

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

VLIV HLADINY GLUKÓZY  
NA ENERGETICKÝ METABOLISMUS  
JATERNÍCH BUNĚK

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Veronika Špalková  
Vedoucí práce: Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.  
Odborný konzultant: Moustafa Elkalaf, M.B.B.Ch., Ph.D.

2023

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

EFFECT OF GLUCOSE LEVEL  
ON ENERGY METABOLISM OF LIVER  
CELLS

THESIS

Author: Bc. Veronika Špalková  
Supervisor: Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.  
Consultant: Moustafa Elkalaf, M.B.B.Ch., Ph.D.

2023

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Špalková**  
Osobní číslo: **C21466**  
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Vliv hladiny glukózy na energetický metabolismus jaterních buněk *in vitro***  
Téma práce anglicky: **Effect Of Glucose Level On Energy Metabolism Of Liver Cells *In Vitro***  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

Studie mitochondriální bioenergetiky a metabolismu hlavních mitochondriálních substrátů, zejména Krebsův cyklus a elektronový transportní řetězec. Zásady kultivace buněk a tkání *in vitro*. Přehled metabolismu glukózy v hepatocytech vzhledem ke koncentraci glukózy v okolním prostředí.

### Experimentální část:

Školení o kultivaci buněčné linie napodobující funkci hepatocytů (linie HepG2 atd.).  
Kultivace buněk v různých podmínkách a příprava vzorků.  
Popsat množení buněk a aktivitu podle fenotypů pomocí reagens WST-1.  
Srovnávání bioenergetických a glykolytických profilů různých fenotypů pomocí XFe96 Seahorse analyzátoru extracelulárního fluxu.

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: **23. prosince 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

LS.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

## **Čestné prohlášení:**

Práci s názvem Vliv hladiny glukózy na energetický metabolismus jaterních buněk jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární parametry a informace, které byly v práci použity, jsou řádně citovány a uvedeny na konci práce 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 05. 05. 2023

Bc. Špalková Veronika

### **Poděkování:**

Touto cestou bych ráda poděkovala zejména mému odbornému konzultantovi, který mě při diplomové práci vedl, panu Moustafovi Elkalafovi, M.B.B.Ch., Ph.D. Děkuji především za jeho cenné rady, odborné vedení, trpělivost a také ochotu. Dále bych mu chtěla poděkovat za čas, který mi věnoval.

Mé díky patří i ostatním, kteří se na mé práci podíleli. Děkuji zaměstnancům a Ústavu fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za odborné rady a vstřícný přístup. Rovněž bych chtěla poděkovat i kamarádovi Vojtovi Malířovi, který mi byl během experimentů pravou rukou. Děkuji i paní Mgr. Pavle Žákové, Ph. D., která byla vedoucí mé diplomové práce za Fakultu Chemicko-technologickou Univerzitu Pardubice. V neposlední řadě bych chtěla obrovsky poděkovat i své rodině, která mě po celou dobu studia aktivně podporovala a byla mi velikou oporou.

## **ANOTACE**

Vypracovaná diplomová práce spočívá v testování buněčné viability a mitochondriální bioenergetiky v závislosti na rozdílné koncentraci glukózy použitých kultivačních médií. Glukóza a s ní spojována hyperglykémie či diabetes mellitus je v dnešní době stále neprobádanou oblastí. Práce se snažila pochopit vzájemný vztah mezi glukózou a metabolickými procesy uplatňujícími se v buňce. Věříme, že by tato studie mohla vést k celkovému pochopení pozměněné mitochondriální bioenergetiky, ovlivněné zvýšenou koncentrací glukózy. Předpokládáme, že mitochondrie jsou nedílnou součástí buňky a jejich porucha vede k řadě již definovaných, ale zejména ještě i neprobádaných komplikovaných stavů a nemocí. Snažíme se zjistit, zda je mezi mitochondriální dysfunkcí a hyperglykemií přímý mechanismus účinku. Energetický metabolismus je ovlivňován řadou impulzů z vnějšího a vnitřního prostředí. Je tedy těžké aplikovat metodu, která by byla schopná akceptovat i tyto rušivé elementy.

Teoretická část práce je zaměřena na biosyntetickou organelu, která je hlavním intracelulárním producentem energie, zvanou mitochondrie. Jelikož je základem práce posuzování, zda rozdílná koncentrace glukózy ovlivňuje určitým způsobem energetický metabolismus, je v teoretické části práce věnována kapitola i glukóze a metabolickým dráhám, ve kterých se glukóza uplatňuje. V neposlední řadě je popisována i HepG2 buněčné linie, která byla důležitým předmětem zkoumání. Praktická část práce je zaměřena na testování buněčné viability a mitochondriálního metabolismu imortilizované lidské buněčné linie HepG2. Buňky byly rozděleny na dva fenotypy, které byly pěstovány na základě různých kultivačních podmínek. První fenotyp buněk byl vystaven dlouhodobým expozičním podmínkám normoglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 1 g/L. Druhý fenotyp buněk byl vystaven dlouhodobým expozičním podmínkám hyperglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 5 g/L.

### **KLÍČOVÁ SLOVA:**

Mitochondrie, bioenergetika, glukóza, hyperglykémie, normoglykémie, hepatocyty, HepG2

## **ANNOTATION**

This work focuses on testing cellular viability and mitochondrial bioenergetics in relation to two different glucose concentrations used in the culture media. The effect of glucose level and its contribution to hyperglycemia or diabetes mellitus on cellular energy metabolism is still not fully understood. The study aimed to clarify the relationship between glucose and the metabolic processes that occur in the cell in order to obtain a better overall understanding of the altered mitochondrial bioenergetics influenced by increased glucose concentration. Mitochondria are an integral part of the cell, and their dysfunction leads to a range of well-defined, but especially understudied complicated conditions and diseases. The goal is to determine whether there is a direct mechanism of action between mitochondrial dysfunction and hyperglycemia. Since energy metabolism is influenced by various signals from the external and internal environment, therefore, applying a method that can also accept these interfering elements is challenging.

The theoretical part of the thesis is focused on the biosynthetic organelle, mitochondria, which is the main intracellular energy producer. Since the basis of the work is to assess whether different glucose concentrations affect energy metabolism in a certain way, a chapter on glucose and metabolic pathways in which glucose is involved is included in the theoretical part. Finally, the HepG2 cell line, which was an important topic of investigation, is described. The practical part of the thesis focuses on testing the cellular viability and mitochondrial metabolism of the immortalised human cell line HepG2. The cells were divided into two phenotypes grown under different culture conditions. The first phenotype was exposed to a long-term normoglycemic condition, where the glucose concentration was 1 g/L. The second phenotype was exposed to a long-term hyperglycemic condition, where the glucose concentration was 5 g/L.

### **KEYWORDS:**

Mitochondria, bioenergetics, glucose, hyperglycemia, normoglycemia, hepatocytes, HepG2



# OBSAH

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>12</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH GRAFŮ .....</b>	<b>13</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>14</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>15</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>18</b>
<b>1 MITOCHONDRIE .....</b>	<b>20</b>
1.1 Struktura mitochondrií .....	20
1.2 Mitochondriální funkce .....	22
1.3 Mitochondrie a regulace buněčného metabolismu.....	24
1.3.1 Citrátový cyklus .....	26
1.3.2 Dýchací řetězec .....	28
<b>2 MITOCHONDRIÁLNÍ METABOLISMUS PŘI ONKOGENEZI .....</b>	<b>32</b>
2.1 Warburgův a Crabtree efekt .....	33
<b>3 MITOCHONDRIÁLNÍ BIOENERGETICKÝ PROFIL .....</b>	<b>35</b>
3.1 Základní respirační parametry BHI.....	35
3.1.1 Bazální respirace .....	36
3.1.2 Rezervní respirační kapacita .....	37
3.1.3 Respirace související s produkcí ATP .....	37
3.1.4 Maximální rychlost respirace.....	38
3.1.5 Nemitochondriální spotřeba kyslíku .....	38
3.1.6 Protonový únik.....	38
3.2 Základní glykolytické parametry BHI .....	39
3.2.1 Bazální PER.....	39
3.2.2 Bazální glykolýza .....	40
3.2.3 Kompenzační glykolýza .....	40
3.2.4 Reziduální acidifikace.....	40
<b>4 MITOCHONDRIÁLNÍ ANALÝZY .....</b>	<b>41</b>
4.1 Testování mitochondriální aktivity .....	42
4.1.1 WST-1 assay .....	42
4.2 Testování mitochondriální bioenergetiky .....	44
4.2.1 Cell Mito Stress Test a Glycolytic Rate Assay .....	44
<b>5 GLUKÓZA .....</b>	<b>45</b>

5.1	Transport glukózy přes buněčnou membránu .....	46
5.2	Vliv glykémie na mitochondriální metabolismus .....	48
5.3	Metabolické dráhy glukózy .....	49
5.3.1	Fosforylace glukózy .....	50
5.3.2	Glykolýza .....	50
5.3.2.1	Anaerobní glykolýza .....	52
5.3.2.2	Aerobní glykolýza .....	53
5.3.3	Glukoneogeneze .....	53
5.3.4	Glykogeneze .....	54
5.3.5	Glykogenolýza .....	54
5.3.6	Pentózová fosfátová dráha .....	55
<b>6</b>	<b>REGULACE METABOLISMU SACHARIDŮ .....</b>	<b>56</b>
6.1	Inzulin .....	56
6.2	Růstový hormon .....	56
6.3	Glukagon .....	57
6.4	Trijódtyronin a tyroxin .....	57
6.5	Glukokortikoidy .....	57
<b>7</b>	<b>BUNĚČNÁ LINIE HEPG2 .....</b>	<b>58</b>
7.1	Morfologické a biochemické vlastnosti .....	59
7.2	Kultivace HepG2 buněk .....	60
<b>8</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>62</b>
8.1	Příprava kultivačního média .....	64
8.2	Rozmrazování buněk HepG2 .....	65
8.3	Pasážování a počítání HepG2 buněk .....	66
8.3.1	HepG2 v normoglykemickém prostředí .....	68
8.3.2	HepG2 v hyperglykemickém prostředí .....	69
8.4	Použité testovací metody a analýzy .....	70
8.4.1	Statistická analýza .....	70
8.4.2	WST-1 assay .....	72
8.4.3	Cell Mito Stress Test a Glycolytic Rate Assay .....	74
8.5	Kolagenace a nekolagenace testovacích jamek .....	76
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>77</b>
9.1	Stanovení viability HepG2 buněk .....	77
9.1.1	Počet 3 000 až 33 000 buněk na jamku .....	77

9.1.2	Počet 4 000 až 44 000 buněk na jamku .....	79
9.1.3	Počet 5 000 až 55 000 buněk na jamku .....	81
9.2	Stanovení bioenergetického profilu HepG2 buněk .....	83
9.2.1	Respirační parametry .....	84
9.2.2	Glykolytické parametry .....	89
<b>DISKUZE</b>	.....	<b>94</b>
<b>ZÁVĚR</b>	.....	<b>99</b>
<b>SUMMARY</b>	.....	<b>100</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	.....	<b>101</b>
<b>PŘÍLOHY</b>	.....	<b>112</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Morfologická struktura mitochondrií .....	21
Obrázek 2 – Spřažení Citrátového cyklu a dýchacího řetězce v mitochondrii .....	25
Obrázek 3 – Průběh Citrátového cyklu .....	26
Obrázek 4 – Mechanismus tvorby ATP prostřednictvím dýchacího řetězce.....	29
Obrázek 5 – Struktura ATP-syntázy zabudované v mitochondriální membráně .....	30
Obrázek 6 – Metabolismus v normální buňce .....	34
Obrázek 7 – Metabolismus v nádorové buňce .....	34
Obrázek 8 – Cell Stress Mito Test .....	35
Obrázek 9 – Glycolytic Rate Assay .....	39
Obrázek 10 – Schéma mitochondriální respirace a glykolýzy .....	41
Obrázek 11 – Princip štěpení WST-1 reagentie u WST-1 assay .....	42
Obrázek 12 – Základní mechanismy glukózy.....	49
Obrázek 13 – Schematický popis glykolýzy probíhající v cytosolu buněk .....	50
Obrázek 14 – Propojení glykogenolýzy, glykolýzy a pentózové fosfátové dráhy .....	55
Obrázek 15 – HepG2 buňky tvořící kolonie .....	59
Obrázek 16 – Buňky HepG2 při různém stupni konfluence.....	61
Obrázek 17 – Schéma znázorňující pracovní postup.....	63
Obrázek 18 – HepG2 buňky neošetřené (A a B) a ošetřené (C a D) vrstvou kolagenu .....	76

## SEZNAM POUŽITÝCH GRAFŮ

Graf 1 – Odlišná viabilita buněčné linie následkem dlouhodobé expozice různým koncentracím glukózy .....	78
Graf 2 – Odlišná viabilita buněčné linie následkem dlouhodobé expozice různým koncentracím glukózy .....	80
Graf 3 – Odlišná viabilita buněčné linie následkem dlouhodobé expozice různým koncentracím glukózy .....	82
Graf 4 – Bazální respirace a respirace související s produkcí ATP po dlouhodobé expozici glukózy.....	84
Graf 5 – Maximální respirace a rezervní respirační kapacita po dlouhodobé expozici glukózy.....	86
Graf 6 – Únik protonů a nemitochondriální spotřeba kyslíku po dlouhodobé expozici glukózy.....	88
Graf 7 – Základní glykolytické parametry mitochondriální bioenergetiky po dlouhodobé expozici glukózy .....	90

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – WST-1 assay; počet buněk 3 000 až 33 000 buněk na jamku.....	113
Příloha 2 – WST-1 assay; počet buněk 4 000 až 44 000 buněk na jamku.....	114
Příloha 3 – WST-1 assay; počet buněk 5 000 až 55000 buněk na jamku.....	115
Příloha 4 – Počet buněk 3 000 až 33 000 na jamku; nenakolagenovaná destička .....	116
Příloha 5 – Počet buněk 3 000 až 33 000 na jamku; nakolagenovaná destička.....	117
Příloha 6 – Počet buněk 4 000 až 44 000 na jamku; nenakolagenovaná destička .....	118
Příloha 7 – Počet buněk 4 000 až 44 000 na jamku; nakolagenovaná destička.....	119
Příloha 8 – Počet buněk 5 000 až 55 000 na jamku; nenakolagenovaná destička .....	120
Příloha 9 – Počet buněk 5 000 až 55 000 na jamku; nakolagenovaná destička.....	121
Příloha 10 – Informace o NG-Col získané prostřednictvím Glycolytic Rate Assay .....	122
Příloha 11 – Informace o HG-Col získané prostřednictvím Glycolytic Rate Assay .....	123
Příloha 12 – Informace o NG+Col získané prostřednictvím Glycolytic Rate Assay .....	124
Příloha 13 – Informace o HG+Col získané prostřednictvím Glycolytic Rate Assay .....	125
Příloha 14 – Informace o NG-Col získané prostřednictvím Mito Cell Test.....	126
Příloha 15 – Informace o NG+Col získané prostřednictvím Mito Cell Test.....	129
Příloha 16 – Informace o HG-Col získané prostřednictvím Mito Cell Test.....	132
Příloha 17 – Informace o HG+Col získané prostřednictvím Mito Cell Test.....	135

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A
ACTH	Adrenokortikotropní hormon
AMK	Aminokyseliny
APAF1	Faktor 1 aktivující apoptickou peptidázu
ATB	Antibiotika
ATP	Adenosintrifosfát
Bak	Bcl-2 homologní antagonist/zabiják
Bax	Bcl-2 přidružený s X proteinem
Bcl-2	B buněčná lymfomální leukémie-2
Bcl-x	B buněčná lymfomální leukémie-x
BHI	Bioenergetický index zdraví
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
CoA	Koenzym A
2-DG	2- deoxyglukóza
DMEM	Dulbeccovo modifikované médium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Dinitrofenol
E <sup>-</sup>	Záporně nabitý elektron
ECAR	Rychlost extracelulární acidifikace
ETC	Elektronový transportní řetězec
FBS	Fetální bovinní sérum
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid
FCCP	Karboxylkyanid-p-trifluormethoxyfenylhydrazon
FDG	18-fluorodeoxyglukóza

GLUT	Glukózové transportéry
GDP	Guanosindifosfát
GTP	Guanosintrifosfát
H <sup>+</sup>	Vodíkový proton
HG-Col	Hyperglykemické prostředí bez kolagenu
HG+Col	Hyperglykemické prostředí s kolagenem
H <sub>2</sub> O	Voda
HepG2	Imortilizována jaterní buněčná linie z hepatocelulárního karcinomu
MEM	Minimální esenciální médium
MtDNA	Mitochondriální DNA
MTT	Test zaměřený na redoxní potenciál
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NAD <sup>+</sup>	Oxidovaný NAD
NADH	Redukovaný NAD
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NG-Col	Normoglykemické prostředí bez kolagenace
NG+Col	Nosmoglykemické prostředí s kolagenací
O <sub>2</sub>	Kyslík
OCR	Rychlost spotřeby kyslíku
OSCP	Protein mitochondriální citlivosti na oligomycin
PBS	Fosfátový pufr
PET	Pozitronová emisní tomografie
PER	Rychlost protonového úniku z buňky
pH	Vodíkový potenciál
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SLGT	Sodíkově závislé kotransportéry glukózy



Sukcinyl-CoA	Sukcinykoenzym A
T <sub>3</sub>	Trijódtyronin
T <sub>4</sub>	Tyroxin
WST-1	Ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl
XTT	Tetrazoliová sůl

## ÚVOD

Buněčná elektrárna, tak je oprávněně přezdívána buněčná organela zvaná mitochondrie, která je nedílnou součástí eukaryotních buněk. Její zásadní role spočívá v intracelulární syntéze ATP. Je hlavní spojnicí mnohých metabolických drah a to především Citrátového cyklu a dýchacího řetězce. Další neméně důležitou schopností je iniciace vnitřní cesty apoptózy, jakožto základního eliminačního mechanismu poškozených či nepotřebných buněk. Bohužel některé buňky, jako jsou například buňky nádorové, jsou i vůči těmto eliminačním buněčným mechanismům rezistentní. Mitochondrie jsou tedy důležitými aspekty nejen buněk fyziologických, ale i těch nádorových. V nádorových buňkách bývá jejich množství oproti buňkám fyziologickým poloviční. Nicméně i v těchto buňkách se mitochondrie zásadně uplatňují při procesu buněčné signalizace. Právě dysregulace bioenergetického mitochondriálního metabolismu hraje důležitou roli při predikci a detekci onkologických stavů.

V dnešní době existuje řada testů zabývajících se buněčnou viabilitou, mitochondriální aktivitou či bioenergetickým profilem mitochondrií. Využívají se analýzy založené zejména na detekci mitochondriálního metabolismu, mitochondriální respirace a metabolitů glykolýzy. Při aktuálně zvyšující se incidenci karcinomů, by měly být mitochondrie bezprostředním předmětem zkoumání a tyto testy by měly sloužit, jako základní materiál pro pochopení mechanismu onkogeneze.

V řadě těchto procesů se jako hlavní energetický substrát uplatňuje glukóza. Během celé řady let, byly postupnými výzkumy nalezeny různé metabolické dráhy, při jejichž disonanci není možné, aby byl organismus schopný udržovat koncentraci glukózy v optimálním a úzkém rozmezí. Glukóza je pro organismus hlavním a nejrychlejším zdrojem energie a její zvýšená koncentrace má na celkový stav organismus neblahý vliv. Je tedy důležité hledat nové možnosti a způsoby, jak hyperglykémii a s ní často spojovaný diabetes mellitus predikovat ještě dříve, než budou patrné komplikace poškozující buněčnou funkčnost. Zatím, ale nebylo objeveno široké spektrum skutečně reprezentativních studií, které by byly zaměřené právě na léčbu pacientů mladého věku s teprve rozvíjející se glykemickou poruchou.

Diabetes mellitus je rovněž velice komplikovaným stavem, který postihuje obyvatelstvo napříč celým světem. Má stále zvyšující se incidenci. Stále očekáváme, že přijde doba, kdy nebude diabetes mellitus možné jen kompenzovat, ale bude jej možné také vyléčit. Práce je tedy zaměřena na to, jak se vzájemně bude lišit buněčný metabolismus během normoglykemických a hyperglykemických podmínek.

K tomuto experimentu jsem používala buněčnou linii HepG2, která je výbornou alternativou primárních lidských hepatocytů in vitro. Buňky jsem pěstovala v normoglykemickém a hyperglykemickém prostředí. Následně jsem zjišťovala, prostřednictvím testů zaměřujících se na již výše zmíněné mitochondriální procesy, zda je mezi rozdílnými kultivačními prostředími přítomná korelace či nikoliv.

# 1 MITOCHONDRIE

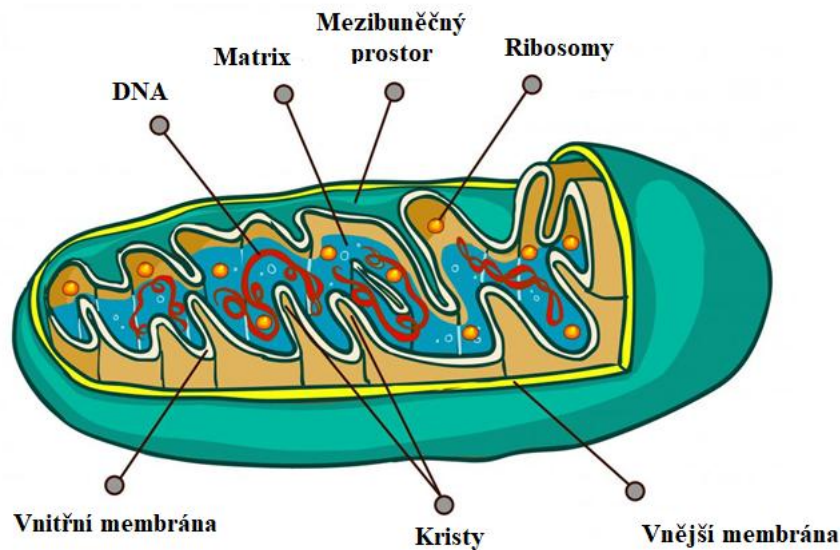
Mitochondrie je **bioenergetická semiautonomní** buněčná organela. Pravděpodobně původně vznikla z bakterií, které prostoupily skrze membránu do jiných buněk. Tímto způsobem mitochondrie získaly svoji charakteristickou strukturu tvořenou dvojitou fosfolipidovou membránou. Za semiautonomní organelu je označovaná z důvodu přítomnosti vlastního genomu v podobě mtDNA (mitochondriální DNA). Mitochondriální DNA kóduje celkem 13 proteinů, jež hrají důležitou roli v procesu oxidační fosforylace. [1, 2, 3]

Vyskytují se prakticky ve všech eukaryotních buňkách. Nejsou však přítomny v erythrocytech a ve zrohovatělých buňkách. Jejich počet se odvíjí na základě energetické potřeby. Je to organela proměnlivá, lišící se tvarem a velikostí (od 1 $\mu$ m do 10 $\mu$ m). Morfologie mitochondrií se rovněž odvíjí dle typu tkáně, ve které se nachází. [3]

Mitochondrie jsou spojnicí mnoha důležitých metabolických drah. Probíhá zde oxidační dekarboxylace pyruvátu,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, Citrátový cyklus, dýchací řetězec, syntéza ATP (adenosintrifosfát) a částečně i močovinový cyklus. Díky syntéze ATP je **označována jako buněčná elektrárna**. [2, 4]

## 1.1 Struktura mitochondrií

Zapamatovatelná je díky své charakteristické struktuře, kterou představují dvě fosfolipidové membrány, definované jako vnější a vnitřní mitochondriální membrána. Tato fosfolipidová dvojvrstva hraje důležitou roli při tvorbě elektrochemického gradientu, který se uplatňuje při syntéze ATP. Obě membrány jsou od sebe odděleny mezimembránovým prostorem. Vzájemně se liší obsahem lipidů, obsahem transmembránových proteinů a permeabilitou. [5, 6, 7]



Obrázek 1 – Morfologická struktura mitochondrií [8]

**Vnější membrána** je obdobná membráně eukaryotních buněk. Chrání a ohraničuje mitochondrii od okolního prostředí. Má hladkou strukturu a je permeabilní pro produkty metabolismu, jako jsou ionty a různé typy molekul do hmotnosti 10 kDa. Na rozdíl od vnitřní mitochondriální membrány je zde poměrně malý počet enzymatických systémů. [6, 9]

Vnější membránu od vnitřní odděluje **mezimembránový prostor**. Zde bývá hladina pH (potenciál vodíku) nižší z důvodu uvolňování vodíkových protonů, které vznikají v dýchacím řetězci. Probíhá zde přeměna nukleotidfosfátů. Adenylátkináza je následně přesouvána do matrix mitochondrií, jakožto substrát k probíhající fosforylaci. [6]

