirační kapacitu signifikantně snížil 1 mM propionát sodný o  $34,06 \pm 3,28$  %. 10 mM propionát sodný způsobil zvýšení tohoto parametru o  $51,08 \pm 16,74$  % – graf 8 (A). Významné snížení úniku protonů nastalo po ošetření 10  $\mu$ M acetátem sodným. Naopak zvýšení v tomto parametru nastalo po ošetření 100  $\mu$ M a 10 mM acetátem a propionátem sodným - graf 8 (B). Tyto změny nebyly vyšší nežli 14 %.





**Graf 7** Respirace související s produkcí ATP (%) a maximální respirační kapacita (%) buněčné linie HepG2, krátkodobá expozice SCFA.

**(A)** respirace související s produkcí ATP po ošetření buněk acetátem (AS) a propionátem sodným (PS) (%), **(B)** maximální respirační kapacita po ošetření buněk acetátem (AS) a propionátem sodným (PS) (%). Cell mito stress test. Kontrolou (CTRL) byly buňky ničím neošetřené, průměr ± SD.

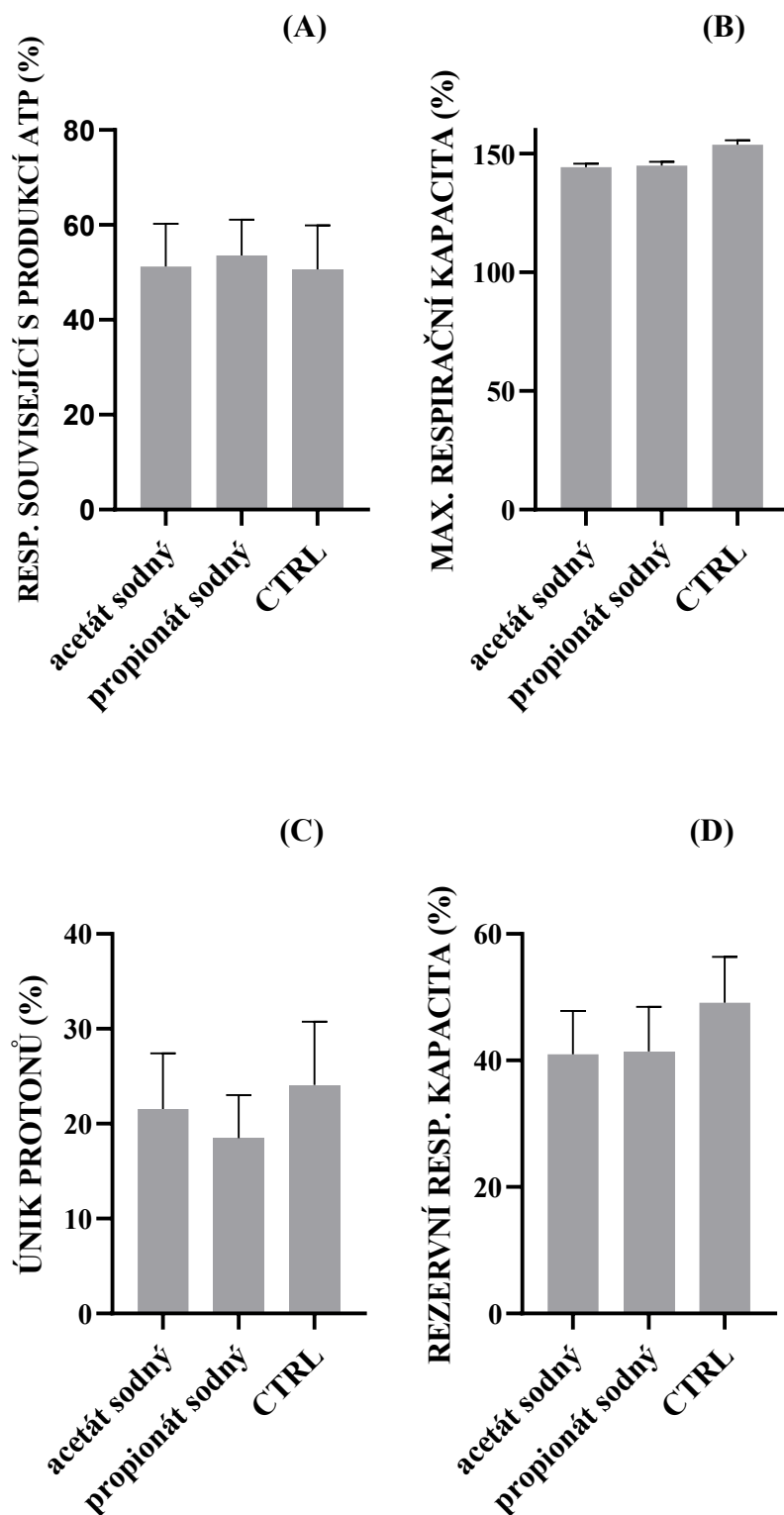


**Graf 8** Rezervní respirační aktivita (%) a únik protonů (%) buněčné linie HepG2, krátkodobá expozice SCFA.

**(A)** rezervní respirační kapacita po ošetření buněk acetátem (AS) a propionátem sodným (PS) (%), **(B)** únik po ošetření buněk acetátem (AS) a propionátem sodným (PS) (%). Cell mito stress test. Kontrolou (CTRL) byly buňky ničím neošetřené, průměr  $\pm$  SD.

#### **4.7 Cell mito stress test – akutní expozice, buněčná linie HepG2**

Akutní expozice propionátem a acetátem sodným buněčné linie HepG2 způsobila signifikantní změny pouze u maximální respirační kapacity – graf 9 (B). Došlo k poklesu tohoto parametru díky acetátu sodnému o  $9,34 \pm 1,39$  % a propionátu sodnému o  $8,74 \pm 1,67$  % .



**Graf 9** Parametry mitochondriální bioenergetiky buněčné linie HepG2, akutní expozice SCFA.

(A) respirace související s produkcí ATP (%), (B) maximální respirační kapacita (%), (C) únik protonů (%), (D) rezervní respirační kapacita (%). Cell mito stress test. Kontrolou (CTRL) byly buňky ničím neošetřené, průměr  $\pm$  SD.

