

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**MODULACE MITOCHONDRIÁLNÍ BIOENERGETIKY
NÁDOROVÝCH BUNĚK**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Lucie Bravencová

VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.

ODBORNÝ KONZULTANT: Moustafa Elkalaf, M.B.B.Ch., Ph.D.

2022

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**MODULATION OF MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS
OF TUMOR CELLS**

THESIS

AUTHOR: Bc. Lucie Bravencová

SUPERVISITOR: Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.

CONSULTANT: 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. Lucie Bravencová**
Osobní číslo: **C20469**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Modulace mitochondriální bioenergetiky nádorových buněk**
Téma práce anglicky: **Modulation Of Mitochondrial Bioenergetics Of Tumor Cells**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- změna metabolismu nádorových buněk modulací jejich mitochondriální bioenergetiky jako strategie prevence a léčby onemocnění,
- zásady kultivace buněk *in vitro*.

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. Pavla Žáková, 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:

Práci s názvem Modulace mitochondriální bioenergetiky nádorových buněk 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 4. 5. 2022

Bravencová Lucie

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat svému odbornému konzultantovi Moustafovi Elkalafovi, M.B.B.Ch., Ph.D. za trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval v průběhu vypracování této diplomové práce a vedoucí diplomové práce Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. Dále děkuji paní Mgr. Pavle Staňkové Ph.D. za cenné rady a vstřícný přístup. Také bych ráda poděkovala za umožnění vypracování mé diplomové práce a za milé přijetí na pracovišti Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a všem, kteří mě během mého studia vždy podpořili.

Anotace

Tato diplomová práce pojednává o modulaci mitochondriální bioenergetiky pomocí vlivu mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA). V teoretické části je stručně popsána struktura mitochondrií a jejich funkce v buňkách. Následně jsou vysvětleny parametry mitochondriálního bioenergetického profilu a dále vliv SCFA na metabolismus nádorových buněk. Konec teoretické části je věnován správným zásadám *in vitro* kultivace buněčných linií. Experimentální část práce se zabývá postupy prací s buněčnými kulturami a analýzou buněk po expozicích SCFA s různými koncentracemi. Pro tyto účely byly použity nádorové buněčné linie HepG2 a A549. K největšímu ovlivnění mitochondriální respirace došlo po dlouhodobé expozici SCFA.

Klíčová slova

Bioenergetika, Buněčná linie, Mastné kyseliny s krátkým řetězcem, Mitochondrie, *In vitro* kultivace.

Annotation

The main objective of this work is to analyze the effect of short chain fatty acids (SCFA) on modulating mitochondrial bioenergetics. The theoretical part describes the structure of mitochondria, steps of energy production, the parameters of mitochondrial bioenergetic profile, SCFA metabolism and their effect on tumor cells. The last part is devoted to the principles of *in vitro* cultivation and the used cell lines. The experimental part of this work explains the procedures of cell culture and analysis of cellular metabolism after treatment with different concentrations of SCFA. The main finding of this work is that long time exposure SCFA has the biggest effect on the mitochondrial respiration.

Key words

Bioenergetics, Cell line, Short chain fatty acid, Mitochondria. *In vitro* cultivation.

OBSAH

Úvod	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Mitochondrie	16
1.1.1 Syntéza ATP	17
1.1.2 Elektronový transportní řetězec (ETC).....	19
1.1.3 Mitochondriální metabolismus a rakovina.....	23
1.1.3.1 Warburgův efekt.....	24
1.2 Mitochondriální bioenergetický profil.....	25
1.2.1 Bazální respirace	26
1.2.2 Respirace související s tvorbou ATP	27
1.2.3 Maximální rychlost respirace	27
1.2.4 Rezervní respirační kapacita	28
1.2.5 Únik protonů.....	28
1.2.6 Non-mitochondriální spotřeba kyslíku	29
1.3 Metabolismus SCFA.....	30
1.4 Vliv SCFA na karcinogenezi.....	32
1.4.1 Receptory HDAC	33
1.4.2 Receptory GPR41, GPR43, GPR109A.....	34
1.4.3 Účinky butyrátu	35
1.4.4 Účinky kyseliny valerové	36
1.5 Zásady kultivace buněk <i>in vitro</i>	37
1.5.1 Vybavení laboratoře.....	38
1.5.2 Kultivační média.....	39
1.5.3 Podmínky kultivace.....	41
1.5.4 Buněčná linie HepG2.....	42

1.5.5	Buněčná linie A549.....	43
2	CÍLE PRÁCE.....	45
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46
3.1	Přístroje a použité pomůcky.....	46
3.2	Chemikálie	47
3.3	Příprava kultivačních médií	48
3.3.1	Příprava základního kultivačního média	48
3.3.2	Příprava kultivačního média pro WST-1 assay.....	48
3.4	Rozmražení buněk	49
3.5	Pasážování buněčných linií.....	49
3.5.1	Počítání buněk a nasazení	50
3.6	Příprava zásobních roztoků SCFA.....	51
3.7	WST-1 assay	52
3.8	Analýza mitochondriálního metabolismu	54
3.8.1	Analýza účinku SCFA na buněčné linie HepG2 a A549.....	54
3.8.1.1	Akutní expozice SCFA.....	54
3.8.1.2	Krátkodobá expozice SCFA.....	55
3.8.1.3	Dlouhodobá expozice SCFA.....	55
4	VÝSLEDKY	56
4.1	Stanovení viability buněk po expozici SCFA	56
4.2	Stanovení mitochondriální respirace po expozici SCFA	57
4.2.1	Akutní expozice.....	57
4.2.2	Krátkodobá expozice	58
4.2.2.1	Buněčná linie HepG2	59
4.2.2.2	Buněčná linie A549	62
4.2.3	Dlouhodobá expozice	65
5	DISKUZE.....	67

6	ZÁVĚR	70
7	ZDROJE	71

Seznam obrázků:

Obr. 1:	Mitochondriální struktura.	17
Obr. 2:	Schématické znázornění TCA.....	19
Obr. 3:	Schéma OXPHOS a syntézy substrátů pro ETC.....	22
Obr. 4:	Modulátory užívané během analýzy mitochondriální respirace.	26
Obr. 5:	Parametry mitochondriálního energetického profilu.	29
Obr. 6:	Metabolické dráhy mikrobiomu tlustého střeva.....	31
Obr. 7:	Schéma jednotlivých koncentrací SCFA a jejich gradient	32
Obr. 8:	Základní uspořádání laminárního boxu pro kultivaci buněk.	39
Obr. 9:	Původní resekcční vzorek nádoru buněk HepG2.....	42
Obr. 10:	Buněčná linie HepG2, zvětšení 100x.....	43
Obr. 11:	Buněčná linie A549, zvětšení 100x.....	44
Obr. 12:	Nákres struktury Neubauerovy komůrky.....	51
Obr. 13:	Princip reakce při WST-1 analýze.....	53

Seznam tabulek:

Tab. I:	Složky a jejich koncentrace v kultivačním médiu.....	48
Tab. II:	Složky a koncentrace média pro WST-1 assay.....	49

Seznam grafů:

Graf 1:	Odlišnosti v buněčné viabilitě, buněčná linie HepG2.....	56
Graf 2:	Akutní expozice SCFA (c = 1 mM); buněčná linie HepG2	57
Graf 3:	Akutní expozice SCFA (c = 1 mM); buněčná linie A549.	58
Graf 4:	Krátkodobá expozice SCFA (c = 1 μM); buněčná linie HepG2.	59
Graf 5:	Krátkodobá expozice SCFA (c = 10 μM); buněčná linie HepG2.....	59
Graf 6:	Krátkodobá expozice SCFA (c = 100 μM); buněčná linie HepG2.....	60
Graf 7:	Krátkodobá expozice SCFA (c = 1 mM); buněčná linie HepG2.	60

Graf 8: Krátkodobá expozice SCFA (c = 10 mM); buněčná linie HepG2.....	61
Graf 9: Krátkodobá expozice SCFA (c = 1 μM); buněčná linie A549.....	62
Graf 10: Krátkodobá expozice SCFA (c = 10 μM); buněčná linie A549.....	63
Graf 11: Krátkodobá expozice SCFA (c = 100 μM); buněčná linie A549.....	63
Graf 12: Krátkodobá expozice SCFA (c = 1 mM); buněčná linie A549.....	64
Graf 13: Krátkodobá expozice SCFA (c = 10 mM); buněčná linie A549.....	64
Graf 14: Dlouhodobá expozice SCFA (c = 1 mM); buněčná linie HepG2.....	65
Graf 15: Dlouhodobá expozice SCFA (c = 1 mM); buněčná linie A549.....	66

Seznam použitých zkratk:

ATCC	American Type Culture Collection
CJ	cristae junctions
CRC	kolorektální karcinom
DMSO	dimethylsulfoxid
ECAR	rychlost extracelulární acidifikace
ETC	elektronový transportní řetězec
FADH ₂	flavin adenin dinukleotid
FBS	fetální bovinní sérum
FCCP	karbonylkyanid- <i>p</i> -trifluormethoxyfenylhydrazon
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem
GTP	guanosin trifosfát
HCA2	receptor hydroxykarboxylové kyseliny 2
HDAC	histondeacetylázy
IBD	idiopatické střevní záněty
IBM	vnitřní hraniční membrána
IC50	polovina maximální účinné koncentrace
IMM	vnitřní mitochondriální membrána
IMS	mezimembránový mitochondriální prostor
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinázová signalizace
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
OCR	rychlost spotřeby kyslíku
OH ₂	ubichinol
OMM	vnější mitochondriální membrána

OSCP	oligomycin sensitivity-coferring protein
OXPPOS	oxidativní fosforylace
PMF	protonmotivní síla
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAHA	kyselina suberoyalnilid hydroxamová
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin, citrátový cyklus

Úvod

Mitochondrie jsou hlavními intracelulárními producenty ATP prostřednictvím OXPHOS. Kromě energetického metabolismu se tyto orgány podílejí i na dalších biologických procesech, jako je např. apoptóza. Dysregulace energetického metabolismu patří mezi dobře známé znaky kancerogeneze v různých fázích vývoje a progresu. Mitochondrie proto vždy přitahovaly pozornost jako cíle pro vývoj nových protirakovinných látek.

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) vznikají především bakteriálním metabolismem v tlustém střevě po příjmu potravy s obsahem vlákniny. Mezi hlavní SCFA patří acetát (C2), propionát (C3) a butyrát (C4). Tyto mastné kyseliny hrají důležitou roli v metabolismu lipidů, sacharidů a v udržování homeostázy organismu. Existuje mnoho důkazů, že SCFA mají také protizánětlivé účinky, které regulují migraci imunitních buněk, adhezi a expresi cytokinů, buněčnou proliferaci a apoptózu.

Pro kvantifikaci energetického metabolismu buněk jsou využívány analýzy glykolýzy a mitochondriálního metabolismu. Mezi tyto metody patří i měření bioenergetických parametrů OCR (rychlost spotřeby kyslíku) a ECAR (rychlost extracelulární acidifikace). K těmto účelům se využívá analyzátor Agilent Seahorse XFe 96, který umožňuje monitoring buněk v reálném čase.

1 TEORETICKÁ ČÁST

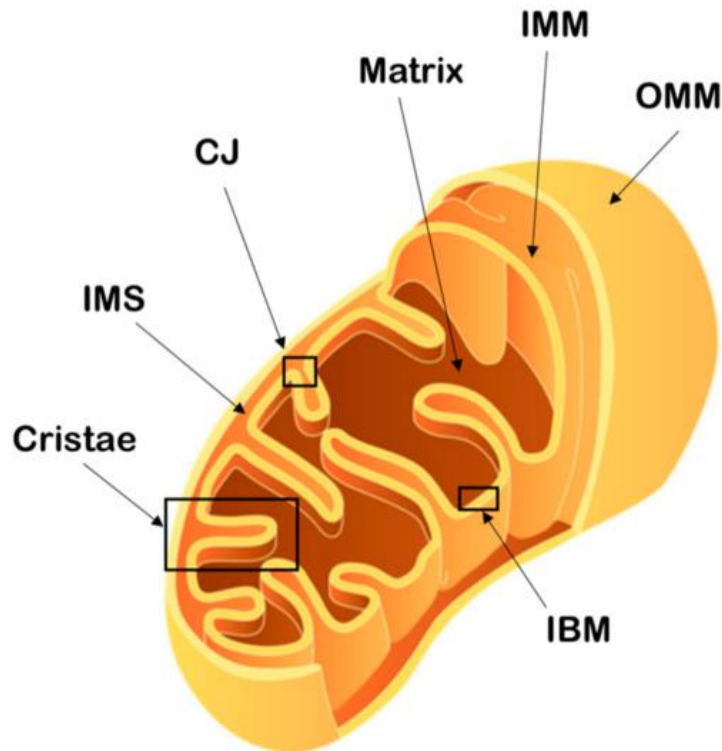
1.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou bioenergetické a biosyntetické organely, které přijímají substráty z buněčné cytoplazmy a probíhá v nich řada esenciálních metabolických reakcí včetně oxidace mastných kyselin, citrátového cyklu, ETC, syntézy aminokyselin, lipidů, nukleotidů a hemu (*Zong et al., 2016*). Kromě metabolických pochodů mají mitochondrie zásadní úlohu v procesu apoptózy. Změny ve fungování mitochondriálních procesů mohou mít velký vliv na chování buněk a jejich životaschopnost a jsou typické pro nádorové buňky (*Krejčíř et al., 2018*).

Dvoumembránová struktura mitochondrií vytváří specializované kompartmenty, které jsou velmi důležité pro funkci organely, a rozděluje tak mitochondrii na dva prostory, matrix a mezimembránový prostor. Vnější membrána (OMM) odděluje organelu od cytosolu buňky. Vnitřní membrána (IMM) je morfologicky složitější a tvoří tzv. kristy, což jsou organizované záhyby, které zvětšují povrch této membrány a tím zvyšují kapacitu pro OXPHOS (*Iovine et al. 2021*). Část IMM, která nevybíhá v kristy ale leží paralelně s OMM, je vnitřní hraniční membrána (IBM) a je s kristami spojena úzkými trubkovitými nebo štěrbinovitými strukturami, tzv. cristae junctions (CJs).

Tyto dvě membrány se významně liší ve složení lipidů, charakteristice, permeabilitě a obsahu transmembránových proteinů. OMM je složením lipidů podobná membránám eukaryotických buněk a umožňuje průchod iontů a malých molekul přes napětově řízené aniontové kanály. IMM má naopak vyšší poměr lipidů ku proteinům a je volně propustná pro vodu, kyslík a oxid uhličitý. Tyto vlastnosti umožňují vznik elektrochemického gradientu, který tvoří základ pro syntézu ATP a regulaci dalších iontů, jako je např. vápník, který je z velké části využíván v buněčné signalizaci (*Protasoni et al., 2021*).

Oblast mezi vnější a vnitřní membránou se nazývá mezimembránový prostor (IMS). Uvnitř organely je mitochondriální matrix, která je tvořena hustou hmotou s obsahem proteinů a enzymů (*Bottje, 2019*).



Obr. 1: Mitochondriální struktura (Protasoni et al., 2021).

1.1.1 Syntéza ATP

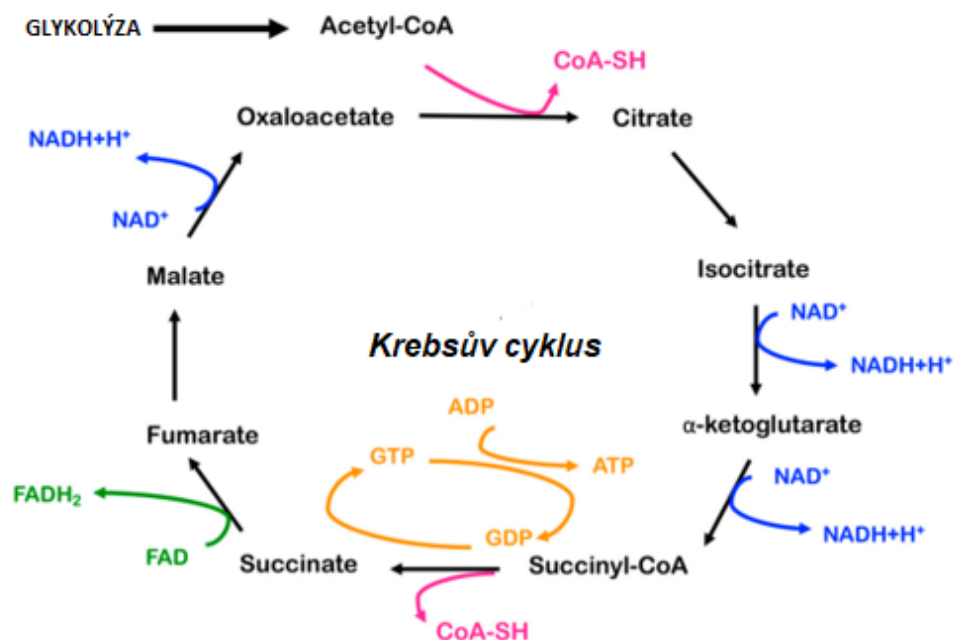
Hlavním zdrojem energie v buňkách je defosforylace ATP na ADP, ale aby byl tento proces udržitelný, musí docházet k regeneraci molekul ATP. Tato ATP potřebná pro reprodukci a přežití buněk pochází ze dvou zdrojů. Prvním je glykolýza a druhým zdrojem je cyklus TCA neboli citrátový cyklus (*Gasmi et al., 2021*).

Molekula glukózy se během chemických reakcí metabolizuje na pyruvát a následně v TCA až na CO_2 . Atomy vodíku uvolněné během oxidačních reakcí jsou prostřednictvím dýchacího řetězce přenášeny na kyslík za vzniku vody. První fáze tohoto mechanismu je anaerobní a probíhá nezávisle na mitochondriích v cytosolu buněk. Během těchto reakcí jsou z jedné molekuly glukózy produkovány dvě molekuly ATP a vznikají dvě molekuly pyruvátu. Anaerobní glykolýza je preferovaná v buňkách, které jsou anoxické, embryonální nebo silně proliferující.

Pro optimalizaci syntézy ATP je glykolýza spojena s dalším metabolickým dějem TCA, který probíhá v matrixu mitochondrií za aerobních podmínek (*Protasoni et al., 2021*). Jedná se o konečnou dráhu oxidace lipidů, sacharidů a aminokyselin, proto je to nejdůležitější metabolický cyklus, který spojuje téměř všechny ostatní dráhy metabolismu (*Gasmi et al., 2021*). Dochází také k syntéze meziproductů, které jsou důležité při glukoneogenezi, lipolýze, tvorbě neurotransmiterů atd.

TCA se skládá z devíti enzymatických reakcí a každý cyklus jsou tvořeny tři molekuly NADH (nikotinamid adenin dinukleotid), jedna molekula FADH₂ (flavin adenin dinukleotid) a jeden GTP (guanosin trifosfát). Substrátem je acetyl-CoA, který vzniká při oxidaci mastných kyselin, glukózy, aminokyselin, acetátu a ketolátek. V prvním kroku dochází k fúzi acetylové skupiny acetyl-CoA s oxaloacetátem katalyzovanou citrát syntázou, uvolňuje se CoA-SH, teplo a citrát (*Kumari, 2018*).

Citrát je poté transformován enzymem akonitázou na isocitrát, který se následně během dekarboxylační reakce pomocí isocitrátdehydrogenázy mění na α -ketoglutarát (*Gasmi et al., 2021*). Oxidativní dekarboxylací enzymovým komplexem α -ketoglutarátdehydrogenázou vzniká sukcinyl-CoA, ze kterého se dále tvoří sukcinát, přičemž se fosforylací generuje GTP/ATP. Pomocí enzymu sukcinátdehydrogenáza dochází k přeměně sukcinátu na fumarát, ke kterému fumaráza přidává vodu a vzniká malát. Působením NAD⁺ dependentní malátdehydrogenázy vzniká oxaloacetát a dochází tak k regeneraci cyklu (*Kumari, 2018*).



Obr. 2: Schématické znázornění TCA (Protasoni et al., 2021).

1.1.2 Elektronový transportní řetězec (ETC)

ETC je složen z řady komplexů, které jsou v membráně řazeny s postupně se zvyšujícím redoxním potenciálem. Tyto komplexy přenášejí redoxními reakcemi elektrony z donorů na akceptory a zároveň také dochází k přenosu H⁺ iontů přes IMM. Mitochondriální ETC tak vytváří elektrochemický potenciál protonů, který je následně využit k syntéze buněčného ATP prostřednictvím OXPHOS (Bhatti et al., 2021).

Tvorba tohoto elektrochemického gradientu je možná díky povaze fosfolipidové dvojvrstvy, která tvoří IMM. Gradient tvoří tzv. protonmotivní sílu (PMF), kterou můžeme popsat jako míru potenciální energie uložené v IMM (Protasoni et al., 2021). Za fyziologických podmínek se hodnota PMF pohybuje kolem -220 mV. (Lodish et al., 2000).

Důsledkem přenosu elektronů je také syntéza reaktivních forem kyslíku (ROS), které fyziologicky slouží k buněčné signalizaci ale i k oxidačnímu stresu během patologických stavů. Tento mechanismus se skládá ze 4 transmembránových proteinových komplexů (I – IV) uložených v IMM a volně pohyblivých nosičů pro přenos elektronů ubichinonu a cytochromu c.