**Vnitřní membrána** je velice důležitou součástí mitochondrií. Jedná se o část velice metabolicky aktivní. Permeabilní je pouze pro menší typy molekul, jako je voda, kyslík a CO<sub>2</sub> (oxid uhličitý), pohybující se hmotností od 100 kDa do 150 kDa. Ve vnitřní membráně se nachází menší množství cholesterolu nežli u membrány vnější. Součástí membrány jsou zejména enzymy a přenašeče, díky nimž se do matrix přesouvají pouze určité meziprodukty. [6, 9]

Jak lze vidět na obrázku číslo 1, tak vnitřní mitochondriální membrána tvoří zřasení, které označujeme jako **kristy**. Díky zřasení se povrch mitochondrií několikrát navýší, a tudíž se zvětší i prostorová kapacita pro probíhající metabolické děje. Nicméně existují i jiné typy mitochondrií, které mají kristy například v podobě tubulů. Tento typ mitochondrií syntetizuje steroidy. Hormony kůry nadledvin a hormony pohlavních orgánů. [5, 6, 9]

Část vnitřní mitochondriální membrány, která nepodléhá zřasení, ale je uložena souběžně s vnější mitochondriální membránou, se označuje jako membrána hraniční. [9]

Uvnitř vnitřní mitochondriální membrány se nachází hustá buněčná hmota zvaná **matrix**. Mitochondriální matrix je centrem již výše zmíněných metabolických drah, které jsou úzce spjaty s aerobní fosforylací. Probíhá zde zejména  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a Citrátový cyklus. Současně zde z části probíhají i dvě vysoce energeticky náročné syntetické dráhy. Matrix mitochondrií je místem, kde probíhá začátek a konec syntézy hemu a zasahuje zde i část syntetické dráhy močoviny. [2, 5, 6, 9]

## 1.2 Mitochondriální funkce

Lokalizace mitochondrií podmiňuje jejich funkci. Jejich funkce souvisí i se stářím organismu. Čím je organismus starší, tím se funkční schopnost mitochondrií snižuje. Se zvyšujícím se stářím se zvyšuje i počet možných mtDNA mutací. [5, 10]

Mitochondrie jsou důležitou organelou, jenž plní řadu významných a nezbytných funkcí. Nejdůležitější je tvorba energie v podobě ATP prostřednictvím procesu oxidační fosforylace. Probíhá zde i oxidace mastných kyselin a Citrátový cyklus. Mitochondrie se značně podílejí na syntéze biomakromolekulárních látek, jako jsou aminokyseliny, lipidy a nukleotidy. [4, 7]

Dále zde probíhá syntéza hemu a NADPH (nikotinamidadeninukleotidfosfát). Mitochondrie jsou zodpovědné i za regulaci hladiny vápenatých iontů uvnitř buňky. [4, 10]

Naprogramovaná buněčná smrt, neboli apoptóza zastává u mitochondrií značně důležitou roli v přenosu a ve zpracování signálů buněčné smrti. Tento proces se uplatňuje, jako eliminační mechanismus poškozených či nepotřebných buněk. Jedná se o proces vysoce energeticky náročný, proto je vyžadován dostatečný přísun energie v podobě ATP. Obecně má proces apoptózy dvě možné zahajovací fáze, které označujeme jako vnější a vnitřní. [4, 11, 12,13]

Mitochondrie se uplatňují při vnitřní iniciační fázi, která je podmíněna narušením mitochondriální struktury. Na vnější mitochondriální membráně jsou přítomny faktory, které průběh buněčné smrti regulují. [12,13]

Tyto faktory se rozdělují na **pro-apoptické** (Bax, Bak), jež jsou iniciátory buněčné smrti a na faktory **proti-apoptické** (Bcl-2, Bcl-X), jež jsou naopak inhibitory buněčné smrti. První zmíněné tedy podporují formaci pórů ve vnější mitochondriální membráně, druhé zmíněné této formaci brání. [14]

Rovnováha těchto faktorů je pro fyziologický stav buňky velice důležitá. Proti-apoptické faktory mohou být inaktivovány, čímž vzniká následná nerovnováha a zvýšeným působením pro-apoptických faktorů je poté zahájena apoptóza. [12,13,14]

Dochází k perforaci vnější mitochondriální membrány. Začínají se tvořit kanály, kterými se do cytoplazmy mitochondrií uvolňují proteiny důležité pro signalizační kaskádu apoptózy. Nejdůležitější z nich je cytochrom C, který se v cytoplazmě buněk naváže na APAF1 (Faktor 1 aktivující apoptickou peptidázu). Ke vzniklému komplexu se dále váže i prokaspáza 9. Konečný komplex označujeme jako apoptozom. [4, 15]

Apoptozom je důležitý pro aktivaci kaspázy 9, která hraje zásadní roli při zahájení společné efektorové fáze mezi vnější a vnitřní iniciační cestou. [15]

## 1.3 Mitochondrie a regulace buněčného metabolismu

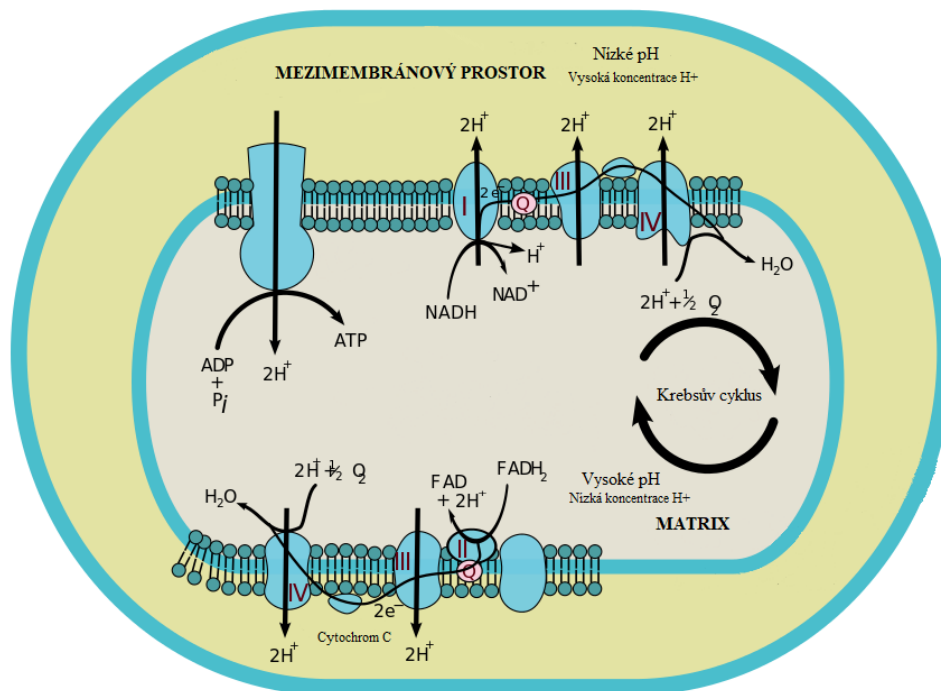
Základní zdroj intracelulární energie je získáván prostřednictvím dvou metabolických dějů. Prvním dějem syntézy ATP je Citrátový cyklus. Druhým dějem syntézy ATP je glykolýza. Druhý zmíněný děj neprobíhá v souvislosti s mitochondriemi, proto je rozepsán až v další kapitole zaměřující se na základní energetický substrát glukózu. Zde je popsán jen stručný přehled obou reakcí pro komplexnost informací. [7,16]

**Glykolýza a Citrátový cyklus** jsou vzájemně propojenými ději. Během procesu Citrátového cyklu dochází ke konečné oxidaci metabolických substrátů, jako jsou AMK (aminokyseliny), lipidy a sacharidy. Principem glykolýzy je transformace glukózy přes několik různých metabolitů až na konečný produkt pyruvát, který následně podléhá anaerobním či aerobním podmínkám. V Citrátovém cyklu je konečným produktem pyruvátu  $\text{CO}_2$ . [7,17,18]

**Dýchací cyklus** probíhající v mitochondriích, je hlavním zdrojem energie v diferenciovaných buňkách. Oproti tomu hlavním zdrojem energie v kmenových buňkách je právě jedna z nejvýznamnějších metabolických drah glukózy a to **glykolýza**. [17,18]

Pro syntézu ATP je důležitý dostatečný přívod kyslíku a také dostatečný přívod redukovaných koenzymů. Jelikož pro fyziologický stav organismu je důležitá nepřetržitá dodávka energie, je nutné, aby docházelo i k neustálé tvorbě redukovaných koenzymů jako je  $\text{NADH}+\text{H}^+$  (redukováná forma koenzymu nikotinamidadenin dinukleotidu). Tento redukovaný koenzym je výslednou fází různých reakcí. Je konečným výsledkem například i u Citrátového cyklu. [17,19,20]





**Obrázek 2 – Spřažení Citrátového cyklu a dýchacího řetězce v mitochondrii [21]**

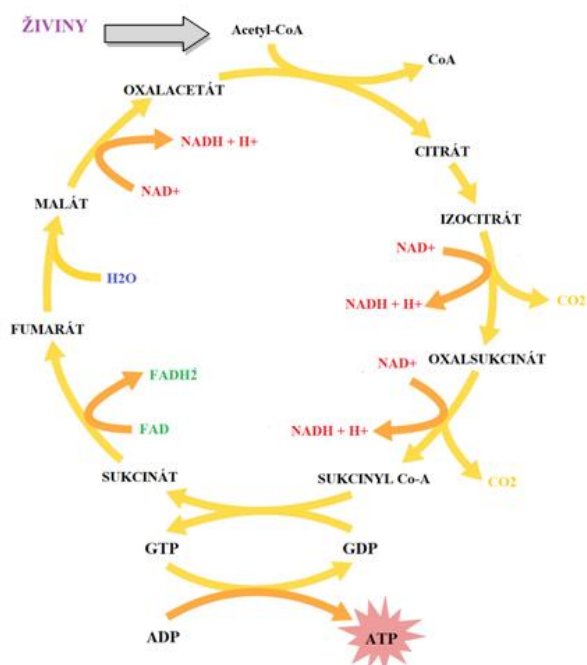
Mitochondrie mají při syntéze ATP významnou roli. Jejich struktura byla popsána již výše v podkapitole číslo 1.1. Nicméně pro ustálení informací je zde přiložen obrázek číslo 2, na kterém je struktura mitochondrií schematicky popsána. Na tomto obrázku je patrné i spřažení Citrátového cyklu a dýchacího řetězce. [4, 6]

Víme tedy, že mitochondrie jsou složeny z vnitřní a vnější membrány, mezimembránového prostoru a vnitřní hmoty označované jako matrix. Hlavním zdrojem redukovaných koenzymů je Citrátový cyklus probíhající právě v mitochondriálním matrix. [4, 6]

### 1.3.1 Citrátový cyklus

Citrátový cyklus je rovněž známý také jako **Krebsův cyklus** či **cyklus kyseliny citronové**. Jelikož se jedná o dráhu intermediální, bývá často označována i za **srdce energetického metabolismu**. Probíhá zde syntéza substrátů, jež jsou následně využívány v dalších metabolických procesech, jako je například glukoneogeneze či syntéza AMK. [16, 22]

Citrátový cyklus je cyklickou metabolickou dráhou lokalizovanou v mitochondriálním matrix, jejímž principem je sled několika enzymatických reakcí, které probíhají kontinuálně za sebou. Během cyklu dohází k tvorbě redukovaných koenzymů degradací acetyl-CoA (acetylkoenzym A). Tento koenzym je transformován na 2 molekuly  $\text{CO}_2$ . Principem transformace je oxidace aktivované formy kyseliny octové. Během této konverze se uvolňuje i energie v podobě GTP (guanosintrifosfát). Výsledným produktem každého cyklu jsou respektive 1 molekula  $\text{FADH}_2$  (flavinadenindinukleotid), 3 molekuly  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , 1 molekula energie a 2 molekuly  $\text{CO}_2$ . Během Citrátového cyklu dochází i k regeneraci CoA (koenzym A). [17, 18, 20, 22, 23]



Obrázek 3 – Průběh Citrátového cyklu [24]

Pro kontinuální průběh je důležitá dostatečná aktivita enzymů, které se během cyklu uplatňují. Důležitý je i dostatečný přívod substrátů. Palivem Krebsova cyklu mohou být téměř veškeré živiny, které jsou různými mezikroky konvertovány na vstupní substrát **acetyl-CoA**. Hlavním zdrojem acetyl-CoA může být oxidace mastných kyselin, glykolýza či metabolické procesy AMK. Během období lačnění je zdrojem acetyl-CoA zejména glykogen a triacylglyceroly. Dalším důležitým vstupním substrátem je **oxalacetát**. [17, 18, 20, 22]

Na obrázku číslo 3, lze vidět průběh Citrátového cyklu. V prvním kroku reakci zahajuje acetyl-CoA, jehož acetylová skupina se spojuje s oxalacetátem. První krok je katalyzován prostřednictvím citrátsyntázy. Během reakce se odštěpí CoA, uvolní se teplo a následně **vzniká citrát**. V druhém kroku je citrát transformován na **izocitrát**. Tuto přeměnu katalyzuje enzym akonitáthydratáza. Izocitrát je v třetím kroku prostřednictvím enzymu izocitrátdehydrogenázy dekarboxylován na **oxalsukcinát**, označovaný také v některých publikacích jako  $\alpha$ -ketoglutarát. Následně ve čtvrtém kroku oxidativní dekarboxylací vzniká **sukcinyl-CoA** (sukcinylkoenzym A). Tuto přeměnu katalyzuje enzym oxoglutarátdehydrogenáza. Ze sukcinyl-CoA vzniká v pátém kroku **sukcinát** prostřednictvím enzymu sukcinyl-CoA-syntázy. Během této přeměny se substrátovou fosforylací uvolňuje energie, která konvertuje GDP (guanosindifosfát) na GTP a následně se GTP konvertuje na ATP. Během šestého kroku se sukcinát transformuje na **fumarát** za katalýzy enzymem sukcinátdehydrogenázy. K fumarátu je v sedmém kroku, jak lze vidět na obrázku číslo 3 přidána voda. Adicí vody vzniká **malát**. Tato reakce je katalyzována prostřednictvím enzymu fumaráthydratázy. Během osmého kroku se uplatňuje enzym malátdehydrogenáza, který zajišťuje prostřednictvím  $\text{NAD}^+$  (oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu) transformaci malátu na **oxalacetát**, čímž se celá reakce dostává opět na začátek a celý cyklus je regenerován pro další kontinuální průběh. [17, 18, 20, 22]

Jak již bylo zmíněno výše, dostatečná nabídka substrátů ovlivňuje průběh reakce. Nabídka substrátů může mimo jiné ovlivňovat i rychlost probíhající reakce. Reakční rychlost může být na druhou stranu i zpomalena a to zejména zvýšením poměru  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  a rovněž i navýšením poměru  $\text{ATP}/\text{ADP}$ . [17, 18, 20, 22]

### 1.3.2 Dýchací řetězec

Dýchací řetězec je velmi složitým mechanismem. Jeho účelem je snaha syntetizovat ATP. K tomu jsou využívány **redukované koenzymy** a **elektronový transport**. Dýchací řetězec je na rozdíl od Citrátového cyklu lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně. V mitochondriích probíhá i oxidace mastných kyselin a již několikrát zmiňovaný Citrátový cyklus. Díky těmto dějům je do dýchacího řetězce zajišťována neustálá dodávka redukovaných koenzymů. [17, 18, 25]

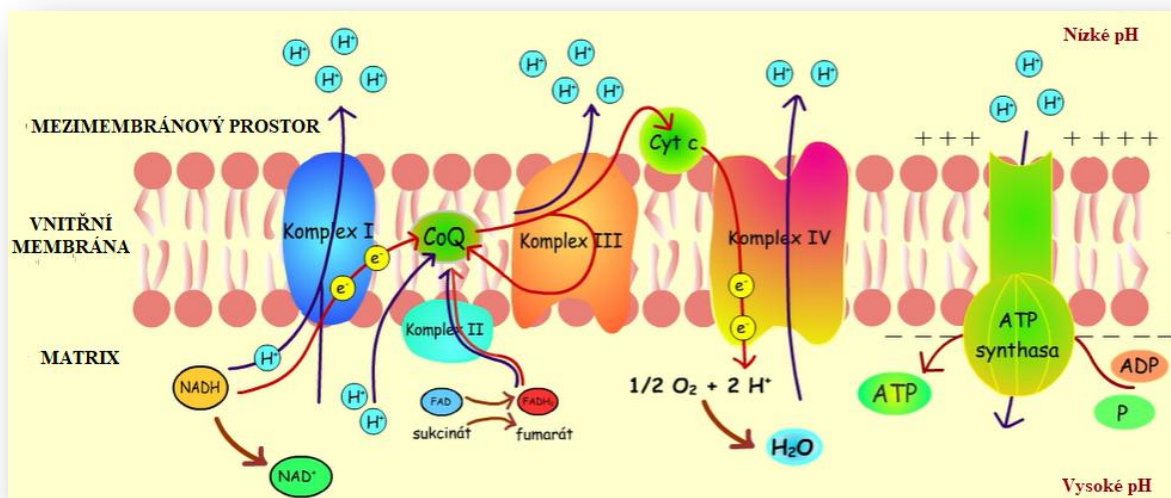
Dýchací řetězec je podmíněn počtem záhybů (krist). Kristy několikanásobně zvětšují mitochondriální plochu, s čímž koreluje i zvýšená intenzita probíhajícího buněčného dýchání. [5]

Na membráně mitochondrií detekujeme **čtyři rozdílné komplexy**. Jsou jimi dehydrogenáza, sukcinátdehydrogenáza, cytochrom c-reduktáza a cytochrom c-oxidáza. Každý z těchto komplexů oplývá rozdílným oxidoredukčním potenciálem a enzymatickou aktivitou. Komplexy jsou schopné přes sebe transportovat elektrony. Během elektronového transportu je uvolněna energie, která se dále uplatňuje při následném přenosu vodíkových protonů. Protony jsou transportovány přes membránu oproti koncentračnímu spádu. [17, 18, 23]

Mimo těchto zakotvených komplexů se ETC (elektronový transportní řetězec) účastní i hydrofobní koenzym Q10 a hydrofilní cytochrom C, který je rovněž uplatňován během procesu apoptózy. [23]

Na obrázku číslo 4 je schematicky popsán mechanismus dýchacího řetězce. Elektrony se mohou začlenit do dýchacího řetězce buďto napojením na komplex I (prostřednictvím  $\text{NADH} + \text{H}^+$ ), nebo napojením na komplex II (prostřednictvím  $\text{FADH}_2$ ). [23]

Po následném napojení elektronů na **komplex I** dochází k jejich transportu na koenzym Q10, přičemž se uvolní energie, která zajišťuje přenos čtyř vodíkových protonů do mezimembránového prostoru oproti koncentračnímu gradientu. Elektrony jsou dále transportovány na **komplex III**. Přes tento komplex je umožněno další uvolňování vodíkových protonů do mezimembránového prostoru. Poté jsou elektrony transportovány přes cytochrom C až na **komplex IV**. Z komplexu IV jsou následně elektrony transportovány zpět do mitochondriálního matrix, kde jsou přeneseny na kyslík. Vzniklý aniont kyslíku reaguje s vodíkovými protony za vzniku molekuly vody. Současně během této konverze dochází i k přenosu dalších vodíkových protonů z komplexu IV do mitochondriálního matrix. **Komplex II** je schopen reoxidace  $\text{FADH}_2$ . Během této reoxidace nedochází k uvolňování vodíkových protonů do mezimembránového prostoru. Následně dochází k transportu elektronů na koenzym Q10, odkud se poté elektrony transportují, již výše popsaným elektronovým transportem, až do procesu fúze s kyslíkem. [17, 18, 23]

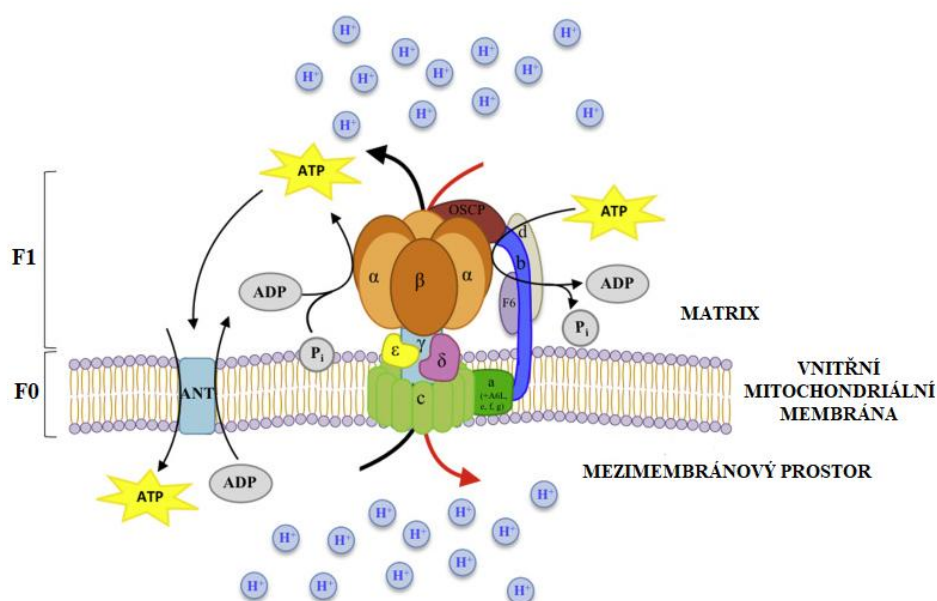


Obrázek 4 – Mechanismus tvorby ATP prostřednictvím dýchacího řetězce [26]

Celkovým výsledkem, jak naznačuje obrázek číslo 4, je navzdory koncentračnímu spádu transport **10 vodíkových iontů** z mitochondriálního matrix do mezimembránového prostoru. Tímto procesem vzniká v mezimembránovém mitochondriálním prostoru protonový gradient, který svou energií umožňuje zahájení syntézy ATP. Během reakce dochází také k **redukci kyslíku za vzniku vody**. [17, 18, 23]

Na obrázku číslo 4 je rovněž patrné, že zásadní roli hraje rozdílná hodnota pH, přičemž v matrix mitochondrií je hodnota pH vyšší, nežli v mezimembránovém mitochondriálním prostoru. Tento fakt je zapříčiněn zvýšenou koncentrací vodíkových protonů v mezimembránovém prostoru. [17, 25]

Mitochondrie regulují syntézu ATP prostřednictvím své vnitřní mitochondriální membrány. V membráně je zabudován enzym ATP-syntáza, jenž je schopen ovlivňovat membránovou permeabilitu, čímž je umožněn transport vodíkových protonů z mezimembránového prostoru zpětně do mitochondriálního matrix. [17, 18, 25]



**Obrázek 5 – Struktura ATP-syntázy zabudované v mitochondriální membráně [27]**

Na obrázku číslo 5 je patrné, že ATP-syntáza se skládá ze dvou základních podjednotek označovaných jako F0 a F1. Obě podjednotky zaujímají rozdílnou lokalizaci a funkci. [27]

Z obrázku je také patrné, že hlavní částí F<sub>0</sub> podjednotky je c-kruh. Na F<sub>0</sub> podjednotce je přítomen i OSCP (protein mitochondriální citlivosti na oligomycin). Hlavní částí F<sub>1</sub> podjednotky jsou 3 struktury  $\alpha$ , 3 struktury  $\beta$ , 1 struktura  $\gamma$ , 1 struktura  $\epsilon$  a 1 struktura  $\sigma$ . Tak zvaná katalytická hlava ATP-syntázy je tvořena 3 strukturami  $\alpha$  a 3 strukturami  $\beta$ . Spojnicí F<sub>0</sub> a F<sub>1</sub> podjednotky je centrální stopka tvořená zbylými strukturami F<sub>1</sub> podjednotky (struktury  $\gamma$ ,  $\sigma$  a  $\epsilon$ ). [27, 28]

Podjednotka F<sub>1</sub> je situována na rozhraní membrány a mitochondriálního matrix. Funkcí je aktivace ATP-syntázy. Podjednotka F<sub>0</sub> je situována na rozhraní vnitřní mitochondriální membrány. Její funkcí je zpětný přenos vodíkových protonů. [27, 28]

Mechanismem antiportu je do mezimembránového prostoru přenášeno ATP a opačným směrem je přes vnitřní mitochondriální membránu přenášeno ADP. Mechanismem symportu jsou do mitochondriálního matrix přenášeny vodíkové protony a fosfátové anionty. [17, 18]

ATP-syntáza je schopna katalyzovat přeměnu ADP a fosfátových aniontů na ATP. Tento mechanismus je zapříčiněn vazbou vodíkových protonů na c-kruh. Každý c-kruh váže pouze 1 vodíkový proton. Následnou vazbou protonového vodíku se c-kruh roztáčí a tím je zajištěn transport vodíkových protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Následně za účelem syntézy ATP je umožněna fúze ADP a fosfátu. [3, 7, 27, 28]

Dlouhodobě existovaly předpoklady, že ATP-syntáza je výhradně součástí vnitřní mitochondriální membrány. Novodobé experimenty však poukazují na to, že ATP-syntáza je rovněž přítomna na vnějším povrchu plazmatických membrán mnohých buněčných linií. Předpokládá se, že by ATP-syntáza mohla být součástí plazmatické membrány hepatocytů, adipocytů či endoteliálních buněk. [27]