## 5 DISKUZE

V experimentální části této diplomové práce byl testován vliv vybraných mastných kyselin s krátkým řetězcem (acetátu a propionátu sodného) v různých koncentracích na metabolismus nádorových buněčných linií HepG2 a A549. Nejprve byla otestována viabilita HepG2 buněk po ošetření jednotlivých SCFA v koncentracích 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM a 10 mM. Poté byly buněčné linie vystaveny působení zmíněných SCFA dlouhodobě (koncentrace 1 mM, po dobu 3 pasáží – 1 týden), krátkodobě (koncentrace 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM a 10 mM, po dobu 24 hodin) a akutně (koncentrace 1 mM, SCFA byly přidány těsně před měřením).

Studie provedena na nádorové buněčné linii HepG2 potvrdila cytotoxický účinek butyrátu v koncentraci 1 – 10 mM. Inkubaci butyrátu sodného s buňkami prováděli 24 hodin a 48 hodin. Viabilitu buněk zjišťovali testem vylučování trypanové modři a závěrem jejich studie je fakt, že viabilita vyšetřovaných buněk klesala se zvyšující se inkubační dobou a koncentrací butyrátu sodného. (Joachimiak a kol., 2007) Test viability jsme na rozdíl od této studie prováděli pouze 24 hodin a naše výsledky naznačují nižší viabilitu linie HepG2 po ošetření acetátem a propionátem v koncentraci 10  $\mu$ M. Ke zjištění viability plicní nádorové buněčné linie A549 a nádorové buněčné linie HCT116 pocházející z kolorektálního karcinomu po ošetření butyrátem sodným v koncentracích 0-16 mM vědci použily MTT test. Stejně jako v předchozí publikaci inkubaci zvolili 24 a 48 hodin a viabilita obou typů nádorových buněk klesala se zvyšující se inkubační dobou a koncentrací butyrátu sodného. (Shi a kol., 2020) Efekt acetátu, butyrátu a propionátu na schopnost proliferace a životaschopnosti byl testován na buněčné linii HCT116. Opět byl zvolen test vylučování trypanové modři. Autoři zvolili 80 mM acetát, 8 mM propionát a 4 mM butyrát a v 24- a 48-hodinovém intervalu naměřili jejich inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ). Došli k závěru, že  $IC_{50}$  (mM) acetátu byla vyšší v porovnání s propionátem a butyrátem. (Zeng a kol., 2020)