Důvodem umístění ETC v těsné blízkosti mitochondriální matrix je využití substrátů NADH a FADH₂ produkovaných v TCA (*Nolfi-Donagan et al., 2020*). Uvolněná energie při průchodu elektronů řetězcem redoxních reakcí vede ke vzniku elektrochemického protonového gradientu napříč IMM, který je využit k syntéze ATP (*Protasoni et al., 2021*).

Komplex I neboli NADH-ubichinonoxidoreduktázy, je největší enzymový komplex ECT složený z více podjednotek a jeho klíčovou úlohou je přenos elektronů z NADH z matrix na ubichinon (Q) (*Zhao et al., 2019*). Elektrony jsou v komplexu I transportovány pomocí řetězce kofaktorů včetně flavinmononukleotidu (FMN) a FeS klastry v komplexu I. Energie uvolněná při průchodu elektronů je využita k čerpání protonů z matrix do IMS, přičemž transport dvou elektronů má za následek čerpání čtyř protonů (*Nolfi-Donagan et al., 2020*).

Elektrony ale mohou do ECT vstupovat také přes komplex II (sukcinátdehydrogenáza), který oxiduje sukcinát na fumarát v TCA za vzniku FADH₂. Elektrony z FADH₂ jsou tedy přenášeny na ubichinon přes klastr FeS komplexu II. Na rozdíl od komplexu I není transport elektronů komplexem II doprovázen translokací protonů z matrix do IMM, jelikož komplex II není protonová pumpa.

Ubichinon je po navázání elektronů redukován na ubichinol (QH₂), následně je tato sloučenina oxidována komplexem III, známým jako ubichinol:cytochrom c oxidoreduktáza (*Protasoni et al., 2021*). Komplex III je symetrický dimer, přičemž každý monomer se skládá z 11 podjednotek. Katalyticky aktivní podjednotky jsou cytochrom b, cytochrom c₁ a FeS klastr (*Zhao et al., 2019*).

Nejdříve se QH₂ váže na cytoplazmatickou stranu komplexu III a uvolní se 2 protony do IMS. Jeden elektron je přenesen z QH₂ na FeS klastr a druhý elektron je přenesen na cytochrom b. Tento elektron je později transportován z cytochromu b na druhou molekulu ubichinonu, která je vázána na matrixové straně komplexu, za vzniku ubisemichinonu.

Současně je elektron na FeS klastru přesunut na cytochrom c₁ a poté na cytochrom c. Poté se další molekula QH₂ opět naváže na cytoplazmatickou stranu komplexu III a proběhne stejný oxidační proces, aby byl zredukován ubisemichinon zpět na QH₂ a došlo k napumpování dvou protonů do IMS (*Nolfi-*

Donegan et al., 2020). Elektrony z ubiquinolu jsou tedy jeden po druhém přeneseny procesem tzv. Q cyklu (*Mourokh et al., 2020*).

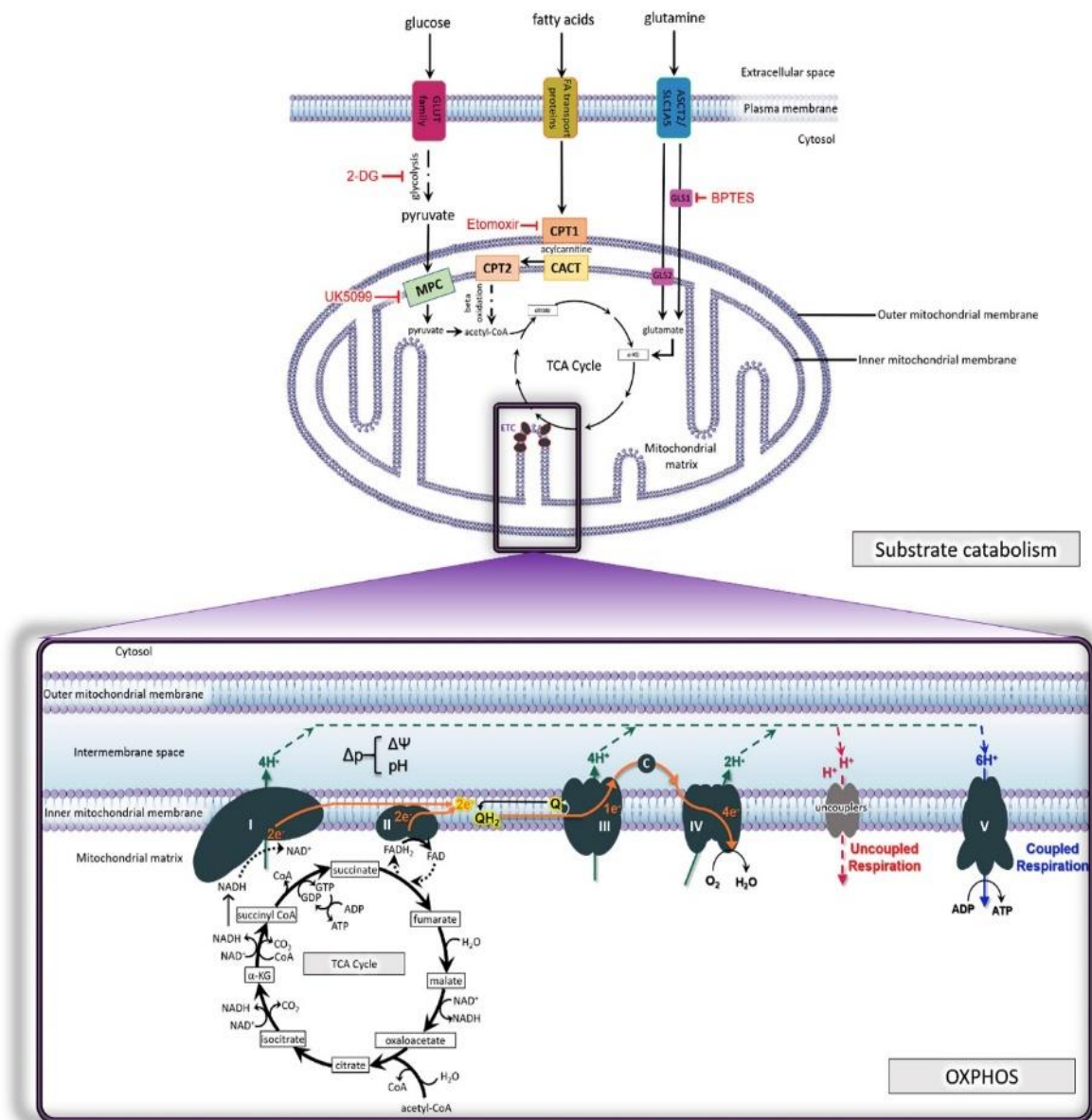
Jakmile je mobilní nosič elektronů cytochrom c redukován, přenáší jednotlivé elektrony z komplexu III na komplex IV neboli cytochrom c oxidáza. Tento komplex transportuje elektrony z cytochromu c na koncový akceptor elektronů O_2 za vzniku vody. Skládá se ze 14 podjednotek a obsahuje 3 prostetické skupiny: cytochrom a, cytochrom a_3 a Cu_B , která má binukleární centrum (*Protasoni et al., 2021*).

Redukovaný cytochrom c se pohybuje po povrchu membrány a interaguje s podjednotkou II komplexu IV elektrostatickými interakcemi a současně přenáší elektrony. V binukleárním centru podjednotky I je poté O_2 redukován na vodu. Proto je v komplexu IV čerpáno z matrix celkem 8 protonů, 4 jsou využity ke tvorbě dvou molekul vody a zbylé 4 jsou přeneseny do IMS. Tento proces je známý jako mitochondriální dýchání.

V závislosti na transport elektronů je dohromady 10 protonů (2 z komplexu III, 4 z komplexu I a 4 z komplexu IV) pumpováno z matrix do IMS, kde dochází ke kumulaci, a tvoří tzv. protonový elektrochemický gradient neboli mitochondriální membránový potenciál. Tento gradient spolu s pH generují protonmotivní sílu, která je zásadní složkou v procesu ukládání energie během OXPHOS, jelikož spojuje transport elektronu (komplexy I – IV) s aktivitou komplexu V (*Nolfi-Donagan et al., 2020*).

Komplex V, též ATP syntáza, je enzym katalyzující syntézu ATP z ADP a fosfátu. Je složen ze dvou odlišných domén: doména F_1 , směřující k mitochondriální matrix, a doména F_0 , která se nachází v IMM. F_0 je složena z c-kruhu a jedné kopie z každé podjednotky a, b, d, F6 a OSCP neboli oligomycin sensitivity-coferring protein (*Protasoni et al., 2021*). F_1 se skládá z rozpustných podjednotek, 3 podjednotky α a 3 podjednotky β a jedna z každé podjednotky γ , δ , ϵ . 3 podjednotky α a 3 podjednotky β tvoří katalytickou hlavu F_1 domény a zbylé podjednotky tvoří centrální stopku, která spojuje hlavu F_1 s c-kruhem F_1 (*Zhao et al., 2019*).

Každý c-kruh je schopen vázat jeden proton z IMS, který reaguje s karboxylátovou skupinou postranního řetězce glutamátu nebo aspartátu. Protonace vyvolá rotaci c-kruhu, která je spojena s přenosem protonů přes IMM a vede je spojení fosfátu k ADP za účelem syntézy ATP v místě F₁ domény (Nolfi-Donagan et al., 2020).



Obr. 3: Schéma OXPHOS a syntézy substrátů pro ETC (Nolfi-Donagan et al., 2020).

1.1.3 Mitochondriální metabolismus a rakovina

Rakovinné buňky vykazují několik odlišných biologických znaků, které vyplývají z genetických a epigenetických změn. Transformují fyziologické buňky na nádorové s neomezenými růstovými a pohybovými vlastnostmi. Jedním z charakteristických klíčových znaků je tendence rakovinných buněk přeprogramovat svůj metabolismus. Přeprogramování metabolismu je přímým účinkem aktivace onkogenů a inhibice nádorových supresorů (*Kalyanaraman et al., 2018*).

Mitochondrie hrají v onkologických onemocněních důležitou roli, a to prostřednictvím syntézy energie a produkce makromolekul. U benigních nádorů se vyskytují patogenní mutace mitochondriální DNA, zatímco u maligních nádorů je mitochondriální genom a funkce ETC striktně zachována, což poukazuje na důležitost mitochondriálního metabolismu pro progres rakoviny. Naproti tomu mutantní enzymy TCA cyklu produkují onkometabolity, které podporují tumorogenezi (*Zong et al., 2016*).

Historicky byl mitochondriální metabolismus považován za nepodstatný pro metabolické potřeby rychle proliferujících rakovinných buněk. Avšak dlouhotrvající přesvědčení, že mitochondriální metabolismus je postradatelný pro růst nádorů, bylo zpochybněno (*Vasan et al., 2020*).

S příchodem 21. století byl vymýceny dvě hlavní mylné představy: rakovina je čistě buněčná porucha, která pramení z epigenetických nebo genetických změn a názor, že maligní buňky plní své bioenergetické a anabolické funkce prostřednictvím aerobní glykolýzy.

Nyní je zastáván názor, že mitochondriální metabolismus má zásadní vliv na všechny kroky onkogeneze, tj. maligní transformace, progresu nádoru a odpověď na léčbu. Mitochondrie jsou důležité pro všechny aspekty progresu nádoru. Jsou hlavním zdrojem ATP, poskytují metabolity pro anabolické procesy a mají schopnost produkovat ROS (*Porporato et al., 2018*).

Mitochondrie jsou momentálně ústředním bodem mnoha cílených terapií. Např. ve studiích, které využívají buněčné kultury a preklinické modely xenoimplantátů různých druhů rakoviny pro využití nových mitochondriálně specifických cílů k účinné léčbě nádorových onemocnění (*Kalyanaraman et al., 2018*).

1.1.3.1 Warburgův efekt

Nádorové buňky vykazují charakteristickou formu buněčného metabolismu, kdy i před dostatečné množství kyslíku dochází ke zvýšené přeměně glukózy na laktózu prostřednictvím glykolytické dráhy. Tento děj se nazývá tzv. Warburgův efekt a je spojen se zvýšeným příjmem glukózy těmito buňkami a poté nadměrnou produkcí laktátu. Nádorové buňky tedy místo přeměny glukózy pomocí OXPHOS a převedením produktů glykolýzy do TCA transformují glukózu na laktát za aerobních podmínek (*Kumar et al., 2021*).

Studie na izolovaných nádorových mitochondriích ukazují, že celkový mitochondriální metabolismus je v rakovinných buňkách potlačen, takže glykolýza odpovídá za polovinu a více veškeré produkce ATP. Výhody Warburgova efektu pro růst a proliferaci buněk jsou četné. Glykolýza může syntetizovat ATP rychleji než OXPHOS a to bez mitochondrií. Glykolýza také poskytuje prekurzorové molekuly, které jsou důležité pro proliferaci buněk. Růst nádoru obvykle převyšuje jejich zásobování krví a glykolýza se tak stává užitečnou adaptací na výslednou hypoxii (*Lemasters, 2021*).

Warburgův efekt je ale také alespoň částečně způsoben tím, že rakovinné buňky nevyužívají mitochondrie v takové míře jako buňky nenádorové. Mitochondriální respirace je spojena s produkcí ROS, které mají v organismu svou fyziologickou funkci, ale pouze v nízkých koncentracích. Při vysokých koncentracích ROS poškozují biomolekuly, inhibují růst a způsobují buněčnou smrt. V nádorech je často prostředí s nízkým obsahem kyslíku, které podporuje tvorbu ROS prostřednictvím mitochondrií.

Zvýšená kapacita pro glykolýzu a snížená závislost na mitochondriálním metabolismu chrání nádorové buňky před negativními vlivy vysokých hladin ROS (*Harris et al., 2019*). Udržovat vhodnou koncentraci ROS je tedy pro nádorové buňky zcela zásadní. Nedostatek ROS totiž způsobuje poruchu signalizačních procesů, které jsou potřebné pro proliferaci buněk (*Liberti et al., 2016*).

Klinicky se tento jev využívá během PET (pozitronová emisní tomografie) pro vizualizaci nádorů. Pacientům je injekčně podán ^{18}F -fluorodeoxyglukóza, nemetabolizovatelný derivát glukózy, který je přednostně vychytáván nádorovými buňkami. Většina nádorů, které jsou PET pozitivní, jsou rychle rostoucí (*Kumar et al., 2021*).

1.2 Mitochondriální bioenergetický profil

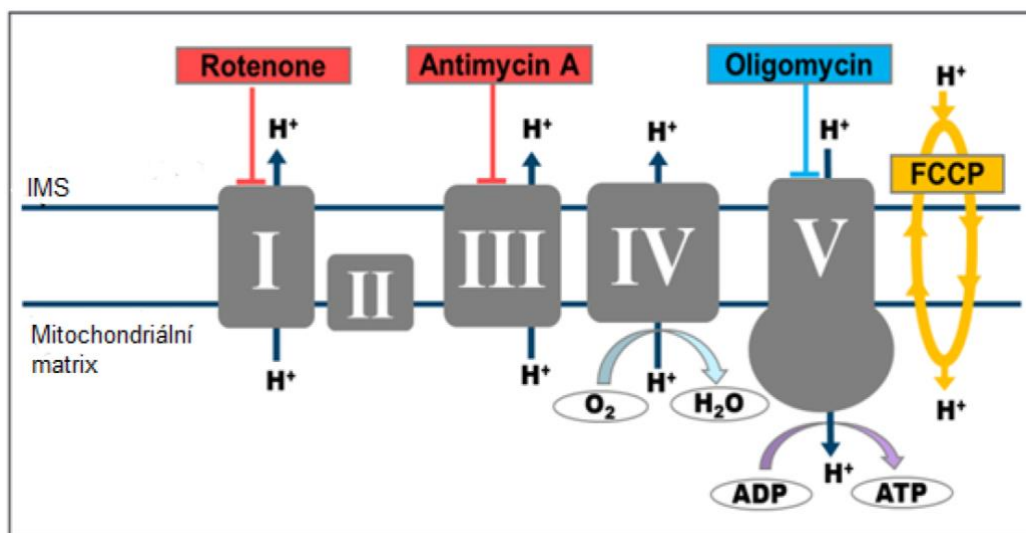
Nádorové buňky se mění a přizpůsobují v závislosti na metabolických nebo bioenergetických požadavcích, které jsou potřebné pro udržení jejich neomezeného růstu a každá rakovinná tkáň má své vlastní individuální metabolické vlastnosti. Pro naplnění potřeb rychlé proliferace buňky pozměňují preferenci substrátu, včetně zvýšeného metabolismu glukózy, glutaminu a lipidů. Metabolické fenotypy rakovinových buněk se tedy liší a měření či sledování parametrů, které souvisejí s charakteristickými znaky rakoviny, poskytuje lepší pochopení metabolických procesů nádorových buněk.

Dva klíčové a snadno měřitelné bioenergetické parametry, které spojují přeprogramování metabolismu, metabolický fenotyp a preferenci substrátu, jsou glykolytická funkce neboli rychlost extracelulární acidifikace (ECAR) a mitochondriální dýchání, tzv. OCR, což je rychlost spotřeby kyslíku. Tyto hodnoty poskytují přímou kvantifikaci mitochondriálního dýchání a glykolýzy (*Kalyanaraman et al., 2018*).

Bioenergetický profil buněk je složen z analýz mitochondriálního dýchání pomocí různých respiračních parametrů. Měření mitochondriálního dýchání je spolehlivý a citlivý test pro hodnocení mitochondriálních funkcí. V buňkách, které mají dostatečně aktivní glykolýzu, lze všechny hlavní aspekty mitochondriálního dýchání měřit v jednom experimentu. Jedná se o bazální respiraci, respiraci související s tvorbou ATP, únik protonů, maximální rychlost respirace, rezervní respirační kapacita a non-mitochondriální spotřeba kyslíku.

Tyto parametry lze určit přidáním inhibitoru ATP-syntázy oligomycinu, protonoforového rozpřahovače, jako je FCCP a ETC, např. rotenonu nebo antimycinu A. Změny v glykolytické i mitochondriální aktivitě nádorových buněk lze měřit v reálném čase. Pokud je glykolýza v buňkách omezena a bioenergetika buňky se stane nestabilní, můžeme provést samostatné paralelní experimenty s oligomycinem a FCCP (*Brand et al., 2011*).

Analýza mitochondriálního profilu je využívána k hodnocení buněčné bioenergetiky, identifikaci mitochondriální dysfunkce a predikci reakce buněk na stresové podmínky (*Nicholls et al., 2010*).



Obr. 4: Modulátory užívané během analýzy mitochondriální respirace (Agilent Seahorse User Guide).

1.2.1 Bazální respirace

Bazální respirace představuje energetickou náročnost buňky za bazálních podmínek. Je definována jako mitochondriální OCR, které je získáno odečtením reziduálního OCR po podání ETC inhibitorů od celkové spotřeby buněčného kyslíku před podáním modulátorů mitochondriální funkce (Kalyanaraman *et al.*, 2018).

Je řízena respirací související s tvorbou ATP, ale jen částečně ovlivněna oxidací substrátu a únikem protonů. Hodnoty bazální respirace se mohou velmi lišit v závislosti na obsahu substrátů nebo hormonů v médiu. Ke změně hodnot respirace může docházet buď fyziologickou adaptací buněk nebo reakcí na stres.

Zvýšení bazálního dýchání může být způsobeno zvýšenou respirací související s tvorbou ATP, zvýšeným únikem protonů nebo zvýšením non-mitochondriální spotřeby kyslíku, jako je např. produkce ROS (Hill *et al.*, 2012). U hepatocytů může dojít k navýšení bazální respirace pomocí mastných kyselin, pyruvátu, laktátu nebo adrenalinu (Brand *et al.*, 2011).

1.2.2 Respirace související s tvorbou ATP

Jedná se o rychlost mitochondriální syntézy ATP v určitém definovaném bazálním stavu. Tuto hodnotu můžeme získat pomocí oligomycinu, který inhibuje ATP syntázu v F_0 podjednotce. Inhibice ATP syntázy vede k mírné hyperpolarizaci mitochondrií, zároveň únik protonů je závislý na napětí membrány. Proto může docházet k podhodnocení syntézy ATP, a naopak nadhodnocení úniku protonů. Tato chyba je obvykle poměrně malá, dochází k podhodnocení syntézy ATP o maximálně 10 % a nadhodnocení rychlosti úniku protonů o 15-20 %.

Po přidání oligomycinu k buňkám dochází ke změně jejich metabolismu a produkce ATP je závislá na glykolýze. Pro udržení produkce ATP je proto zapotřebí, aby se glykolýza zrychlila asi 10krát. Většina buněk má dostatečnou glykolytickou aktivitu, ale v některých buňkách může dojít po přidání oligomycinu ke vzniku krize spojené s nedostatkem ATP, což způsobuje selhání glykolýzy, která vyžaduje pro svůj průběh ATP, a selhání aktivace a katabolismu mastných kyselin. Tyto změny poté vedou k přerušení dodávání substrátů pro OXPHOS a progresivnímu poklesu dýchání (*Brand et al., 2011*).