## 2 MITOCHONDRIÁLNÍ METABOLISMUS PŘI ONKOGENEZI

V současné době se při rozvoji onkologických onemocnění mitochondriálnímu metabolismu připisuje značně důležitá role. Mitochondrie hrají zásadní roli u veškerých kroků podmiňující onkogenezi. Zejména z důvodu toho, že jsou hlavním a zásadním zdrojem energie ve formě ATP. Také mají zásadní vliv při produkci ROS (reaktivní formy kyslíku), jakožto vedlejších produktů buněčné respirace. Rovněž jsou i poskytovateli různých makromolekul, které jsou zásadní pro další metabolické procesy. [3,4, 29, 30, 31]

V nádorových buňkách bývá často mitochondriální aktivita utlumena. Přesto v těchto buňkách probíhají specifické enzymatické reakce, jejichž signalizaci mitochondrie podmiňují. Nádorové buňky jsou zcela odlišné povahy. Vykazují hned několik charakteristických změn oproti fyziologickým buňkám. Je u nich přítomná mutace v mtDNA a zvýšená tvorba ROS. Může být i strukturní porucha komplexů dýchacího řetězce, čímž dochází i k narušení syntézy ATP. Následnou změnou metabolismu, jsou nádorové buňky schopné oplývat získanou rezistencí vůči apoptóze a jsou schopné ještě více přeprogramovat svůj metabolismus na základě svých aktuálních potřeb. K tomu jim dopomáhá aktivace onkogenů. Rovněž jsou schopné nekontrolovatelně se dělit a to i za nepříznivých podmínek kultivačního prostředí, jako je například nízká koncentrace živin či růstových faktorů. [29, 32, 33, 34]

Nicméně aby byla proliferace nádorových buněk rychlejší, je potřeba vyšší koncentrace substrátů. Možností, jak nároky těchto buněk pokrýt a současně zachovat průběh Citrátového cyklu, je glutamin. Glutamin je základní látkou pro tvorbu významných biomakromolekul. Podílí se na regulačních mechanismech a nádorově transformovanými buňkami je využíván ve vysokém měřítku. Zejména díky své zvýšené koncentraci v krevním oběhu. První možností, jak může být glutamin využit, je jeho přeměna přes glutamát na antioxidant glutathion. Druhou možností je odstranění dusíku za vzniku oxalsukcinátu, který může následně vstupovat do Citrátového cyklu. [30, 35]



Buňky transformované onkogenezí potřebují pro aktivitu svého metabolismu vyšší koncentraci glukózy. Tento fakt je využíván při diagnostice onkologických onemocnění prostřednictvím techniky zvané PET (pozitronová emisní tomografie). Principem je radioaktivní značení FDG (18-fluorodeoxyglukóza), jakožto analoga glukózy. FDG je následně vychytáván nádorovými buňkami, čímž je umožněna lokalizace nádoru. [34]

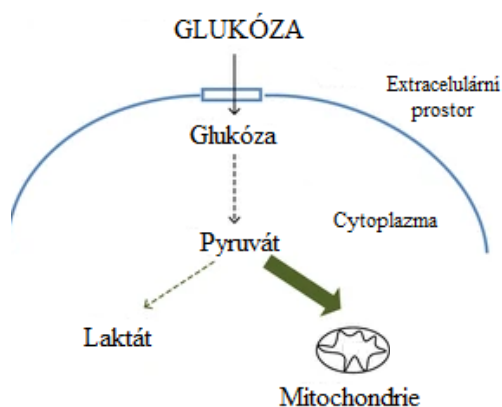
## 2.1 Warburgův a Crabtree efekt

Pro nádorové buňky je typický **Warburgův efekt**. Poprvé byl popsán svým jmenovatelem Ottem Warburgem ve 20. letech 20. století. Na základě tohoto děje dochází k tomu, že nádorové buňky získávají energii spíše prostřednictvím anaerobní glykolýzy. Namísto toho, aby za klasických aerobních podmínek využívaly energii získanou prostřednictvím oxidační fosforylace. [4, 34, 36]

Výsledkem glykolýzy je přeměna glukózy na pyruvát. Jestliže je glykolýza masivní, koreluje to i s masivní tvorbou pyruvátu. Vzniklé nadměrné množství pyruvátu není možné v Krebsově cyklu tak rychle zoxidovat a dochází tedy k podmíněné fermentaci pyruvátu na laktát. [4, 31, 37]

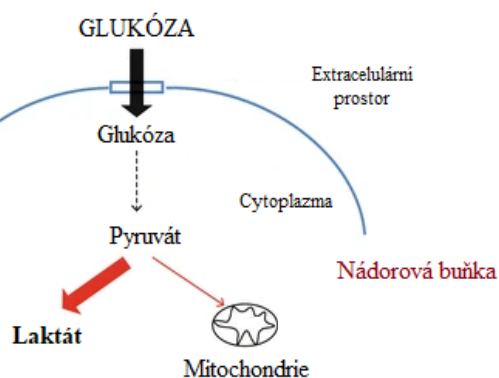
Výhodou tohoto fenoménu je, že prostřednictvím glykolýzy je možné syntetizovat energii v podobě ATP rychleji, než je tomu v případě oxidační fosforylace. [4, 37]

S obdobným efektem přišel i Herbert Crabtree. Ten přišel s tvrzením, že mitochondriální respirace je přechodně inhibována prostřednictvím zvýšené glykolýzy. Tento jev nazval jako **Crabtree efekt**. [38]



**Obrázek 6 – Metabolismus v normální buňce [39]**

Obrázek číslo 6 představuje klasickou cestu zisku energie, kdy je pyruvát získaný během glykolýzy transportován do Citrátového cyklu, který se odehrává v mitochondrii.



**Obrázek 7 – Metabolismus v nádorové buňce [39]**

Obrázek číslo 7 představuje Warburgův efekt, jenž je typickým znakem nádorových buněk. Při tomto ději je prostřednictvím glykolýzy získáván pyruvát. Pyruvát však následně není zpracován v Citrátovém cyklu, jak je tomu ve zdravých buňkách. V tomto případě dochází k fermentaci pyruvátu na laktát.

### 3 MITOCHONDRIÁLNÍ BIOENERGETICKÝ PROFIL

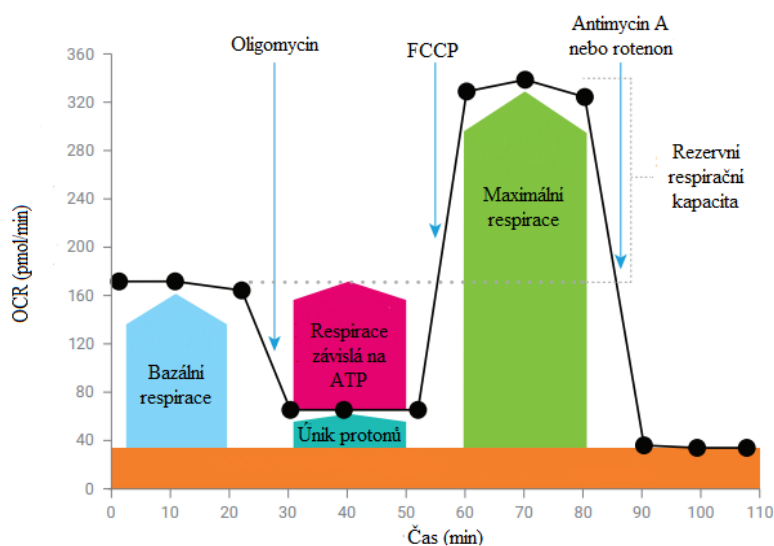
Bioenergetický profil představuje soubor parametrů označovaných jako **BHI** (index bioenergetického zdraví). Tyto parametry indukují, zda mitochondrie zastávají své funkce v organismu ve fyziologických rozmezích. [40]

Mezi dva nejvýznamnější měřitelné bioenergetické parametry, které zastupují v mitochondriálním metabolismu nenahraditelnou roli, patří **OCR** (rychlost spotřeby kyslíku) a **ECAR** (rychlost extracelulární acidifikace). [31, 41]

Mnohé z chorob jsou propojovány s problematikou právě mitochondriální funkčnosti. Index bioenergetického zdraví by se mohl stát potenciálně důležitým parametrem, jenž by mohl vést k časně a účinné predikci různě závažných chorob či zátěžových stavů, které mají neblahý vliv na fyziologii buňky a současně i ohrožují celkový stav organismu. [40]

#### 3.1 Základní respirační parametry BHI

Mezi základní respirační parametry bioenergetického profilu spadá bazální respirace, rezervní respirační kapacita, respirace související se syntézou ATP, maximální rychlost respirace, nemitochondriální spotřeba kyslíku a únik protonů. [41]



Obrázek 8 – Cell Stress Mito Test [40]

Na obrázku číslo 8 je patrný obecný protokol zátěžového Cell Mito Stress Testu. Tento test slouží ke komplexnímu porozumění mitochondriální funkce, respektive interpretuje možné mitochondriální dysfunkce. Na obrázku jsou patrné základní parametry OCR. Oligomycin, FCCP (karbonylkyanid-p-trifluormethoxyfenylhydrazon) a antimycin A/rotenon jsou základními inhibitory respiračního bioenergetického profilu. [40]

Pro zdravý organismus jsou typické zvýšené hodnoty parametrů rezervní respirační kapacity a respirace související se syntézou ATP. U zdravého organismu je patrná snížená hodnota protonového úniku. Jestliže je přítomen nějaký defekt či stresový faktor, dochází k postupné dysregulaci bioenergetického metabolismu a k následnému mitochondriálnímu eliminačnímu mechanismu. Sníženým mitochondriálním počtem se výrazně snižují i parametry bioenergetického zdraví, které by byly za fyziologických podmínek v normě. Dochází ke snižování hodnoty parametru rezervní respirační kapacity a také respirace související se syntézou ATP. Zvyšuje se hodnota parametru nemitochondriální spotřeby kyslíku. Poškozené mitochondrie dále vykazují i zvýšený únik protonů. [42]

### **3.1.1 Bazální respirace**

Bazální respirace je minimální množství energie, které je zapotřebí k normální buněčné funkci. Je definována na základě respirace související se syntézou ATP a únikem protonů. [31, 43]

Hodnota parametru se liší, dle přítomnosti různých suplementů obsažených v kultivačním médiu. Mezi suplementy, které se v médiu mohou vyskytovat, patří pyruvát, mastné kyseliny a laktát. Přítomny mohou být i některé hormony jako je například adrenalin. Tyto suplementy jsou rovněž používány k navýšení bazální respirace u HepG2 buněk. [29, 39, 40 ]

### **3.1.2 Rezervní respirační kapacita**

Rezervní respirační kapacita je schopnost buňky kontinuálně odpovídat na zvýšenou poptávku energie. Udává, jak procentuálně mitochondriální respirace odpovídá syntéze ATP za určitého membránového potenciálu. [31, 43]

Jestliže detekujeme sníženou hodnotu tohoto parametru, signalizuje to, že je zřejmě přítomná některá z mitochondriálních dysfunkcí. Dysfunkce se projevuje pouze u zátěžových stavů, u kterých je vyžadována spotřeba ATP. Za fyziologických podmínek jsou tyto dysfunkce nepatrné. Hodnota parametru se detekuje na základě rozdílu mezi maximální respirační kapacitou a bazální respirací. [35, 43, 44]

### **3.1.3 Respirace související s produkcí ATP**

Respirace související se syntézou ATP je parametrem, který definuje rychlost syntézy ATP v bazálním stavu. Stejně jako u parametru definující únik protonů i tady je využíván inhibitor ATP syntázy zvaný oligomycin. Aplikací oligomycinu se sníží míra respirace a zdrojem ATP se stává pouze aktivovaná glykolýza. [44, 45]

Jelikož je nutné, aby se proces glykolýzy zrychlil natolik, aby obrat ATP byl i za těchto podmínek dostatečný. Dochází u některých buněk k rozvoji patologického stavu vyvrcholeného až následným selháním glykolýzy. Selhává i metabolismus ostatních substrátů potřebných pro správný průběh oxidační fosforylace. Výsledkem je snížená respirace. [44, 45]

### **3.1.4 Maximální rychlost respirace**

Maximální rychlost respirace je schopnost buňky odpovídat na zvýšenou potřebu syntézy ATP. Zjišťování parametru se provádí za aplikace silných protonoforů, které jsou schopné rozpojit děj oxidační fosforylace ve fázi syntézy ATP tím, že se zvýší permeabilita vnitřní mitochondriální membrány. [31, 46, 47]

Zvýšenou permeabilitou vnitřní mitochondriální membrány dochází k pronikání protonů do matrix mitochondrií. Nejčastěji používanými protonofory jsou FCCP a DNP (dinitrofenol). [31, 46, 47]

### **3.1.5 Nemitochondriální spotřeba kyslíku**

Nemitochondriální spotřeba kyslíku je detekovatelná v konečné fázi experimentu. Jelikož je nezávislá na ECT (elektronový transportní řetězec), dochází při její detekci k úplné mitochondriální inhibici. Používají se specifické inhibitory jako je rotenon (pro komplex I) a antimycin A (pro komplex II). Hodnota nemitochondriální spotřeby kyslíku se liší dle použité buněčné linie. [43, 44, 46]

Mitochondriální respirační kapacita se zjišťuje na základě rozdílu mezi hodnotami nemitochondriální spotřeby kyslíku a hodnotami mitochondriální spotřeby kyslíku. [44, 46]

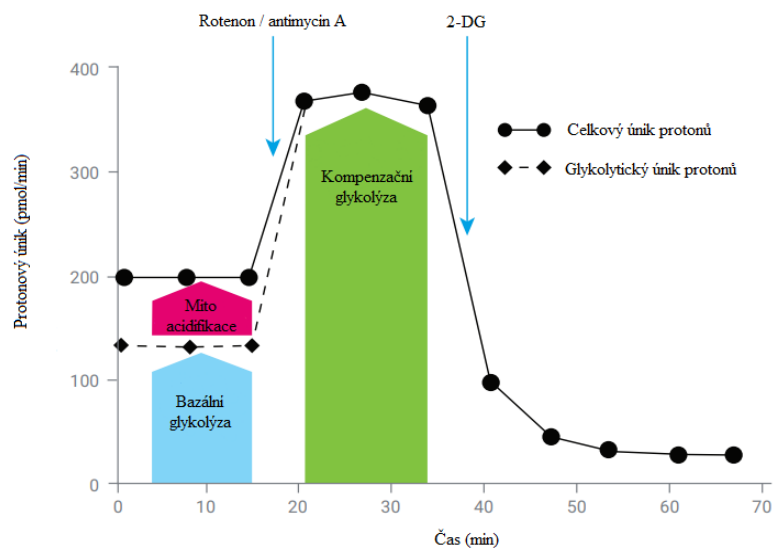
### **3.1.6 Protonový únik**

Vnitřní mitochondriální membrána je permeabilní pouze pro určité molekuly malé velikosti. Protony membránou za normálních okolností téměř neprocházejí, tento stav však lze za určitých podmínek pozměnit. Únik protonů se zjišťuje na základě rozdílu mezi OCR a hodnotou nemitochondriální respirace kyslíku. OCR se měří až po přidání oligomycinu, jenž je typickým inhibitorem syntézy ATP. [43, 47]

Výsledkem je vyšší protonový gradient, který znemožňuje přechod protonů přes komplexy vnitřní mitochondriální membrány (komplex I až IV.). Tím je snížena i následná spotřeba kyslíku. Únikem protonů přes vnitřní mitochondriální membránu je umožněna mitochondriální respirace. [39, 44]

## 3.2 Základní glykolytické parametry BHI

Mezi základní glykolytické parametry bioenergetického profilu spadá bazální PER (rychlost protonového úniku z buňky), bazální glykolýza, kompenzační glykolýza a reziduální acidifikace. [41]



Obrázek 9 – Glycolytic Rate Assay [40]

Na obrázku číslo 9 je patrný obecný protokol Glycolytic Rate Assay. Tento test slouží k přesnému popisu glykolýzy a to díky kvantifikaci rychlosti protonového úniku. Poskytuje informace o bazální a kompenzační glykolýze. Detekuje i rychlá či přechodná metabolická přepnutí, jako je například již výše popsany Warburgův efekt. Na obrázku jsou patrné základní parametry ECAR. Rotenon/antimycin A a 2-DG (2-deoxyglukóza) jsou základními inhibitory glykolytického bioenergetického profilu. [40]

### 3.2.1 Bazální PER

Bazální PER značí rychlost protonového úniku skrz buňku během bazálního stavu, kdy je spotřeba kyslíku minimální. Během bazální PER jsou veškeré procesy udržovány na bazální úrovni, která zajišťuje fyziologický průběh životně důležitých funkcí, jako je udržování srdeční činnosti, tělesné teploty a dýchání. [48, 49, 50]

### **3.2.2 Bazální glykolýza**

Bazální glykolýza je parametrem, jehož principem je štěpení glukózy na dvě molekuly pyruvátu, z něhož redukcí vzniká následně laktát. Bazální glykolýza probíhá v buněčném cytosolu a není závislá na přítomnosti kyslíku. Čím rychleji je spotřebována glukóza, tím rychleji dochází k syntéze laktátu, což koreluje i se zvýšenou aktivitou glykolýzy a se zvýšeným bioenergetickým metabolismem. [48, 49, 50]

### **3.2.3 Kompenzační glykolýza**

Kompenzační glykolýza je procesem, který je uplatňován v buňkách při snížené spotřebě kyslíku a zvýšené potřebě ATP. Buňky se během tohoto stavu mohou spoléhat pouze na aktivovanou anaerobní glykolýzu. Principem anaerobní glykolýzy je štěpení glukózy na dvě molekuly pyruvátu, ze kterého následně vzniká laktát. [48, 49, 50]

### **3.2.4 Reziduální acidifikace**

Reziduální acidifikace je posledním měřitelným parametrem Glycolytic Rate Assay, jak lze vidět i na schematickém obrázku číslo 8. Jedná se o zbytkovou míru okyselení, jež je přítomná v extracelulárním prostoru po ukončení procesu glykolýzy. Během procesu glykolýzy je v extracelulárním buněčném prostoru přítomno zvýšené množství protonových iontů, které lze detekovat zapomocí pH senzoru. [48, 49, 50]

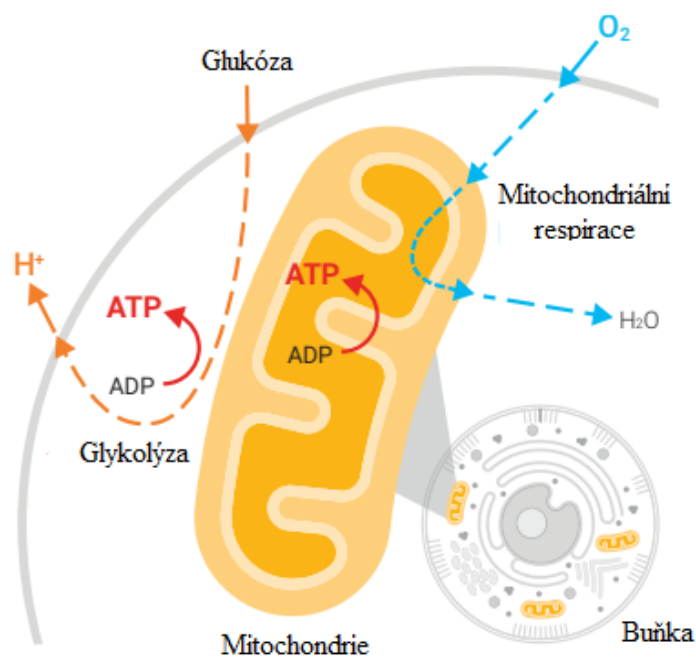


## 4 MITOCHONDRIÁLNÍ ANALÝZY

Vědci zjišťují prostřednictvím různých experimentů, jak funguje lidský organismus a jakou roli hrají konkrétní léky při léčbě určitého typu onemocnění.

Zkoumají se i testy, které se soustředí na měření metabolismu živých buněk, jelikož chorobné stavy jsou do jisté míry podmiňovány právě dysfunkčním metabolismem. Na základě zjištěných informací jsme poté schopni lepšího a hlubšího porozumění možné prevence, diagnostiky a terapie.

U některých z nejvýznamnějších objevů desetiletí byly podkladem právě principy popisující, jak se energetický metabolismus v buněčných procesech uplatňuje. [40]



Obrázek 10 – Schéma mitochondriální respirace a glykolýzy [40]

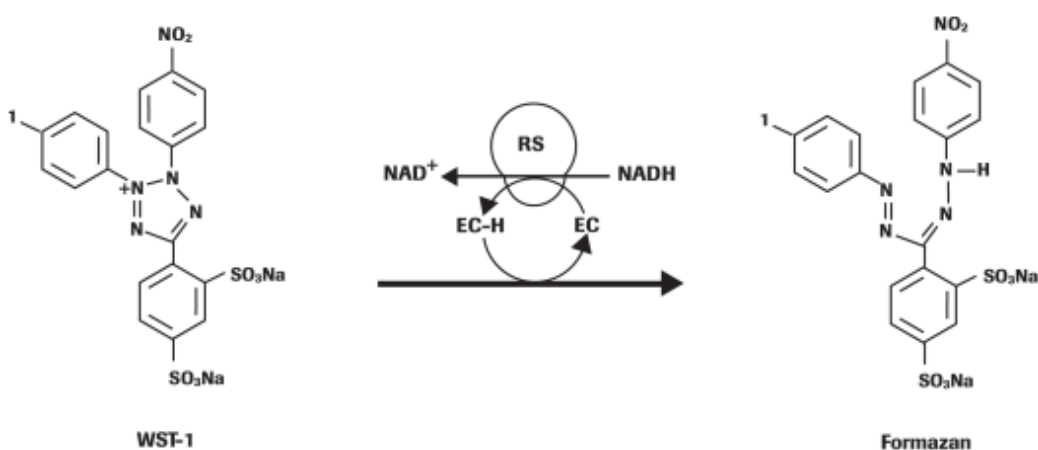
## 4.1 Testování mitochondriální aktivity

Mitochondrie je pro buňku velice důležitou organelou. Studium mitochondriální aktivity by mohlo odhalit řadu onemocnění či poruch. K měření mitochondriální aktivity nám slouží testy, jako jsou WST-1, XTT a MTT.

### 4.1.1 WST-1 assay

Tecan-I-control slouží k analýze WST-1 assay, což je rychlá a jednoduchá metoda sloužící ke stanovení klíčových parametrů z oblasti buněčné biologie. Prostřednictvím WST-1 assay stanovujeme **buněčnou proliferaci, viabilitu a buněčnou cytotoxicitu**. [51, 52]

Základem je **WST-1 reagentie**, která disponuje schopností spektrofotometrické detekce buněčného růstu a současně i schopností chemosenzitivity v buněčných kulturách. Princip metody spočívá v mírném štěpení, již výše zmíněné načervenalé tetrazoliové soli WST-1 (WST-1 reagentie), za vzniku formazanového barviva tmavě červené barvy. [52, 53]



Obrázek 11 – Princip štěpení WST-1 reagentie u WST-1 assay [53]

Formazanové tmavě červené barvivo vzniká pouze u životaschopných metabolicky aktivních buněk a to prostřednictvím buněčných mitochondriálních dehydrogenáz. Čím vyšší je přítomnost živých buněk, tím vyšší je i celková aktivita těchto dehydrogenáz, což koreluje s tvorbou většího množství formazanového barviva. [51, 52, 53]

Kvantifikace je následně prováděna prostřednictvím ELISA čtečky jamkového spektrofotometru, zajišťující rychlejší a snadnější manipulaci většího množství vzorků. Ke měření absorbance vzniklého formazanového produktu se používá vlnová délka v rozmezí **420 až 480 nm**. [51, 52, 53]

Metoda je výhradně používána za účelem zjišťování buněčné proliferace v souvislosti s živinami, cytokiny, fyziologickými mediátory, růstovými faktory či také v souvislosti s protilátkami, které jsou naopak schopné růst buněk inhibovat. Současně se analýza provádí i za účelem testování vlivu cytostatických a cytotoxických léčiv. [51, 52, 53]

## 4.2 Testování mitochondriální bioenergetiky

Každá buňka vyžaduje schopnost přepínat své anabolické a katabolické procesy dle svých aktuálních metabolických potřeb. Proto existují různé metody, jak aktivitu metabolických drah sledovat a upravovat tak, aby bylo fyziologickým požadavkům buněk vyhověno. [40]

### 4.2.1 Cell Mito Stress Test a Glycolytic Rate Assay

Analyzátor Agilent Seahorse XFe 96 slouží k měření **bioenergetického metabolismu** v živých buňkách. Respektive slouží k měření klíčových parametrů glykolýzy a mitochondriální respirace.