V několika studiích byla prokázána schopnost butyrátu sodného, jakožto inhibitoru histonových deacetyláz, působit protinádorově, inhibovat růst buněk a indukovat apoptózu v různých nádorových buněčných liniích pocházejících např. z tlustého střeva, prsu a jater (Archer a kol., 1998; Davie, 2003; Ogawa a kol., 2004; Fung a kol., 2011, Sun a kol., 2012). Butyrát sodný by tedy mohl představovat budoucnost v léčbě nádorových onemocnění (Marks a kol., 2011). Avšak nejvíce diskutovaným nádorovým onemocněním spojovaným s účinky butyrátu

sodného je hepatocelulární karcinom, který se v populaci vyskytuje velmi frekventovaně (Jiang a kol., 2012; Wang a kol., 2013; Yu a kol., 2022). Jiná publikace poukazuje na vlastnost propionátu sodného potlačovat proliferaci a indukovat apoptózu buněk rakoviny prsou (Park a kol., 2020). Schopnost kyseliny valerové potlačit rozvoj rakoviny jater byl poprvé prokázán studií Han a kol., 2020. Buněčnou proliferaci po ošetření 0,5; 1; 2; 4 a 8 mM kyselinou valerovou otestovali MTS testem u 14 buněčných linií, včetně HepG2, v časových intervalech 24, 48, 72 a 96 hodin. Buněčná linie HepG2 patřila do skupiny s nejnižší IC<sub>50</sub>. Závěrem studie je fakt, že kyselina valerová působí jako inhibitor histonových deacetyláz. (Han a kol., 2020)

Další vědecká skupina testovala vliv 100 μM, 500 μM a 1 mM propionátu na lymfoblastoidní buněčnou linii. Zvolili 24- a 48- hodinovou inkubaci před měřením na analyzátoru Seahorse. Závěrem studie je fakt, že propionát v koncentraci 100 μM zvyšuje maximální respirační kapacitu, respiraci související s produkcí ATP a rezervní respirační kapacitu. Tento efekt byl pozorovatelný nejvíce po 24 hodinové inkubaci. Delší expozice a vyšší koncentrace propionátu zvýšila únik protonů. (Frye a kol., 2016) Naše výsledky na buněčné linii HepG2 po ošetření 100 μM propionátem sodným a 24 hodinové inkubaci naznačují pokles maximální respirační kapacity a zvýšený únik protonů.

Experiment na mitochondriích izolovaných z krysích ledvin prokázal schopnost SCFA a mastných kyselin se středním řetězcem (MCFA, Medium Chain Fatty Acid) zvýšit mitochondriální respiraci, avšak efekt se zvyšoval se zvětšující se délkou řetězce mastných kyselin. Mastné kyseliny s kratším řetězcem dokázaly zvýšit spotřebu kyslíku, ale až při vyšších koncentracích (butyrát – 5 mM, hexanoát – 2,5 mM). Efektivněji tedy zvýšil spotřebu kyslíku 0,5 mM oktanoát (Schönfeld a kol., 1998).