1.2.3 Maximální rychlost respirace

Tento stav se měří po podání FCCP, silného protonoforu, který rozpojuje OXPHOS prostřednictvím zvýšení propustnosti IMM pro protony a stimuluje tak mitochondriální dýchání, a odděluje tedy tvorbu mitochondriálního ATP od spotřeby kyslíku (*Kalyanaraman et al., 2018*). Po podání FCCP je umožněn na ATP-syntáze nezávislý tok protonů přes IMM a je účinně snižován potenciál mitochondriální membrány. Přidáním tohoto protonoforu je tedy umožněn odhad hodnoty OCR bez závislosti na transportu ATP/ADP a aktivitě ATP syntázy (*Dranka et al., 2011*).

Experimentálně může mít použití FCCP několik omezení, pokud je koncentrace protonoforu příliš vysoká, může být inhibiční. Tyto látky také mohou působit jako protonofory napříč všemi membránami, okyselují cytosol a narušují funkci endozomů a dalších kompartmentů. Dohromady mohou tyto faktory

inhibovat dodávku substrátu a způsobit, že je hodnota nižší než skutečná maximální respirační kapacita (*Brand et al., 2011*).

Nižší maximální rychlost respirace tedy může naznačovat, že je snižená dostupnost substrátů nebo narušenou mitochondriální integritu. Naopak vysoké hodnoty maximální respirace ve srovnání s bazálním stavem signalizuje, že má buňka podstatnou mitochondriální rezervní kapacitu (*Hill et al., 2012*).

1.2.4 Rezervní respirační kapacita

Rezervní respirační kapacita vyjadřuje schopnost buňky reagovat dodávkou substrátu a transportu elektronů na zvýšení poptávky po energii. Tato hodnota lze zjistit rozdílem mezi maximální respirační kapacitou a bazální respirací. Nedostatek volné respirační kapacity může signalizovat mitochondriální dysfunkci, která není patrná za bazálního stavu, kdy je rychlost respirace řízena respirací související s tvorbou ATP, ale projevuje se pouze u zátěže, při které dochází ke zvyšování spotřeby ATP a oxidace substrátu výrazněji ovlivňuje respiraci (*Brand et al., 2011*).

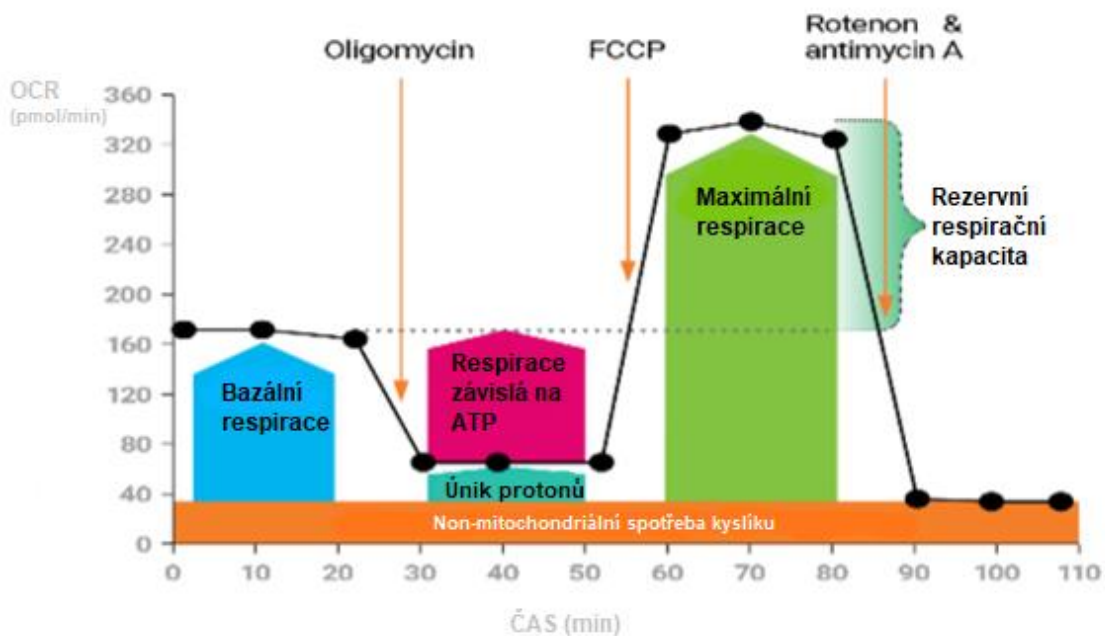
1.2.5 Únik protonů

IMM je pro protony téměř nepropustná, ale propustnost se může měnit, což může vést k tomu, že některé protony generované během oxidačních reakcí uniknou bez syntézy ATP. Rychlost úniku protonů při daném membránovém potenciálu je tedy testována jako mitochondriální spotřeba kyslíku bez přítomnosti OXPHOS (*Ainscow et al., 2001*).

Výpočet úniku protonů je založen na rozdílu mezi OCR naměřeným po ošetření buněk oligomycinem a non-mitochondriální OCR (*Kalyanaraman et al., 2018*). Větší nárůst těchto hodnot může být způsobeno těžším poškozením mitochondrií, mírná odchylka v rychlosti úniku protonů by mohla indukovat změnu v nepropustnosti protonů nebo změnu v membránovém potenciálu mitochondrií způsobenou odlišnou oxidací substrátu (*Brand et al., 2011*). Dále se také na zvýšení rychlosti úniku může podílet zvýšená aktivita uncoupling proteins nebo poškození ETC komplexů, což vede k úniku protonů do matrix (*Hill et al., 2012*).

1.2.6 Non-mitochondriální spotřeba kyslíku

Non-mitochondriální spotřeba kyslíku neboli zbytková OCR, nezávislá na ETC, je analyzována na konci experimentu úplnou inhibicí mitochondriálního ETC pomocí specifických inhibitorů jako je rotenon, antimycin nebo myxothiazol. Většina buněk má non-mitochondriální spotřebu kyslíku nízkou, ale přesto významnou (Brand *et al.*, 2011). Může dosahovat okolo 10 % z celkové spotřeby kyslíku, ale tato hodnota se liší dle typu buněčné linie, například v hepatocytech a kardiomyocytech tato hodnota může dosahovat až 40 %, ale v endoteliálních buňkách přibližně 15 % (Hill *et al.*, 2012).



Obr. 5: Parametry mitochondriálního energetického profilu (Agilent Seahorse User Guide).

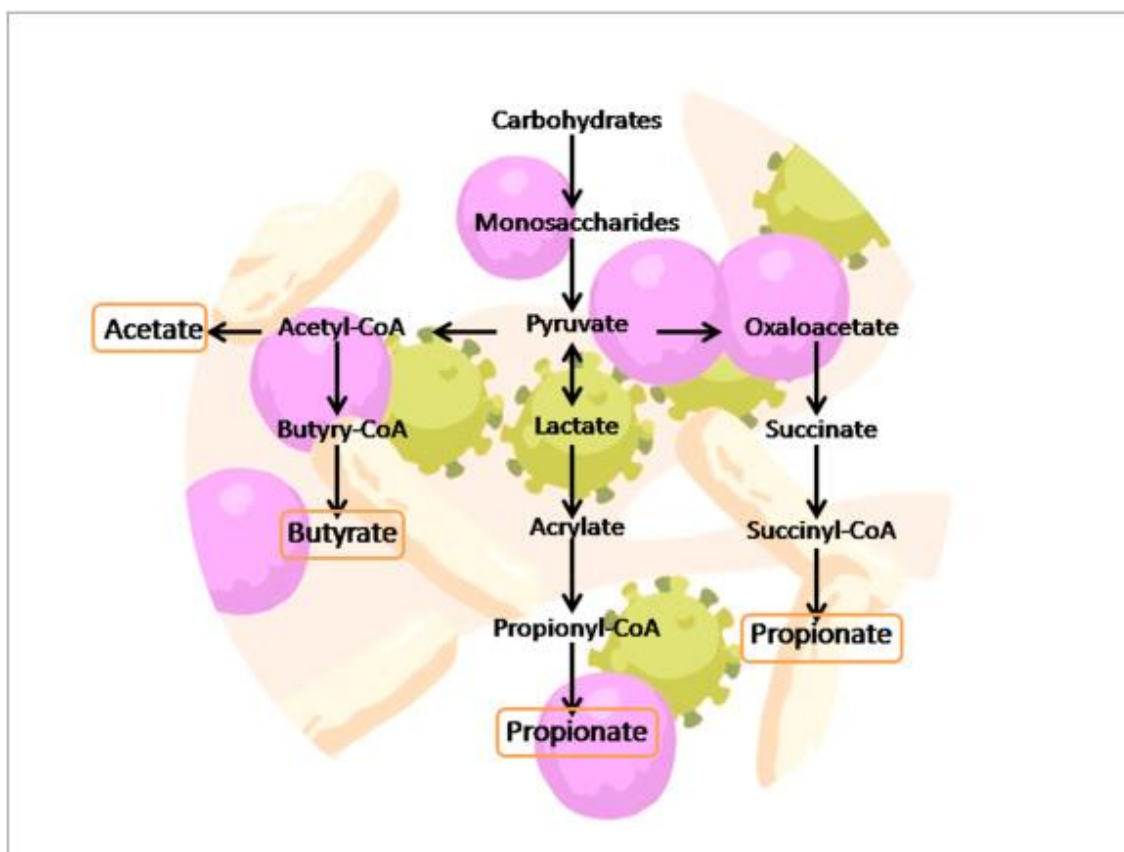
1.3 Metabolismus SCFA

Mastné kyseliny jsou důležitým zdrojem energie ve stavech, kdy je dodání glukózy omezené, avšak i když je glukóza dobře dostupná, jsou mastné kyseliny hlavním zdrojem energie pro srdce, kosterní svalovinu a ledviny. Hlavní cesta jejich metabolismu je mitochondriální β -oxidace, která je nezbytná pro udržení energetické homeostázy v lidském těle (Houten S. M. et al., 2016). Fyziologické funkce SCFA souvisí s délkou alifatického řetězce a jsou závislé na aktivaci specifických membránových receptorů (González-Bosch et al., 2021).

SCFA je skupina dvou až šesti uhlíkatých sloučenin a řadí se sem: acetát (C2), propionát (C3), butyrát (C4), valerát (C5) a kaproát (C6), ale 95 % SCFA produkovaných v lidském těle tvoří acetát, propionát a butyrát. Jsou syntetizovány především bakteriální fermentací nestrávených sacharidů, včetně vlákniny. Tvorba těchto látek probíhá v tlustém střevě dvěma hlavními bakteriálními skupinami: propionát a acetát tvoří kmen *Bacteroidetes*, zatímco butyrát je produkován kmenem *Firmicutes* (Mirzaei et al., 2021).

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou vychytávány v tlustém střevě pomocí různých transportních systémů. Apikální vstřebávání probíhá jednoduchou pasivní difúzí, ale největší část SCFA je vychytávána několika aktivními transportními mechanismy (Beek et al., 2017).

SCFA jakožto metabolity střevních bakterií, jsou využívány epiteliálními buňkami jako jejich primární zdroj energie, kromě toho mají SCFA také zásadní roli při udržování funkce střevní bariéry zlepšením exprese proteinů, které spojují epiteliální buňky (Chambers et al., 2018). Acetát je tvořen z pyruvátu přes meziproduct acetyl-CoA, butyrát vzniká konverzí acetyl-CoA na butyryl-CoA pomocí enzymů butyryl-CoA transferázy a butyrátkinázy. Propionát je konečným produktem laktátové a sukcinátové dráhy (Fattahi et al., 2020).



Obr. 6: Metabolické dráhy mikrobiomu tlustého střeva, kterými jsou syntetizovány SCFA (Fattahi et al., 2020).

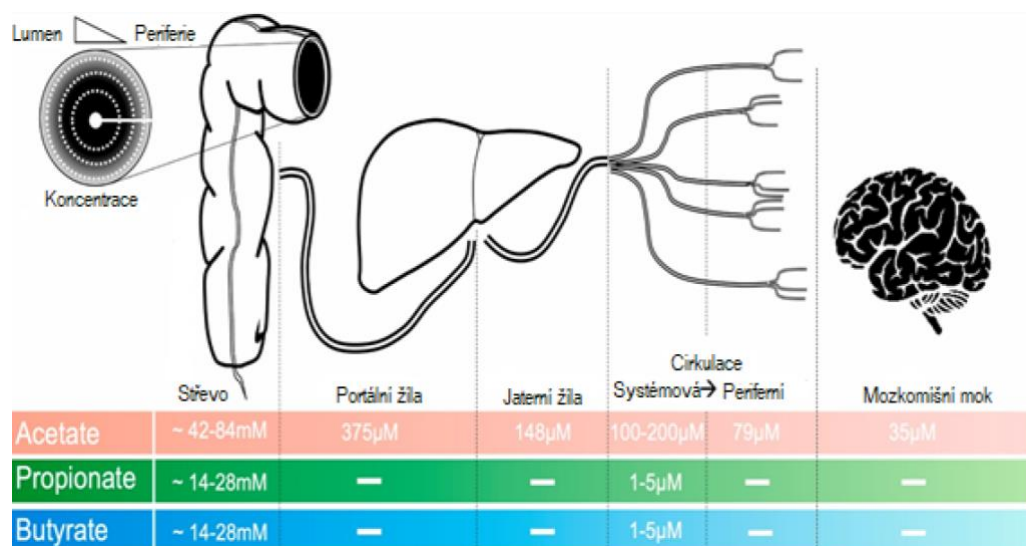
SCFA jsou převážně metabolizovány v enterocytech a játrech, mají vliv na příjem potravy, čímž se podílejí na regulaci energetické homeostázy a tělesné hmotnosti. Dále jsou také schopny za určitých podmínek indukovat apoptózu a tím řídit buněčnou proliferaci. Hrají důležitou roli v intracelulární signalizaci a přispívají k regulaci buněčného metabolismu (Schönfeld et al., 2016).

SCFA mohou také působit jako modulátory pH tlustého střeva a intracelulárního pH, objemu buněk a dalších funkcí spojených s transportem iontů. Zvýšení koncentrace SCFA vede ke snížení pH, které nepřímo ovlivňuje složení mikroflóry tlustého střeva například tím, že kyselější pH snižuje počet potenciálně patologických klostridií, snižuje rozpustnost žlučových kyselin, nepřímo zvyšuje absorpci minerálů a snižuje absorpci amoniaku (Wong et al., 2006).

Z tlustého střeva, kde jejich celková koncentrace přesahuje 100mM v poměru asi 3:1:1 pro acetát, propionát a butyrát (Mirzaei et al., 2021, Sivaprakasam et al., 2016), jsou SCFA z velké části absorbovány do kolonocytů,

kde je část využita jako zdroj energie a je okamžitě oxidována. Zbývající SCFA jsou transportovány portálním oběhem do jater odkud se dostávají do periferního oběhu.

V důsledku toho jsou koncentrace SCFA v plazmě a séru podstatně nižší než v lumen tlustého střeva (Deroover *et al.*, 2017). Hladina acetátu v plazmě se pohybuje mezi 50 – 100 $\mu\text{mol/l}$, koncentrace propionátu a butyrátu jsou v rozmezí 0,5 – 10 $\mu\text{mol/l}$ (Priyadarshini *et al.*, 2014, Fernandes *et al.*, 2011). Jen malé množství butyrátu se za fyziologických podmínek nachází v systémovém oběhu, jelikož butyrát slouží jako zdroj energie pro kolonocyty. Acetát je jediný ze skupiny SCFA, který se ve značném množství za normálních podmínek může vyskytovat v periferní krvi u lidí (Beek *et al.*, 2017).



Obr. 7: Schéma jednotlivých koncentrací SCFA a jejich gradient mezi lumen střeva a periferií (González-Bosch *et al.*, 2021).

1.4 Vliv SCFA na karcinogenezi

Je známo, že SCFA jsou spojovány s příznivými účinky na lidské zdraví pro jejich metabolické a signalizační vlastnosti, regulují buněčný růst a diferenciaci, působí protizánětlivě, inhibují buněčnou proliferaci a indukují apoptózu karcinogenních buněk (McBrearty *et al.*, 2021). Proto mohou SCFA ovlivňovat progresi různých onemocnění, jako je zánětlivé onemocnění střev

(IBD, např. Crohnova choroba, ulcerózní kolitida), diabetes, alergie, ateroskleróza a CRC (kolorektální karcinom) (*Mirzaei et al., 2021*).

Byly prokázány mnohé přínosy střevního mikrobiomu na lidské zdraví, jako jsou protizánětlivé účinky a protinádorové účinky. Dle epidemiologických studií suplementace vlákniny spolu s prospěšnými střevními bakteriemi snižuje rozvoj CRC. Tyto informace poukazují na vztah mezi SCFA a CRC, SCFA zabraňují vzniku rakoviny tlustého střeva prostřednictvím indukce apoptózy specifické pro rakovinu a autofagie (*Fattahi et al., 2020*).

1.4.1 Receptory HDAC

Základem účinku SCFA na tlusté střevo je složitý molekulární mechanismus, kdy dochází k interakci s více signálními molekulami exprimovanými epitelem střeva a buňkami imunitního systému (*Sivaprakasam et al., 2016*). Nejvíce studovaným cílem pro butyrát a propionát jsou HDAC neboli histondeacetylázy, které brání genové expresi remodelací chromatinu a epigeneticky regulují transkripci (*Fattahi et al., 2020*). Jedná se o rodinu proteinů, která se dělí do dvou skupin (*Sivaprakasam et al., 2016*). Butyrát a propionát specificky inhibují aktivitu HDAC-1 a HDAC-3, které patří do první skupiny, což vede ke zvýšení acetylace specifických lysinových zbytků v histonech a ke snížení kladného náboje histonu.

Dochází k inhibici vazby DNA na histony, která má za následek otevřenou strukturu DNA a chromatinu, a stává se tak dostupnou pro transkripční aparát. Zamezení acetylace histonů by tedy mělo vést ke zvýšení transkripce genů. Mnoho studií prokázalo pozitivní korelaci mezi účinkem butyrátu inhibovat HDAC a indukovat apoptózu v buňkách CRC (*Thangaraju et al., 2009*).

Inhibice HDAC tedy mění aktivitu buněčného proteazomu a systém replikace či opravy DNA, čímž ovlivňují expresní vzorce buněčné proliferace, diferenciaci a genů pro regulaci apoptózy. To znamená, že SCFA mají schopnost potlačovat karcinogenezi a mohou ovlivňovat imunitní systém. Další funkcí, která je dosažena pomocí inhibice HDAC, je modulace oxidačního stresu a snížení poškození DNA epitelálních buněk (*Fattahi et al., 2020*).

1.4.2 Receptory GPR41, GPR43, GPR109A

Jako mediátory biologických účinků SCFA jsou zkoumány receptory volných mastných kyselin GPR41 (FFA3), GPR43 (FFA2), GPR109A (receptor hydroxykarboxylové kyseliny 2, HCA2) a čichový receptor 78, které jsou exprimovány na povrchu buněk. Jedná se o GPCR neboli rodiny receptorů spřažených s G-proteinem, na které se kyseliny váží a dochází k aktivaci.

Signální mechanismy používané těmito receptory mohou být specifické pro buněčný typ a ligand (*Sivaprakasam et al., 2016*). Po navázání SCFA na GPR41 a GPR43 se aktivují signální dráhy, jako je mitogenem aktivovaná proteinkinázová signalizace (MAPK), což vede například k produkci chemokinů, cytokinů a k regulaci buněčné proliferace (*Beek et al., 2017*).

Receptor FFA2 je většinou popisován jako buněčný povrchový receptor pro acetát a je hustě exprimován v neutrofilech, monocytech a dalších buňkách imunitního systému a také v gastrointestinálním epitelu, kde dokáže regulovat zánětlivé procesy (*Moniri et al., 2021*). Bylo zjištěno, že u lidského adenokarcinomu tlustého střeva a také u adenokarcinomu lymfatických uzlin je exprese receptoru FFA2 snížena nebo úplně omezena ve srovnání s fyziologickou tkání tlustého střeva (*Tang et al., 2011*).

Receptor FFA3 většinou preferuje vazbu na butyrát nebo propionát a je široce exprimován v různých tkáních, včetně tkáně tukové, slinivky břišní, sleziny, buněk imunitního systému a tlustém střevu. Exprese tohoto receptoru snižuje butyrátem indukovanou acetylaci histonů a antiproliferativní a apoptotické účinky (*Wu et al., 2012*).

Dále také dochází k regulaci buněk ve fázi G1 buněčného cyklu, zvýšení počtu buněk v S fázi buněčného cyklu a snížení exprese p21. Toto zjištění vede k názoru, že FFA3 negativně ovlivňuje účinky butyrátu (*Ang et al., 2016*). Existuje i konfliktní literatura a vzhledem k tomu je zřejmé, že je zapotřebí další výzkum k objasnění, jakou roli může mít FFA3 u kancerogeneze.

GPR109A je vysoce exprimován na buňkách imunitního systému, sítnici, buňkách tlustého střeva a adipocytech. Na rozdíl od ostatních SCFA GPCR má tento receptor špatnou afinitu k propionátu a acetátu (*Moniri et al., 2021*). Butyrát slouží jako ligand pro GPR109A, který je receptorem pro niacin. Pokud je GPR109A exprimován v apikální membráně kolonocytů směřující do lumen

střeva, může butyrát ovlivnit vznik rakoviny a zánětu tlustého střeva extracelulárně aniž by vstupoval do buněk (*Thangaraju et al., 2009*).