Zaměřuje se na měření OCR a také na měření ECAR v kultivovaných živých buňkách usídlených v jamkách mikrotitrační destičky. **OCR** je indikátorem mitochondriální respirace a **ECAR** je indikátorem zejména glykolýzy. [40, 54, 55]

Na 96 jamkové destičce dochází v reálném čase při teplotě 37 °C k monitorování bioenergetiky živých buněk. Analyzátor se soustředí zejména na dvě hlavní metabolické energetické dráhy, při kterých dochází k nadměrné produkci energie. Obě dráhy jsou analyzovány současně s vysokou přesností a rychlostí. [40, 54, 55]

Základem testu je nasazení buněk do testovacích jamek mikrotitrační destičky XF 96. Nasazení buněk je nejlepší provádět při konfluenci 60 až 90 %. Při měření se využívají senzory, které detekují extracelulární změny probíhající v nasazených buňkách mikrotitrační destičky XF 96. Detekují se odpovědi buněk vůči různým inhibitorům či substrátům. [40, 54]

Analyzátor Agilent Seahorse tak umožňuje zjistit, jak rychle probíhají metabolické dráhy jako je **buněčná respirace, glykolýza a s nimi spojená syntéza ATP**. Tyto parametry se analyzují testy Cell Mito Stress Test a Glycolytic Rate Assay. [40]

## 5 GLUKÓZA

Základním a nejdůležitějším sacharidem pro lidský organismus je glukóza. V našem těle se vyskytuje i přirozeně. Patří do skupiny jednoduchých sacharidů. Pro organismus má však nezastupitelnou úlohu a díky své komplexnosti s ostatními metabolickými dráhami bývá nazývána jako **univerzální energetická měna**. [17, 18, 56, 57]

Mechanismus účinku glukózy je rozdílný u zdravých a nádorových buněk. U fyziologických buněk za účelem zisku energie, podléhá glukóza glykolýze a oxidativní fosforylaci. Rakovinné buňky vyžadují zvýšené množství glukózy na základě probíhajícího **Warburgova efektu**. [58]

Je považována za **výjimečný energetický substrát díky několika vlastnostem**. Je z ní možné získávat energii i bez ohledu na dostupnosti kyslíku. Její metabolismus není podmíněn přítomností mitochondrií. V některých tkáních plní roli nenahraditelného zdrojového substrátu pro acetyl-CoA. Důležitou vlastností také je, že v nadbytečném množství je výchozím substrátem syntézy mastných kyselin a z nich následně syntetizovaných triacylglycerolů. [17]

Hladina glukózy v krvi je označována termínem **glykémie**. Nalačno by se tato koncentrace za podmínek in vivo měla pohybovat mezi **3,3 až 5,6 mmol/l**. Za podmínek in vitro se běžně pro výzkumné účely používá jako referenční hodnota normoglykemického prostředí **koncentrace 1 g/L**. [59]

Do cirkulace se dostává prostřednictvím tří základních mechanismů. Prvním možným mechanismem je **transport glukózy ze střeva**, kde dochází k natrávení sacharidů přítomných v potravě. Druhým mechanismem, jak lze glukózu do krevního oběhu získat, je **glykogenolýza**. Principem je rozklad jaterního glykogenu. Tento mechanismus je schopný pokrýt nároky na glukózu na 24 až 48 hodin, nejčastěji je však využíván jako zdroj energie mezi jídly. Štěpení glykogenu je možné i v kosterním svalstvu. Zde je bohužel tento proces méně efektivní. Zdrojem energie kosterního svalu je v tomto případě glukóza-6-fosfát. [17, 18, 60]

Třetím mechanismem, jak lze glukózu do krevního oběhu získat, je **glukoneogeneze**. Principem je tvorba glukózy prostřednictvím nesacharidových složek. Tento mechanismus pokrývá dlouhodobé nároky na glukózu způsobené například lačněním či hladověním. Principy glykogenolýzy a glukoneogeneze jsou podrobněji sepsány níže. [17, 18, 60]

Koncentrace glukózy v krvi je snižována rovněž na základě různých mechanismů. Mezi tyto mechanismy **patří tvorba glykogenu v játrech a svalech**. Dále **spotřební mechanismus u tkání, které jsou na glukóze závislé a spotřební mechanismus u tkání, které na glukóze závislé nejsou**. V neposlední řadě je koncentrace glukózy v krvi snižována **přeměnou glukózy na mastné kyseliny** respektive na triacylglyceroly. [17]

## 5.1 Transport glukózy přes buněčnou membránu

Glukóza je fyziologicky nejvýznamnějším a nejrozšířenějším sacharidem polárního charakteru. Zásadní roli při transportu glukózy přes buněčnou membránu má mimo polarity i fakt, že má poměrně vysokou molekulovou hmotnost. Díky těmto vlastnostem je znemožněn její transport přes buněčnou membránu prostřednictvím prosté difuze. Glukóza je tudíž transportována mechanismy jako je **aktivní transport a facilitovaná difuze**. [17, 18, 61]

Transport glukózy hraje pro metabolismus sacharidů zásadní roli. Důležitá je nejen exprese jednotlivých typů přenašečů v buňkách, ale také jejich vzájemná kombinace. Neboť transmembránový přenos glukózy je regulovaným, ale zejména komplexním dějem. [18]

**Aktivní transport** je využíván jen u určitých typů buněk, jako jsou buňky proximálních tubulů ledvin a enterocytů. Mezi mechanismy aktivního transportu glukózy přes buněčnou membránu patří transportéry označované jako **SGLT1-3** (sodíkově závislé kotransportéry glukózy). [18, 62]

Nicméně častějším mechanismem je **facilitovaná difuze**, kterou zajišťuje 13 odlišných přenašečů označovaných jako **GLUT** (glukózové transportéry). U tohoto typu difuze se k určení směru transportu využívá koncentrační gradient. [18, 63]

Transportér **GLUT2** je transportním mechanismem glukózy přes buněčnou membránu u buněk jater, ledvin, střev a  $\beta$ -buněk pankreatu. [63]

Játra disponují schopností kumulovat glukózu, díky přítomnosti právě GLUT2 přenašečů. Jakmile je glukóza transportována do prostředí hepatocytu, dochází k co nejrychlejšímu způsobu její utilizace. Kdyby tomu tak nebylo, glukóza by se zde hromadila a nezbyl by další prostor pro vstup i ostatních látek. Tento mechanismu je uplatňován zejména po příjmu potravy bohaté na sacharidy. Opačným mechanismem je hladovění. V tomto případě je důležitý vzestup koncentrace glukózy v intracelulárním prostoru hepatocytu nad koncentrací glukózy v prostoru extracelulárním. Tímto způsobem je usnadněn transport glukózy do krevního oběhu. [17, 18, 64]

Hladina glukózy v hepatocytech je podmiňována na základě dvou mechanismů. Jednak se jedná o reakce, které zajišťují **snižování hladiny glukózy** v buňce. Mezi tyto reakce patří syntéza glykogenu, glykolýza a také aktivita hexokináz. A na druhé straně se jedná o reakce, které zajišťují **zvyšování hladiny glukózy** v buňce. Mezi tyto reakce patří glykogenolýza, glukoneogeneze a také aktivita glukózy-6-fosfát. [17, 18]

Některé přenašeče jsou ovlivňovány prostřednictvím inzulínu. Inzulín je schopen nejen regulovat počet takovýchto přenašečů, ale umožňuje ovlivňovat také jejich afinitu a kapacitu. Takovým regulovaným přenašečem je například GLUT4, jenž je typickým přenašečem glukózy v tukové a svalové tkáni. Tento fakt se ale netýká přenašeče GLUT2. [17, 18, 63]

**SGLT** transportní systémy umožňují transportovat glukózu přes buněčnou membránu navzdory jejímu koncentračnímu gradientu, čímž se na jedné straně může vytvořit až nulová hodnota koncentračního gradientu. K tomuto přenosu je využíván koncentrační gradient sodíku vytvořený mezi intracelulární a extracelulární tekutinou. Na tvorbě gradientu se mimo sodíku podílí i draslík a adenosintrifosfatáza. [17, 18, 62]

## 5.2 Vliv glykémie na mitochondriální metabolismus

Většina metabolických nemocí a komplikace s nimi spojenými, vznikají na podkladě hyperglykémie a zvýšené koncentrace nenasycených mastných kyselin. [65]

Centrem pro řízení syntézy energie a metabolické homeostázy jsou mitochondrie. Mitochondriální dysfunkce vznikají na základě poškození hepatocytů a ovlivňují následnou buněčnou viabilitu.

Zvýšená koncentrace energetických substrátů jako je právě glukóza či nenasycené mastné kyseliny mají na mitochondriální metabolismus neblahý vliv. Následkem je aktivace metabolického, mitochondriálního a oxidačního stresu. Tyto stavy mohou být ještě navíc doprovázeny zánětlivými změnami. [37, 65]

**Zvýšená koncentrace glukózy** a ostatních vysokoenergetických metabolitů podněcuje syntézu ROS a buněčnou apoptózu. Na druhou stranu dochází k inhibici proliferace a procesu buněčné mitofagie, který obdobně jako apoptóza zajišťuje odstranění defektních mitochondrií. **Nízká koncentrace glukózy** indukuje syntézu ROS a proces buněčné mitofagie. Na druhou stranu i zde dochází k útlumu buněčné apoptózy a proliferace. Následkem těchto mechanismů dochází k vážnému narušení mitochondriálního metabolismu a buněčné signalizace. [37, 65]

Rovněž i některé izoformy cytochromu P450 mají omezenou funkčnost následkem hypoglykemického či hyperglykemického prostředí. [65]

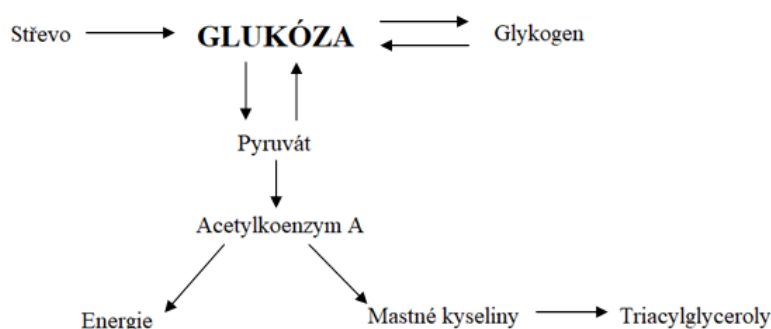


### 5.3 Metabolické dráhy glukózy

Koncentrace glukózy je prostřednictvím různých mechanismů neustále udržována v úzkém rozmezí hodnot. Její regulace podléhá nejprísnějším podmínkám. [58]

Během těchto mechanismů se uplatňují jako výchozí substráty různé sloučeniny. Může to být samotná glukóza v podobě glukózy-6-fosfátu či její polymer glykogen. Glukóza je nejdříve fosforylována na podobu glukóza-6-fosfátu, jenž je spojnicí mnohých metabolických cest. Je to ústřední látka pro glykolýzu, syntézu glykogenu, pro pentózový cyklus a je meziproduktem u glykogenolýzy a glukoneogeneze. Glukóza-6-fosfát je rovněž důležitá pro syntézu proteoglykanů, kyseliny glukuronové, glykoproteinů a mnohých dalších. [66, 67, 68]

Polymerem glukózy je glykogen. Prekurzorem pro jeho syntézu je proglykogen. V organismu se glykogen nachází v těsném kontaktu s enzymy, které regulují jeho syntézu či degradaci. Skladován je v buňce ve formě granulí. Hlavními zásobními orgány glykogenu jsou játra a kosterní svalstvo. U jater ovlivňuje koncentraci glykogenu zejména příjem potravy. Glykogen je významným zejména z důvodu rychlého glukózového zdroje. [18, 68]



Obrázek 12 – Základní mechanismy glukózy [17]

Vzniklé triacylglyceroly jsou bohatým zdrojem energie. Nicméně je tato přeměna substrátů, jak naznačují i šipky na obrázku číslo 12, ireverzibilní. Není tedy možné, aby se triacylglyceroly staly zpětným zdrojem glukózy. Tento problém je vyřešen reverzibilní syntézou glykogenu. [17, 66, 68]

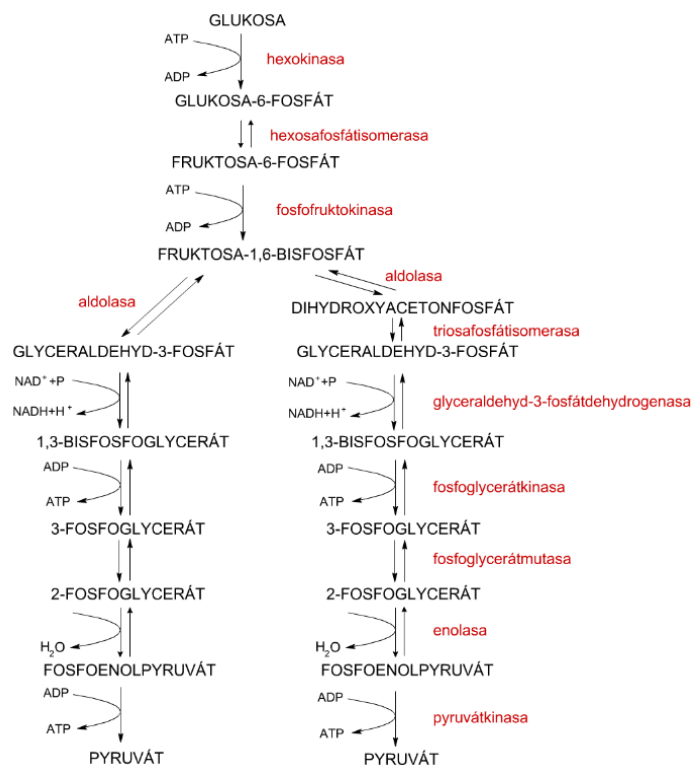
### 5.3.1 Fosforylace glukózy

Fosforylace glukózy je zahajovacím mechanismem mnohých glukózových metabolických cest. Jakmile je glukóza transportována do buněčného cytosolu, dochází k její fosforylaci. Do molekuly glukózy je vštěpena fosfátová skupina. Během této reakce dochází ke spotřebě 1 molekuly ATP. [67, 68]

Výsledným produktem je **glukóza-6-fosfát**. Reakce může být katalyzována za účasti dvou enzymů a to prostřednictvím **hexokinázy** či **glukokinázy**. V jaterních buňkách se uplatňuje účinek glukokinázy. [66, 67, 68]

### 5.3.2 Glykolýza

Glykolýza je základním metabolickým dějem, při kterém dochází k syntéze **triacylglycerolů** a **ATP**. Principem je transformace glukózy přes řadu metabolitů až na pyruvát, který je ústředním substrátem syntézy acetyl-CoA v mitochondriích. Glykolýza se naopak odehrává v cytosolu buněk a je tvořena **prostřednictvím deseti kroků**, které katalyzuje rovněž deset různých enzymů. [68, 69]



Obrázek 13 – Schematický popis glykolýzy probíhající v cytosolu buněk [70]

Jak lze vidět na schematicém obrázku číslo 13, nejprve dochází k transformaci glukózy na **glukóza-6-fosfát**. Tuto reakci katalyzuje v jaterních buňkách enzym hexokináza. V tomto prvním kroku dochází i ke spotřebě první molekuly ATP. [68]

Druhým krokem je prostřednictvím enzymu fosfogluoizomerázy katalyzována transformace glukózy-6-fosfát na **fruktóza-6-fosfát**. V následném třetím kroku je opět spotřebována již druhá molekula ATP. Při tomto kroku dochází k transformaci fruktózo-6-fosfátu na **fruktóza-1,6-bifosfát**. Tato přeměna je katalyzována prostřednictvím enzymu fosfofruktokinázy. Následně je v dalším kroku prostřednictvím aldolázy vzniklá fruktóza-1,6-bifosfát rozčleněna na dvě molekuly a to **dihydroxyacetonfosfát** a **glyceralaldehyd-3-fosfát**. První zmíněná molekula je prostřednictvím enzymu triózo-fosfátizomerázy transformována rovněž na **glyceralaldehyd-3-fosfát**. V dalším kroku se uplatňuje enzym glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, který transformuje výše zmíněné molekuly na **1,3-bifosfoglycerát**. Při této transformaci se uvolňují dvě molekuly NADH. Dalším krokem je transformace 1,3-bifosfoglycerátu prostřednictvím enzymu fosfoglycerátkinázy za vzniku **3-fosfoglycerátu**. I při tomto kroku dochází k produkci 2 molekul ATP. Výsledný 3-fosfoglycerát je následně prostřednictvím enzymu fosfoglycerátmutázy transformován na **2-fosfoglycerát** z něhož následnou katalýzou enzymu enolázy vzniká **fosfoenolpyruvát**. [68]

Během posledního kroku je uplatňován enzym pyruvátkináza, díky němuž je fosfoenolpyruvát transformován na konečný produkt **pyruvát**. Během poslední transformace jsou uvolněny 2 molekuly ATP. [68]

Až na základě aktuálních možností organismu se rozhodne, zda bude probíhat **reakce katabolická** (syntéza ATP) či **reakce anabolická** (syntéza acetyl-CoA a následný vznik triacylglycerolů). Příkladem spuštění anabolického procesu může být příjem potravy. Glykolýza pak vede k tomu, že uvolněná glukóza se v játrech a tukové tkáni využije pro syntézu triacylglycerolů. Co se týče procesu katabolického, zde hraje spouštěcí roli například fyzická zátěž. Glykolýza zde vede k tomu, že je získáván hlavní zdroj energie pro kosterní svalstvo, mozek a erytrocyty. [17, 18]

Výsledným ziskem katabolického procesu glykolýzy jsou **2 molekuly ATP a 2 molekuly NADH+H<sup>+</sup>**. Zisk energie je nižší než by se dalo očekávat. Důsledkem je spotřeba dvou molekul ATP, již během prvního a třetího kroku. I když je zisk energie prostřednictvím glykolýzy nižší, i tak zastupuje glykolýza jakožto zdroj energie nenahraditelnou roli. Zisk energie je mnohonásobně rychlejší, než je tomu během Citrátového cyklu. Další zásadní rolí glykolýzy je to, že je zcela nezávislá na přítomnosti kyslíku. [68, 69, 71, 72]

### **5.3.2.1 Anaerobní glykolýza**

Během anaerobní glykolýzy hraje zásadní roli vzniklý NADH, jenž se není schopen konvertovat na NAD<sup>+</sup>. Ten za normálních okolností zajišťuje kontinuální průběh reakce na základě anaerobních podmínek. Zvýšená kumulace NADH zabraňuje tomu, aby výsledný pyruvát mohl vstupovat do Citrátového cyklu. Rovněž zvýšená kumulace inhibuje i proces glykolýzy. [18, 73]

Možností jak vzniklý pyruvát využít, je jeho reverzibilní transformace na laktát prostřednictvím enzymu laktátdehydrogenázy. Výsledný laktát může být využíván v řadě tkání. Může být následně i zpětně krví transportován do jater, kde proběhne jeho oxidace za vzniku pyruvátu. Tímto reverzibilním mechanismem za spotřeby energie vzniká opět základní substrát metabolických dějů zvaný glukóza. [18, 73]

Během anaerobní glykolýzy vznikají z **1 molekuly glukózy 2 molekuly ATP**. Typickými orgány, ve kterých se anaerobní glykolýza uplatňuje, jsou nádorové tkáně či kosterní svalová tkáň zatížená fyzickou zátěží. Rovněž je důležitá i pro erytrocyty. Obecně se anaerobní glykolýza uplatňuje v prostředí buněk, kde nejsou přítomny mitochondrie a tam, kde není zajištěna dodávka kyslíku. [18, 73]

### 5.3.2.2 Aerobní glykolýza

Jestliže má buňka dostatečný příjem kyslíku, je schopna prostřednictvím aktivního transportu přenášet pyruvát vzniklý v buněčném cytosolu. Transport přes mitochondriální membránu probíhá za spotřeby energie. Během aerobní glykolýzy je výsledný pyruvát přesunutý do mitochondriálního matrix, kde je oxidován na acetyl-Co A. Prostřednictvím něj dochází k spřažení aerobní glykolýzy s mechanismy Citrátového cyklu. V cyklu dochází mimo jiné i k tvorbě NADH. [68, 72]

Tento NADH a rovněž i NADH, jenž vzniká při oxidaci glycerinaldehydu-3-fosfátu během procesu glykolýzy, jsou použity jako základní substráty pro syntézu ATP v dýchacím řetězci. [18, 68]

Během anaerobní glykolýzy vzniká **z 1 molekuly glukózy 38 molekul ATP**. Jedná se tedy o nejvýznamnější reakci, jež zprostředkovává získání energie ve formě ATP. Důležitou roli hraje zejména pro nervový systém. [68, 72]

### 5.3.3 Glukoneogeneze

Glukoneogeneze je na pohled opačným metabolickým dějem glykolýzy, jejímž výsledkem je **úplně nová syntéza glukózy**. Nicméně, některé kroky uplatněné během glukoneogeneze se u glykolýzy nevyskytují. [68]

Příkladem rozdílného mechanismu může být transformace pyruvátu na fosfoenolpyruvát. Reakce neprobíhá kontinuálně jako je tomu u glykolýzy, ale je zde přítomen mezikrok v podobě tvorby oxalacetátu. Rovněž i při transformaci fruktóza-1,6-bifosfátu na fruktóza-6-fosfát je přítomna změna. Zde není reakce katalyzována prostřednictvím enzymu fosfofruktokinázy, nýbrž je reakce modulována za přítomnosti vody a na základě působení enzymu fruktóza-1,6-bifosfatázy. Poslední změnou je působení enzymu glukóza-6-fosfatázy, který nahrazuje hexoxinázu, jenž se během glykolýzy uplatňuje při transformaci glukózy na glukóza-6-fosfát. I zde je důležitá přítomnost vody. [68]

Výchozí látkou jsou při glukoneogenezi nesacharidové složky, jako je **glycerol, laktát či téměř většina AMK**. Tato reakce je uplatňována pouze v orgánech, jako jsou játra a ledviny. [18, 73]

### 5.3.4 Glykogeneze

Glykogeneze je metabolickým dějem, při kterém se syntetizuje glykogen. Výchozí látkou pro syntézu je **glukóza-6-fosfát**. Zdrojem této výchozí látky je buďto samotná glukóza, jež je transportována do jater z krevního řečiště a následně je na glukóza-6-fosfát konvertována prostřednictvím hexokinázy. Nebo může být výchozí látka získávána z **laktátu, AMK či glycerolu** prostřednictvím procesu glukoneogeneze. [18, 68]

### 5.3.5 Glykogenolýza

Glykogenolýza je oproti glykogenezi metabolickým dějem, při kterém se glykogen nesyntetizuje, ba naopak se odbourává. [18, 68]

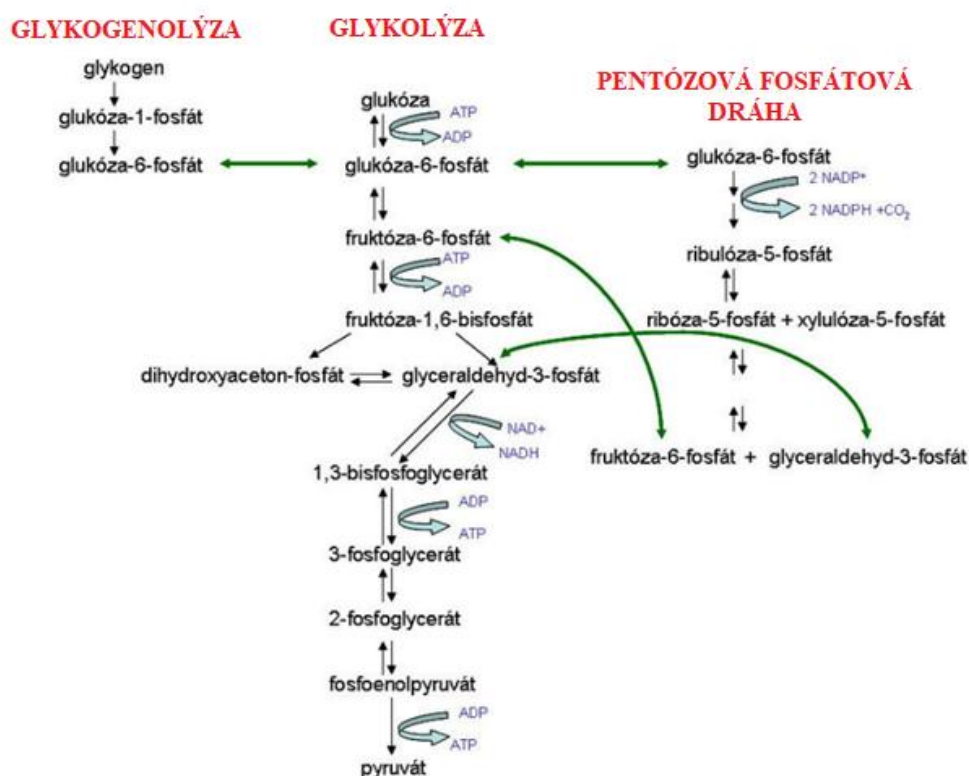
Glykogen je štěpen prostřednictvím glykogenfosforylázy za vzniku **glukóza-1-fosfát**. Principem glykogenolýzy je štěpení 1,4-glykosidické vazby glykogenu. Následně je glukóza-1-fosfát prostřednictvím fosfoglukomutázy přeměněna na **glukóza-6-fosfát**. [18, 68]