Další publikace sledovala efekt butyrátu a acetátu na buňkách lidských ostrůvků a myší β-buněčné linii MIN6. Autoři prokázali schopnost těchto SCFA v koncentraci 1 mM podpořit viabilitu a buněčný metabolismus zmíněných buněk, přičemž u acetátu prokázali vyšší účinnost. Butyrát a acetát v koncentraci 4 mM naopak způsobili pokles viability. Z této studie vyplývá, že SCFA vznikající střevní mikrobiotou, hrají roli v prevenci či léčbě onemocnění diabetes mellitus, protože díky nim jsou β-buňky více odolné vůči oxidačnímu stresu. K průkazu těchto SCFA na buněčný metabolismus určili míru spotřeby kyslíku (OCR, Oxygen Consumption Rate), která slouží jako indikátor mitochondriální respirace. Test kvůli dostupnosti prováděli pouze na buněčné linii MIN6 a kvůli zjištěnému pozitivnímu účinku použili pouze 1 mM SCFA. Prokázali zvýšenou bazální spotřebu kyslíku, respirace související

s produkcí ATP a rezervní respirační kapacitu. U butyrátu nepozorovali zvýšenou mitochondriální respiraci (Hu a kol., 2020). Onemocněním diabetes mellitus se zabývala i další studie, ve které využívali buněčnou linii HepG2, kterou inkubovaly s vysokými koncentracemi inzulinu k navození inzulinové rezistence. Tyto buňky ošetřili butyrátem sodným, který dokázal navýšit membránový potenciál a množství DNA (Zhao a kol., 2020).

## ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo otestovat vliv vybraných mastných kyselin s krátkým řetězcem (acetátu a propionátu sodného) v různých koncentracích na metabolismus nádorových buněčných linií HepG2 a A549. Mnoho publikací v dnešní době popisuje vliv SCFA na lidské zdraví a často je diskutován jejich slibný účinek na nejrůznější nádorová onemocnění.

Nejprve byla otestována viabilita HepG2 buněk po ošetření jednotlivých SCFA v koncentracích 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM a 10 mM. Viabilita buněk byla testována WST-1 testem a bylo prokázáno, že došlo k poklesu viability buněčné linie HepG2 po ošetření všemi SCFA v koncentraci 10  $\mu$ M.

Buněčné linie byly poté vystaveny působení zmíněných SCFA dlouhodobě (koncentrace 1 mM, po dobu 3 pasáží – 1 týden), krátkodobě (koncentrace 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM a 10 mM, po dobu 24 hodin) a akutně (koncentrace 1 mM, SCFA byly přidány těsně před měřením). Z výsledků lze usoudit, že SCFA výrazně ovlivní respirační metabolismus nádorových buněčných linií při dlouhodobější expozici 1 mM SCFA. Acetát i propionát sodný po dlouhodobé expozici u obou buněčných linií způsobil navýšení maximální a rezervní respirační kapacity. Akutní expozice 1 mM SCFA nezpůsobila signifikantní změny v metabolismu nádorových buněčných linií. Po krátkodobé expozici došlo ke zvýšení maximální respirační aktivity u obou buněčných linií hlavně po ošetření 10 mM propionátem sodným.



## SEZNAM LITERATURY

**Aerts L. a Morais V. A.** Electron transport chain. In Patrik Verstreken. *Parkinson's disease: Molecular mechanisms underlying pathology*. 1st edition. Elsevier, 2017, 41-75.

*Agilent*. Dostupné z: <https://www.agilent.com/>

**Akram M.** *Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014, 68(3), 475-478.

**Annesley S. J. a Fisher P. R.** *Mitochondria in Health and Disease*. Cells, 2019, (8)7, 1-7.

**Archer S. Y., Meng S., Shey A. a Hodin R. A.** *P21 WAF1 is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(12), 6791-6796.

**Arzumanian, V. A., Kiseleva O. I. a Poverennaya E. V.** *The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise*. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23), 1-19.

**Bardella C., Pollard P. J. a Tomlinson I.** *SDH mutations in cancer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 2011, 1807(11), 1432-1443.