1.4.3 Účinky butyrátu

Butyrát je netoxická a potenciální protirakovinná látka, která má schopnost měnit acetylaci histonů expresi velkého počtu genů. Jedná se o přirozeně se vyskytující inhibitor HDAC a vykazuje významný účinek na nádorové buňky s minimální toxicitou na buňky fyziologické. Mezi účinky butyrátu patří inhibice růstu nádorových buněk, indukce diferenciací nádorových buněk nebo také eliminace těchto buněk navozením apoptózy. Ve fyziologických buňkách tlustého střeva je ovšem butyrát růstovým faktorem a živinou (*Scharlau et al., 2009*).

Butyrát hraje důležitou roli v regulaci zánětu, a to zejména ve střevech. Ve studii na myších bylo prokázáno, že ovlivňuje zánětlivé procesy pomocí posílení střevní bariéry (*Xu et al., 2018*). Další protizánětlivé účinky byly objeveny u myších jater nebo při modulaci interakce mezi adipocyty a makrofágy prostřednictvím snížení lipolýzy a produkce protizánětlivých markerů (*Zhang et al., 2021*).

Bylo také zjištěno, že butyrát dokáže inhibovat CRC prostřednictvím regulace signální dráhy Wnt, která souvisí s výskytem rakoviny tlustého střeva, a pomocí protizánětlivých a imunomodulačních účinků, které inhibují proliferaci a migraci nádorových buněk, inhibují nádorovou angiogenezi, indukují apoptózu rakovinných buněk a podporují diferenciaci neoplastických kolonocytů. Butyrát by tedy potencionálně mohl být využíván jako účinný prostředek pro prevenci a léčbu CRC (*Liu et al., 2021*).

Účinky butyrátu byly zkoumány také na rakovině prsu. Bylo dokázáno, že butyrát snižuje životaschopnost buněk, vykazuje protirakovinné a genotoxické účinky, a to zejména prostřednictvím antioxidantních enzymů. Avšak tento efekt se mění v závislosti na dávce a čase (*Yuksel et al., 2022*).

1.4.4 Účinky kyseliny valerové

Kyselina valerová neboli pentanová ($C_5H_{10}O_2$) patří mezi hlavní aktivní látky kozlíku lékařského a je používána jako bylinný doplněk pro své terapeutické účinky především proti nespavosti a záchvatům (*Torres-Hernández et al., 2015*). Bylo však zjištěno, že kozlík lékařský je také schopen ovlivňovat imunitní systém a tím působit proti vzniku rakoviny (*Scott et al., 2012*). Kyselina valerová jakožto organická látka je velmi strukturně podobná s inhibítor HDAC kyselinou valproovou ($C_8H_{16}O_2$), která je užívána k léčbě záchvatových poruch, a kyselinou suberoylnilid hydroxamovou (SAHA, $C_{14}H_{20}N_2O_3$), pomocí které se léčí lymfomy T-buněk (*Duvic et al., 2007*).

Výsledky studií ukazují, že kyselina valerová má široké spektrum protirakovinného působení. Hodnoty IC50 získané ze série koncentrací při testování buněčné proliferace u rakoviny jater odhalily silné potlačení růstu nádorových buněk (*Han et al., 2020*). Mezi možné molekulární mechanismy protinádorového působení kyseliny valerové patří inhibice HDAC, který je charakteristickým znakem rakovinového bujení a hraje klíčovou roli v genové transkripci, řízení proliferace, přežití buněk, diferenciaci a genetické stabilitě. Proto HDAC patří mezi nejslibnější terapeutické cíle pro léčbu onkologických onemocnění (*Buurman et al., 2016*).

Protinádorový účinek kyseliny valerové byl zjištěn také u buněk rakoviny prsu. Kyselina inhibovala proliferaci, migraci a tvorbu kolonií nádorových buněk rakoviny prsu způsobem závislým na dávce a času. Bylo zjištěno, že kyselina valerová významně snižuje aktivitu HDAC v ošetřovaných rakovinných buňkách (*Fengqin S. et al., 2021*). Inhibiční účinek kyseliny byl významně snížen u zdravých epiteliálních buněk prsu a jater, což naznačuje specifický účinek na nádorové buňky s nízkými vedlejšími účinky na fyziologické okolí nádoru. Tyto výsledky jasně naznačují, kyselina valerová by mohla být slibným prostředkem pro léčbu rakoviny jater i rakoviny prsu a je zapotřebí další zkoumání jejích terapeutických účinků (*Buurman et al., 2016, Fengqin S. et al., 2021*).

1.5 Zásady kultivace buněk *in vitro*

In vitro kultivace buněk je velmi široce používaná metoda napříč různými vědními obory, jelikož buněčné kultury mají mnoho využití především v medicíně, mikrobiologii, genetice nebo imunologii a ve výzkumu. Překlad latinského slovního spojení „*in vitro*“ znamená „ve skle“ a jedná se o takové metody, jejichž cílem je simulovat pro buňky podmínky velmi podobné těm v organismu (Kachan, 2017). Buněčná linie tedy označuje odstranění buněk z organismu a jejich následný růst v příznivém umělém prostředí.

Buňky mohou pocházet přímo z přímo a disagregovány enzymatickými nebo mechanickými prostředky, nebo mohou být odvozeny z buněčné linie či kmene, které již byly založeny. Fyziologicky jsou buňky schopny dělit se pouze omezený počet časů. Některé buněčné linie se však stávají nesmrtelnými pomocí procesu transformace, který může nastat spontánně nebo virovou či chemickou indukci. Tyto kultury jsou pak označovány jako kontinuální (*Cell Culture Basics – Handbook*).

Kultivace buněčných linií má jako experimentální model nenahraditelné postavení, jejich využití v experimentech má mnoho zásadních výhod, především ve srovnání s jinými typy biologických modelů, jako jsou např. laboratorní zvířata. Je důležité, že pokus probíhá na jediném, dobře charakterizovaném buněčném typu a výsledky tak nejsou ovlivněny dalšími vlivy, jako třeba jinými orgány, tkáněmi nebo populacemi buněk. Další výhodou je také snadná kultivace buněk.

Je zapotřebí také zvážit některé nevýhody těchto metod. Tyto buněčné linie rostou za nefyziologických podmínek. Kultivace probíhá v kultivačním médiu. Buňkám chybí normální tkáňové prostředí neboli přítomnost dalších typů buněk, ve kterém se za běžných podmínek nacházejí. Proto v důsledku těchto podmínek dochází často ke změně fenotypu kultivované buněčné linie, a tím může dojít i ke změně některých vlastností jako je morfologie buněk nebo genová exprese (*Vejražka*).

1.5.1 Vybavení laboratoře

Prostory a vybavení laboratoře musí být udržovány vhodným způsobem, aby se co nejvíce zabránilo vzniku chybné manipulace. Všechny kroky práce s buněčnými kulturami se provádějí výhradně v prostorách a zařízeních, které se snadno udržují a čistí. Jejich kvalita a uspořádání musí, pokud možno co nejvíce zabraňovat vniku nečistot a křížové kontaminace. Vybavení laboratoře by tedy mělo být navrženo, umístěno a udržováno tak, aby vyhovovalo zamýšlenému účelu (*Römhild, 2016*).

Základním cílem bezpečnosti v laboratoři pro kultivaci buněk je snížit nebo úplně odstranit expozici laboratorních pracovníků a vnějšího prostředí potenciálně škodlivým biologickým činitelům. Nejdůležitějším prvkem bezpečnosti je přísné dodržování standardních mikrobiologických technik a postupů.

Hlavním požadavkem laboratoře pro kultivaci buněk je nutnost dodržovat aseptický provoz. Zdrojem kontaminace bakterií, virů nebo plísní jsou nesterilní média a činidla, částice ze vzduchu a nedostatečně očištěné pracovní plochy. Aseptická práce poskytuje bariéru mezi mikroorganismy v prostředí a sterilní buněčnou kulturou. Prvky aseptického provozu jsou sterilní pracovní plocha, dostatečná osobní hygiena pracovníků, sterilní činidla a média a sterilní manipulace, jelikož i nízká úroveň kontaminace může vést k abnormálním výsledkům a nesprávným vědeckým interpretacím (*Segeritz et al., 2017*).

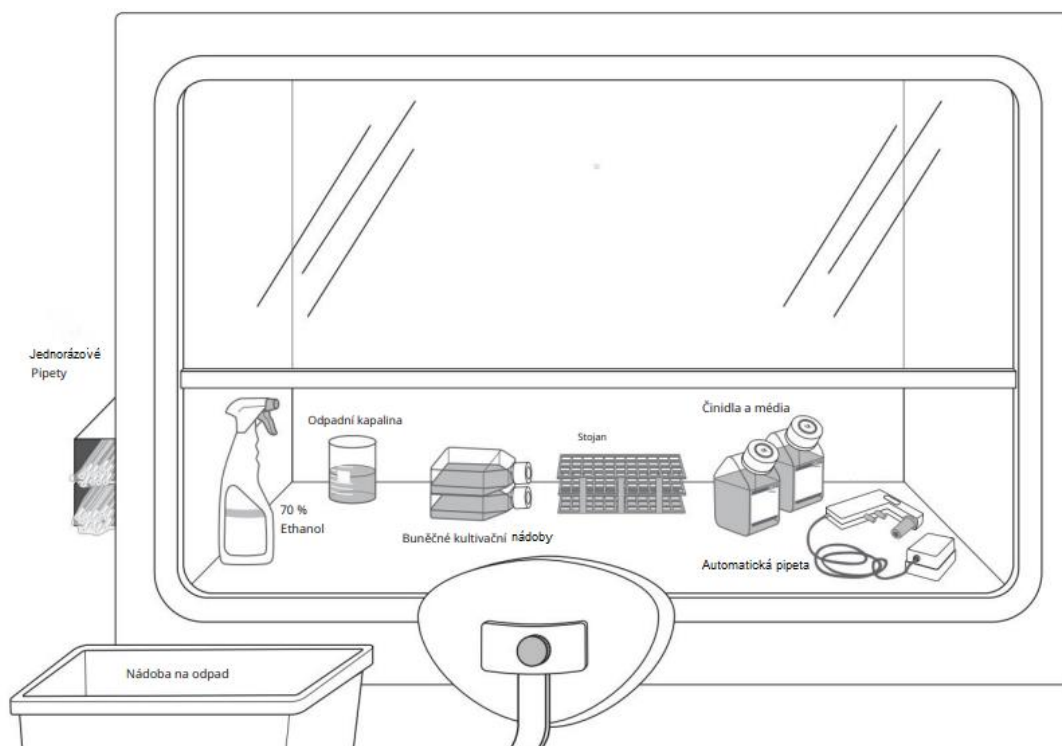
Proto je při práci s buněčnými kulturami je důležité dodržovat určitá pravidla sterilní manipulace, což je například použití laminárních boxů. Tyto boxy jsou velmi důležité pro kultivaci buněk, jelikož umožňují sterilní práci. Při správném provozu chrání produkt před kontaminací a zároveň zamezuje přístup aerosolu k obsluze boxu pomocí HEPA filtru. Stupeň zabezpečení se liší dle třídy boxu (*Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook*).

Laminární box by měl být dostatečně velký, snadno čistitelný uvnitř i venku a měl by mít dostatečné osvětlení. Pracovní prostor by měl být přehledný a čistý. Než vložíme pracovní pomůcky do boxu, je důležité je řádně vydesinfikovat 70 % ethanolem a otřít dočista (*Cell Culture Basics – Handbook*).

Dalším nutným zařízením v buněčné laboratoři je inkubátor s řízeným obohacováním atmosféry oxidem uhličitým, jelikož buněčné kultury vyžadují

přísně kontrolované prostředí, ve kterém mohou růst. Jsou tak zajištěny podmínky pro správnou kultivaci jako je teplota, stupeň vlhkosti a hladina CO₂ nebo O₂. Inkubátory z nerezové oceli jsou snadno čistitelné a chráněné před korozí, zejména u inkubací ve vlhku.

Kromě těchto zařízení by v laboratoři neměl chybět ani inverzní mikroskop vybavený fázovým kontrastem a obvyklé laboratorní pomůcky jako je centrifuga, vodní lázeň, chladnička a mrazák (*Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook*).



Obr. 8: Základní uspořádání laminárního boxu pro kultivaci buněk (Cell Culture Basics – Handbook).

1.5.2 Kultivační média

Kultivované buněčné linie vyžadují sterilní prostředí a přísun živin. Kultivační prostředí by mělo splňovat několik podmínek: stabilita pH a teploty, vhodné koncentrace látek. Platí, že kultivační médium do značné míry napodobuje extracelulární tekutinu a mění se zpravidla dvakrát až třikrát týdně.

Mezi nejzákladnější složky kultivačních médií patří: anorganické soli, sacharidy, aminokyseliny, vitamíny, mastné kyseliny, lipidy, proteiny, peptidy, sérum, stopové prvky.

Anorganické soli pomáhají udržovat v kultivačním médiu osmotickou rovnováhu buněk a regulují membránový potenciál pomocí sodíku, draslíku a vápníku. Mají také zásadní význam na udržování stálého pH, především uhličitany a fosfáty.

Většina buněčných linií vyžaduje pH v rozmezí 7,2 – 7,4. Kromě anorganických pufrů se pro udržení stálého pH přidávají organické pufrы HEPES a TES, které mají vynikající pufrovací kapacitu, ale jsou relativně drahé. Dále můžeme zvolit „přirozený“ pufrovací systém, kdy se plynný CO₂ vyrovnává s obsahem CO₂/HCO₃ v kultivačním médiu. Tyto systémy musí být udržovány v plynné atmosféře 5–10 % CO₂. Výhodou je netoxičita a nízká cena oxidu uhličitého. Do většiny kultivačních médií se také přidává fenolová červeň, která signalizuje pomocí zabarvení média změnu složení. Pokud dojde ke zežloutnutí, pH je sníženo, pokud médium zčernalo, pH je zásadité.

Obecně jsou hlavním zdrojem energie sacharidy ve formě cukrů. Mezi nejpoužívanější patří glukóza a galaktóza, v některých médiích najdeme i fruktózu či maltózu. Dle daného média se mění jejich koncentrace a platí, že vyšší koncentrace cukrů podporují růst širšího spektra buněčných typů. Kromě cukrů využívají buňky jako zdroj energie také L-glutamin. Další složkou kultivačního média jsou aminokyseliny. Esenciální aminokyseliny musí být přidány do média, jelikož buňky nejsou schopny jejich syntézy.

Nezbytnou částí kultivačního média je sérum, což je komplexní směs biologicky významných organických látek, jako jsou albuminy, růstové faktory, inhibitory růstu nebo látky pro adhezi buněk. Sérum také reguluje propustnost buněčné membrány. Nejčastěji používaným sérem je fetální bovinní sérum (FBS), jelikož fetální sérum má nejvyšší koncentraci růstových faktorů. Kromě tohoto typu existují séra z dalších živočichů, např. z koně nebo králíka. Použití séra ale představuje riziko kontaminace i přesto, že se séra sterilizují filtrací a někteří dodavatelé provádějí řadu testů kontroly kvality.

Sérum je také důležitým zdrojem vitamínů, které jsou prekurzory mnoha kofaktorů. Zejména vitamíny skupiny B jsou nezbytné pro růst a proliferaci buněk. Některá média mohou obsahovat i zvýšené hladiny vitamínů A nebo E, běžně

jsou však používány riboflavin, thiamin a biotin. V séru jsou také přítomny stopové prvky jako je mangan, selen, měď nebo zinek a další.

Existují i bezsérová média, která zlepšují definovanost kultivačních médií a eliminují problémy s použitím séra tím, že nahrazují sérum vhodnými nutričními a hormonálními přípravky. Všechny potřebné růstové faktory a další látky se doplňují do média samostatně, proto je příprava takových médií náročnější a dražší.

Do médií se také často přidávají antibiotika, aby se předešlo kontaminaci buněčných kultur bakteriemi. Nejčastěji se přidává penicilin a streptomycin. Některá antibiotika však mohou mít významný vliv na chování buněčných linií a jejich proliferaci (*Vejražka, Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook*).

1.5.3 Podmínky kultivace

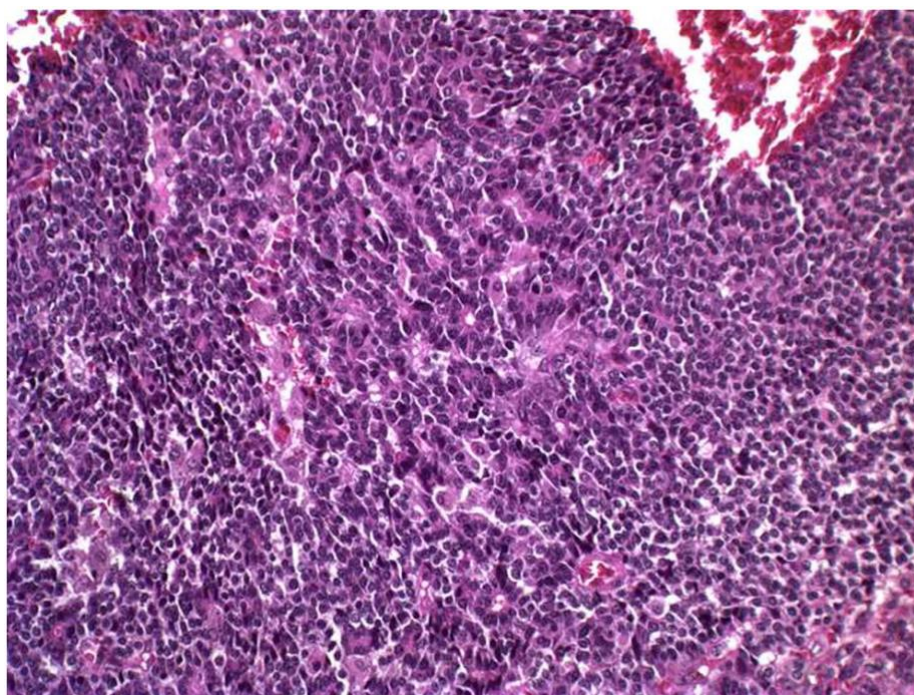
U každého typu buněčných linií se podmínky kultivace značně liší, ale prostředí, ve kterém kultivace probíhá by se vždy mělo skládat z vhodné kultivační nádoby s obsahem substrátu či média, které jsou zdrojem živin (aminokyseliny, sacharidy, vitamíny, minerály), hormonů a růstových faktorů. Médium také reguluje fyzikálně chemické prostředí (pH, osmotický tlak).

Platí, že pro většinu savčích buněčných linií je ideální hodnota pH 7,4 a mezi různými buněčnými typy je variabilita velmi malá. Teplotní optimum pro buněčnou kulturu závisí do určité míry na tělesné teplotě hostitele, ze kterého byly linie izolovány. Převážná část lidských a savčích buněk je pro optimální růst udržována při teplotě 36 °C až 37 °C.

K pasážování adherentních buněk by mělo dojít, když jsou buňky v logaritmické fázi růst. Fyziologické buňky přestanou růst, pokud dosáhnou konfluence (kontaktní inhibice), transformované buňky mohou pokračovat v proliferaci i po dosažení konfluence, ale dochází ke zhoršení asi po dvou zdvojnásobení počtu (*Cell Culture Basics – Handbook*).

1.5.4 Buněčná linie HepG2

Buněčná linie HepG2 původně pochází z roku 1979 a byla založena Barbarou Knowlesovou a jejími kolegy. Tato linie však byla mylně označována za hepatocelulární karcinom (*Aden et al., 1979*). V repozitáři ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) je vedena jako lidská buněčná linie pocházející z jaterní tkáně 15letého bílého muže s dobře diferencovaným hepatocelulárním karcinomem. HepG2 je dle histopatologického zhodnocení klasickým příkladem epiteliálního hepatoblastomu, buňky nádoru jsou malé a špatně diferencované hepatoblasty, které tvoří malé tubuly a mají tak podobu embryonálních jater (*López-Terrada et al., 2009*).



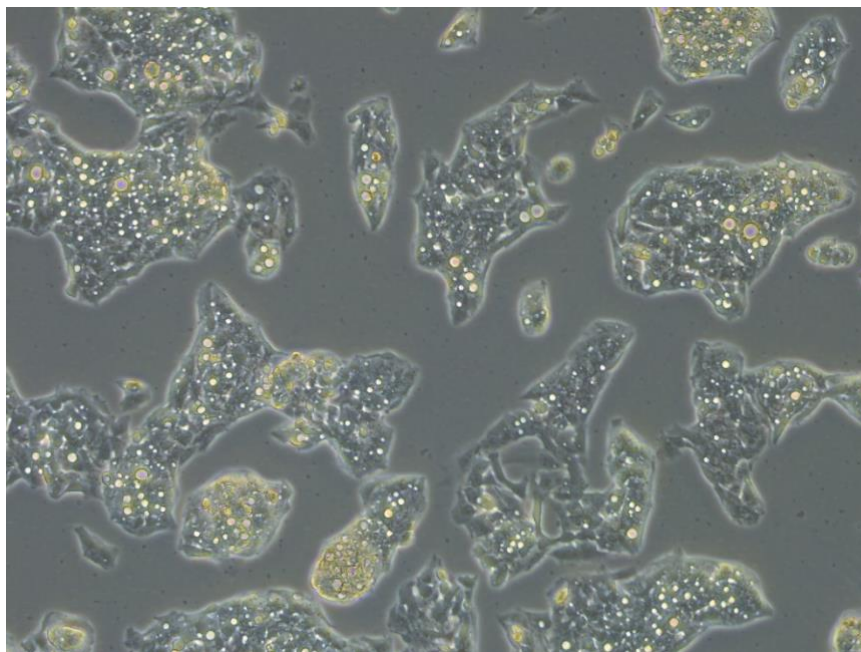
Obr. 9: Původní resekční vzorek nádoru buněk HepG2 – hematoxylin-eosin, zvětšení 250x, (*López-Terrada et al., 2009*).