Glukóza-6-fosfát je výchozí látkou mnohých reakcí. Při glykogenolýze je následně využita jako substrát pro další reakce nebo je prostřednictvím glukóza-6-fosfatázy přeměněna na základní monosacharid glukózu, která je schopná přecházet do krevního oběhu. Tato metabolická dráha se uplatňuje zejména v **játrech a ledvinách**. Játra mají lepší schopnost, díky zvýšené koncentraci glukózy-6-fosfát, uvolňovat vzniklou glukózu do krevního oběhu. Při tomto mechanismu se uplatňují i určité hormony jako je inzulín, glukagon či adrenalin. [68]

### 5.3.6 Pentózová fosfátová dráha

Pentózová fosfátová dráha je metabolickým dějem, který probíhá jako cyklus. Principem je cyklické odbourávání glukózy, jejímž přínosným výsledkem je **NADPH**, **CO<sub>2</sub>** a **pentóza**. Následnou interakcí s různými monosacharidy vznikají fosfátové hexózy, které opět vstupují do cyklu. Reakce je regulována prostřednictvím enzymů, jenž jsou přítomny v cytosolu buňky. [17, 18, 68, 71, 74]

Výslednou pentózou je **ribóza-5-fosfát**, která je podstatnou sacharidovou složkou syntézy nukleových kyselin a nukleotidů. Pentózový cyklus probíhá zejména v **játrech**, **tukové tkáni**, **kůře nadledvin** a obecně v orgánech, kde dochází ke zvýšené spotřebě **NADPH+H<sup>+</sup>**. [17, 18, 68, 71, 74]



Obrázek 14 – Propojení glykogenolýzy, glykolýzy a pentózové fosfátové dráhy [75]

## 6 REGULACE METABOLISMU SACHARIDŮ

Hormony jsou látky syntetizované v endokrinních žlázách, odtud jsou secernované do krevního oběhu. Krevní oběh je unáší k místu cílových buněk, kde se navážou na specifický receptor. Právě přítomnost či nepřítomnost tohoto receptoru zodpovídá za to, která tkáň bude či nebude daným hormonem ovlivněna. [18]

### 6.1 Inzulin

**Inzulin** je hormon syntetizovaný v  $\beta$ -buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu. Vzniká na základě štěpení svých prekurzorů preproinzulinu a proinzulinu. [18]

Inzulín ovlivňuje vstup glukózy do buněk svalové či tukové tkáně. Stimuluje **glykolýzu** na různých úrovních. Stimuluje zvýšení glykogenu stimulací **glykogenogeneze** a inhibicí **glykogenolýzy**. V játrech podmiňuje inhibici **glukoneogeneze** a zprostředkovává přeměnu glukózy na mastné kyseliny. [18, 76]

### 6.2 Růstový hormon

**Růstový hormon neboli somatotropin** je hormonem adenohipofýzy, jehož syntéza je regulována na základě mechanismů vycházejících z hypotalamu. Růstový hormon ovlivňuje růst a vývoj téměř veškeré důležité tkáně. [18]

Svým působením stimuluje účinky **glukoneogeneze** a **glykogenolýzy**. Nicméně je schopen ovlivňovat metabolismus glukózy i v negativním smyslu. Je schopen inhibovat využití glukózy v důležitých tkáních jako je tuková či svalová tkáň. Následkem je hyperglykémie, zvýšená syntéza inzulinu, inzulinová rezistenci či diabetes mellitus. [77, 78]



## 6.3 Glukagon

**Glukagon** je hormon vznikající v  $\alpha$ -buňkách pankreatu. Rovněž jako inzulin vzniká štěpením svého prekurzoru zvaného proglukagon. Jedná se o antagonistu inzulinu. [18]

Syntetizován je v souvislosti s poklesem **glykémie**. Při stresových stavech organismu, jako je hladovění či fyzická zátěž, produkce glukagonu stoupá. Přímo reguluje játra ke zvýšené syntéze glukózy de novo. [18, 79]

## 6.4 Trijódtyronin a tyroxin

**Trijódtyronin (T<sub>3</sub>) a tyroxin (T<sub>4</sub>)** jsou hormony štítné žlázy. Vznikají ve folikulárních buňkách prostřednictvím jodace tyrozinu zabudovaného v glykoproteinu tyreoglobulinu. Hormony štítné žlázy vstupují do cílových buněk prostřednictvím jaderných receptorů. [18]

Působením T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> je iniciován transport glukózy přes buněčnou membránu. Hormony štítné žlázy zvyšují resorpci glukózy v tenkém střevě. Rovněž ovlivňují i glykolýzu a glukoneogenezi. Nadměrné aktivace těchto hormonů vede k hyperglykémii. [80]

## 6.5 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy jsou skupinou hormonů vznikající ve vnitřní a střední části kůry nadledvin. Nejznámějším a nejvýznamnějším zástupcem je **kortizol**, jehož tvorba je stimulována prostřednictvím ACTH (adrenokortikotropní hormon). [18]

Prostřednictvím glukokortikoidů je ovlivňována nejen **glukóza**, ale také **glykogen**. Glukóza může být regulována hned několika způsoby. Glukokortikoidy stimulují glukoneogenezi v játrech a naopak v tukové tkáni a svalech snižují využití glukózy. Výsledkem tohoto mechanismu je hyperglykémie a inzulinová rezistence. Glykogen je v játrech vlivem glukokortikoidů využíván ve větší míře a naopak ve svalech dochází k inhibici syntézy glykogenu prostřednictvím potlačení funkce inzulinu. Hlavní úkolem glukokortikoidů je tedy zachovat homeostázu glukózy, neboť i krátkodobá expozice vysokým hladinám glukózy může mít na buněčný metabolismus nepříznivý vliv. [81, 82]

## 7 BUNĚČNÁ LINIE HEPG2

Buněčné linie jsou revoluční metodou, jak se co nejvíce přiblížit skutečným vlastnostem lidských tkání in vivo. Jsou výbornými in vitro alternativami primárních lidských buněk díky své vysoké dostupnosti, snadné manipulaci, neomezené viabilitě a stabilnímu fenotypu. Nacházejí své uplatnění při výrobě vakcín, při identifikaci metabolických drah léčiv, při testování cytotoxicity, u studia funkce genů či při vytváření umělých tkání. [83]

Dlouhou dobu byla HepG2 buněčná linie používána jako model pro buňky hepatoblastomu, hepatocelulárního karcinomu a primárních hepatocytů. Nicméně studie HepG2 buněk, založené na výzkumech molekulární struktury, prokázaly že HepG2 buňky jsou podobné karcinogenním buňkám a primárním hepatocytům pouze z částečného hlediska. [84]

**HepG2** je často používaná jaterní linie nádorového původu disponující podobným metabolismem, jako mají primární lidské hepatocyty za podmínek in vivo. Jejich hlavním rozdílem a omezením je snížená či chybějící exprese některých metabolických enzymů jako je cytochrom P450, jehož funkce hraje základní roli v první fázi oxidace xenobiotik. [85, 86]

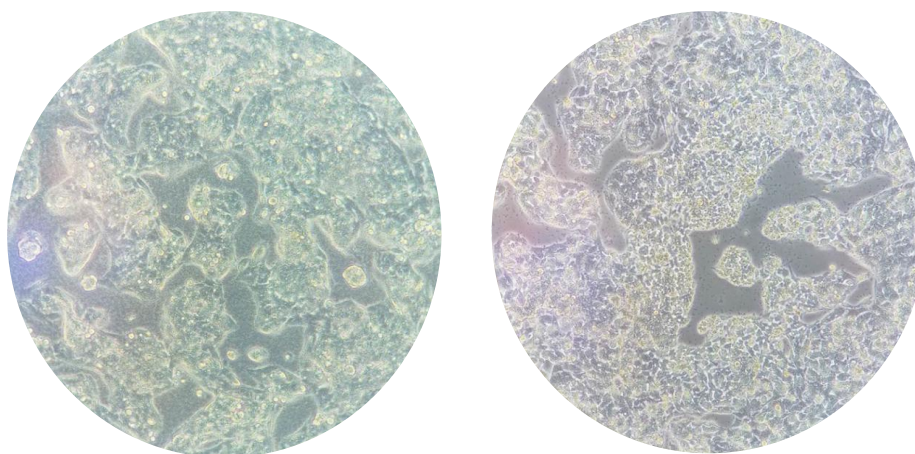
Byla původně objevena již v roce 1979. Zdrojem této linie byl hepatocelulární karcinom získaný z jater mladého chlapce. Používá se v celé řadě významných studií od in vitro testování mitochondriální aktivity, toxicity kovů, onkogeneze či jaterní cytotoxicity způsobené léky. [87]

## 7.1 Morfologické a biochemické vlastnosti

HepG2 buňky jsou dle zjištěných cytologických charakteristik středníkem mezi primárními lidskými hepatocyty *in vivo* a nádorovými buňkami. Obecně jsou primární hepatocyty relativně bohaté na organely, jako jsou mitochondrie a endoplazmatické retikulum. Tyto organely odrážejí schopnost buňky vykonávat energetický metabolismus a proteinovou syntézu. HepG2 buňky mají tuto organelovou výbavu, jakožto nádorová buňka poloviční. Typická je i abnormální struktura těchto organel odrážející podmínky stresového prostředí. Mají nestabilní genom obsahující přibližně 50 až 60 chromozomů. [88]

Vykazují širokou škálu specifických jaterních funkcí, jako je například inzulinová signalizace, syntéza a sekrece plazmatických proteinů, syntéza žlučových kyselin, syntéza glykogenu, metabolismus cholesterolu či metabolismus a transport lipoproteinů. [89]

Jsou to buňky adherentní povahy s vysokou schopností proliferace tvořící charakteristické ostrůvky a shluky. HepG2 buňky mají průměr okolo 10 až 20  $\mu\text{m}$ . V buňkách se nachází jedno jádro a přibližně 3 až 7 jadérek, které jsou výrazně větší velikosti než je tomu u *in vivo* primárních hepatocytů. [88, 90]



**Obrázek 15 – HepG2 buňky tvořící kolonie**

Inverzní mikroskop; zvětšení 400x

(vlastní zdroj pořízený na LF v HK)

## 7.2 Kultivace HepG2 buněk

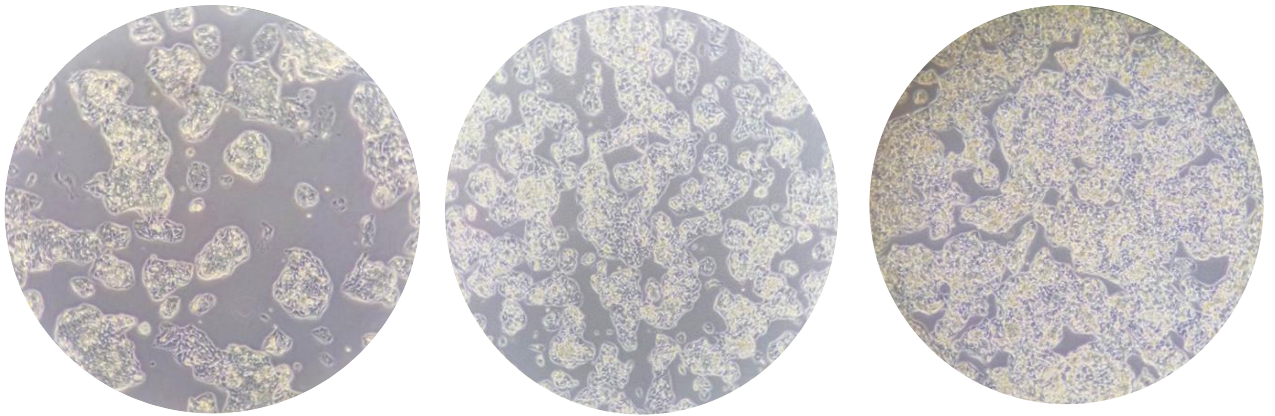
Nejčastěji se ke kultivaci HepG2 buněk používají komerčně dostupná média. Tyto média obsahují zejména anorganické soli, pufrý, glukózu, AMK a vitamíny. Součástí jsou i bioaktivní sloučeniny, jejichž koncentrace se liší na základě příslušného typu média. [91]

Nejčastějším typem média, jenž se pro kultivaci HepG2 buněk používá je **MEM** (minimální esenciální médium), které je obecně vhodným médiem pro růst širokého spektra savčích buněk. Médium MEM postrádá růstové faktory, lipidy a proteiny. Běžně je suplementováno pomocí FBS (fetální bovinní sérum), které by mělo zastupovat 10 % z celkového objemu. Toto médium se ještě běžně suplementuje o neesenciální AMK, ATB (antibiotika) a pyruvát. [92, 93]

Dalším médiem, jež se pro kultivaci HepG2 buněk používá ve velké míře, je **DMEM** (Dulbeccovo modifikované médium). DMEM, obsahuje oproti MEM čtyřikrát vyšší koncentraci AMK a vitamínů. Rovněž jako u MEM i toto médium vyžaduje suplementaci pomocí FBS. [94, 95]

Jakmile jsou HepG2 buňky nasazeny do kultivační láhve o nízké denzitně, tvoří podlouhlou nediferenciovanou strukturu. Následně se buňky aktivně dělí a při dosažení konfluencie 70 % se vytvářejí typické HepG2 kolonie. [90]

HepG2 buňky se **inkubují při teplotě 37 °C ve vlhké atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>**. Inkubační doba je závislá na míře konfluencie. Obvykle se doba duplikace buněk pohybuje mezi **24 až 48 hodinami**, kdy míra konfluencie poté činí **70 až 80 %**. V tomto rozmezí je pasážování buněk nejideálnější. [96]



**Obrázek 16 – Buňky HepG2 při různém stupni konfluence**

Inverzní mikroskop; zvětšení 100x

(vlastní zdroj pořízený na LF v HK)

**Na obrázcích číslo 16** vidíme pod inverzním mikroskopem různé stupně konfluence HepG2 buněk v kultivační nádobce. Obrázek na levé straně vykazuje nejnižší míru konfluence, která by se mohla pohybovat mezi 50 až 60 %. Obrázek uprostřed vykazuje střední míru konfluence a pro nás tedy nejideálnější množství buněk v kultivační nádobce. Zde by se konfluence mohla pohybovat mezi 70 až 80 %. A co se týče obrázku na pravé straně, tam je míra konfluence nejvyšší. Konfluence by v tomto případě přesahovala již 80 %.

Toto hodnocení je však velice subjektivní a odráží se na pozorovacích schopnostech výzkumného pracovníka.

## 8 PRAKTICKÁ ČÁST

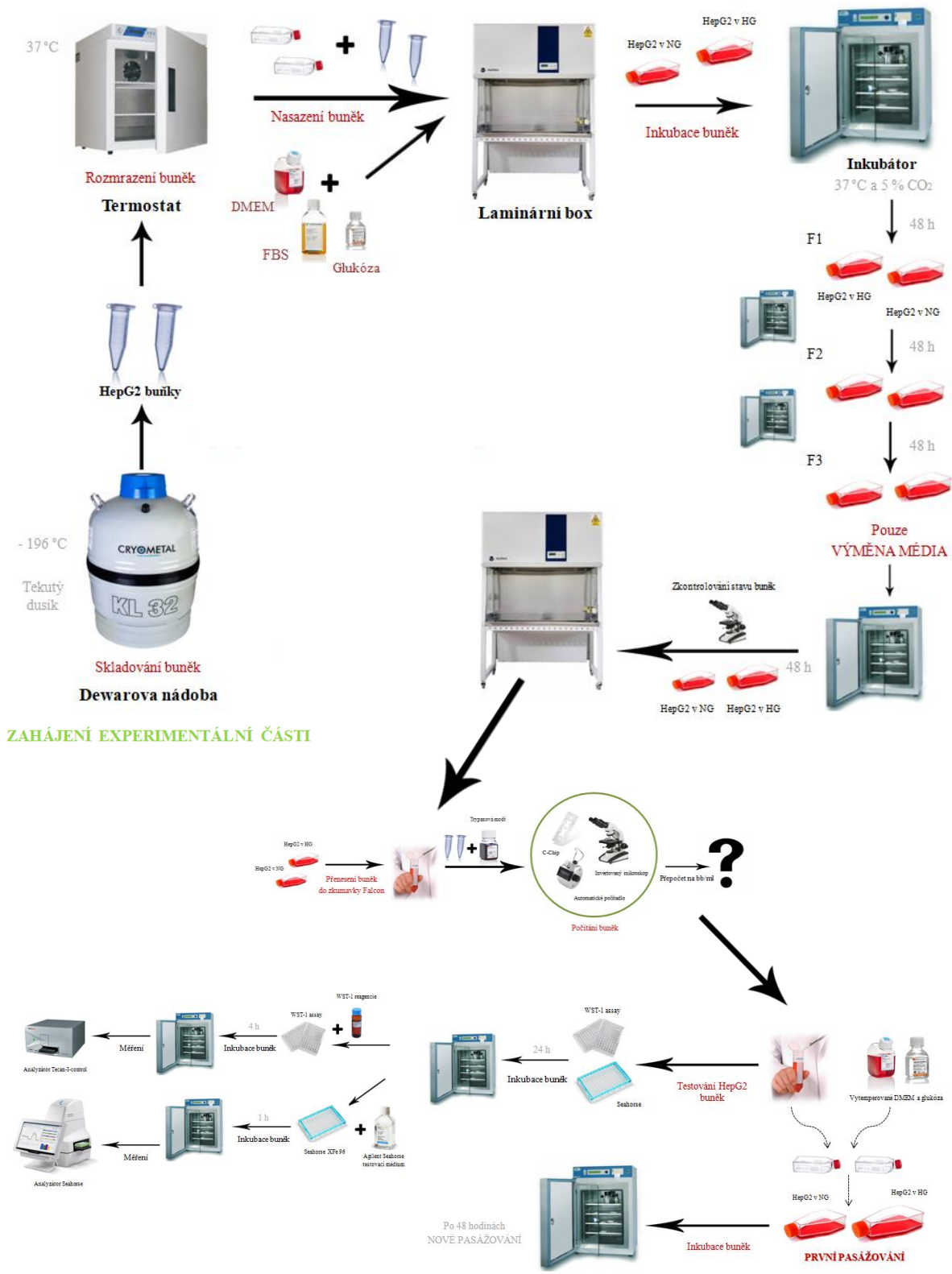
V praktické části jsem pracovala s imortilizovanou lidskou **buněčnou linií HepG2**. Snažila jsem se zjistit, jak je proměnlivá mitochondriální aktivita a mitochondriální bioenergetický profil v závislosti na koncentraci glukózy obsažené v kultivačním médiu.

Experimentální část práce zahrnovala kroky, jako je příprava kultivačního média, rozmrazení buněk, pasážování buněk a s ním spojené počítání buněk, nasazení buněk do nových kultivačních lahví a v neposlední řadě i nejdůležitější část práce analýzu buněk. Celý pracovní postup lze vidět na schematickém obrázku číslo 17.

Pěstovaly se dva fenotypy buněk, které původně pocházely z jednoho organismu. První fenotyp buněk byl pěstován v normoglykemickém prostředí, kde koncentrace glukózy byla 1g/L. Druhý fenotyp buněk byl pěstován v hyperglykemickém prostředí, kde koncentrace glukózy byla 5g/L.

Pro zjištění vzájemné korelace normoglykemického a hyperglykemického prostředí byly použity WST-1 assay, Cell Mito Stress Test a Glycolytic Rate Assay. U těchto testů byla použita různá metodika, týkající se aplikace HepG2 buněk do testovacích mikrotitračních jamek. Na některé jamky byl aplikován kolagen. U ostatních jamek k aplikaci kolagenu nedošlo.

Výsledným předmětem zkoumání byly tedy čtyři různé skupiny, které jsou v práci popisovány zkratkami NG+Col (normoglykemické HepG2 buňky s kolagenem), NG-Col (normoglykemické HepG2 buňky bez kolagenu), HG+Col (hyperglykemické HepG2 buňky s kolagenem) a HG-Col (hyperglykemické HepG2 bez kolagenu).



Obrázek 17 – Schéma znázorňující pracovní postup

(vlastní zdroj)

## 8.1 Příprava kultivačního média

V experimentu bylo, jako základní médium použito komerčně dodávané DMEM, které bylo následně ošetřeno dle potřeb normoglykemického či hyperglykemického prostředí. Oba typy médií byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C. Až před následným použitím, byla média v termostatu vytemperována na teplotu 37 °C.

Základním kultivačním médiem normoglykemického prostředí bylo komerčně dodávané DMEM. Součástí média je již glutamin a **glukóza v koncentraci 1g/L**. Médium obsahuje rovněž složky, jako jsou neesenciální AMK, pyruvát a ATB. Každá z těchto složek zaujímá v médiu 1 % z celkového objemu. Dále bylo k tomuto médiu suplementováno FBS, jež tvořilo 10 % z celkového objemu připraveného média.

Základním kultivačním médiem hyperglykemického prostředí bylo, rovněž komerčně dodávané DMEM, které bylo již v předešlém kroku pro potřeby normoglykemického prostředí suplementované FBS. Toto zásobní médium bylo potřeba upravit pro potřeby hyperglykemického prostředí. Doplněno bylo o 4 g/L glukózy. Konečná koncentrace glukózy v hyperglykemickém prostředí **byla následně 5 g/L**.



## 8.2 Rozmrazování buněk HepG2

Buněčná linie HepG2 byla skladována v odstředivých zkumavkách v prostředí tekutého dusíku při teplotě  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uchovávána byla v Dewarových nádobách v prostředí obsahující DMSO (dimethylsulfoxid). Po rozmrazení je DMSO pro buňky značně toxický, je tedy nutné následně zajistit, co nejrychlejší pracovní postup.

Z Dewarovy nádoby byla opatrně vytáhnutá buněčná linie HepG2 izolovaná z hepatocelulárního karcinomu roku 2018. Izolované HepG2 buňky byly rozmrazeny prostřednictvím termostatu vyhřátého na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ještě předtím byla vytemperována média obsahující určité koncentrace glukózy.

Mezitím, co se izolované buňky v termostatu rozmrazovaly, bylo nutné připravit si dvě kultivační láhve o velikosti plochy  $25\text{ cm}^2$ . Důležité je, aby byly kultivační láhve řádně označeny (typ buněk, datum a iniciály experimentátora). Poté bylo do těchto lahví přidáno 6 ml předem vytemperovaného média o určité koncentraci glukózy.

Jakmile se HepG2 buňky rozmrazily, byly přeneseny do předem připravených označených kultivačních lahví. Následně byly kultivační láhve s HepG2 buňkami zkontrolovány pod inverzním mikroskopem a vloženy do inkubátoru. Zde byly buňky inkubovány při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve zvlhčeném prostředí pomocí 5 %  $\text{CO}_2$ .

Veškerá práce, co se týče aplikace média či samotná aplikace HepG2 buněk do kultivačních lahví probíhala za podmínek sterilního prostředí laminárního boxu.

### 8.3 Pasážování a počítání HepG2 buněk

Při každé návštěvě laboratoře bylo jako první nutné si kultivační láhve s vypěstovanými buňkami zkontrolovat pod inverzním mikroskopem. Kontrola vedla ke zjištění, zda buňky neutrpěly během inkubace šok a zda jsou stále ve viabilním stavu. Ohodnoceno bylo i okolní prostředí buněk, zda v láhvi není přítomna kontaminace. Následně byla subjektivně dle experimentátora zhodnocena i míra konfluence. Jakmile byla míra konfluence zhruba 70 až 80 %, bylo možné začít s pasážováním.

Nicméně ještě před samotným zahájením práce bylo potřeba, nachystat si veškeré roztoky a kultivační pomůcky. Vždy před pasážováním či před výměnou média, byly v termostatu vytemperovány veškeré roztoky na teplotu 37 °C (obě používaná média DMEM, trypsin a PBS).

V laminárním boxu byla připravena odsávací pipeta, pomocí které bylo z kultivační láhve odsáto staré médium. Poté byl k buňkám na promytí přidán roztok sterilního PBS (fosfátový pufr), díky čemuž se od sebe vzájemně oddělily živé a neživé buňky. Mrtvé buňky se odlepily ode dna kultivační láhve a následně bylo možné je jako součást roztoku PBS odsát. Tento promývací postup byl aplikován celkem třikrát. Po posledním odsátí PBS byl do kultivační láhve napipetován trypsin, jehož množství závisí na velikosti použité kultivační láhve.

Pro běžné pasážování byly používány kultivační láhve o velikosti 75 cm<sup>2</sup>. Pro tuto velikost byly potřeba 2 ml trypsinu. Ze začátku experimentu, když se buňky HepG2 teprve rozmrazovaly, byly používány kultivační láhve velikosti 25 cm<sup>2</sup>. Pro tuto velikost bylo potřeba 0,666 ml trypsinu.