**Barros L. F., Ruminot I., San Martín A.** a kol. *Aerobic Glycolysis in the Brain: Warburg and Crabtree Contra Pasteur*. Neurochemical Research, 2021, 46(1), 15-22.

**Bartolák-Suki E., Imsirovic J., Nishibori Y.** a kol. *Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors*. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(8), 1-17.

**Baust J. M., Buehring G. S., Cambell L.** a kol. *Best practices in cell culture: an overview*. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal, 2017, 53(8), 669-672.

**Baust J. M., Campbell L. H. a Harbell J. W.** *Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells*. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal, 2017, 53(10), 855-871.

**Brand M. D. a Nicholls D. G.** *Assessing mitochondrial dysfunction in cells*. Biochemical Journal, 2011, 435(2), 297-312.

**Coté R. J.** *Aseptic Technique for Cell Culture*. Current Protocols in Cell Biology, 1998, 00(1), 1-10.

**Das B., Ray P. a Raut S.**, Disease- specific case studies. In Ostojic S. M. *Clinical bioenergetics: From pathophysiology to clinical translation*, 1st edition, Academic press, 2020, 95-97.

**Davie J. R.** *Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate*. The Journal of Nutrition, 2003, 133(7), 2485-2493.

**de Kok M. J. C., Schaapherder A. F., Wüst R. C. I. a kol.** *Circumventing the Crabtree effect in cell culture: A systematic review*. Mitochondrion, 2021, 59, 83-95.

**Divakaruni A. S., Paradyse A., Ferrick D. A. a kol.** *Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data*. Mitochondrial Function, 2014, 309-354.

**Foster K. A., Oster C. G., Mayer M. M. a kol.** *Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism*. Experimental Cell Research, 1998, 243(2), 359-366.

**Friedman J. R. a Nunnari J.** *Mitochondrial form and function*. Nature, 2014, 505 (7483), 335-343.

**Frye R. E., Rose S., Chacko J. a kol.** *Modulation of mitochondrial function by the microbiome metabolite propionic acid in autism and control cell lines*. Translational Psychiatry, 2016, 6(10), 1-10.

**Fung K. Y. C., Brierley G. V., Henderson S. a kol.** *Butyrate-Induced Apoptosis in HCT116 Colorectal Cancer Cells Includes Induction of a Cell Stress Response*. Journal of Proteome Research, 2011, 10(4), 1860-1869.

**Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J. a kol.** *In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 1973, 51(5), 1417-1423.

**Guo R., Gu J., Zong S. a kol.** *Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain*. Biomedical Journal, 2018, 41(1), 9-20.

**Han R., Nusbaum O., Chen X. a Zhu Y.** *Valeric Acid Suppresses Liver Cancer Development by Acting as a Novel HDAC Inhibitor*. Molecular Therapy – Oncolytics, 2020, 19, 8-18.

**Hara H., Kuwano K. a Araya J.** *Mitochondrial Quality Control in COPD and IPF*. Cells, 2018, 7(8), 1-13.

**He J., Zhang P., Shen L. a kol.** *Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism*. International Journal of Molecular Science, 2020, 21(17), 1-16.

**Hu S., Kuwabara R., de Hann B. J. a kol.** *Acetate and Butyrate Improve  $\beta$ -cell Metabolism and Mitochondrial Respiration under Oxidative Stress*. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(4), 1-17.

**Chaban Y., Boekema E. J. a Dudkina N. V.** *Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 2014, 1837(4), 418-426.

**Chacko B. K., Kramer P. A., Ravi S. a kol.** *The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research*. Clinical Science, 2014, 127(6), 367-373.

**Chandhok G., Lazarou M. a Neumann B.** *Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease*. Biological Reviews, 2018, 93(2), 933-949.

**Chelimsky G., Simpson P., Zhang L. a kol.** *Impaired Mitochondrial Bioenergetics Function in Pediatric Chronic Overlapping Pain Conditions with Functional Gastrointestinal Disorders*. Pain Research and Management, 2021, 1-7.