Buněčná linie HepG2 se nejčastěji používá jako *in vitro* alternativa k primárním lidským hepatocytům ke studiu metabolismu léčiv a hepatotoxicity. Tato buněčná linie se vyznačuje téměř neomezenou životaschopností, stabilním fenotypem, snadnou manipulací a vysokou dostupností. Nedostatkem je ale snížení některých metabolických aktivit ve srovnání s fyziologickými hepatocyty.

Jedná se o adherentní linii s vysokou rychlostí proliferace a tvoří charakteristické shluky nebo ostrůvky a lze je stimulovat růstovým hormonem (*Donato et al., 2014*).

Tyto non-tumorogenní buňky mají vysokou rychlost proliferace, epitelu podobnou morfologii a jsou schopny konat mnoho diferencovaných jaterních funkcí, jako je např. metabolismus lipoproteinů, syntéza žlučových kyselin a glykogenu, inzulinová signalizace nebo syntéza a sekrece plazmatických proteinů jako je např. transferin, fibrinogen, plazminogen nebo albumin (*Knowles et al., 1980*). Nevýhodou ale je, že exprese enzymů a transportérů, které metabolizují léky je omezená.

Buňky HepG2 také exprimují širokou škálu enzymů jako je P450 (CYP), katalázu, peroxidázu, cytochrom P450 reduktázu, glutathion-S-transferázu (GST) nebo N-acetyl transferázu (*Donato et al., 2014*).



Obr. 10: Buněčná linie HepG2, zvětšení 100x (vlastní zdroj).

1.5.5 Buněčná linie A549

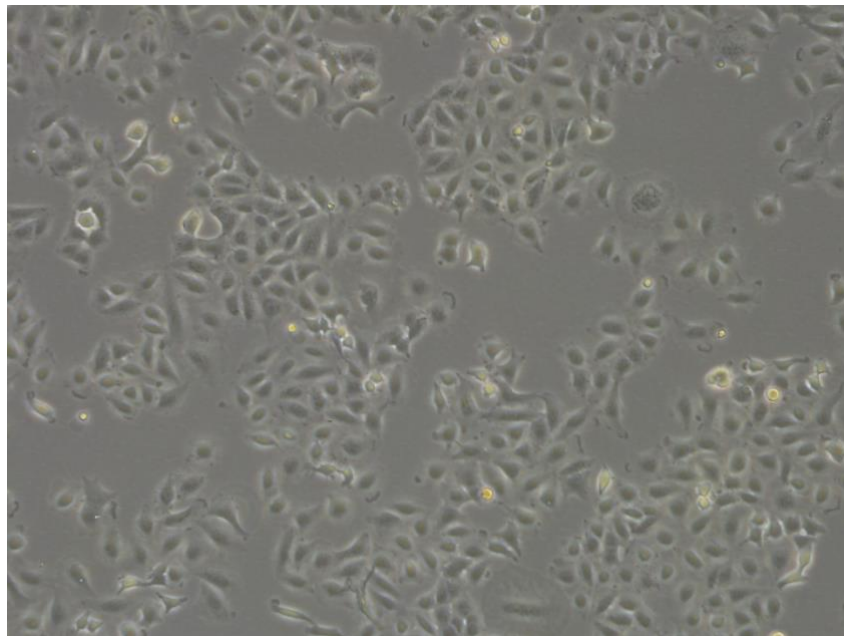
Buněčná kultura A549 je označení pro hypotriploidní alveolární bazální epitelální buňky a patří mezi nejběžněji používané buněčné linie lidského nemalobuněčného karcinomu plic pro výzkum (*Jiang et al., 2010*). Buňky byly

izolovány z lidského karcinomu alveolárních buněk 58letého muže v roce 1972 (Giard *et al.*, 1973), úzce se shodovaly s fenotypem alveolárních buněk II typu a také mají společných mnoho vlastností a charakteristik s alveolárními epiteliálními buňkami včetně lamelárních tělísek (Lieber *et al.*, 1976).

Buňky A549 rostou konfluentně v jedné vrstvě přilnuté ke dnu kultivační nádoby s charakteristickou morfologií (Heijink *et al.*, 2010). Jsou také schopny produkovat lecitin a obsahují nenasycené mastné kyseliny, které jsou důležité pro udržování fosfolipidů membrány (Giard *et al.*, 1973).

Jednou z klíčových vlastností buněk *in vivo* je produkce povrchově aktivní látky, tedy povrchově aktivních lipidů neboli plicního surfaktantu (Lieber *et al.*, 1976), který hraje roli v imunitní obraně a produkci komplementu (Strunk *et al.*, 1988). Proto je tato buněčná linie využívána ke studiu rakoviny a respiračního výzkumu nebo také k vývoji léčiv (Cooper *et al.*, 2016).

Generační doba těchto buněk je přibližně 22 hodin (Changa *et al.*, 2011) a ke kultivaci lze použít základní kultivační médium s přídavkem fetálního bovinního séra a dalších suplementů v prostředí s 5 % CO₂ při 37 °C (Foster *et al.*, 1998).



Obr. 11: Buněčná linie A549, zvětšení 100x (vlastní zdroj).

2 CÍLE PRÁCE

- 1) Analyzovat viabilitu buněčné linie HepG2 pomocí WST-1 assay po expozici SCFA různých koncentrací.
- 2) Detekovat změny mitochondriální respirace nádorové buněčné linie HepG2 po expozici SCFA různých koncentrací.
- 3) Detekovat změny mitochondriální respirace nádorové buněčné linie A549 po expozici SCFA různých koncentrací.
- 4) Porovnat změny a rozdíly v metabolismu mitochondrií nádorových linií.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a použité pomůcky

- Automatické pipety FinnpiPETTE® (Thermo Fisher Scientific)
- Automatický pipetor accu-jet® pro (BRAND, Německo)
- CO₂ inkubátor (Panasonic, Schoeller Instruments s.r.o., Japonsko)
- Dewarova nádoba na tekutý dusík LS750 (Worthington Industries)
- Invertovaný mikroskop Leica DMI1 (Leica Microsystems, Německo)
- Krycí sklíčka (Hirschmann Laborgeräte, Německo)
- Kultivační lahve a další plastové pomůcky pro kultivaci buněčných linií (SARSTEDT AG & Co KG, Německo)
- Laminární box (Schoeller Instruments s.r.o.)
- Lednice s mrazákem (Liebherr, Německo)
- Manuální počítadlo buněk (Carl Roth, Německo)
- Mikrotitrační destička pro buněčné kultury Seahorse XF96 (Agilent Technologies, USA)
- Mikrotitrační destička Nunclon (Thermo Fisher Scientific, Německo)
- Počítací komůrka Neubauer (Assistent, Německo)
- Vodní lázeň Julabo TW12
- Laboratorní odsávací přístroj (Gilson, USA)
- Magnetické míchadlo s ohřevem RH basic 2 (IKA, Německo)
- Laboratorní váha
- Multifunkční modulární reader INFINITE M200 (TECAN, Švýcarsko)
- pH metr (inoLab)
- Seahorse analyzátor SFe 96 (Agilent Technologies, USA)

3.2 Chemikálie

- Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, Německo)
- D-(+)-Glucose solution (Sigma-Aldrich, USA)
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco|Thermo Fisher Scientific)
- DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (Gibco|Thermo Fisher Scientific)
- Ethanol 70%
- FBS – fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamin (PAN-Biotech, Německo)
- MEM Non-essential Amino Acid Solution (Sigma-Aldrich, USA)
 - L-alanin (0,89 g/l)
 - L-asparagin (1,5 g/l)
 - kyselina L-asparagová (1,33 g/l)
 - kyselina L-glutamová (1,47 g/l)
 - glycin (0,75 g/l), L-prolin (1,15 g/l)
 - L-serin (1,05 g/l)
- Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich, USA)
Složení: Earlova sůl, L-glutamin, NaHCO₃, fenolová červeň
- Penicillin-Streptomycin (PAN-Biotech, Německo)
 - Penicilin 10 000 jednotek
 - Streptomycin 10 mg/ml
- Savo
- Butyrát sodný 98 % (Sigma-Aldrich, USA)
- Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsin (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina valerová ≥ 99,0 % (Sigma-Aldrich, USA)

3.3 Příprava kultivačních médií

3.3.1 Příprava základního kultivačního média

Pro kultivaci buněčných linií HepG2 a A549 jsme použili stejné kultivační médium MEM (Minimum Essential Medium Eagle) s příslušnými suplementy.

Postup:

Pro kultivaci buněk jsme dle potřeby připravovali 600 ml kultivačního média dle Tab. I do zásobní sterilní lahve. Takto připravené médium bylo rozpipetováno do 50 ml označených sterilních tub, dále uchováváno v lednici při teplotě 4 °C a používáno dle potřeby, vždy vytemperované ve vodní lázni na teplotu 37 °C.

Tab. I: Složky a jejich koncentrace v kultivačním médiu.

Složka	Množství	Koncentrace
Minimum Essential Medium Eagle	522 ml	-
Fetální bovinní sérum	60 ml	10 %
Penicillin-Streptomycin	6 ml	1 %
Non-essential Amino Acid Solution	6 ml	1 %
Pyruvát sodný	6 ml	1 %

3.3.2 Příprava kultivačního média pro WST-1 assay

Pro WST-1 assay jsme vždy připravovali médium čerstvé dle Tab II. Bylo používáno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bez glukózy, glutaminu, fenolové červeně a pyruvátu. Ze zásobních roztoků glutaminu (200 mM), glukózy (450 g/l), aminokyselin (200 mM) a pyruvátu (200 mM) jsme přidali příslušné množství k DMEM. Pro jedno měření WST-1 assay bylo vždy potřeba 27 ml média, které jsme poté napipetovali do mikrotitrační destičky.

Tab. II: Složky a koncentrace média pro WST-1 assay.

Složka	Množství	Koncentrace
Dulbecco's Modified Eagle Medium	26 130 µl	-
D-(+)-Glucose solution	60 µl	1 g/l
Non-essential Amino Acid Solution	270 µl	1 %
Pyruvát sodný	270 µl	1 %
L-Glutamin	270 µl	1 %

3.4 Rozmražení buněk

Buněčné linie jsou uchovávány v prostředí kapalného dusíku při -196 °C v Dewarových nádobách, ze kterých se v případě potřeby mohou vyjmout a rozmrazit. Buňky jsou zmrazeny v médiu obsahující DMSO (dimethylsulfoxid), který je pro buňky toxický. Proto je třeba po rozmrazení postupovat velmi rychle.

Postup:

Médium pro kultivaci buněk vytemperujeme ve vodní lázni na 37 °C a připravíme si sterilní kultivační láhev o velikosti 75 cm². Do lahve napipetujeme 15 ml teplého média a necháme ji připravenou v laminárním boxu. Poté vyjmeme buňky z tekutého dusíku a rozmrazujeme ve vodní lázni přibližně 3 minuty. Pro urychlení lze mikroskopickou průběžně promíchávat. Rozpuštěnou suspenzi buněk co nejrychleji přeneseme do vytemperovaného média v lahvi a jemně promícháme. Médium s buňkami můžeme zkontrolovat pod mikroskopem a poté vložíme do termostatu (37 °C, 5 % CO₂). Následující den vyměníme médium v lahvích za čerstvé a po dosažení konfluence lze buňky dále pasážovat.

3.5 Pasážování buněčných linií

Buňky pasážujeme po dosažení konfluence a dle potřeby. Používáme vytemperovaná média a další roztoky na 37 °C, vždy pasážujeme za sterilních podmínek v laminárním boxu.

Postup:

Po zapnutí vodní lázně necháme vytemperovat dostatečné množství kultivačního média, PBS a trypsinu. Kultivační lahev s buňkami zkontrolujeme pod mikroskopem a po zhodnocení konfluence můžeme pasážovat. Odsajeme staré médium a k buňkám přidáme PBS, poté odsajeme. Tento postup zopakujeme celkem třikrát. Po promytí buněk pomocí PBS napipetujeme trypsin, množství odpovídá velikosti lahve, a promícháme. Do lahve o velikosti 75 cm² přidáváme 2 ml trypsinu, do lahve o velikosti 25 cm² pipetujeme 666 µl trypsinu. Opatrně buňky s trypsinem promýváme, pro urychlení lze buněčnou vrstvu trypsinem polévat pomocí pipety. Zkontrolujeme v mikroskopu, zda se většina buněk oddělila ode dna lahve.

Poté přidáme do lahve dostatečné množství média, aby se zastavila enzymatická aktivita trypsinu. Opět záleží na velikosti lahve, do 75 cm² velké lahve přidáme 8 ml kultivačního média a do 25 cm² velké lahve pipetujeme 3 ml média. Buněčnou suspenzi z lahve přeneseme do předem přichystané sterilní falkony.

3.5.1 Počítání buněk a nasazení

Buňky počítáme při jejich pasážování ze vzniklé buněčné suspenze. Používáme Neubauerovu počítací komůrku a trypanovou modř.

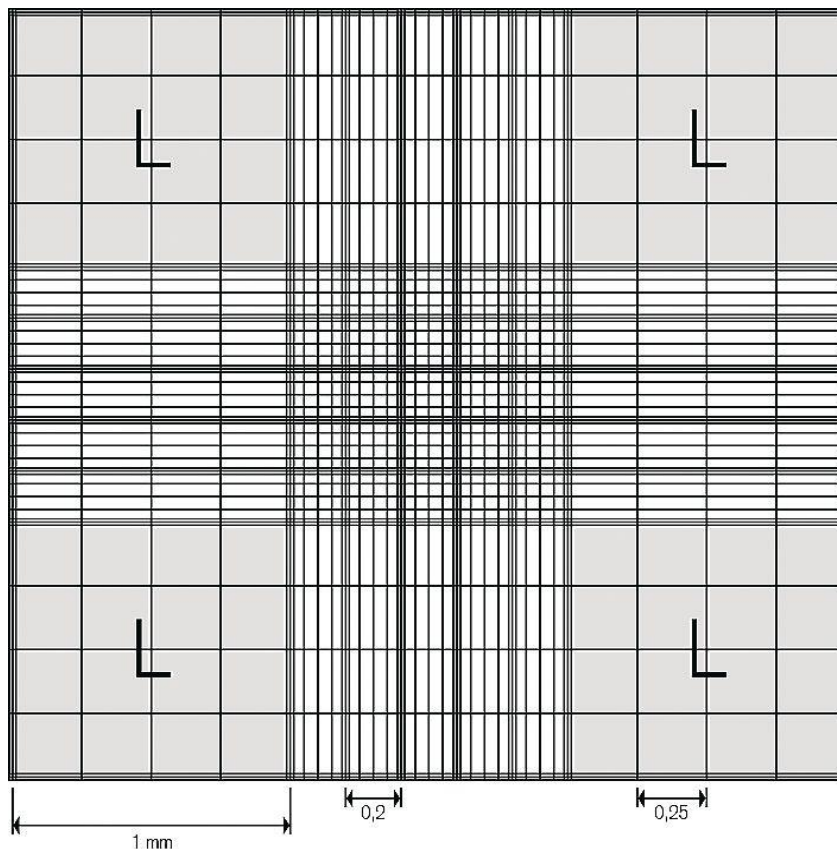
Postup:

Z buněčné suspenze odebereme 50 µl do mikrozkuřavky a přidáme 50 µl trypanové modři. Z tohoto roztoku odpipetujeme 20 µl do Neubauerovy komůrky a počítáme buňky ve čtyřech velkých čtvercích (značených L), na každé straně komůrky dva čtverce, dle pravidla dvou stran. Počet buněk poté dosazujeme do vzorce.

Výslednou koncentraci buněk poté přepočítáme na požadovaný objem buněčné suspenze podle toho, kolik buněk potřebujeme nasadit. Do malé lahve o objemu 25 cm² jsme nasazovali dle potřeby 500 000 – 800 000 buněk/ml, do velkých o objemu 75 cm² 10⁶ – 2,5 × 10⁶ buněk.

Poté do nových kultivačních lahví napipetujeme daný objem čistého kultivačního média tak, aby výsledný objem i s buněčnou suspenzí tvořil v lahvi

velikosti 75 cm² 13 ml a v menší lahvi o velikosti 25 cm² 5 ml. Popsanou a označenou lahev s novou suspenzí zkontrolujeme pod mikroskopem a vložíme do termostatu. Zbylou buněčnou suspenzí můžeme využít na experimenty.



Obr. 12: Nákres struktury Neubauerovy komůrky (firma Brand).

3.6 Příprava zásobních roztoků SCFA

Požadovaná koncentrace výsledných zásobních roztoků je 1 M. Po přípravě bylo upraveno pH roztoků na 7,4. Dále byly roztoky sterilně přefiltrovány a rozpipetovány na menší objemy. Poté byly roztoky skladovány v mrazáku a dle potřeby byly rozmrazeny a použity.

a) *Butyrát sodný*

Navážka butyrátu sodného byla 11,009 g ($M = 110,09$ g/mol). Toto množství bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Výsledná koncentrace roztoku byla 1 M.

b) Valerát sodný

Objem 0,239 ml kyseliny valerové o koncentraci 9,102 M ($\rho = 0,939$ g/ml; $M = 102,13$ ml) bylo doplněno destilovanou vodou do 20 ml. Výsledná koncentrace roztoku byla 1 M.

3.7 WST-1 assay

Jedná se o rychlý a jednoduchý test buněčné proliferace, buněčné životaschopnosti a cytotoxicity. Tato metoda využívá WST-1 reagensii, která je vhodná ke spektrofotometrické detekci růstu a chemosenzitivity v buněčných kulturách. Obecně lze tuto metodu aplikovat na měření buněčné proliferace v reakci na živiny, cytokiny či růstové faktory, stanovení fyziologických mediátorů a protilátek, které inhibují růst a k analýze cytotoxických a cytostatických sloučenin.

K analýze WST-1 byla použita buněčná linie HepG2 a byl sledován účinek různých koncentrací SCFA na tyto buňky.

Princip:

Princip tohoto testu je založen na štěpení tetrazoliové soli (WST-1 reagensie) na tmavě červený formazan pomocí buněčných mitochondriálních dehydrogenáz. Platí, že čím vyšší je expanze počtu životaschopnost buněk, vyšší je také aktivita těchto enzymů a může se tvořit více formazanového barviva. Kvantifikace formazanu produkovaného metabolicky aktivními buňkami je poté provedena pomocí jamkového spektrofotometru.

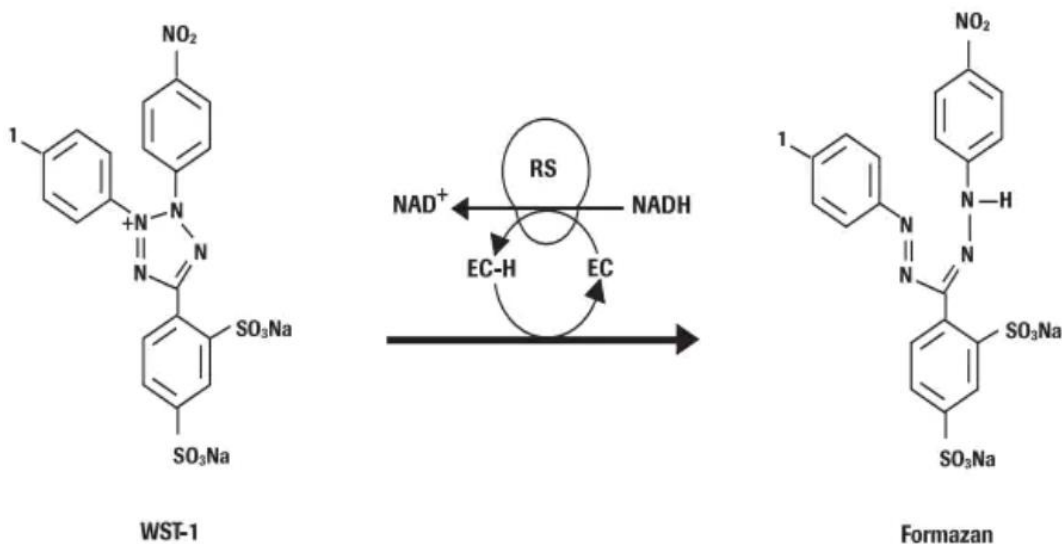
Postup:

Do 96jamkové mikrotitrační destičky napipetujeme buněčnou suspenzi ošetřenou základním kultivačním médiem MEM tak, aby byl počet buněk ≈ 5000 na jamku. Ze zásobních roztoků SCFA připravíme roztoky acetátu sodného, propionátu sodného, butyrátu sodného a kyseliny valerové a tyto roztoky přidáme do mikrotitrační destičky k buňkám dle předem připraveného plánu. Výsledná koncentrace roztoků SCFA v jednotlivých jamkách je 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM a 10 mM. Jako kontrolní jamky použijeme buňky ošetřené kultivačním

médium s PBS. Konečný objem v jedné jamce je 100 μ l. Takto připravenou destičku necháme inkubovat 24 hod při 37 $^{\circ}$ C a 5 % CO_2 .