Jakmile byl do kultivačních lahví napipetován trypsin, byly kultivační láhve na dobu 7 minut vloženy nazpět do inkubátoru. Po uplynutí 7 minut byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem. Tím se ověřilo, zda se buňky již odlepily ode dna kultivační láhve. V co nejrychlejším a nejkratším kroku bylo nutné do kultivačních lahví přidat 8 ml vytemperovaného média, což vedlo k neutralizaci účinků trypsinu.

Za pomoci automatické pipety byly láhve několikrát médiem propláchnuty, aby byla výtěžnost buněk co nejvyšší. Následně byly buněčné suspenze pomoci automatické pipety přeneseny do předem připravených sterilních zkumavek Falcon.

Pokud hodnota konfluence byla z nějakého důvodu nižší, bylo nutné buňky pomoci roztoku PBS propláchnout. Tento promývací postup byl aplikován celkem třikrát. Po odsátí PBS, byla do kultivačních láhvi napipetována nová předem vytemperovaná média.

Během následného počítání HepG2 buněk byly použity materiály a pracovní pomůcky, jako jsou počítací komůrky zvané C-chip, odstředivé zkumavky, inverzní mikroskop, automatické počítadlo a pomoci PBS naředěný roztok trypanové modře. Počítání buněk následuje po trypsinizaci buněčné suspenze. Respektive po neutralizaci trypsinu vytemperovanými médii a následným přenesením HepG2 buněk z kultivačních láhvi do sterilních zkumavek Falcon. Jak bylo podrobně popsáno již o něco dříve.

Předem byly připraveny centrifugační zkumavky, do kterých se pipetovalo 20  $\mu$ l roztoku trypanové modře. Do centrifugačních zkumavek s modří se následně přidávalo i 20  $\mu$ l získaných buněčných suspenzí. Celkový objem centrifugačních zkumavek bylo nutné řádně promíchat. Z takto připravené suspenze bylo do počítacích komůrek (C-Chip) přeneseno 20  $\mu$ l.

Trypanová modř je využívána z důvodu oddělení živých a neživých buněk, díky čemuž se usnadní i následné počítání. Buňky se počítaly celkem ve čtyřech čtvercích. Vždy dva čtverce z levé poloviny komůrky (část A) a dva čtverce z pravé poloviny komůrky (část B). Základem pro počítání bylo pravidlo dvou stran.

Dle zjištěného počtu HepG2 buněk v 1 ml, byl definován počet buněk, který byl zapotřebí k novému pasážování. Následně bylo toto požadované množství buněk v závislosti na zjištěném počtu buněk přepočítáno na objem. Čímž se zjistilo, kolik ml buněčné suspenze je zapotřebí přenést ze zkumavek Falcon do nových sterilních kultivačních láhvi.

Výpočet byl proveden dle toho, kolik buněk bylo zrovna do nových kultivačních láhví potřeba nasadit. Většinou byly buňky nasazovány na plochu 75 cm<sup>2</sup> v počtu 1×10<sup>6</sup> až 2×10<sup>6</sup>. Buňky se nasazovaly do kultivačních lahví, ve kterých bylo již předem připraveno 13 ml vytemperovaného média. Nové nasazení buněk probíhalo za účelem pěstování a testování dalších HepG2 generací.

Nakonec bylo nutné si kultivační láhve, v nichž už byly přítomny buňky, zkontrolovat i pod inverzním mikroskopem. Ověřilo se tak, zda byla kultivace provedena správně a zda jsou buňky v láhvi přítomny. Označené láhev s buňkami HepG2 byly následně vloženy do inkubátoru. Tento pracovní postup byl za dobu 48 hodin opět opakován.

Zbylé buněčné suspenze přítomné ve zkumavkách Falcon, byly využity na další experimenty potřebné k porovnání mitochondriální bioenergetiky u HepG2 buněk normoglykemického a hyperglykemického prostředí.

### **8.3.1 HepG2 v normoglykemickém prostředí**

Normoglykemické HepG2 buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích v prostředí suplementovaného média DMEM o koncentraci glukózy 1g/L. Na pohled byly HepG2 buňky pěstované v normoglykemickém prostředí mnohem menší, nežli HepG2 buňky pěstované v hyperglykemickém prostředí.

Během procesu trypsinizace jsem měla pocit, že tento fenotyp buněk byl vůči trypsinu méně odolný. Bylo tedy opravdu důležité pohlídat si dobu po přidání trypsinu, aby nedošlo k nežádoucímu usmrcení buněk. Jak již bylo popsáno v předchozím kroku, tak se k neutralizaci trypsinu následně pipetuje i 8 ml příslušného vytemperovaného média. Čas přidání média po přidání trypsinu by měl být mezi 6 až 7 minutami. Buňky pěstované v normoglykemickém prostředí jsem si raději pod inverzním mikroskopem kontrolovala již po 6 minutách. Po této době bylo už patrné, že se buňky ode dna kultivační láhve snadno odlepily a bylo tak možné s nimi nadále pracovat. Pracovní postup musel být opravdu rychlý.

Počítání, nasazení buněk do nových kultivačních lahví a inkubace probíhaly, již za stejných podmínek u obou fenotypů HepG2 buněk.

Následná kontrola za 24 hodin (popřípadě 48 hodin) poukázala na to, že buňky při normální koncentraci glukózy rostou pomaleji a jejich denzita je v kultivační láhvi opticky nižší. Nicméně tento fakt může být zapříčiněn určitým zkreslením, které přikládám tomu, že buňky HepG2 jsou v hyperglykemickém prostředí větší velikosti, což jejich denzitu i opticky zvyšuje.

### **8.3.2 HepG2 v hyperglykemickém prostředí**

Hyperglykemické HepG2 buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích v prostředí suplementovaného média DMEM o koncentraci glukózy 5g/L. Na pohled byly HepG2 buňky pěstované v hyperglykemickém prostředí mnohem větší, nežli HepG2 buňky pěstované v normoglykemickém prostředí.

Během procesu trypsinizace, jsem měla pocit, že tento fenotyp buněk byl vůči trypsinu více odolný. Čas přidání média po přidání trypsinu, by měl být i v tomto případě mezi 6 až 7 minutami. Buňky pěstované v hyperglykemickém prostředí jsem si pod inverzním mikroskopem kontrolovala něco málo před ukončenou 7 minutou. Tyto HepG2 buňky se ode dna kultivační láhve odlepovaly hůře, nežli to bylo u normoglykemických HepG2 buněk. Ve většině případů bylo potřeba provést i mírný poklep o boční hranu kultivační láhve, aby se buňky ode dna láhve vůbec odlepily. Poté bylo možné s buňkami nadále pracovat. Bylo potřeba, co nejrychleji do kultivační láhve k neutralizaci trypsinu přidat i 8 ml vytemperovaného média DMEM s koncentrací glukózy 5g/L.

Počítání, nasazení buněk do nových kultivačních lahví a inkubace probíhaly již za stejných podmínek u obou fenotypů HepG2 buněk.

Následná kontrola za 24 hodin (popřípadě 48 hodin) poukázala na to, že buňky při zvýšené koncentraci glukózy rostou do větší velikosti. Předpokládala jsem, že se i rychleji dělí a jejich množství bude rovněž zvýšené.

Nicméně na základě faktu zjištěného během počítání HepG2 buněk, jsem došla k jinému závěru. Počet HepG2 buněk byl v 1 ml u obou typů téměř obdobný, respektive se jednalo o rozdíl zcela zanedbatelný. Předpokládám, že vyšší denzita buněk je zkreslována zvětšenou velikostí HepG2 buněk v hyperglykemickém prostředí.

Co se týče nároku na živiny, tak hyperglykemické HepG2 buňky byly na spotřebu živin náročnější. Živiny obsažené v médiu spotřebovaly rychleji, nežli normoglykemické HepG2 buňky.

## **8.4 Použité testovací metody a analýzy**

Buněčná a mitochondriální funkčnost byla u normoglykemických a hyperglykemických HepG2 buněk testována prostřednictvím několika metod. První metodou byl WST-1 assay, prováděný na analyzátoru Tecan-I-control. Prostřednictvím tohoto testu, byly získány informace týkající se viability HepG2 buněk pěstovaných za rozdílných podmínek. Dalšími metodami byly Cell Mito Stress Test a Glycolitic Rate Assay, prováděné na přístroji Agilent Seahorse XFe 96. Prostřednictvím těchto testů, byly získány informace týkající se parametrů OCR a ECAR.

### **8.4.1 Statistická analýza**

U **WST-1 assay** byla získaná data z analyzátoru Tecan-I-control automaticky přenesena do programu Microsoft Office Excel (přílohy 1 až 3). Data byla následně zpracována do podoby jednoduchých XY bodových grafů (přílohy 4 až 9). U těchto jednoduchých grafů byla přidána lineární spojnice trendu, byla vytvořena rovnice regrese a rovněž byla i definována hodnota spolehlivosti R. Hodnota R se může pohybovat v intervalu od 0 do 1. Popisuje, jak přesně odpovídají skutečné naměřené hodnoty hodnotám předpokládaným. Na základě definované hodnoty R je poté možné určit, zda naměřená data byla signifikantní. Čím blíže je hodnota spolehlivosti R číslu 1, tím vyšší významnost byla nalezena. Díky tomu bylo možné data již jednoduše na pohled zhodnotit. Následně byla získaná data zpracována i prostřednictvím programu GraphPad Prism 9.

Jedná se o program, jenž je speciálně vytvořen pro vědecké experimenty. Respektive je využíván za účelem tvorby analýz naměřených dat a k následnému přenesení výsledků do podoby grafů. Je to jednoduchý způsob, jak se dají elegantně a výstižně interpretovat naměřená data. V tomto programu byl k interpretaci analyzovaných dat zvolen XY bodový graf s vyznačenými spojnicemi a značkami. Rovněž byly u grafů vyznačeny i chybové úsečky popisující povolené chyby a směrodatné odchylky. K analýze naměřených dat byla použita nelineární regresivní analýza, jejímž principem je spojení obou proměnných (X a Y hodnot) za použití nelineárního vztahu.

**U Cell Mito Stress Test a Glycolytic Rate Assay** byla data z analyzátoru Agilent Seahorse XFe 96 přenesena do softwarového programu Seahorse Wave Desktop Software (přílohy 10 až 16). Data byla následně prostřednictvím tohoto programu zpracována do podoby, již publikovatelných grafů (přílohy číslo 18 a 19). Následně byla získána data zpracována i prostřednictvím programu GraphPad Prism 9. Prostřednictvím tohoto programu byla provedena statistická analýza jednosměrná ANOVA. Pomocí níž byla automaticky vypočtena hladina signifikace (p-hodnota), která je používána za účelem statistického testování hypotéz.

P-hodnota je následně porovnávána se stanovenou hladinou významnosti. Hladina významnosti byla pro tyto experimenty stanovena na hodnotu 0,05. K interpretaci analyzovaných dat byl zvolen sloupcový graf, u kterého byly pro vyšší přehlednost propojeny vzájemné vztahy testovacích skupin. Rovněž byly pro lepší přehlednost použity hvězdičky vyjadřující míru signifikace. Jedna hvězdička je typická pro **p-hodnotu nižší než 0,05**. Dvě hvězdičky jsou typické pro **p-hodnotu nižší než 0,01** a tři hvězdičky jsou typické pro **p-hodnotu nižší nežli 0,001**. Nesignifikantní výsledek je detekován při hladině p-hodnoty vyšší nežli 0,05.

## 8.4.2 WST-1 assay

Během experimentů byl k analýze normoglykemických a hyperglykemických HepG2 buněk použit WST-1 assay. Principem analýz bylo zjistit, jak připravená média obsahující jednotlivé koncentrace glukózy (1g/L a 5g/L) ovlivňují buněčnou viabilitu u výše zmiňované buněčné linie.

Používány byly **dva fenotypy buněk**. První fenotyp buněk byl po celou dobu pěstovaný v médiu, jehož **koncentrace glukózy byla 1g/L**. Druhý fenotyp buněk byl po celou dobu pěstovaný v médiu, jehož **koncentrace glukózy byla 5g/L**.

Rozhodla jsem se, že během WST-1 experimentů se budu pohybovat ve třech početních skupinách. Testovala jsem HepG2 buňky, které byly v mikrotitrační destičce zastoupeny v počtu 3 000 až 33 000 bb/jamku, v počtu 4 000 až 44 000 bb/jamku a nakonec v počtu 5 000 až 55 000 bb/jamku. Členění bylo provedeno z důvodu **optimalizace experimentálních podmínek**, přičemž při vyšší buněčné hustotě může být metabolická aktivita ovlivněna na základě hypoxie, což by mělo za následek nevalidní výsledky. Naopak nižší buněčná hustota může podmiňovat nižší metabolickou aktivitu, což by vedlo ke snížené schopnosti získat dostatečné množství signálu. Dále z důvodu **snížení variability**, přičemž použití menšího počtu buněk v určitém rozmezí může vést k lepší přesnosti naměřených dat. Posledním důvodem je **minimalizace následné spotřeby buněk**. Použití menšího rozmezí buněk pro každou skupinu umožňovalo minimalizovat spotřebu buněk, což bylo výhodné, jelikož při jednom pasážování bylo k dispozici jen určité omezené množství HepG2 buněk.

K analýze buněčné viability byl použit analyzátor Tecan-I-control. Používaly se mikrotitrační destičky určené pro tkáňovou kulturu, tvořené 96 jamkami s plochým dnem. Rozhodla jsem se, že některé jamky mikrotitračních destiček budou potaženy vrstvou kolagenu a některé jamky vrstvou kolagenu potaženy nebudou. Zajímalo mě, zda i tato rozdílná metodika bude mít na jednotlivá měření vliv.



Nejprve byly jamky některých mikrotitračních destiček potaženy 55  $\mu$ l kolagenového roztoku. Nakolagenovaná destička se poté ponechala v laminárním boxu přibližně na dobu 15 minut inkubovat, aby se vytvořila vrstva kolagenu, která by následně HepG2 buňkám poskytla lepší podporu pro adhezi a buněčný růst. Následně byl odsávací pipetou zbytek kolagenu z jamek odstraněn. Poté bylo již možné začít s pipetováním předem ošetřené buněčné suspenze. U mikrotitračních destiček, u kterých jsem se pro kolagenaci jamek nerozhodla, bylo již prvním krokem pipetování předem ošetřené buněčné suspenze. Dané buněčné suspenze byly předem jednotlivě ošetřeny dle potřebného počtu buněk na jednu jamku příslušným kultivačním médiem.

Každá mikrotitrační destička byla rozdělena na dvě stejné části. Jedna část destičky byla určena pro buňky HepG2, jež byly pěstované **v normoglykemickém prostředí** (1g/L), druhá část destičky byla určena pro buňky HepG2, jež byly pěstované **v hyperglykemickém prostředí** (5g/L). Jako blank bylo použito čisté médium obsahující příslušnou koncentraci glukózy. Konečný objem připravené buněčné suspenze s médiem byl 100  $\mu$ l na jamku.

Takto připravená destička byla ponechána v inkubátoru **na dobu 24 hodin při teplotě 37°C ve zvlhčené atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>**. Jakmile byla inkubační doba u konce, z příslušných jamek se prostřednictvím odsávací pipety odstranilo vodné prostředí tvořené suplementovaným médiem DMEM.

Odsáté jamky byly dvakrát propláchnuty pomocí multikanálové pipety roztokem PBS. Opět se pro proplach jamek použil objem 100  $\mu$ l. Následně bylo z jamek odsáto vodné prostředí v tomto případě tvořené již PBS. Po následném odsátí PBS bylo k HepG2 buňkám přilnutým ke dnu jamek, aplikováno i předem připravené médium zkombinované s WST reagensy v poměru 10:1. Nakonec byla mikrotitrační destička inkubována **po dobu 4 hodin při teplotě 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>**. Po uplynutí inkubační doby byla destička spektrofotometricky změřena pomocí přístroje Tecan-I-control. Absorbance se v jednotlivých jamkách měřila při **vlnové délce 440 nm**.

### 8.4.3 Cell Mito Stress Test a Glycolytic Rate Assay

Během experimentů byly k analýze normoglykemických a hyperglykemických HepG2 buněk použity testy Cell Mito Stress Test a Glycolytic Rate Assay. Principem analýz bylo zjistit, jak připravená média obsahující jednotlivé koncentrace glukózy (1g/L a 5g/L) ovlivňují mitochondriální bioenergetický profil. Analyzovány byly parametry mitochondriální respirace a glykolýzy.

Používány byly **dva fenotypy buněk**. První fenotyp buněk byl po celou dobu pěstovaný v médiu, jehož **koncentrace glukózy byla 1g/L**. Druhý fenotyp buněk byl po celou dobu pěstovaný v médiu, jehož **koncentrace glukózy byla 5g/L**.

K analýzám mitochondriální bioenergetiky byl použit analyzátor Agilent Seahorse XF 96. Používaly se mikrotitrační destičky Seahorse XFe, tvořené 96 jamkami s kulatým dnem. I zde jsem se rozhodla, že některé jamky mikrotitračních destiček budou potaženy vrstvou kolagenu a některé jamky vrstvou kolagenu potaženy nebudou. Zajímalo mě, zda tato rozdílná metodika bude mít na jednotlivá měření bioenergetických parametrů vliv.

Každá mikrotitrační destička byla rozdělena na čtyři stejné části. Jedna polovina destičky byla určena pro buňky HepG2, jež byly pěstované **v normoglykemickém prostředí** (1g/L), druhá část destičky byla určena pro buňky HepG2, jež byly pěstované **v hyperglykemickém prostředí** (5g/L). Tyto dvě poloviny byly následně také rozděleny na dvě stejné části. Přičemž v jedné části byla provedena kolagenace jamek a v druhé části kolagenace jamek provedena nebyla.

Nejprve byly jamky některých mikrotitračních destiček potaženy 30  $\mu$ l kolagenu. Nakolagenovaná destička se poté ponechala inkubovat v laminárním boxu přibližně na dobu 15 minut. Následně byl odsávací pipetou zbytek kolagenu z jamek odstraněn. Poté bylo již možné začít s pipetováním předem ošetřené buněčné suspenze. Dané buněčné suspenze byly předem jednotlivě ošetřeny dle potřebného počtu buněk na jednu jamku příslušným kultivačním médiem, tak aby byly vždy nasazeny **v koncentraci 20 000 buněk na jamku**. Konečný objem připravené buněčné suspenze s médiem byl 30  $\mu$ l na jamku.

Takto připravená destička byla ponechána v inkubátoru **na dobu 24 hodin při teplotě 37°C ve zvlhčené atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>**. Jakmile byla inkubační doba u konce, z příslušných jamek se prostřednictvím odsávací pipety odstranilo vodné prostředí tvořené suplementovaným médiem DMEM.

Odsáté jamky byly dvakrát propláchnuty pomocí multikanálové pipety testovacím médiem Seahorse XF DMEM Medium. Opět se pro proplach jamek použil objem 30  $\mu$ l. Testovací médium s pH 7,4 obsahuje 5 mmol HEPES, 1 mmol pyruvátu, 4 mmol glutamatu, neobsahuje bikarbonát a bylo doplněno na koncentraci glukózy 1 g/L. Následně bylo testovací médium do jamek aplikováno ještě naposledy. Takto připravená mikrotitrační destička byla inkubována **po dobu 1 hodiny při teplotě 37°C bez přítomnosti CO<sub>2</sub>**. Po uplynutí inkubační doby byla destička změřena pomocí přístroje Agilent Seahorse XFe 96.

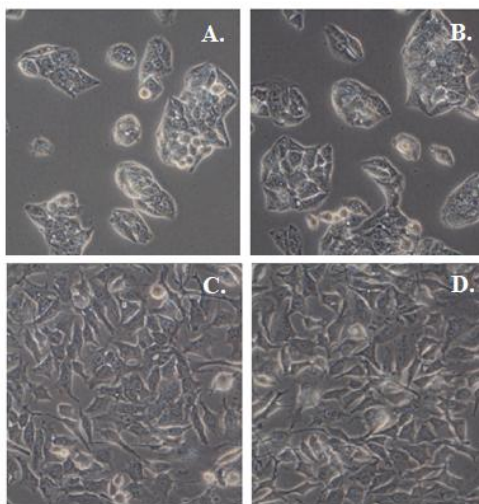
HEPES je zásaditý pufr, který se využívá k udržení fyziologické hladiny pH. V buňkách a tkáních by měla být hodnota pH udržována v rozmezí 6,8 až 8,2. DMEM neobsahující bikarbonát je aplikován z důvodu toho, že by v prostředí Seahorse reagoval s kyselinou chlorovodíkovou, která se používá ke kalibraci senzorů, jenž se používají pro měření hladiny pH. Tato reakce by mohla ovlivnit následné měření. Destička je inkubována v prostředí bez CO<sub>2</sub> kvůli tomu, aby nedocházelo k nežádoucí reakci v podobě tvorby kyseliny uhličité, což by mělo rovněž na měření interferující vliv. [97, 98]

Příprava destiček pro Cell Mito Stress Test a Glycolytic Rate Assay se lišila pouze na základě použitých inhibitorů. U Cell Mito stress Test se použily inhibitory blokující důležité enzymy dýchacího řetězce. Těmito inhibitory byly oligomycin, FCCP a rotenon/antimycin A. Oligomycin inhibuje ATP-syntázu a způsobuje tak zpomalení oxidační fosforylace. FCCP umožňuje navýšení protonového gradientu, což podmiňuje maximální respirační rychlost. Rotenon a antimycin A inhibují komplexy dýchacího řetězce číslo I a III, následkem toho je blokáce elektronového transportního řetězce a současně s tímto dějem dochází i ke snížení rychlosti probíhající buněčné respirace. Všechny inhibitory byly aplikovány v koncentraci 1  $\mu$ mol. U Glycolytic Rate Assay se použily inhibitory, jako jsou rotenon a 2-DG. Rotenon byl aplikován v koncentraci 1  $\mu$ mol a 2-DG byla aplikována v koncentraci 20 mmol. [97, 98]

## 8.5 Kolagenace a nekolagenace testovacích jamek

Jak bylo již popsáno u konkrétních metod. Předmětem zájmu bylo také zjistit, zda i případná kolagenace či nekolagenace jamek použitých mikrotitračních destiček, bude mít na analyzované parametry, zjišťované u normoglykemických a hyperglykemických HepG2 buněk, nějaký vliv. Kolagenace jamek by měla vést ke zvýšení citlivosti a přesnosti používaných analýz. [99]

Aplikace kolagenu se začleňuje do pracovních postupů z důvodu zajištění lepší adheze buněk k ploše jamek, zajišťuje také rovnoměrný růst přilnutých buněk a současně se vlivem kolagenace pozměňuje i morfologické struktura buněk, jak lze vidět na následujících obrázcích číslo 18. [99]



**Obrázek 18 – HepG2 buňky neošetřené (A a B) a ošetřené (C a D) vrstvou kolagenu**

Světelný mikroskop s fázovým kontrastem; zvětšení 100x

**Nekolagenací jamek** byl zachován původní tvar HepG2 buněk, jejichž typickou vlastností je tvorba agregátů. Nekolagenace jamek mikrotitračních destiček je patrná na obrázcích A a B.

**Kolagenací jamek** byl zajištěn plošný hvězdicovitý tvar HepG2 buněk. Následnou změnou tvaru došlo i ke zhoršení možnosti přístupu kyslíku k HepG2 buňkám. Kolagenace jamek mikrotitračních destiček je patrná na obrázcích C a D.

## 9 VÝSLEDKY

Během testování se porovnávaly vzájemné vztahy mezi normoglykemickými a hyperglykemickými HepG2 buňkami. Porovnávalo se také, zda různorodá příprava mikrotitračních destiček bude mít na následná měření nějaký vliv.