**Chen J.-Q. a Russo J.** *Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2012, 1826(2), 370-384.

**Jedrzejczak-Silicka M.** *History of Cell Culture*. In Gowder S. J. T. *New Insights into Cell Culture Technology*. Croatia: InTechOpen, 2017, 1-41.

**Jiang, W., Guo O., Wu J. a kol.** *Dual effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells*. Molecular Biology Reports, 2012, 39(5), 6235-6242.

**Joachimiak R., Kaznica A., Drewa T.** *Influence of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells (HepG2) and glioblastoma (C6) cell lines in vitro*. Pharmacology, 2007, 63 (6), 561-563.

**Kaur G. a Dufour J. M.** *Cell lines*. Spermatogenesis, 2012, 2(1), 1-5.

**Krejčír R., Valík D. a Vojtěšek B.** *Využití mitochondriálních procesů v cílené terapii nádorových onemocnění*. Klinická onkologie, 2018, 31(2), 14-20.

**Li X.-b., Gu J.-d., Zhou Q.-h.** *Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy*. Thoracic Cancer, 2015, 6(1), 17-24.

**Lieber M., Todaro G., Smith B. a kol.** *A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells*. International Journal of Cancer, 1976, 17(1), 62-70.

- Lin Y., Zhang M. a Barnes P. F.** *Chemokine Production by a Human Alveolar Epithelial Cell Line in Response to Mycobacterium tuberculosis.* Infection and Immunity, 1998, 66(3), 1121-1126.
- López-Terrada D., Cheung S. W., Finegold M. J. a Knowles B. B.** Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology*, 2009, 40(10), 1512-1515.
- Macfarlane S. a Macfarlane G. T.** *Regulation of short-chain fatty acid production.* Proceedings of the Nutrition Society, 2003, 62(1), 67-72.
- Marks P. A., Rifkind R. A., Richon V. M. a kol.** *Histone deacetylases and cancer: causes and therapies.* Nature Reviews Cancer, 2001, 1(3), 194-202.
- Martínez-Reyes I. a Chandel N. S.** *Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease.* Nature communications, 2020, 11(1), 1-11.
- Mather J. P. a Roberts P. E.** *Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique.* Boston, MA: Springer US, 1998.
- Morrison D. J. a Preston T.** *Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism.* Gut Microbes, 2016, 7(3), 189-200.
- Mot A. I., Liddell J. R., White A. R. a Crouch P. J.** *Circumventing the Crabtree Effect: A method to induce lactate consumption and increase oxidative phosphorylation in cell culture.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2016, 79, 128-138.
- Nims R. W. a Reid Y.** *Best practices for authenticating cell lines.* In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal, 2017, 53(10), 880-887.
- Nolfi-Donagan D., Braganza A., Shiva S.** *Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement.* Redox Biology, 2020, 37, 1-9.
- Ogawa K., Ysumara S., Atarashi Y. a kol.** *Sodium butyrate enhances Fas-mediated apoptosis of human hepatoma cells.* Journal of Hepatology, 2004, 40(2), 278-284.
- Owens K. M., Modica-Napolitano J. S. a Singh K. K.,** Mitochondria and cancer. In Singh K. a Costello L. *Mitochondria and Cancer*, 2009th edition, Springer, 2009, 1-22.
- Park H. - S., Han J. - H., Park J. W. a kol.** *Sodium propionate exerts anticancer effect in mice bearing breast cancer cell xenograft by regulating JAK2/STAT3/ROS/p38 MAPK signaling.* Acta Pharmacologica Sinica, 2021, 42(8), 1311-1323.
- Peña F. J., Ortiz-Rodríguez J. S. a Gaitskell-Phillips G. L. a kol.** *An integrated overview on the regulation of sperm metabolism (glycolysis-Krebs cycle-oxidative phosphorylation).* Animal Reproduction Science, 2021, 1-12.