Po uplynutí inkubační doby odsajeme médium MEM se SCFA z jamek a přidáme k buňkám připravené bezbarvé médium pro WST-1 assay, do každé jamky pipetujeme 100 μ l a přidáme ještě 10 μ l reagentie WST-1 do každé jamky. Pro kontrolu absorbance pozadí použijeme čisté médium s reagentií WST-1. Destičku necháme 4 hodiny inkubovat při 37 $^{\circ}$ C a 5 % CO_2 .

Poté můžeme pomocí spektrofotometru INFINITE M200 vytemperovaného na 37 $^{\circ}$ C měřit absorbanci v každé jamce destičky při 450 nm, přičemž referenční vlnová délka je 600 nm. Po ukončení měření můžeme destičky zlikvidovat.



Obr. 13: Princip reakce při WST-1 analýze: přeměna WST-1 reagentie na formazan (Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability).

3.8 Analýza mitochondriálního metabolismu

K měření parametrů mitochondriálního metabolismu jsme použili analyzátor Agilent Seahorse XFe 96, který měří klíčové indikátory mitochondriální respirace a glykolýzy, jako je ECAR a OCR živých buněk v 96jamkových destičkách. OCR je ukazatelem mitochondriálního dýchání a ECAR je z velké části výsledkem glykolýzy. Tyto analýzy poskytují pohled na metabolickou buněčnou funkci v kultivovaných buňkách a *ex vivo* vzorcích na systémové úrovni.

Analyzátor je schopen detekovat odpovědi buněk na substráty, inhibitory a ostatní látky v reálném čase pomocí čtyřkanálového injekčního systému a udržuje teplotu prostředí na 37 °C.

3.8.1 Analýza účinku SCFA na buněčné linie HepG2 a A549

Buněčná kultura HepG2 byla pro tyto experimenty ošetřována kultivačním médiem MEM s danými suplementy a kultivována v prostředí 5 % CO₂ při 37 °C.

Buněčná kultura A549 byla pro tyto experimenty ošetřována kultivačním médiem MEM s danými suplementy a kultivována v prostředí 5 % CO₂ při 37 °C.

3.8.1.1 Akutní expozice SCFA

Pro tento experiment byly buňky nasazeny do mikrotitrační destičky pro buněčné kultury Seahorse XF96 vždy v koncentraci ≈20 000 buněk na jamku, a to bez předchozího ošetření SCFA. Bylo použito připravené kultivační médium MEM se suplementy. Buňky byly v mikrotitrační destičce inkubovány 24 hod při 37 °C a 5 % CO₂ a poté proběhla analýza. K injekci daných SCFA o koncentracích 1 mM došlo až těsně před měřením mitochondriálního metabolismu na přístroji Agilent Seahorse XFe 96.

3.8.1.2 Krátkodobá expozice SCFA

K tomuto experimentu byly buňky nasazeny do mikrotitrační destičky pro buněčné kultury Seahorse XF96 v koncentraci $\approx 20\,000$ buněk na jamku. K buňkám byly přidány roztoky SCFA tak, aby jejich výsledná koncentrace byla: $1\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$, $1\ \text{mM}$ a $10\ \text{mM}$. Takto byly buňky inkubovány 24 hodin při $37\ ^\circ\text{C}$ a $5\ \%$ CO_2 a poté proběhla analýza mitochondriálního metabolismu na přístroji přístroji Agilent Seahorse XFe 96.

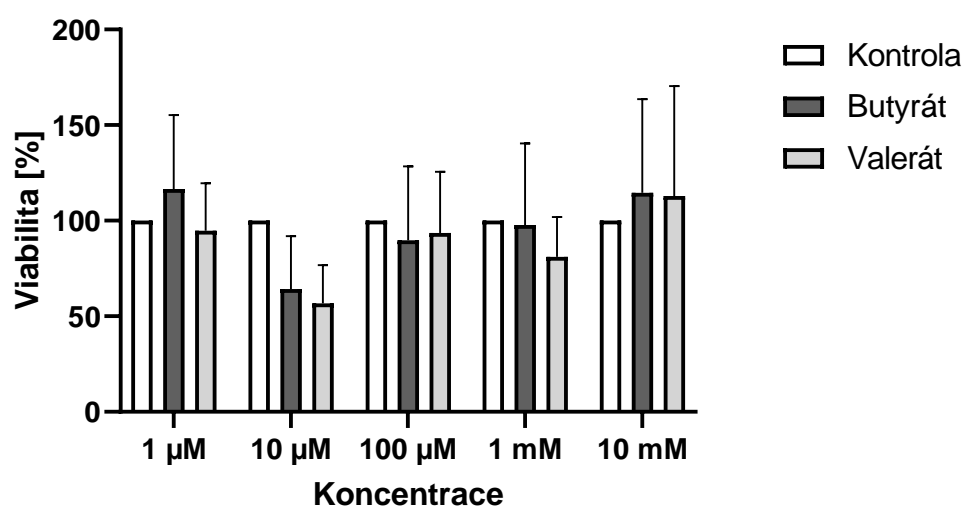
3.8.1.3 Dlouhodobá expozice SCFA

K tomuto experimentu byly buňky kultivovány v prostředí jednotlivých SCFA (butyrát, valerát) v samostatných kultivačních lahvích. Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu MEM se suplementy a SCFA o výsledných koncentracích $1\ \text{mM}$. Dlouhodobá expozice probíhala 7 dnů, přičemž byly buňky celou dobu kultivovány v médiu s přidavkem SCFA. Poté jsme buňky přenesli do mikrotitračních destiček pro buněčné kultury Seahorse XF96 v koncentraci $\approx 20\,000$ buněk na jamku. Buňky v mikrotitračních destičkách byly opět uchovávány v prostředí kultivačního média MEM a $1\ \text{mM}$ SCFA. Následovala analýza mitochondriálního metabolismu na přístroji přístroji Agilent Seahorse XFe 96.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení viability buněk po expozici SCFA

Použili jsme WST-1 assay se spektrofotometrickým vyhodnocením ke stanovení buněčné viability. Test byl proveden na buněčné linii HepG2 po 24hodinové expozici SCFA. Byly použity roztoky butyrátu a valerátu o koncentracích 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM a 10 mM.



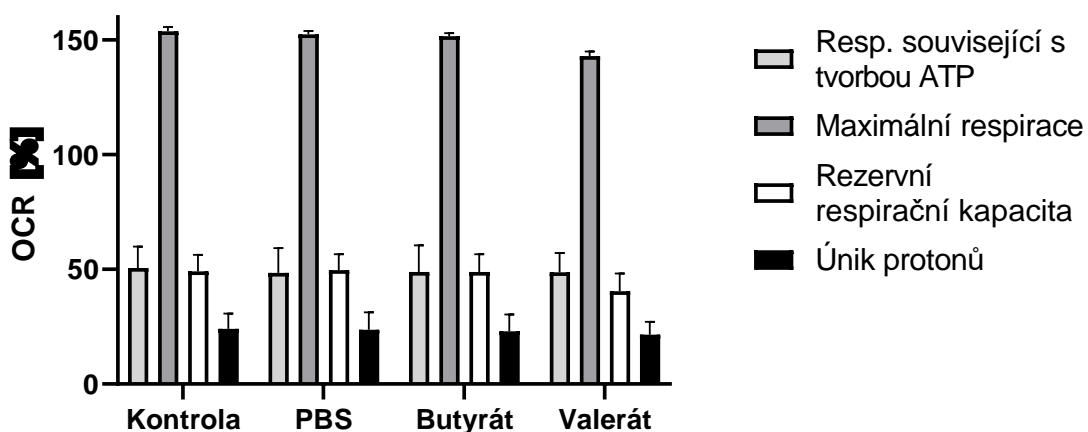
Graf 1: Odlišnosti v buněčné viabilitě po expozici SCFA, buněčná linie HepG2, kontrola = 100; kontrola ošetřena PBS; průměr \pm SD; WST-1 assay (450 nm).

V grafu 1 můžeme vidět působení butyrátu a valerátu na buněčnou linii HepG2 po 24hodinové inkubaci při 37 °C a 5 % CO₂. Z grafu je patrné zejména působení koncentrace 10 μM obou uvedených SCFA, u této koncentrace je viabilita buněk oproti kontrole výrazněji snížena. U buněk ošetřených butyrátem došlo k poklesu o 35,83 % \pm 27,8 a u valerátu o 43,33 % \pm 20.

4.2 Stanovení mitochondriální respirace po expozici SCFA

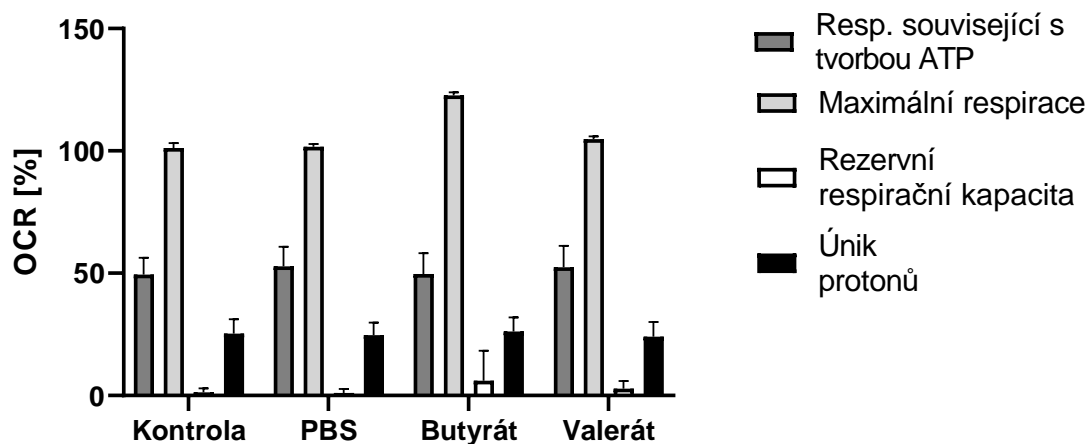
4.2.1 Akutní expozice

Buněčné linie HepG2 a A549 byly inkubovány bez jakéhokoliv ošetření SCFA v kultivačním médiu MEM se suplementy. Po nasazení buněk do mikrotitrační destičky pro buněčné kultury Seahorse XF96 a po 24hodinové inkubaci při 37 °C a 5 % CO₂ byla sledována mitochondriální respirace po injekci SCFA v koncentraci 1 mM k buňkám v analyzátoru Agilent Seahorse XFe 96.



Graf 2: Akutní expozice SCFA (koncentrace 1 mM), kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr ± SD; buněčná linie HepG2.

V grafu 2 můžeme vidět mitochondriální respiraci u buněčné linie HepG2 po akutní expozici jednotlivými SCFA. Signifikantní výsledky vykazuje parametr maximální respirace. U buněk ošetřených valerátem dochází ke snížení hodnot oproti kontrole, a to o 10,69 % ± 1,9. Další parametry nevykazují signifikantní výsledky.



Graf 3: Akutní expozice SCFA (koncentrace 1 mM), kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr ± SD; buněčná linie A549.

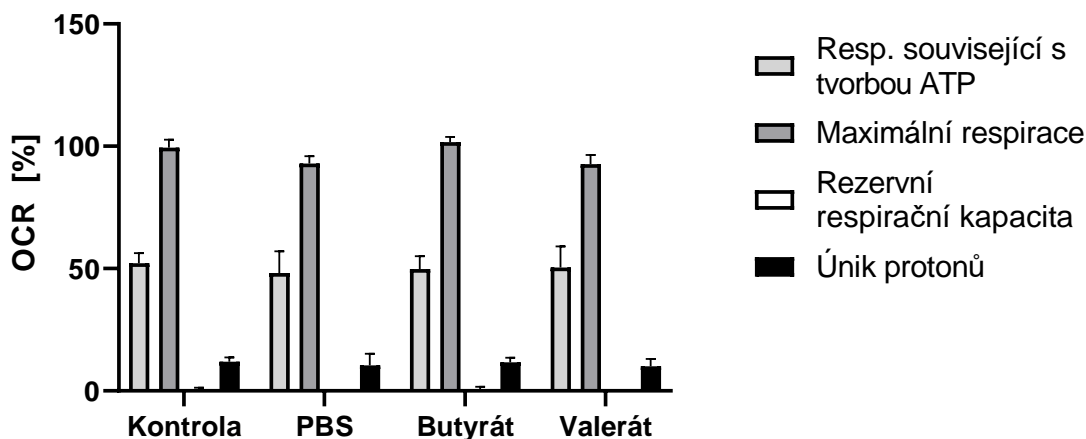
Analýza mitochondriální respirace buněčné linie A549 po akutní expozici SCFA ukázala (Graf 3) signifikantní výsledky parametru maximální respirace u obou použitých SCFA. Ke zvýšení maximální respirace oproti kontrole došlo u buněk ošetřených butyrátem o 21,42 % ± 1,3 a valerátem o 3,59 % ± 1,2.

Porovnání analýzy obou buněčných linií HepG2 a A549 ukazuje, že obě buněčné linie mají signifikantní výsledky parametru maximální respirace. U buněk A549 došlo k výraznějšímu vzrůstu těchto hodnot, naopak u buněk HepG2 došlo ke snížení parametru u buněk ošetřených valerátem.

4.2.2 Krátkodobá expozice

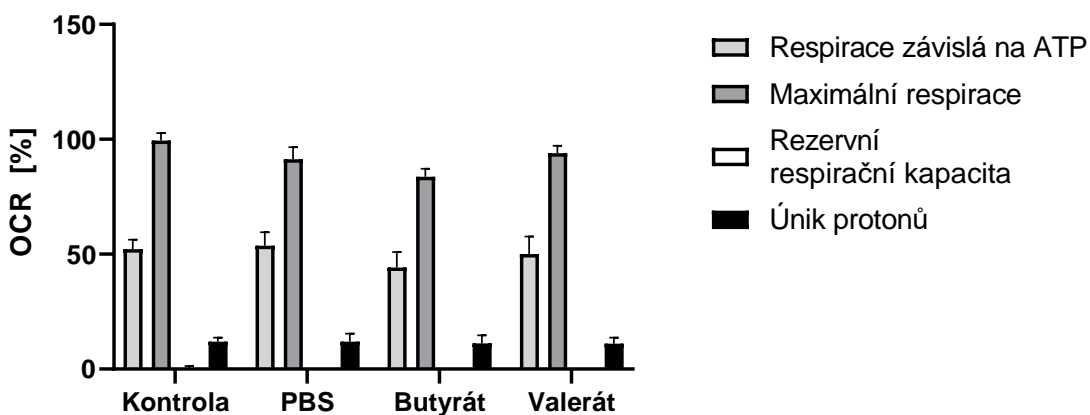
Buněčné kultury HepG2 a A549 byly ke krátkodobé expozici nasazeny do mikrotitračních destiček pro buněčné kultury Seahorse XF96 a inkubovány v prostředí 5 % CO₂ a 37 °C po dobu 24 hodin. Inkubace probíhala v kulturačním médiu MEM se suplementy a přidanými SCFA o koncentracích 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM a 10 mM.

4.2.2.1 Buněčná linie HepG2



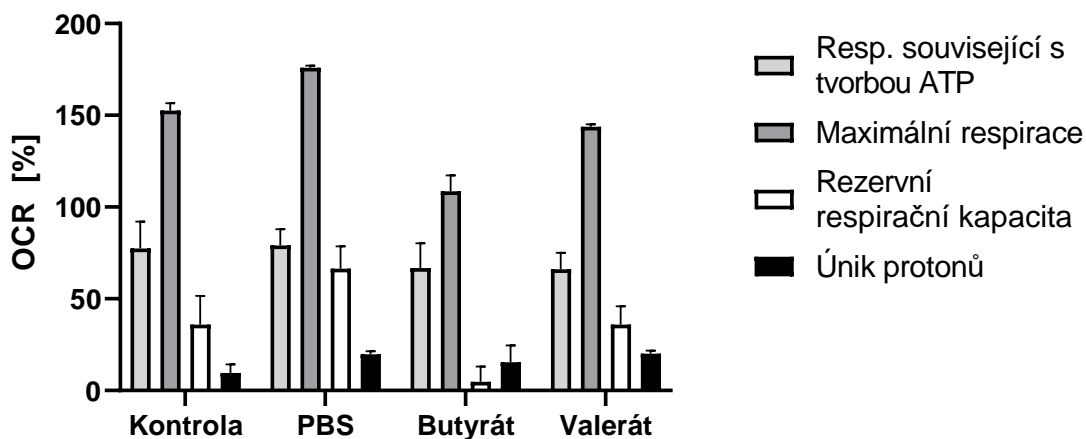
Graf 4: Krátkodobá expozice SCFA o koncentraci 1 μM , kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr \pm SD; buněčná linie HepG2.

V grafu 4 můžeme vidět mitochondriální respiraci u buněk HepG2 po krátkodobé expozici 1 μM SCFA. Tato expozice nevykazuje žádné signifikantní výsledky.



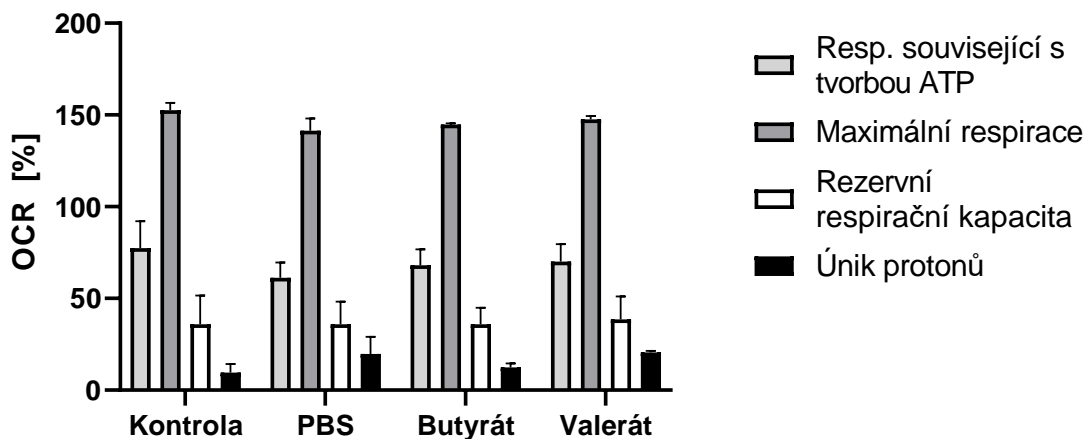
Graf 5: Krátkodobá expozice SCFA o koncentraci 10 μM , kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr \pm SD; buněčná linie HepG2.

U této koncentrace SCFA (Graf 5) byl zjištěn signifikantní rozdíl hodnot u parametru maximální respirace. U buněk ošetřených butyrátem došlo ke snížení maximální respirace o 15,72 % \pm 3,4 oproti kontrole.



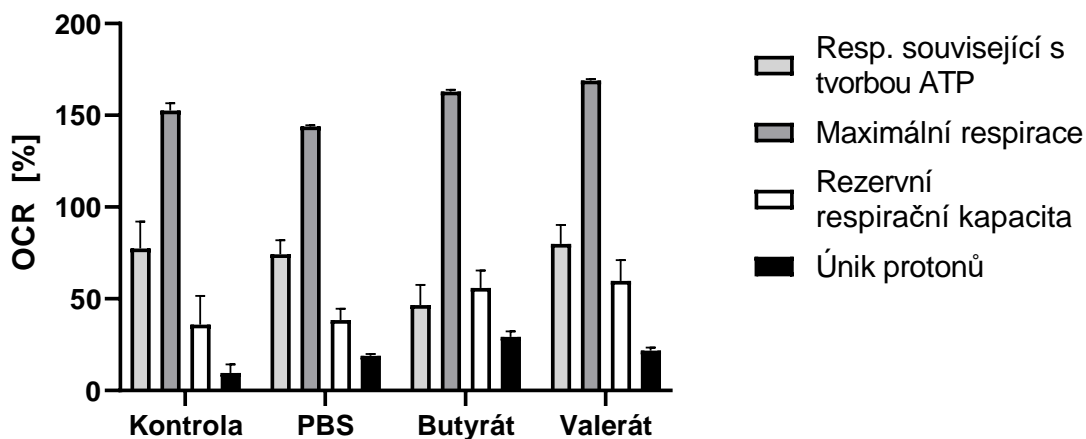
Graf 6: Krátkodobá expozice SCFA o koncentraci 100 µM, kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr ± SD; buněčná linie HepG2.

V grafu 6 můžeme vidět působení koncentrace SCFA 100 µM na buněčnou linii HepG2. Signifikantní výsledky byly zjištěny u parametru maximální respirace, u buněk ošetřených butyrátem došlo k poklesu hodnot oproti kontrole o 43,88 % ± 8,5. Dále jsou sníženy hodnoty u rezervní respirační kapacity opět u buněk ošetřených butyrátem o 31,18 % ± 8,3.