### 9.1 Stanovení viability HepG2 buněk

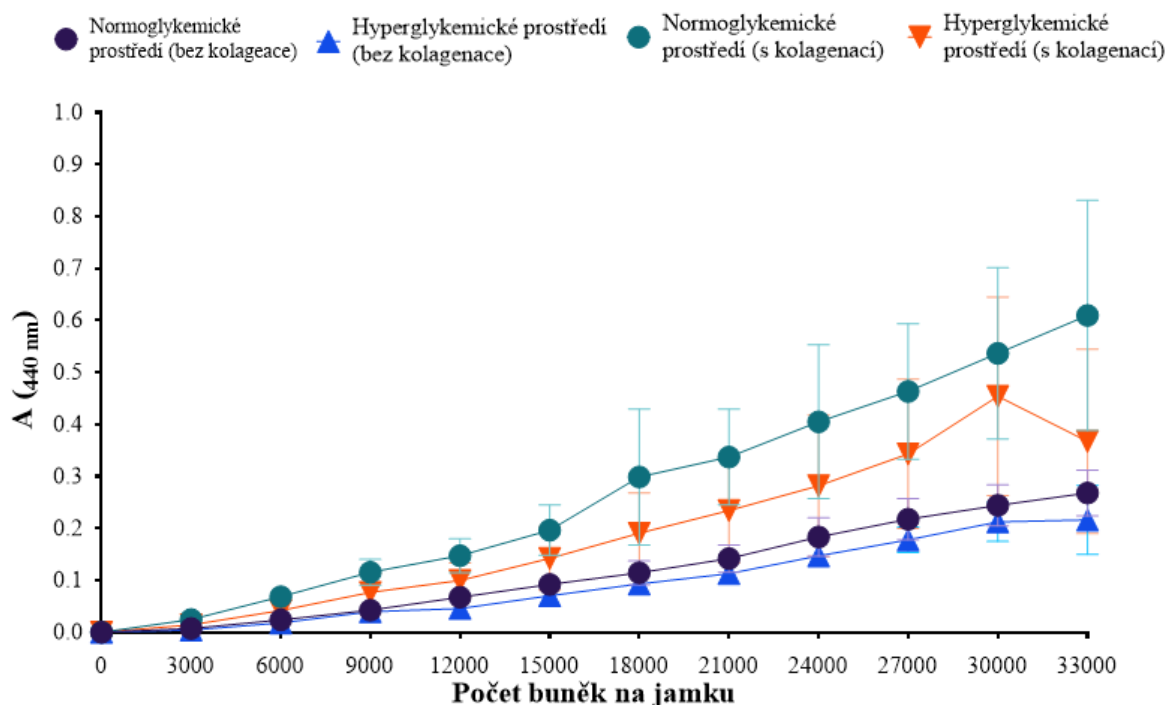
Ke stanovení buněčné viability HepG2 buněk byl použit WST-1 assay, jehož principem byla spektrofotometrická detekce absorbance při vlnové délce 440 nm. Viabilita buněk byla testována na rozhraní dvou různých prostředí (normoglykemické a hyperglykemické prostředí), ve kterých byly HepG2 buňky vystaveny dlouhodobé expozici různým koncentracím glukózy (1g/L a 5g/L).

Testovaly se tři různé početní skupiny. První analyzovaná skupina byla v rozmezí 3 000 až 33 000 buněk na jamku. Druhá analyzovaná skupina byla v rozmezí 4 000 až 44 000 buněk na jamku. Třetí analyzovaná skupina byla v rozmezí 5 000 až 55 000 buněk na jamku.

#### 9.1.1 Počet 3 000 až 33 000 buněk na jamku

Nejdříve byly testovány HepG2 buňky v počtu od 3 000 do 33 000 buněk na jamku. Z legendy grafu číslo 1 je patrné, že buněčná linie HepG2 byla rozdělena na dva fenotypy. Prvním fenotypem byly buňky přizpůsobené dlouhodobým expozičním podmínkám normoglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 1 g/L. Druhým fenotypem byly buňky přizpůsobené dlouhodobým expozičním podmínkám hyperglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 5 g/L. Současně byly navoleny i destičky, u kterých byl na povrch jamek aplikován kolagen. U zbývajících destiček aplikace kolagenu provedena nebyla. Zjišťovalo se, zda i tato rozdílná metodika bude mít na výsledná měření vliv.

## Korelace HepG2 buněk pěstovaných v normoglykemickém a hyperglykemickém prostředí



**Graf 1 – Odlišná viabilita buněčné linie následkem dlouhodobé expozice různým koncentracím glukózy**

Buněčná linie HepG2 v počtu 3 000 až 33 000 bb/jamku: NG ± Col (1 g/L); HG ± Col (5 g/L); WST-1 assay (450 nm); skupiny HG+Col a NG+Col byly tvořeny každá 24 jamkami; počet testovaných destiček byl u těchto parametrů 6; skupiny HG-Col a NG-Col byly tvořeny každá 16 jamkami; počet testovaných destiček byl u těchto parametrů 4

HG-Col x HG+Col ( $\emptyset = 0,1485$ ;  $SD = 0,164$ ); NG+Co x NG-Col ( $\emptyset = 0,226$ ;  $SD = 0,193$ );

NG+Col x HG+Col ( $\emptyset = 0,248$ ;  $SD = 0,199$ ); NG-Col x HG-Col ( $\emptyset = 0,235$ ;  $SD = 0,256$ )

Informace k jednotlivým naměřeným hodnotám:

NG-Col ( $\emptyset = 0,128$ ;  $SD = 0,089$ ); HG-Col ( $\emptyset = 0,103$ ;  $SD = 0,076$ ); NG+Col ( $\emptyset = 0,291$ ;  $SD = 0,214$ );

HG+Col ( $\emptyset = 0,204$ ;  $SD = 0,169$ )

Na grafu číslo 1 můžeme pozorovat, jak různorodá hladina glukózy ovlivňovala buněčnou viabilitu HepG2 buněk po 24 hodinové inkubaci s reagensí při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Buněčná viabilita je zde interpretována v podobě absorbance měřené při vlnové délce 440 nm.

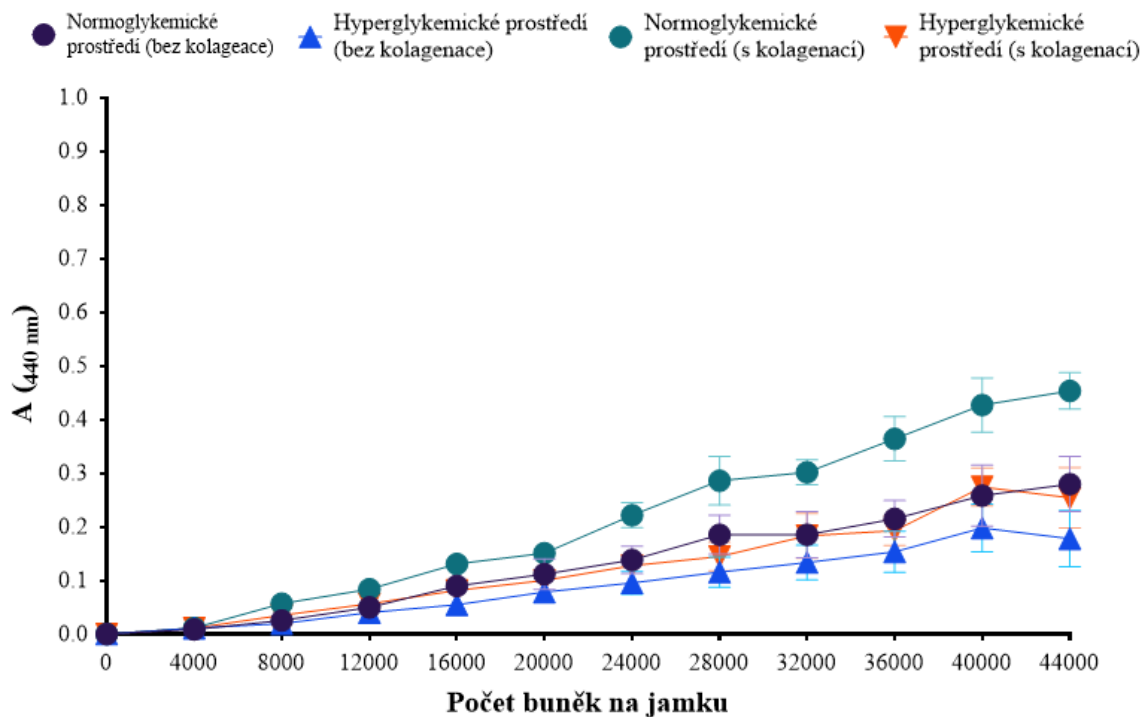
Už na pohled je z grafu číslo 1 patrné, že nejnižší stupeň viability byl detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v HG-Col. O něco vyšší stupeň viability byl detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v NG-Col. Střední stupeň viability byl detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v HG+Col. Nejvyšší stupeň viability je dle grafu číslo 1 detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v NG+Col.

Nejvyšší korelace analyzovaných hodnot byla patrná mezi H+Col a HG-Col. Nejnižší korelace naměřených hodnoty byla dle uvedených SD pod grafem číslo 3 mezi NG-Col a HG-Col.

### **9.1.2 Počet 4 000 až 44 000 buněk na jamku**

Následně byly testovány HepG2 buňky v počtu od 4 000 do 44 000 buněk na jamku. Z legendy grafu číslo 2 je patrné, že buněčná linie HepG2 byla rozdělena na dva fenotypy. Prvním fenotypem byly buňky přizpůsobené dlouhodobým expozičním podmínkám normoglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 1 g/L. Druhým fenotypem byly buňky přizpůsobené dlouhodobým expozičním podmínkám hyperglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 5 g/L. Současně byly navoleny i destičky, u kterých byl na povrch jamek aplikován kolagen. U zbývajících destiček aplikace kolagenu provedena nebyla. Zjišťovalo se, zda i tato rozdílná metodika bude mít na výsledná měření vliv.

## Korelace HepG2 buněk pěstovaných v normoglykemickém a hyperglykemickém prostředí



**Graf 2 – Odlišná viabilita buněčné linie následkem dlouhodobé expozice různým koncentracím glukózy**

Buněčná linie HepG2 v počtu 4 000 až 44 000 bb/jamku: NG ± Col (1 g/L); HG ± Col (5 g/L); WST-1 assay (450 nm); každá skupina byla tvořena 24 jamkami; počet testovaných destiček byl u každého z parametrů 6

HG-Col x HG+Col ( $\emptyset = 0,115$ ;  $SD = 0,079$ ); NG+Co x NG-Col ( $\emptyset = 0,293$ ;  $SD = 0,213$ );  
 NG+Col x HG+Col ( $\emptyset = 0,183$ ;  $SD = 0,130$ ); NG-Col x HG-Col ( $\emptyset = 0,119$ ;  $SD = 0,083$ )

Informace k jednotlivým naměřeným hodnotám:

NG-Col ( $\emptyset = 0,141$ ;  $SD = 0,093$ ); HG-Col ( $\emptyset = 0,098$ ;  $SD = 0,066$ ); NG+Col ( $\emptyset = 226$ ;  $SD = 0,147$ );  
 HG+Col ( $\emptyset = 0;133$ ;  $SD = 0,086$ )



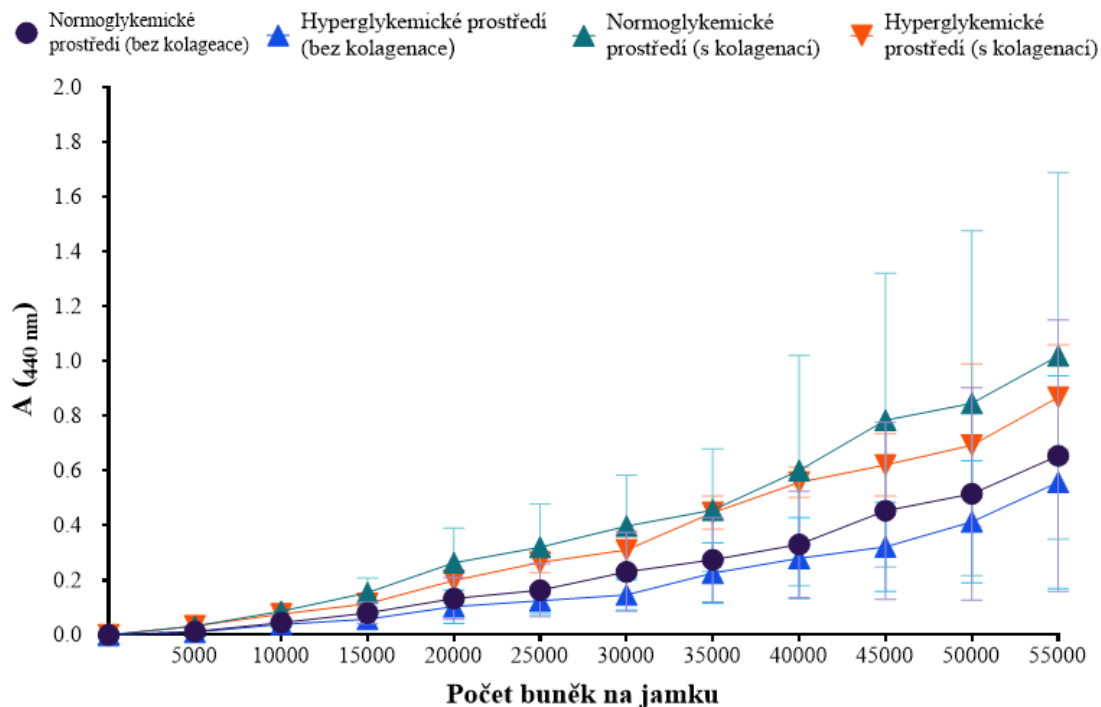
Na grafu číslo 2 můžeme pozorovat, jak různorodá hladina glukózy ovlivňovala buněčnou viabilitu HepG2 buněk po 24 hodinové inkubaci s WST-1 reagenčními při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Buněčná viabilita je zde interpretována v podobě absorbance měřené při vlnové délce 440 nm.

Už na pohled je z grafu číslo 2 patrné, že nejnižší stupeň viability byl detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v HG-Col. O něco vyšší stupeň viability byl detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v NG-Col a rovněž i u HepG2 buněk pěstovaných v HG+Col. Nejvyšší stupeň viability je dle grafu číslo 2 detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v NG+Col. Nejvyšší korelace analyzovaných hodnot byla patrná mezi HG+Col a HG-Col. Nejnižší korelace naměřených hodnot byla dle uvedených SD pod grafem číslo 2 mezi NG-Col a NG+Col.

### **9.1.3 Počet 5 000 až 55 000 buněk na jamku**

Následně byly testovány i HepG2 buňky v počtu od 5 000 do 55 000 buněk na jamku. Z legendy grafu číslo 3 je patrné, že buněčná linie HepG2 byla rozdělena na dva fenotypy. Prvním fenotypem byly buňky přizpůsobené dlouhodobým expozičním podmínkám normoglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 1 g/L. Druhým fenotypem byly buňky přizpůsobené dlouhodobým expozičním podmínkám hyperglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 5 g/L. Současně byly navoleny i destičky, u kterých byl na povrch jamek aplikován kolagen. U zbývajících destiček aplikace kolagenu provedena nebyla. Zjišťovalo se, zda i tato rozdílná metodika bude mít na výsledná měření vliv.

## Korelace HepG2 buněk pěstovaných v normoglykemickém a hyperglykemickém prostředí



**Graf 3 – Odlišná viabilita buněčné linie následkem dlouhodobé expozice různým koncentracím glukózy**

Buněčná linie HepG2 v počtu 5000-55000 bb/jamku: NG ± Col (1 g/L); HG ± Col (5 g/L); WST-1 assay (450 nm); každá skupina byla tvořena 20 jamkami; počet testovaných destiček byl u každého z parametrů 5

*HG-Col x HG+Col* ( $\emptyset = 0,294$ ;  $SD = 0,267$ ); *NG+Col x NG-Col* ( $\emptyset = 0,357$ ;  $SD = 0,388$ );

*NG+Col x HG+Col* ( $\emptyset = 0,183$ ;  $SD = 0,130$ ); *NG-Col x HG-Col* ( $\emptyset = 0,235$ ;  $SD = 0,256$ )

*Informace k jednotlivým naměřeným hodnotám:*

*NG-Col* ( $\emptyset = 0,263$ ;  $SD = 0,288$ ); *HG-Col* ( $\emptyset = 0,208$ ;  $SD = 0,216$ ); *NG+Col* ( $\emptyset = 0,451$ ;  $SD = 0,449$ );

*HG+Col* ( $\emptyset = 0,381$ ;  $SD = 0,284$ )

Na grafu číslo 3 můžeme pozorovat, jak různorodá hladina glukózy ovlivňovala buněčnou viabilitu HepG2 buněk po 24 hodinové inkubaci s WST-1 reagensií při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Buněčná viabilita je zde interpretována v podobě absorbance měřené při vlnové délce 440 nm.

Už na pohled je z grafu číslo 3 patrné, že nejnižší stupeň viability byl detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v HG-Col. O něco vyšší stupeň viability byl detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v NG-Col. Střední stupeň viability byl detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v HG+Col. Nejvyšší stupeň viability je dle grafu číslo 3 detekovaný u HepG2 buněk pěstovaných v NG+Col.

Nejvyšší korelace analyzovaných hodnot byla patrná mezi NG+Col a HG+Col. Nejnižší korelace naměřených hodnoty byla dle uvedených SD pod grafem číslo 3 mezi NG-Col a NG+Col.

## **9.2 Stanovení bioenergetického profilu HepG2 buněk**

Ke stanovení mitochondriální bioenergetiky u HepG2 buněk byly použity testy Cell Mito Stress Test a Glycolytic Rate Assay, jejichž principem je detekce základních parametrů z oblasti OCR a ECAR. Mitochondriální bioenergetický profil HepG2 buněk byl testován na rozhraní dvou různých prostředí (normoglykemické a hyperglykemické prostředí), ve kterých byly HepG2 buňky vystaveny dlouhodobé expozici různým koncentracím glukózy (1g/L a 5g/L). Buňky byly do jamek mikrotitračních destiček nasazeny v koncentraci 20 000 bb/jamku.

Prostřednictvím Cell Mito Stress Testu byly analyzovány parametry, jako jsou bazální respirace, respirace související s produkcí ATP, maximální respirace, rezervní respirační kapacita, únik protonů a nemitochondriální spotřeba kyslíku.

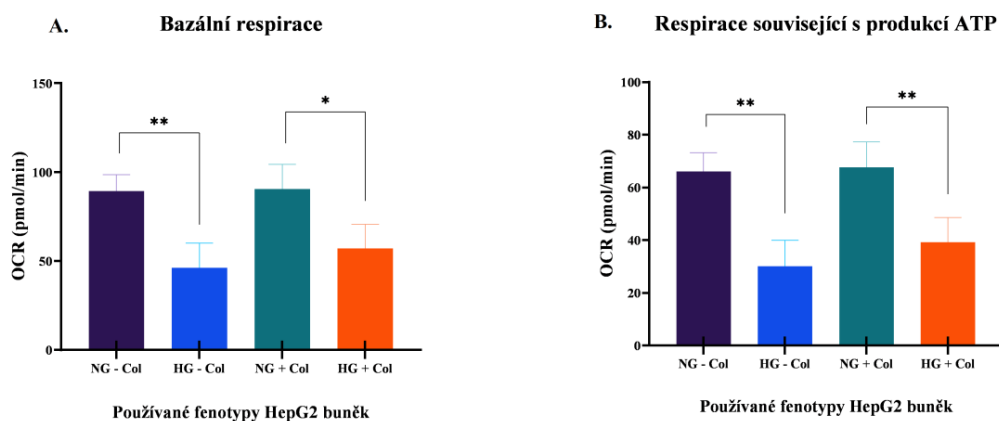
Prostřednictvím Glycolytic Rate Assay byly analyzovány parametry, jako jsou bazální PER, bazální glykolýza, kompenzační glykolýzy a reziduální acidifikace.

## 9.2.1 Respirační parametry

Immortalizovaná lidská buněčná linie HepG2 byla rozdělena na dva fenotypy. Prvním fenotypem byly buňky přizpůsobené dlouhodobým expozičním podmínkám normoglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 1 g/L. Druhým fenotypem byly buňky přizpůsobené dlouhodobým expozičním podmínkám hyperglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 5 g/L.

Hlavním předmětem zkoumání bylo v této části posouzení vzájemného vztahu zjištěných respiračních parametrů OCR mezi normoglykemickými a hyperglykemickými HepG2 buňkami, u kterých nebyl aplikován kolagen. Rovněž se posuzoval i vzájemný vztah těchto parametrů mezi normoglykemickými a hyperglykemickými HepG2 buňkami, u kterých kolagen aplikován byl.

**Grafy číslo 4 až 6** znázorňují základní respirační parametry analyzované u HepG2 buněk, jež byly vystaveny dlouhodobým expozičním podmínkám normoglykemického (1 g/L) a hyperglykemického prostředí (5 g/L). U parametrů byly mezi jednotlivými testovacími skupinami vyznačeny i vzájemné vztahy.



**Graf 4 – Bazální respirace a respirace související s produkcí ATP po dlouhodobé expozici glukózy**

Buněčná linie HepG2 v počtu 20 000 bb/jamku: NG ± Col (1 g/L); HG ± Col (5 g/L); každá skupina byla tvořena 23 jamkami; počet testovaných destiček byl 3; znázorněny základní respirační parametry

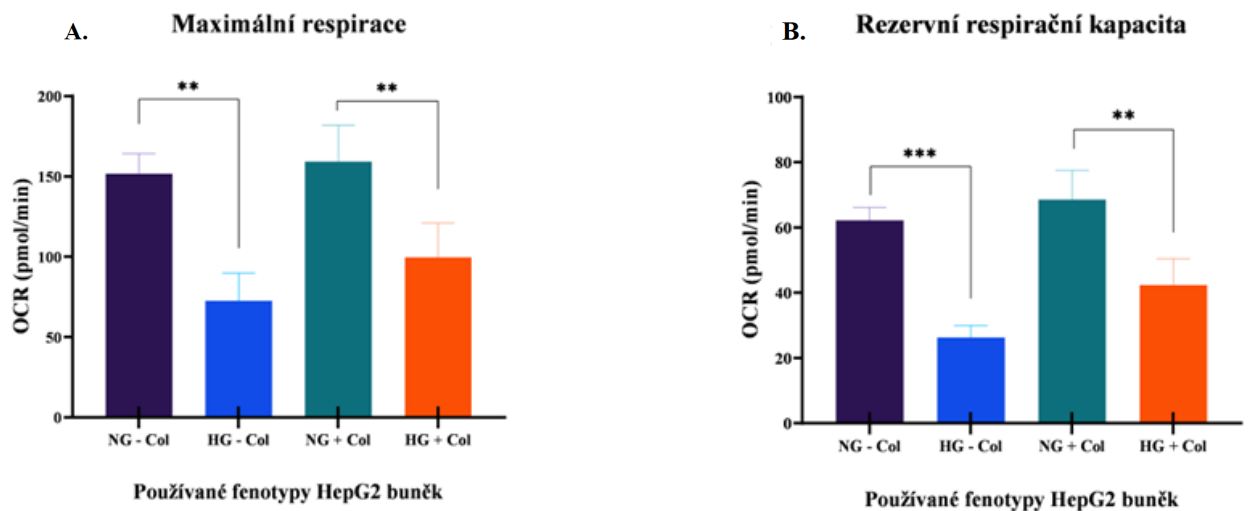
**Bazální respirace (A):** NG-Col ( $\bar{O} = 89,27$ ;  $SD = 17,09$ ); HG-Col ( $\bar{O} = 46,22$ ;  $SD = 18,08$ ); NG+Col ( $\bar{O} = 90,49$ ;  $SD = 16,65$ ); HG+Col ( $\bar{O} = 57,09$ ;  $SD = 13,45$ ); **respirace související s produkcí ATP (B):** NG-Col ( $\bar{O} = 66,04$ ;  $SD = 11,57$ ); HG-Col ( $\bar{O} = 30,06$ ;  $SD = 9,45$ ); NG+Col ( $\bar{O} = 67,62$ ;  $SD = 10,99$ ); HG+Col ( $\bar{O} = 39,21$ ;  $SD = 9,29$ )

U parametru **bazální respirace** (graf č. 4A) byla u obou porovnávaných fenotypů nalezena statisticky významná změna. Mezi HepG2 buňkami NG-Col a HepG2 buňkami HG-Col byla zjištěna statická významnost hodnocená na dvě hvězdičky. P-hodnota byla vypočtena na 0,0066. Mezi HepG2 buňkami NG+Col a HepG2 buňkami HG+Col byla rovněž zjištěna statistická významnost hodnocená na dvě hvězdičky. P-hodnota byla v tomto případě vypočtena na 0,0250.

Z grafu číslo 4A je patrné, že bazální respirace byla efektivnější u HepG2 buněk pěstovaných v normoglykemickém prostředí. Zde se výsledky v závislosti na provedené kolagenaci či nekolagenaci lišily minimálně (NG-Col 89,27 pmol/min; NG+Col 90,49 pmol/min). Nejhuře si vedly HepG2 buňky pěstované v hyperglykemickém prostředí (HG+Col 57,09 pmol/min; HG-Col 46,22 pmol/min). Rozdíl mezi kolagenovanými a nekolagenovanými hyperglykemickými HepG2 buňkami byl téměř 10 jednotek. Dalo by se tedy říci, že zde aplikace kolagenu na jamky mikrotitračních destiček měla na bazální respiraci mitochondrií lepší vliv.

U parametru **respirace související s produkcí ATP** (graf č. 4B) byla u obou porovnávaných fenotypů nalezena statisticky významná změna. Mezi HepG2 buňkami NG-Col a HepG2 buňkami HG-Col byla zjištěna statická významnost hodnocená na dvě hvězdičky. P-hodnota byla vypočtena na 0,0025. Mezi HepG2 buňkami NG+Col a HepG2 buňkami HG+Col byla rovněž zjištěna statistická významnost hodnocená na dvě hvězdičky. P-hodnota byla v tomto případě vypočtena na 0,0099.