**Phelan K. a May K. M.** *Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture*. Current Protocols in Cell Biology, 2015, 66(1), 1-22.

**Protasoni M. a Zeviani M.** *Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions*. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2), 1-53.

**Raimundo N., Baysal B. E. a Shadel G. S.** *Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation*. Trends in Molecular Medicine, 2011, 17(11), 641-649.

**Ravi M., Paramesh V., Kaviya S. R. a kol.** *3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications*. Journal of Cellular Physiology, 2015, 230(1), 16-26.

**Ristow M. a Schulz T. J.,** Warburg and his legacy. In Singh K. a Costello L. *Mitochondria and Cancer*, 2009th edition, Springer, 2009, 23-39.

**Ryan D. G., Frezza C. a O'Neill L. A.** *TCA cycle signalling and the evolution of eukaryotes*. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 68, 72-88.

**Shapiro D. L., Nardone L. L., Rooney S. S. a kol.** *Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1978, 530(2), 197-207.

**Shi B., Xu F. - F., Xiang C. - P. a kol.** *Effect of sodium butyrate on ABC transporters in lung cancer A549 and colorectal cancer HCT116 cells*. Oncology Letters, 2020, 20(5), 1-8.

**Schönfeld P. a Wojtczak L.** *Short-and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective*. Journal of Lipid Research, 2016, 57(6), 943-954.

**Schönfeld P., Wojtczak A. B., Geelen M. J. H. a kol.** *On the mechanism of the so-called uncoupling effect of medium-and short-chain fatty acids*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 1988, 936(3), 280-288.

**Sivaprakasam S., Prasad P. D. a Singh N.** *Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis*. Pharmacology and Therapeutics, 2016, 164, 144-151.

**Solaini G., Sgarbi G. a Baracca A.** *Oxidative phosphorylation in cancer cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 2011, 1807(6), 534-542.

**Sun B., Liu R., Xiao Z. – D. a kol.** *C-MET Protects Breast Cancer Cells from Apoptosis Induced by Sodium Butyrate*. PLoS ONE, 2012, 7(1), 1-6.

**Swain R. J., Kemp S. J., Goldstraw P. a kol.** *Assessment of Cell Line Models of Primary Human Cells by Raman Spectral Phenotyping*. Biophysical Journal, 2010, 98(8), 1703-1711.

**Vyas S., Zaganjor E. a Haigis M. C.** *Mitochondria and Cancer*. Cell, 2016, 166(3), 555-566.

**Wang H. – G., Huang X. – D., Shen P.** a kol. *Anticancer effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells in vitro*. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013, 31(4), 967-974.

**Wojtczak L. a Schönfeld P.** *Effect on fatty acids on energy coupling processes in mitochondria*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1993, 1183(1), 41-57.

**Wong J. M. W., de Souza R., Kendall C. W. C., Emam A. a Jenkins D. J. A.** *Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids*. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2006, 40(3), 235-243.

**Yin L.-M., Wei Y., Wang Y.** a kol. *Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells*. *International Journal of Medical Sciences*, 2013, 10(1), 68-72.

**Yu Q., Dai W., Ji J.** a kol. *Sodium butyrate inhibits aerobic glycolysis of hepatocellular carcinoma cells via the c-myc/hexokinase 2 pathway*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2022, 1-15.

**Zeng H., Hamlin S. K., Safratowich B. D., Cheng W. - H. a Johnson L. K.** *Superior inhibitory efficacy of butyrate over propionate and acetate against human colon cancer cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis: linking dietary fiber to cancer prevention*. *Nutrition Research*, 2020, 83, 63-72.

**Zhao T., Gu J., Zhang H.** a kol. *Sodium Butyrate-Modulated Mitochondrial Function in High-Insulin Induced HepG2 Cell Dysfunction*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1-16.

**Zong W.-X., Rabinowitz J. D. a White E.** *Mitochondria and Cancer*. *Molecular Cell*, 2016, 61(5), 667-676.