Graf 7: Krátkodobá expozice SCFA o koncentraci 1 mM, kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr ± SD; buněčná linie HepG2.

Působení 1 mM koncentrace SCFA na buněčnou linii HepG2 neprokázalo žádné signifikantní výsledky.

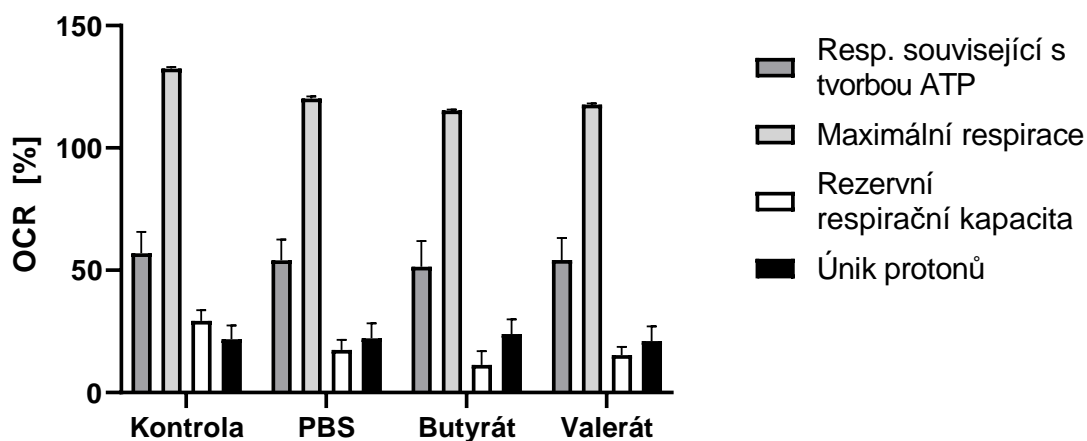


Graf 8: Krátkodobá expozice SCFA o koncentraci 10 mM, kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr \pm SD; buněčná linie HepG2.

V Grafu 8 můžeme vidět signifikantní rozdíly v respiraci související s ATP u butyrátu, došlo ke snížení oproti kontrole o $30,8 \% \pm 10,9$. Dále u maximální respirace došlo ke zvýšení hodnot u butyrátu o $10,44 \% \pm 0,9$ a valerátu o $16,46 \% \pm 0,7$. U parametru únik protonů došlo ke signifikantnímu zvýšení hodnot u butyrátu o $19,7 \% \pm 3$.

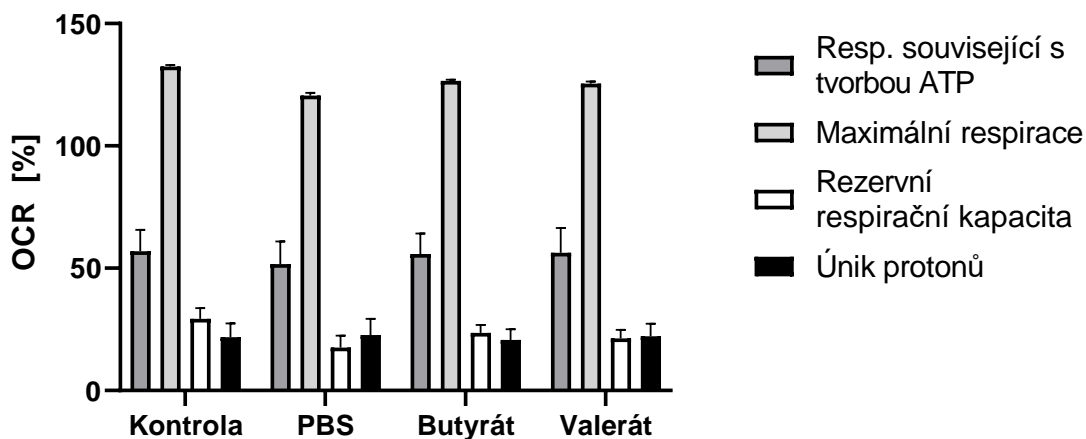
U krátkodobé expozice buněk HepG2 je nejvíce ovlivněným parametrem maximální respirace. U koncentrací 10 μ M, 100 μ M dochází k signifikantnímu snížení maximální respirace u buněk ošetřených butyrátem. Naopak u koncentrace 10 mM dochází ke zvýšení hodnot maximální respirace, ale také rezervní respirační kapacity i úniku protonů.

4.2.2.2 Buněčná linie A549



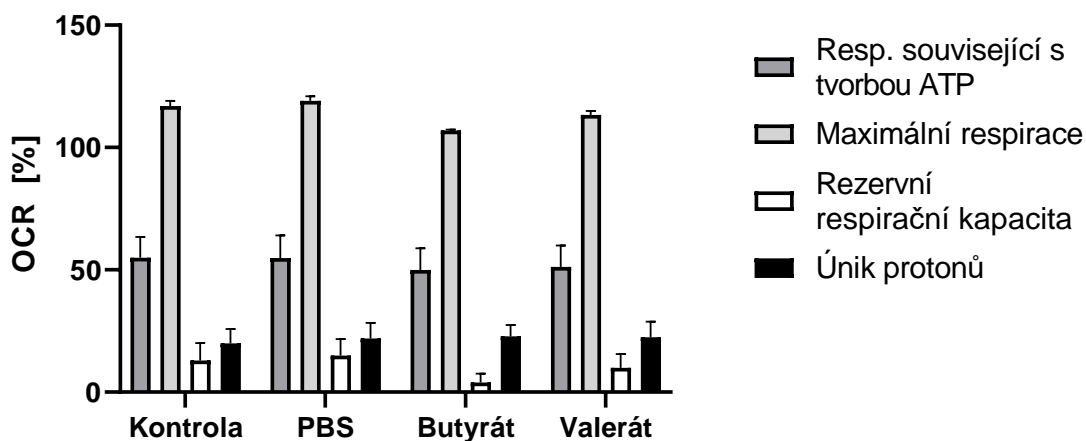
Graf 9: Krátkodobá expozice SCFA o koncentraci 1 μM , kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přídávkem PBS; průměr \pm SD; buněčná linie A549.

V Grafu 9 lze vidět signifikantní rozdíly oproti kontrole u parametru maximální respirace u obou SCFA. Došlo ke snížení hodnot u buněk ošetřených butyrátem o 17,16 % \pm 0,5 a valerátem o 14,71 % \pm 0,5 oproti kontrole. Dále došlo k signifikantnímu snížení hodnot u rezervní respirační kapacity u buněk ošetřených butyrátem o 18,04 % \pm 5,6 a valerátem o 14,08 % \pm 3,4.



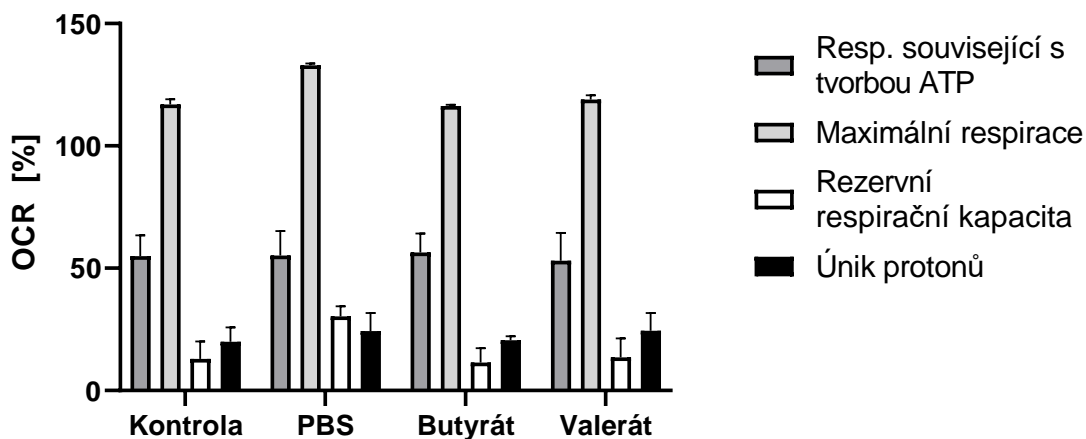
Graf 10: Krátkodobá expozice SCFA o koncentraci 10 μM , kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr \pm SD; buněčná linie A549.

U této koncentrace SCFA (Graf 10) bylo naměřeno signifikantní snížení hodnot parametru maximální respirační kapacita u buněk ošetřených butyrátem o 5,87 % \pm 0,6 a valerátem o 6,93 \pm 0,8.



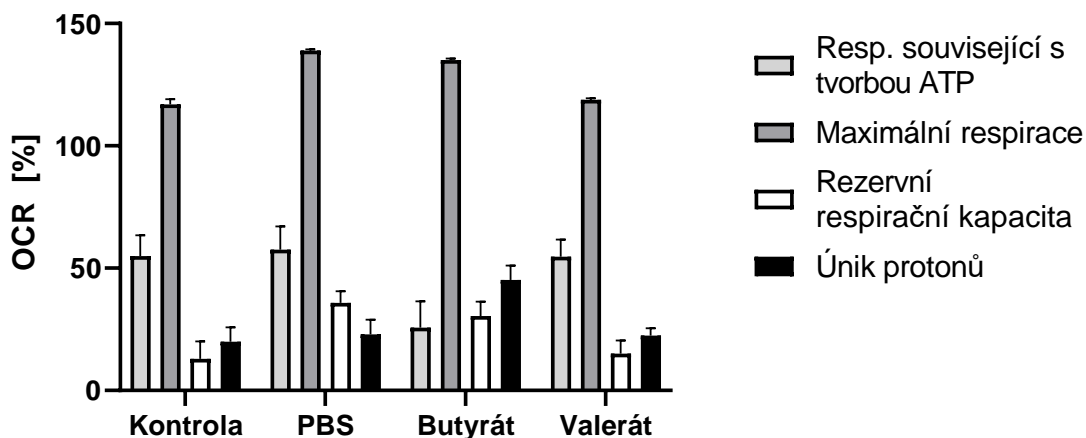
Graf 11: Krátkodobá expozice SCFA o koncentraci 100 μM , kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr \pm SD; buněčná linie A549.

V Grafu 11 můžeme vidět signifikantní pokles hodnot parametru maximální respirace u buněk ošetřených butyrátem o 9,97 % \pm 0,35 oproti kontrole.



Graf 12: Krátkodobá expozice SCFA o koncentraci 1 mM, kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr \pm SD; buněčná linie A549.

U této koncentrace (Graf 12) SCFA nebyly naměřené žádné signifikantní změny hodnot mitochondriální respirace.



Graf 13: Krátkodobá expozice SCFA o koncentraci 10 mM, kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr \pm SD; buněčná linie A549.

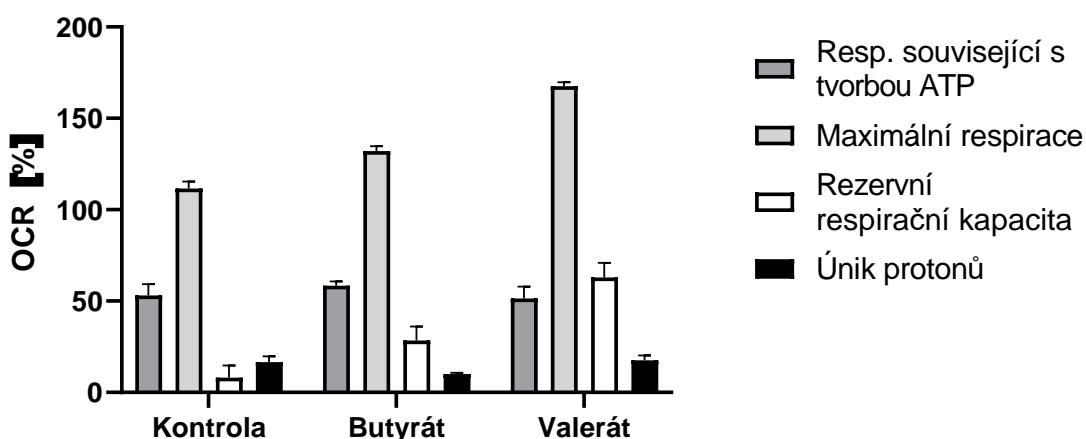
V grafu 13 lze pozorovat signifikantní snížení respirace související s tvorbou ATP oproti kontrole u buněk ošetřených butyrátem o 29,26 % \pm 10,9. Dále byly naměřeny signifikantní rozdíly oproti kontrole u maximální respirace.

Došlo ke zvýšení u butyrátu o 18,22 % ± 0,6. U butyrátu došlo ke zvýšení také rezervní respirační kapacity o 17,51 % ± 6 a úniku protonů o 25,22 % ± 5,88.

U buněčné linie A549 dochází především ke změnám parametru maximální respirace. U koncentrací 1 μM, 10 μM, 100 μM dochází ke snížení tohoto parametru. Naopak u koncentrace 10 mM se hodnoty maximální respirace oproti kontrole zvýšily. Ke zvýšení hodnot u této koncentrace došlo také u parametru únik protonů a rezervní respirační kapacita u buněk ošetřených butyrátem.

4.2.3 Dlouhodobá expozice

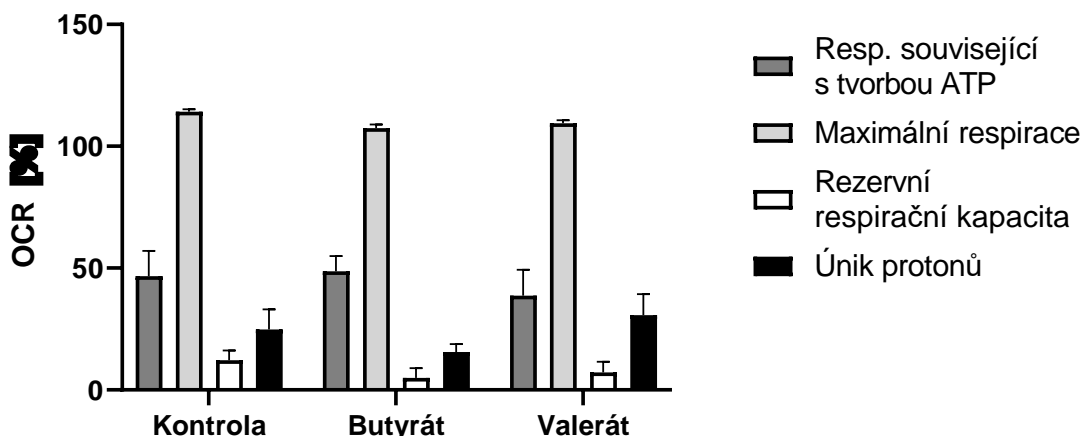
Pro dlouhodobou kultivaci byly buňky HepG2 a A549 kultivovány 7 dnů při 37 °C a 5 % CO₂ v kultivačním médiu MEM se suplementy a jednotlivými SCFA o koncentraci 1 mM. Poté proběhla analýza mitochondriální respirace v analyzátoru Agilent Seahorse XFe 96.



Graf 14: Dlouhodobá expozice SCFA (koncentrace 1 mM), kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr ± SD; buněčná linie HepG2.

U buněk HepG2 byly naměřeny signifikantní rozdíly maximální respirace oproti kontrole. Došlo ke zvýšení parametru u buněk ošetřených butyrátem o 20,44 % ± 2,8 a valerátem o 55,88 % ± 2,21. Dále jsou zvýšeny hodnoty rezervní respirační kapacity opět u buněk ošetřených butyrátem o 20,31 % ± 7,64 a

valerátem o 54,84 % ± 8,1. Další signifikantní změny byly naměřeny u parametru únik protonů, u buněk ošetřených butyrátem došlo ke snížení hodnot oproti kontrole o 6,53 % ± 0,65.



Graf 15: Dlouhodobá expozice SCFA (koncentrace 1 mM), kontrolní buňky ničím neošetřeny; u druhé kontroly buňky ošetřeny přidavkem PBS; průměr ± SD; buněčná linie A549.

U buněčné linie A549 po dlouhodobé expozici (Graf 15) lze pozorovat signifikantní změny oproti kontrole v hodnotách maximální respirace, kdy došlo u buněk ošetřených butyrátem ke snížení o 6,67 % ± 1,5 a u buněk ošetřených valerátem ke snížení o 4,71 % ± 1,3. Dále vykazuje signifikantní změny oproti kontrole parametr respirace související s tvorbou ATP, kdy došlo u buněk ošetřených valerátem ke snížení hodnot oproti kontrole o 8,04 % ± 10,6.

Dlouhodobá expozice SCFA vykazuje nejvíce signifikantních výsledků u obou buněčných linií. U buněk A549 došlo ke snížení maximální respirace u obou SCFA. Také respirace související s tvorbou ATP se u valerátu snížila. Buňky HepG2 vykazuje nejvíce markantní rozdíly oproti kontrole u parametru maximální respirace a rezervní respirační kapacity u obou SCFA. Naopak ke snížení hodnot došlo u parametru únik protonů u butyrátu.

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí testu jednosměrná ANOVA.

5 DISKUZE

V rámci této diplomové práce byl testován vliv butyrátu a valerátu na viabilitu nádorové buněčné linie HepG2 a dále ovlivnění mitochondriální respirace nádorových buněčných linií HepG2 a A549. SCFA jsou v poslední době vnímány jako příznivé pro lidské zdraví díky svým metabolickým a signalizačním vlastnostem (*Miyamoto et al., 2016*).

Slibné účinky na terapii různých onemocnění, včetně diabetu, obezity, zánětlivých střevních onemocnění a kolorektálního karcinomu nebo i neurologických poruch jsou prokázané u acetátu, propionátu i butyrátu (*Canani et al., 2011*). V mnoha studiích jsou proto testovány účinky SCFA na buňky tlustého střeva či na buňky kolorektálního karcinomu (*Tian et al., 2018; Lee et al., 2017; Liu et al., 2021*).

V lidské periferní krvi se SCFA obvykle vyskytují jen ve velmi nízkých hladinách. Koncentrace acetátu v plazmě se pohybuje v rozmezí 50 – 100 $\mu\text{mol/l}$, zatímco koncentrace propionátu a butyrátu je přibližně 0,5 – 10 $\mu\text{mol/l}$ (*Fernandes et al., 2011; Privadarshini et al., 2014*). K experimentům, které zkoumají účinky SCFA, jsou však používány především vyšší koncentrace, nejčastěji mezi 0,1 – 10 mM (*Kim et al., 2019; Tayyeb et al., 2020; Rose et al., 2018*). K našim analýzám byly použity koncentrace SCFA: 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM a 10 mM.

Nejprve byla provedena WST-1 assay s buněčnou linií HepG2 ke zjištění viability buněk po expozici SCFA. K tomuto účelu jsme nasadili buňky do 96jamkové mikrotitrační destičky v denzitě $\approx 5\,000$ buněk na jamku, dle protokolu k metodě WST-1 assay. V ostatních studiích byla WST-1 assay s buněčnou linií HepG2 nejčastěji prováděna při buněčné denzitě $\approx 5\,000$ – 10 000 buněk na jamku (*Rodenak-Kladniew et al., 2018; Al-Malki et al., 2018; Gok et al., 2016*).

Naše výsledky buněčné viability po ošetření buněk HepG2 oběma SCFA o různých koncentracích ukazují, že působení koncentrací 1 μM mírně zvyšuje buněčnou viabilitu oproti kontrole. K nejvyššímu zvýšení dochází u buněk ošetřených butyrátem. Naopak k výraznému snížení viability o 30 – 45 % došlo při použití koncentrace 10 μM a to u obou použitých SCFA. K méně signifikantnímu snížení došlo i u ostatních koncentrací (100 μM , 1 mM, 10 mM).

Ve studii v buňkami HTC, což jsou buňky hepatocelulárního karcinomu potkana, ošetřených 1 – 7 mM butyrátem bylo uvedeno, že při koncentraci 5 mM došlo k inhibici růstu buněk. Při nižších koncentracích butyrátu nedošlo k žádné změně viability, avšak vyšší koncentrace měly za následek buněčnou toxicitu způsobenou butyrátem (*Gupta et al., 1994*).

V další studii bylo prokázáno, že butyrát významně inhibuje buněčnou proliferaci buněčných linií SMMC-7721, HepG2, MHCC97H and MHCC97L ve vyšších koncentracích. Nižší koncentrace butyrátu (0,5 mM a 1 mM) neměly na buňky inhibiční efekt (*Wang et al., 2013*).

Naše výsledky viability HepG2 ošetřených butyrátem ukázaly, že nejnižší viabilita byla dosažena při koncentraci 10 μ M. Při hodnotách koncentrací 100 μ M, 1 mM a 10 mM byla viabilita oproti kontrole snížena. Naopak u koncentrace 1 μ M byla viabilita oproti kontrole mírně zvýšena.

Protirakovinné účinky byly také pozorovány u valerátu, který byl testován v 5 koncentracích (0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM). U buněčné linie HepG2 a dalších nádorových linií došlo ke snížení viability (*Han et al., 2020*). Naše výsledky ukazují snížení viability buněk HepG2 po ošetření valerátem u koncentrace 10 μ M.

Dále jsme analyzovali mitochondriální respiraci dvou nádorových buněčných linií HepG2 a A549 po expozici SCFA v různě dlouhých časových rozmezích. Byly použity SCFA v koncentraci 1 mM, která je využívána i v jiných studiích se SCFA (*Hu et al., 2020*). Po akutní expozici nádorových buněk SCFA nebylo zjištěno žádné výraznější ovlivnění mitochondriální respirace.

Během krátkodobé expozice nádorových buněk byly použity různé koncentrace SCFA (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM a 10 mM), inkubace probíhala 24 hodin v prostředí 5 % CO₂ a 37 °C. Poté byla měřena mitochondriální respirace pomocí analyzátoru Agilent Seahorse XFe 96

Butyrát je velmi často studován pro své účinky na metabolismus nádorových buněk. Naše výsledky krátkodobé expozice ukázaly ovlivnění mitochondriální respirace obou buněčných linií HepG2 i A549. U buněčné linie HepG2 butyrát o koncentraci 10 mM zvýšil maximální respiraci, naopak došlo ke snížení tohoto parametru u koncentrací 10 μ M a výrazně u 100 μ M. U koncentrace 10 mM také došlo ke zvýšení hodnot úniku protonů.

U buněčné linie A549 došlo vlivem butyrátu ke snížení maximální respirace u koncentrací 1 μM , 10 μM a 100 μM . Ke zvýšení maximální respirace, rezervní respirační kapacity a úniku protonů došlo u koncentrace 10 mM, naopak tato koncentrace ukázala snížení respirace související s tvorbou ATP.

Dle studie vlivu 0,5 mM butyrátu na buněčnou linii HepG2 dochází ke zlepšení funkce těchto buněk ovlivněním mitochondrií. Tato modulace mitochondriálního metabolismu je nejvýraznější po 24hodinové inkubaci (*Zhao et al.2020*). Jiná studie provedená na LCL buňkách prokázala, že butyrát je schopen modulovat mitochondriální funkci po expozici 24 a 48 hodin, přičemž mezi těmito časy nebyl rozdíl v účinku butyrátu na buňky. Při koncentraci butyrátu 100 μM došlo ke zvýšení parametrů mitochondriální respirace, přičemž při koncentraci butyrátu 1 mM došlo ke snížení daných parametrů (*Rose et al., 2018*).

Dlouhodobá expozice nádorových buněk HepG2 a A549 mastnými kyselinami prokázala nejvíce signifikantní výsledky. Byla použita koncentrace SCFA 1 mM, přičemž obě buněčné linie byly inkubovány s danými SCFA v prostředí 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 7 dnů. Výsledky této expozice u buněčné linie HepG2 prokázaly významnou modulaci mitochondriální respirace oběma testovanými SCFA. V porovnání s kontrolou došlo ke zvýšení maximální respirace a rezervní respirační kapacity u obou použitých SCFA. Naopak ke snížení došlo u parametru únik protonů u buněk ošetřených butyrátem.

Při porovnání buněčných linií HepG2 a A549 lze vidět, že větší vliv na mitochondriální metabolismus mají SCFA právě u buněčné linie HepG2, a to nejvíce na parametry maximální respirace, rezervní respirační kapacita a únik protonů. U buněk A549 došlo naopak ke snížení parametru maximální respirace u obou použitých SCFA.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zkoumat vlivy butyrátu a valerátu v různých koncentracích na nádorové linie HepG2 a A549. Přestože zatím neexistují žádné přesvědčivé důkazy, klinické výzkumy naznačují, že SCFA by mohly sloužit jako slibné farmakologické látky pro prevenci či léčbu různých zdravotních problémů.

K těmto účelům jsme využili metodu WST-1 assay ke stanovení viability buněk HepG2 po expozici SCFA a také metodu Cell Mito Stress Test, kde jsme pomocí analyzátoru Agilent Seahorse XFe 96. Při studiu viability buněk HepG2 bylo zjištěno působení SCFA na buňky ve smyslu snížení jejich viability, a to nejvíce při koncentraci 10 μ M. Výjimkou je koncentrace SCFA 1 μ M, která jejich viabilitu zvyšuje.

Dále z našich výsledků vyplývá, že působením SCFA dochází k modulaci mitochondriální respirace a vlivu na metabolismus nádorových buněk především z hlediska dlouhodobého působení. U krátkodobé expozice jsme zjistili působení především butyrátu v koncentraci 10 mM. Závěrem lze říci, že SCFA v závislosti na koncentraci ovlivňují určitým způsobem mitochondriální respiraci a metabolismus, výsledky se však liší dle použitých buněčných linií.

7 ZDROJE

- [1] Aden D. P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowles B. B.: *Controlled synthesis of HbsAg in differentiated liver carcinoma-derived cell line*, *Natura* 282: 615 – 617, 1979.
- [2] Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit – User Guide [online, cit. 2022-04-27]. Dostupné z: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf.
- [3] Ainscow E. K., Brand M. D.: *Top-down control analysis of ATP turnover, glycolysis and oxidative phosphorylation in rat hepatocytes*, *European Journal of Biochemistry*, 263 (3): 671 – 685, 2001.
- [4] Al-Malki A. L., Razvi S. S., Mohammed F. A., Zamzami M. A. et al.: *Synthesis and in vitro antitumor activity of novel acylspermidine derivative N-(4-aminobutyl)-N-(3-aminopropyl)-8-hydroxy-dodecanamide (AAHD) against HepG2 cells*, *Bioorganic Chemistry*, 88, 2019.
- [5] Ang Z., Ding J. L.: *GPR41 and GPR43 in obesity and inflammation – Protective or survey*, *Frontiers in Immunology*, 7 (28), 2016.
- [6] Beek Ch. M., Dejong C. H. C., Troost F. J., Masclee A. A. M. et al.: *Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing*, *Nutrition Reviews*, 75 (4): 286 – 305, 2017.
- [7] Bhatti J. S., Pahwa, P., Reddy P. H., Bhatti G. K.: *Chapter 2 – Impaired mitochondrial bioenergetics and signaling pathways: an overview*, *Clinical Bioenergetics*, 61 – 79, 2021.
- [8] Bottje W. G.: *Oxidative metabolism and efficiency: the balancing act of mitochondria*, *Poultry Science*, 98: 4223 – 4230, 2019.
- [9] Brand M. D., Nicholls D. G.: *Assessing mitochondrial dysfunction in cells*, *Biochemical Journal*, 435 (2): 297 – 312, 2011.
- [10] Buurman R., Sandbothe M., Schlegelberger B., Skawran B.: *HDAC inhibition activates the apoptosome via Apaf1 upregulation in hepatocellular carcinoma*, *European Journal of Medical Research*, 21 (1), 2016.

- [11] Canani R. B., Costanzo M. D., Leone L., Pedata M. et al.: *Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases*, World Journal Gastroenterology, 17 (12): 1519 – 1528, 2011.
- [12] Cell Culture Basics - Handbook, GIBCO [online, cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>
- [13] Cooper J. R., Abdullatif M. B., Burnett E., Kempell K. E: *Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype*, PloS One, 11 (10), 2016.
- [14] Deroover L., Boets E., Tie Y., Vandermeulen G. et al.: *Quantification of Plasma or Serum Short-Chain Fatty Acids: Choosing the Correct Blood Tube*, Journal of Nutritional Health & Food Science, 2017.
- [15] Donato M. T., Tolosa L., Gómez-Lechón M. J.: *Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 cells*, Protocols in Vitro Hepatocyte Research, 77 – 93, 2014.
- [16] Dranka B. P., Benavides G. A., Diers A. R., Giordano S. et al.: *Assesing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolis profiling*, Free Radical Biology and Medicine, 51 (9): 1621 – 1635, 2011.
- [17] Duvic M., Talpur R., Ni X., Zhang Ch. et al.: *Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)*, Blood, 109 (1): 31 – 39, 2007.
- [18] Fattahi Y., Heidari H. R., Khosroushahi A. Y.: *Review of short-chain fatty acids effects on the immune system and cancer*, Food Bioscience, 38, 2020.
- [19] Fengqin S., Li Y., Han R., Fu A. et al.: *Valerian and valeric acid inhibit growth of breast cancer cells possibly by mediating epigenetic modifications*, Scientific Reports, 11, 2021.
- [20] Fernandes J., Vogt J., Wolever T. M.: *Inulin increases short-term markers for colonic fermentation similarly in healthy and hyperinsulinaemic humans*, European Journal of clinical nutrition, 65 (12): 1279 – 1286, 2011.
- [21] Foster K. A., Oster C. G., Mayer M. M., Avery M. L. et al.: *Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism*, Experimental Cell Research, 243: 359 – 366, 1998.

- [22] Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook – 2nd Edition. SigmaAldrich Co. 2001 [online, cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <http://www.bristol.ac.uk/safety/media/gn/ecacc-handbook-gn.pdf>
- [23] Gasmi A., Peana M., Arshad M., Butnariu M. et al.: *Krebs cycle: activators, inhibitors and their roles in the modulation of carcinogenesis*, Archives of Toxicology, 95: 1161 – 1178, 2021.
- [24] Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P. et al.: *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*, Journal of the National Cancer Institute, 51 (5): 1417 – 1423, 1973.
- [25] Gok M., Zeybek N. D., Bodur E.: *Butyrylcholinesterase expression is regulated by fatty acids in HepG2 cells*, Chemico-Biological Interactions, 259 (B): 276 – 281, 2016.
- [26] González-Bosch C., Boorman E., Zunszain P. A., Mann G. E.: *Short-chain fatty acids as modulators of redox signaling in health and disease*, Redox Biology, 47, 2021.
- [27] Gupta S., Alpini G., Wmuru R. P., Hurston E. et al.: *Butyrate Synchronization of Hepatocytes: Modulation of Cycling and Cell Cycle Regulated Gene Expression*, Growth Factors, 10 (3): 171 – 180.
- [28] Han R., Nusbaum O., Chen X., Zhu Y.: *Valeric Acid Suppresses Liver Cancer Development by Acting as Novel HDAC Inhibitor*, Molecular Therapy Oncolytics, 19: 8 – 18, 2020.
- [29] Harris R. A., Johnson J. S.: *Glycolysis Overview*, Reference Module in Biomedical Sciences, 2019.
- [30] Heijink I. H., Brandenburg S. M., Noordhoek J. A., Postma D. S. et al.: *Characterisation of cell adhesion in airway epithelial cell types using electric cell-substrate impedance sensing*, European Respiratory Journal, 35: 894 – 903, 2010.
- [31] Hill B. G., Benavides G. A., Lancaster J. R Jr., Ballinger S. et al.: *Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy*, Biological Chemistry, 393 (12): 1485 – 1512, 2012.
- [32] Hill B. G., Dranka B. P., Zou L., Chatham J. C. et al.: *Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress*

- induced by 4-hydroxynonenal*, *Biochemical Journal*, 424 (1): 99 – 107, 2009.
- [33] Houten S. M., Violante S., Ventura F. V., Wanders R. J. A.: *The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorder*, *Annual Review of Physiology*, 78: 23 – 44, 2016.
- [34] Hu S., Kuwabara R., Haan B. J., Smink A. M. et al.: *Acetate and Butyrate Improve β -cell Metabolism and Mitochondrial Respiration under Oxidative Stress*, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (4), 2020.
- [35] Chambers E. S., Preston T., Frost G., Morrison D. J.: *Role of gut microbiota-generated short-chain fatty acids in metabolic and cardiovascular health*, *current Nutrition Reports*, 7: 198 – 206, 2018.
- [36] Changa Y., Yanga S. T., Liua J. H., Donga E. et al.: *In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells*, *Toxicology Letters*, 200: 201 – 210, 2011.
- [37] Iovine J., Claypool S., Alder N.: *Mitochondrial compartmentalization: emerging themes in structure and function*, *Trends in Biochemical Sciences*, 46 (11): 902 – 917, 2021.
- [38] Jiang R. D., Shen H., Piao Y. J.: *The morphometrical analysis on the ultrastructure of A549 cells*, *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 51 (4): 663 – 667, 2010.
- [39] Kachan K.: *Kultivace vrstvy buněk v mikrofluidním systému*, VUT, Ústav biomedicínského inženýrství, bakalářská práce, 2017.
- [40] Kalyanaraman B., Cheng G., Hardy M., Ouari O. et al.: *A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds*, *Redox Biology*, 14: 316 – 327, 2018.
- [41] Kim K., Kwon O., Ryu T. Y., Jung Ch. et al.: *Propionate of microbiota metabolite induces cell apoptosis and cell cycle arrest in lung cancer*, *Molecular Medicine Reports*, 20: 1569 – 1574, 2019.
- [42] Knowles B. B., Howe C. C., Aden D. P.: *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*, *Science*, 209: 497 – 499, 1980.

- [43] Krejčíř R., Valík D., Vojtěšek B.: *Využití mitochondriálních procesů v cílené terapii nádorových onemocnění*, *Klinická Onkologie*, 2: 2S14 – 2S20, 2018.
- [44] Kumari A.: *Citric Acid Cycle*, *Sweet Biochemistry*, 7 – 10, 2018.
- [45] Kumar V., Abbas A. K., Aster J. C.: *Neoplasia*, *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7: 267 – 338.
- [46] Lee Ch., Kim B. G., Kim J. H., Chun J. et al.: *Soidum Butyrate inhibits the NF-kappa B Signaling pathway nad histone deacetylatyon, and attenuates experimental colitis in an IL-10 independent manner*, *International Immunopharmacology*, 51: 47 – 56, 2017.
- [47] Lemasters J. J.: *Metabolic implication of non-electrogenic ATP/ADP Exchange in cancer cells: A mechanistic basis for the Warburg effect*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1862 (7), 2021.
- [48] Liberti M. V., Locasale J. W.: *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?*, *Trends in Biochemical Sciences*, 41 (3): 211 – 218, 2016.
- [49] Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W. et al.: *A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells*, *Journal of the National Cancer Institute*, 17 (1): 62 – 70, 1976.
- [50] Liu H., Bian Z., Zhang Q., Xiao Z. et al.: *Sodium butyrate inhibits colitis associated colorectal cancer through preventing the gut microbiota dysbiosis and reducing the exxpression of NLRP3 and IL-1 β* , *Journal of Functional Foods*, 87, 2021.
- [51] Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P. et al.: *Molecular Cell Biology*, 4th ed.: W. H. Freeman, New York, 2000.
- [52] López-Terrada D., Cheung S. W., Finegol M. J., Knowles B. B.: *HepG2 is heplatoblastoma-derived cell line*, *Human Pathology*, 40 (10): 1512 – 1515, 2009.
- [53] McBrearty N., Arzumanyan A., Bichenkov E., Merali S. et al.: *Short chain fatty acids delay the development of hepatocellular carcinoma in HBx transgenic mice*, *Neoplasia*, 23 (5): 529 – 538, 2021.
- [54] Mirzaei R., Afaghi A., Babakhani S., Sohrabi M. R. et al.: *Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 2021.

- [55] Miyamoto J., Hasegawa S., Kasubuchi M., Ichimura A. et al.: *Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors*, International Journal of Molecular Sciences, 17 (4), 2016.
- [56] Moniri N. H., Farah Q.: *Short-chain fatty acid G protein-coupled receptors in colon cancer*, Biochemical Pharmacology, 186, 2021.
- [57] Mourokh L., Vittadello M.: *Physical model of the proton-pumping Q-cycle in respiratory and photosynthetic electron transport chain*, Chemical Physics, 530, 2020.
- [58] Nicholls D. G., Darley-USmar V. M., Wu M., Jensen P. B. et al.: *Bioenergetic Profile Experiment using C2C12 Myoblast Cells*, Journal of Visualized Experiments, 46: 2511, 2010.
- [59] Nolfi-Donagan D., Braganza A., Shiva S.: *Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement*, Redox Biology, 37, 2020.
- [60] Porporato P. E., Filigheddu N., Pedro J. M., Kroemer G. Et al.: *Mitochondrial metabolism and cancer*, Cell Research, 28: 265 – 280, 2018.
- [61] Priyadarshini M., Thomas A., Reisetter A. C., Scholtens D. M. et al.: *Maternal short-chain fatty acids are associated with metabolic parameters in mothers and newborn*, Translational Research, 164 (2): 153 – 157, 2014.
- [62] Protasoni M., Zeviani M.: *Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions*, International Journal of Molecular Sciences, 22 (2): 586, 2021.
- [63] Rodenak-Kladniew B., Castro A., Stärkel P., Saeger Ch. D. et al.: *Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells through oxidative stress generation and modulation of Ras/MAPK and Akt/mTOR pathways*, Life Science, 199: 48 – 59, 2018.
- [64] Römhild A.: *Good Manufacturing Practice Compliance in the Manufacture of Cell-Based Medicines*, Guide to Cell Therapy GxP, 107 – 175, 2016.
- [65] Rose S., Bennuri S. C., Davis J. E., Wynne R. et al.: *Butyrate enhances mitochondrial function during oxidative stress in cell lines from boys with autism*, Translational Psychiatry, 8 (42), 2018.
- [66] Scott A. M., Wolchok J. D., Old L. J.: *Antibody therapy of cancer*, Nature Reviews Cancer, 12: 278 – 287, 2012.

- [67] Segeritz Ch. P., Vallier L.: *Cell culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro*, Basic Science Methods for Clinical Researchers, 151 – 172, 2017.
- [68] Scharlau D., Borowicki A., Habermann N., Hofmann T. et al.: *Mechanism of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre*, Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 682 (1): 39 – 53, 2009.
- [69] Schönfeld P., Wojtczak L.: *Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective*, Journal of Lipid Research, 57 (6): 943 – 954, 2016.
- [70] Sivaprakasam S., Prasad P. D., Singh N.: *Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis*, Pharmacology & Therapeutics, 164: 144 – 151, 2016.
- [71] Strunk R. C., Eidlen D. M., Mason R. J.: *Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways*, Journal of Clinical Investigation, 81: 1419 – 1426, 1988.
- [72] Tang Y., Chen Y., Jiang H., Robbins G. T. et al.: *G-protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer*, International Journal of Cancer, 128 (4): 847 – 856, 2011.
- [73] Tayyeb J. Z., Popeijus H. E., Mensink R. P., Konings M. C. J. M. et al.: *Short-Chain Fatty Acids (Except Hexanoic Acid) Lower NF- κ B Transactivation, Which Rescues Inflammation-Induced Decreased Apolipoprotein A-I Transcription in HepG2 Cells*, International Journal of Molecular Sciences, 21 (14), 2020.
- [74] Thangaraju M., Carswell K. N., Prasad P. D., Ganapathy V.: *Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3*, Biochemistry Journal, 417: 379 – 389, 2009.
- [75] Thangaraju M., Cresci G. A., Liu K., Ananth S. et al.: *GPR109A is a G-protein-coupled fermentation product butyrate and functions as tumor suppressor in colon*, Cancer Research, 69 (7), 2826 – 2832, 2009.
- [76] Tian Y., Xu Q., Sun L., Ye Y. et al.: *Short fatty acids administration is protective in colitis-associated colorectal cancer development*, The Journal of Nutritional Biochemistry, 57: 103 – 109, 2018.

- [77] Torres-Hernández B. A., Valle-Mojica L. M., Ortíz J. G.: *Valerenic acid and Valeriana officinalis oextraxts delay onset of Pentylenetetrazole (PTZ)-Induced seizures in adult Danio rerio (Zebrafish)*, BMC Complementary and Alternative Medicine, 15 (1), 2015.
- [78] Vasan K., Werner M., Chandel N. S.: *Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy*, Cell Metabolism, 32 (3): 341 – 352, 2020.
- [79] Vejražka M.: *Buněčné kultury*, Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze.
- [80] Wang H. G., Huang X. D., Shen P., Li L. R. et al.: *Anticancer effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells in vitro*, International Journal of Molecular Medicine, 31 (4): 967 – 974, 2013.
- [81] Wong J. M., Souza R., Kendall C. W. C., Emam A. et al.: *Colonic health: fermentation and short chain fatty acids*, Journal of Clinical Gastroenterology, 40 (6): 235 – 243, 2006.
- [82] Wu J., Zhou Z., Hu Y., Dong S.: *Butyrate-induced GPR41 activation inhibits histone acetylation and cell growth*, Journal of Genetics and Genomics, 39: 875 – 384, 2012.
- [83] Xu Y. H., Gao Ch. L., Guo H. L., Zhang W. Q. et al.: *Sodium butyrate supplementation ameliorates diabetic inflammation in db/db mice*, Journal of Endocrinology, 238 (3): 231 – 244, 2018.
- [84] Yuksel B., Ozkan A. D., Aydin D., Betts Z.: *Evaluation of the antioxidative and genotoxic effects of sodium butyrate on breast cancer*, Saudi Journal of Biological Sciences, 29 (3): 1394 – 1401, 2022.
- [85] Zhang L., Liu Ch., Jiang Q., Jiang Q. et al.: *Butyrate in Energy Metabolism: There Is Still More to Learn*, Trends in Endocrinology and Metabolism, 32 (3): 159 – 169, 2021.
- [86] Zhao R., Jiang S., Zhang L., Yu Z.: *Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review)*, International Journal of Molecular Medicine, 44(1): 3 – 15, 2019.
- [87] Zhao T., Gu J., Zhang H., Wang Z.: *Sodium butyrate-Modulated Mitochondrial Function in High Insulin Induced HepG2 Cell Dysfunction*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020.
- [88] Zong W., Rabinowitz J., White E.: *Mitochondria and Cancer*, Molecular Cell, 61 (5): 667 – 676, 2016.