Z grafu číslo 4B je patrné, že u obou typů HepG2 buněk pěstovaných v normoglykemickém prostředí byla prokázána zvýšená syntéza ATP (NG-Col 66,04 pmol/min; NG+Col 67,62 pmol/min). Rozdíl se objevil až na rozhraní hyperglykemických buněk. Obecně byla u hyperglykemických buněk snižená produkce ATP. Nicméně i zde se uplatnila efektivita kolagenace (HG+Col 39,21 pmol/min; HG-Col 30,6 pmol/min). Tyto výsledky poukazují na to, že u normoglykemických buněk byla zvýšená funkčnost mitochondrií a naopak u hyperglykemických buněk byla tato funkčnost znatelně snižena.



**Graf 5 – Maximální respirace a rezervní respirační kapacita po dlouhodobé expozici glukózy**

Buněčná linie HepG2 v počtu 20 000 bb/jamku: NG ± Col (1 g/L); HG ± Col (5 g/L); každá skupina byla tvořena 23 jamkami; počet testovaných destiček byl 3; znázorněny základní respirační parametry

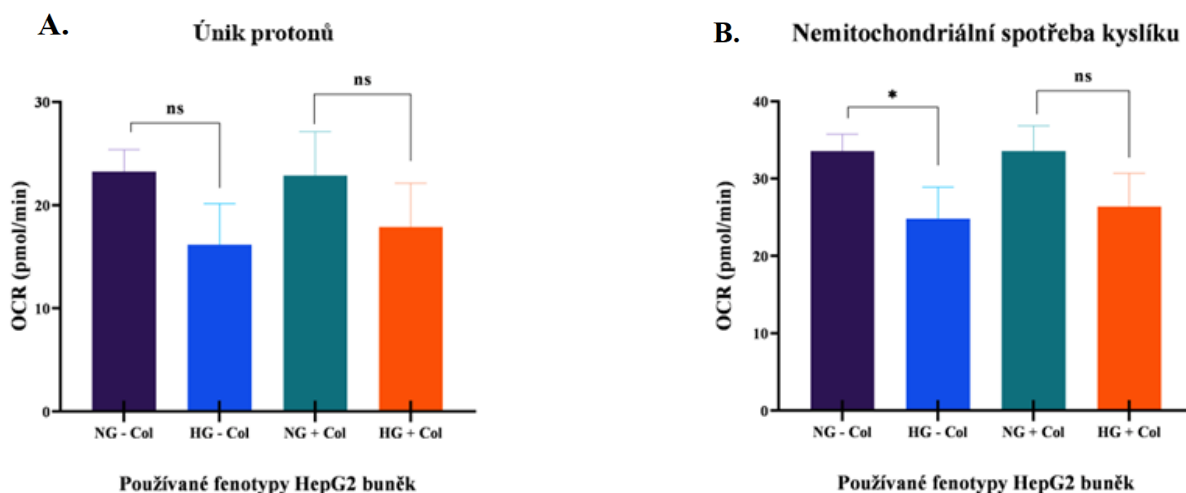
**Maximální respirace (A):** NG-Col ( $\bar{O} = 151,50$ ;  $SD = 37,78$ ); HG-Col ( $\bar{O} = 72,49$ ;  $SD = 18,42$ ); NG+Col ( $\bar{O} = 159,04$ ;  $SD = 32,21$ ); HG+Col ( $\bar{O} = 99,41$ ;  $SD = 22,18$ ); **Rezervní respirační kapacita (B):** NG-Col ( $\bar{O} = 62,22$ ;  $SD = 22,93$ ); HG-Col ( $\bar{O} = 72,49$ ;  $SD = 18,42$ ); NG+Col ( $\bar{O} = 159,04$ ;  $SD = 32,21$ ); HG+Col ( $\bar{O} = 99,41$ ;  $SD = 22,18$ )

U parametru **maximální respirace** (graf č. 5A) byla u obou porovnávaných fenotypů nalezena statisticky významná změna. Mezi HepG2 buňkami NG-Col a HepG2 buňkami HG-Col byla zjištěna statická významnost hodnocená na dvě hvězdičky. P-hodnota byla vypočtena na 0,0019. Mezi HepG2 buňkami NG+Col a HepG2 buňkami HG+Col byla rovněž zjištěna statistická významnost hodnocená na dvě hvězdičky. P-hodnota byla v tomto případě vypočtena na 0,0098.

Z grafu číslo 5A je patrné, že u obou typů HepG2 buněk pěstovaných za podmínek normoglykemického prostředí byla detekována nejvyšší hodnota maximální respirace (NG-Col 151,50 pmol/min; NG+Col 159,04 pmol/min). Rozdíl se rovněž objevil až na rozhraní hyperglykemických buněk (HG+Col 99,41 pmol/min; HG-Col 72,49 pmol/min). Rozdíl mezi kolagenovanými a nekolagenovanými hyperglykemickými HepG2 buňkami byl téměř 30 jednotek. Dalo by se tedy říci, že i zde aplikace kolagenu na jamky mikrotitračních destiček měla na maximální mitochondriální respiraci značně lepší vliv.

U parametru **rezervní respirační kapacita** (graf č. 5B) byla u obou porovnávaných fenotypů nalezena statisticky významná změna. Mezi HepG2 buňkami NG-Col a HepG2 buňkami HG-Col byla zjištěna statická významnost hodnocená na tři hvězdičky. P-hodnota byla vypočtena na 0,0003. Mezi HepG2 buňkami NG+Col a HepG2 buňkami HG+Col byla rovněž zjištěna statistická významnost hodnocená na dvě hvězdičky. P-hodnota byla v tomto případě vypočtena na 0,0025.

Z grafu číslo 5B je patrné, že u obou HepG2 buněk pěstovaných za podmínek normoglykemického prostředí byla detekována nejvyšší hodnota rezervní respirační kapacity (NG-Col 62,22 pmol/min; NG+Col 68,55 pmol/min). Zde vznikl na základě rozdílné metodiky (kolagenace a nekolagenace) již patrnější rozdíl mezi naměřenými hodnotami normoglykemických HepG2 buněk. Rovněž i zde střední hodnotu rezervní respirační kapacity vykazovaly HepG2 buňky pěstované v hyperglykemickém prostředí, u kterých kolagenace příslušných jamek provedena byla (HG+Col 42,32 pmol/min). Nejhorší rezervní respirační kapacitu vykazovaly buňky podrobené dlouhodobé expozici podmínkám hyperglykemického prostředí, u kterých kolagenace jamek provedena nebyla (HG-Col 26,28 pmol/min). Rozdíl mezi HepG2 buňkami u kterých byla rezervní respirační kapacita hodnocena nejlépe a nejhůře (NG+Col:HG-Col), byl téměř 40 jednotek. Tyto výsledky poukazují na to, že u normoglykemických buněk byla zvýšená funkčnost mitochondrií a naopak u hyperglykemických buněk byla tato funkčnost znatelně snížena.



**Graf 6 – Únik protonů a nemitochondriální spotřeba kyslíku po dlouhodobé expozici glukózy**

Buněčná linie HepG2 v počtu 20 000 bb/jamku: NG ± Col (1 g/L); HG ± Col (5 g/L); každá skupina byla tvořena 23 jamkami; počet testovaných destiček byl 3; znázorněny základní respirační parametry

**Únik protonů (A):** NG-Col ( $\bar{O} = 23,23$ ;  $SD = 6,71$ ); HG-Col ( $\bar{O} = 16,16$ ;  $SD = 4,34$ ); NG+Col ( $\bar{O} = 22,87$ ;  $SD = 7,9$ ); HG+Col ( $\bar{O} = 17,88$ ;  $SD = 4,69$ ); **nemitochondriální spotřeba kyslíku (B):** NG-Col ( $\bar{O} = 33,55$ ;  $SD = 7,20$ ); HG-Col ( $\bar{O} = 24,84$ ;  $SD = 6,14$ ); NG+Col ( $\bar{O} = 33,58$ ;  $SD = 6,31$ ); HG+Col ( $\bar{O} = 26,39$ ;  $SD = 6,42$ )

U parametru **únik protonů** (graf č. 6A) nebyly ani u jednoho z porovnávaných fenotypů nalezeny statisticky významné změny. P-hodnota přesahovala hladinu významnosti 0,05.

Z grafu číslo 6A je patrné, že u obou HepG2 buněk pěstovaných za podmínek normoglykemického prostředí byly detekovány zvýšené hodnoty úniku protonů (NG-Col 23,23 pmol/min; NG+Col 22,87 pmol/min). U obou typů HepG2 buněk pěstovaných za podmínek hyperglykemického prostředí byly detekovány nižší hodnoty úniku protonů (HG-Col 16,16 pmol/min; HG+Col 17,88 pmol/min). Rozdíl naměřených hodnot v závislosti na kolagenaci či nekolagenaci byly u obou fenotypů HepG2 buněk minimální.

U parametru **nemitochondriální spotřeba kyslíku** (graf č. 6B) byla u jednoho z porovnávaných fenotypů nalezena statisticky významná změna. Mezi HepG2 buňkami NG-Col a HepG2 buňkami HG-Col byla zjištěna statická významnost hodnocená na jednu hvězdičku. P-hodnota byla vypočtena na 0,0333. Mezi HepG2 buňkami NG+Col a HepG2 buňkami HG+Col nebyla nalezena statistická významná změna.

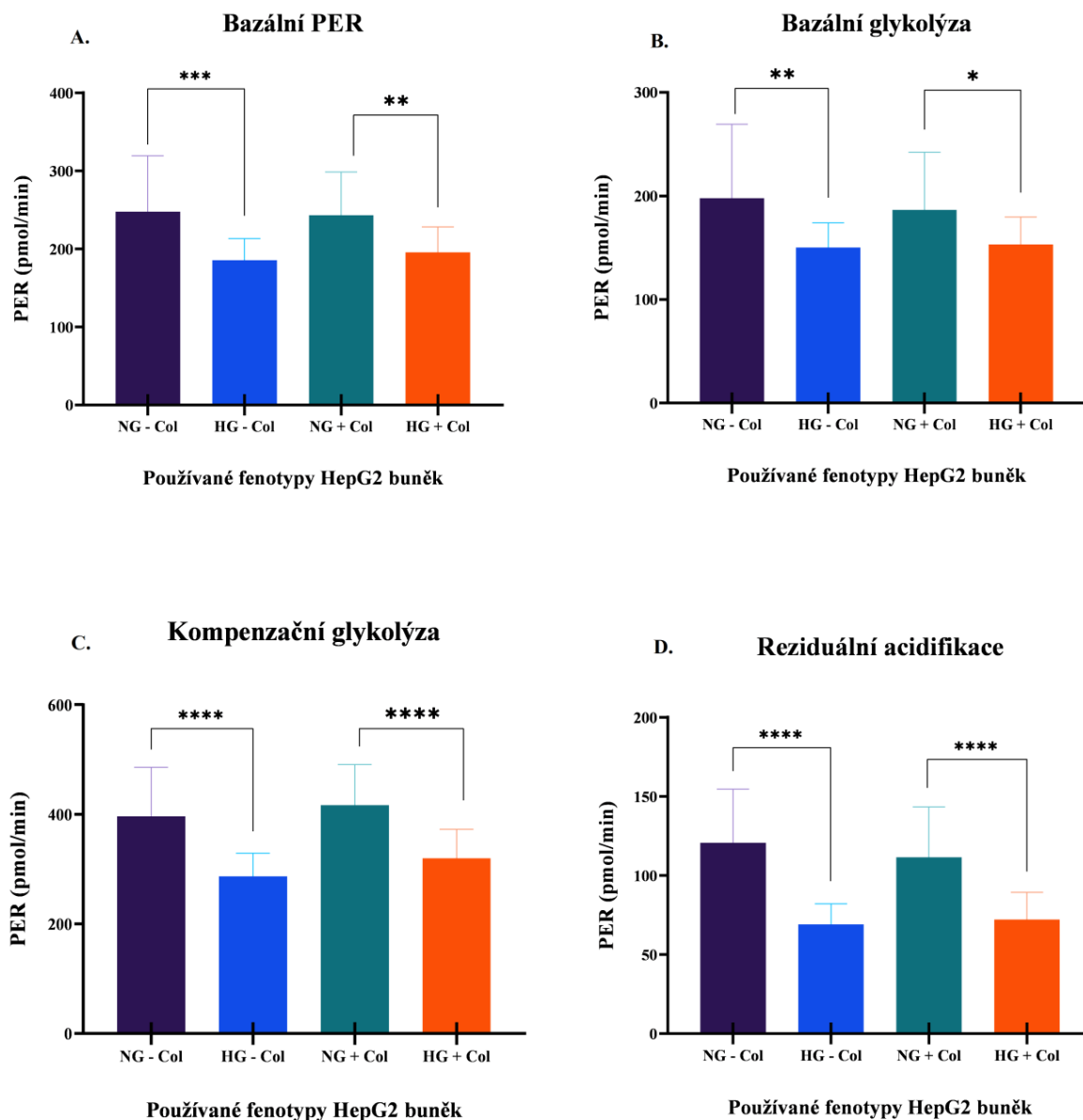


Z grafu číslo 6B je patrné, že u všech čtyř fenotypů HepG2 buněk byly detekované hodnoty nemitochondriální spotřeby kyslíku téměř obdobné (NG-Col 33,55 pmol/min; HG-Col 24,84 pmol/min; NG+Col 33,58; HG+Col 26,39 pmol/min).

### **9.2.2 Glykolytické parametry**

Imortalizovaná lidská buněčná linie HepG2 byla rozdělena na dva fenotypy. Prvním fenotypem byly buňky přizpůsobené dlouhodobým expozičním podmínkám normoglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 1 g/L. Druhým fenotypem byly buňky přizpůsobené dlouhodobým expozičním podmínkám hyperglykemického prostředí, kde koncentrace glukózy byla 5 g/L. I zde byla zjišťována korelace mezi nakolagenovaným a nenakolagenovaným testovacím prostředím.

Hlavním předmětem zkoumání bylo v této části posouzení vzájemného vztahu zjištěných glykolytických parametrů ECAR mezi normoglykemickými a hyperglykemickými HepG2 buňkami, u kterých nebyl aplikován kolagen. Rovněž se posuzoval i vzájemný vztah těchto parametrů mezi normoglykemickými a hyperglykemickými HepG2 buňkami, u kterých kolagen aplikován byl.



**Graf 7 – Základní glykolytické parametry mitochondriální bioenergetiky po dlouhodobé expozici glukózy**

Buněčná linie HepG2 v počtu 20 000 bb/jamku: NG ± Col (1 g/L); HG ± Col (5 g/L); každá skupina byla tvořena 23 jamkami; počet testovaných destiček byl 3; znázorněny základní glykolytické parametry

Informace k jednotlivým naměřeným hodnotám:

**Bazální PER (A):** NG-Col ( $\bar{O} = 247,8$ ;  $SD = 71,7$ ); HG-Col ( $\bar{O} = 185,5$ ;  $SD = 27,6$ ); NG+Col ( $\bar{O} = 243,2$ ;  $SD = 55,4$ ); HG+Col ( $\bar{O} = 195,6$ ;  $SD = 32,3$ ); **bazální glykolýza (B):** NG-Col ( $\bar{O} = 197,9$ ;  $SD = 71,4$ ); HG-Col ( $\bar{O} = 150,2$ ;  $SD = 23,8$ ); NG+Col ( $\bar{O} = 186,4$ ;  $SD = 55,7$ ); HG+Col ( $\bar{O} = 153,1$ ;  $SD = 26,4$ ); **kompenzační glykolýza (C):** NG-Col ( $\bar{O} = 396,0$ ;  $SD = 90,0$ ); HG-Col ( $\bar{O} = 287,0$ ;  $SD = 42,1$ ); NG+Col ( $\bar{O} = 416,7$ ;  $SD = 74,0$ ); HG+Col ( $\bar{O} = 319,8$ ;  $SD = 52,9$ ); **reziiduální acidifikace (D):** NG-Col ( $\bar{O} = 120,7$ ;  $SD = 33,8$ ); HG-Col ( $\bar{O} = 69,0$ ;  $SD = 13,1$ ); NG+Col ( $\bar{O} = 111,4$ ;  $SD = 32,0$ ); HG+Col ( $\bar{O} = 72,1$ ;  $SD = 17,2$ )

**Graf číslo 7** znázorňuje základní glykolytické parametry analyzované u HepG2 buněk, jež byly vystaveny dlouhodobým expozičním podmínkám normoglykemického (1 g/L) a hyperglykemického prostředí (5 g/L). U parametrů byly mezi jednotlivými testovacími skupinami vyznačeny i vzájemné vztahy.

U parametru **bazální PER = rychlost protonového úniku z buňky** (graf č. 7A) byla u obou porovnávaných fenotypů nalezena statisticky významná změna. Mezi HepG2 buňkami NG-Col a HepG2 buňkami HG-Col byla zjištěna statická významnost hodnocená na tři hvězdičky. P-hodnota byla vypočtena na 0,0001. SD mezi těmito dvěma fenotypy činila 61,6. Mezi HepG2 buňkami NG+Col a HepG2 buňkami HG+Col byla rovněž zjištěna statistická významnost hodnocená na dvě hvězdičky. P-hodnota byla v tomto případě vypočtena na 0,0035. SD mezi těmito dvěma fenotypy činila 50,3.

Dle grafu číslo 7A je patrné, že nejvyšší míra bazálního PER byla naměřena u HepG2 buněk normoglykemického prostředí. Lehce vyšší byla u těch, jejichž jamky nebyly ošetřeny vrstvou kolagenu (247,8 pmol/min). O něco málo nižší bazální PER vykazovaly HepG2 buňky, jejichž jamky byly vrstvou kolagenu ošetřeny (243,2 pmol/min). Ostatní HepG2 buňky pěstované v hyperglykemickém prostředí vykazovaly téměř obdobné výsledky (HG-Col 185,5 pmol/min a HG+Col 195,6 pmol/min). Rozdíl mezi nakolagenovanými a nenakolagenovanými jamkami mikrotitračních destiček byl patrný pouze u hyperglykemických buněk.

U parametru **bazální glykolýza** (graf č. 7B) byla u obou porovnávaných fenotypů nalezena statisticky významná změna. Mezi HepG2 buňkami NG-Col a HepG2 buňkami HG-Col byla zjištěna statická významnost hodnocená na dvě hvězdičky. P-hodnota byla vypočtena na 0,0026. SD mezi těmito dvěma fenotypy činila 57,2. Mezi HepG2 buňkami NG+Col a HepG2 buňkami HG+Col byla rovněž zjištěna statistická významnost hodnocená na jednu hvězdičku. P-hodnota byla v tomto případě vypočtena na 0,0446. SD mezi těmito dvěma fenotypy činila 45,8.

Dle grafu číslo 7B je patrné, že nejvyšší míra bazální glykolýzy byla naměřena u HepG2 buněk normoglykemického prostředí. Lehce vyšší byla u těch, jejichž jamky nebyly ošetřeny vrstvou kolagenu (197,9 pmol/min). O něco málo nižší bazální glykolýzu vykazovaly HepG2 buňky, jejichž jamky byly vrstvou kolagenu ošetřeny (186,4 pmol/min). Ostatní HepG2 buňky pěstované v hyperglykemickém prostředí vykazovaly téměř obdobné výsledky (HG-Col 150,2 pmol/min a HG+Col 153,1 pmol/min). Rozdíl mezi nakolagenovanými a nenakolagenovanými jamkami mikrotitračních destiček byl patrný pouze u normoglykemických buněk.

U parametru **komenzační glykolýza** (graf č. 7C) byla u obou porovnávaných fenotypů nalezena statisticky významná změna. Mezi HepG2 buňkami NG-Col a HepG2 buňkami HG-Col byla zjištěna statická významnost hodnocená na čtyři hvězdičky. P-hodnota byla vypočtena na  $< 0,0001$ . SD mezi těmito dvěma fenotypy činila 87,4. Mezi HepG2 buňkami NG+Col a HepG2 buňkami HG+Col byla rovněž zjištěna statistická významnost hodnocená na čtyři hvězdičky. P-hodnota byla v tomto případě vypočtena na  $< 0,0001$ . SD mezi těmito dvěma fenotypy činila 79,6.

Dle grafu číslo 7C je patrné, že nejvyšší míra komenzační glykolýzy byla naměřena u HepG2 buněk normoglykemického prostředí. Zde dominovaly ty, u jejichž jamek byla provedena kolagenace (416,7 pmol/min). Druhé nejvyšší naměřené hodnoty byly patrné u normoglykemických HepG2 buněk, u nichž kolagen aplikován nebyl (396,0 pmol/min). Nejnižší hodnoty byly naměřeny u HepG2 buněk hyperglykemického prostředí. Jamky, u kterých byl aplikován kolagen, měly o něco vyšší naměřenou hodnotu komenzační glykolýzy (319,8 pmol/min). U jamek, u kterých kolagenace provedena nebyla, naměřená hodnota komenzační glykolýzy byla úplně nejnižší. (287,7 pmol/min). Rozdíl komenzační glykolýzy mezi HepG2 buňkami hyperglykemického prostředí s kolagenem a HepG2 buněk hyperglykemického prostředí bez kolagenu byl téměř 30 jednotek. Můžeme tedy prohlásit, že i při tomto měření se aplikace kolagenu osvědčila. Tento rozdíl byl patrný i mezi normoglykemickými buňkami, u kterých byla provedena rovněž rozdílná metodika přípravy mikrotitračních destiček.

U parametru **reziduální acidifikace** (graf č. 7D) byla u obou porovnávaných fenotypů nalezena statisticky významná změna. Mezi HepG2 buňkami NG-Col a HepG2 buňkami HG-Col byla zjištěna statická významnost hodnocená na čtyři hvězdičky. P-hodnota byla vypočtena na  $< 0,0001$ . SD mezi těmito dvěma fenotypy činila 36,0. Mezi HepG2 buňkami NG+Col a HepG2 buňkami HG+Col byla rovněž zjištěna statistická významnost hodnocená na čtyři hvězdičky. P-hodnota byla v tomto případě vypočtena na  $< 0,0001$ . SD mezi těmito dvěma fenotypy činila 32,0.

Dle grafu číslo 7D je patrné, že nejvyšší míra reziduální acidifikace byla naměřena u HepG2 buněk normoglykemického prostředí. Vyšší byla u těch, jejichž jamky nebyly ošetřeny vrstvou kolagenu (120,7 pmol/min). O něco málo nižší bazální PER vykazovaly HepG2 buňky, jejichž jamky byly vrstvou kolagenu ošetřeny (111,4 pmol/min). Ostatní HepG2 buňky pěstované v hyperglykemickém prostředí vykazovaly téměř obdobné výsledky (HG-Col 69,1 pmol/min a HG+Col 72,1 pmol/min). Rozdíl mezi nakolagenovanými a nenakolagenovanými jamkami mikrotitračních destiček byl patrný pouze u hyperglykemických buněk.

## DISKUZE

Principem práce bylo zjištění, zda rozdílná koncentrace glukózy obsažená v kultivačních médiích, ovlivňuje buněčnou viabilitu a mitochondriální bioenergetický profil. Předmětem zkoumání byla imortalizovaná buněčná linie HepG2 získaná z hepatocelulárního karcinomu. HepG2 buněčná linie byla během experimentu vystavena dlouhodobým expozičním podmínkám normoglykemického a hyperglykemického prostředí. V normoglykemickém prostředí byla koncentrace glukózy 1 g/L. V hyperglykemickém prostředí byla koncentrace glukózy 5 g/L. Jako první byla testována buněčná viabilita HepG2 buněk v počtu 3 000 až 33 000 buněk na jamku. Následně byla testována buněčná viabilita HepG2 buněk v počtu 4 000 až 44 000 buněk na jamku. Jako poslední byla testována buněčná viabilita HepG2 buněk v počtu 5 000 až 55 000 buněk na jamku. Následně se u těchto buněk testoval i mitochondriální bioenergetický profil, založený na analýze parametrů z oblasti OCR a ECAR.

HepG2 buňky jsou nejpoužívanější buněčnou linií, jenž se využívá za účelem analýzy metabolického profilu v hepatocytech. Na rozdíl od primárních myších hepatocytů mají několikanásobně rychlejší schopnost inkorporovat glukózu, jak poukázala studie publikovaná v časopise *Endocrinology and Metabolism*. [100]

Hyperglykémie a s ní spojené komplikace jsou závažnými problémy postihující jakoukoliv věkovou generaci. V dnešní době se stále zvyšuje incidence civilizačních chorob, do kterých spadá právě i diabetes mellitus. V potravinových řetězcích se stále objevují nové variace slazených pokrmů a nápojů. Právě konzumace vysokého množství těchto potravin přispívá ke zvýšené incidenci obezity a diabetu mellitu. Takto rychle rostoucí incidence má neblahý vliv na celosvětovou ekonomiku a je značně velkou finanční zátěží pro zdravotnické organizace. Měly by se tedy vyvíjet různé metody a postupy, jak hyperglykemické stavy modulovat, popřípadě využívat v náš prospěch.

Studie z roku 2021 zkoumala hypoglykemické a hypolipidemické účinky borůvek. Popisovala, že borůvky, respektive malvidin obsažený v nich, oplývá antioxidantními vlastnostmi. Předpokládá se, že antioxidantní vlastnosti malvidinu by mohly mít na diabetes mellitus prospěšný vliv. Během této studie byla po dobu 24 hodin HepG2 buněčná linie vystavena podmínkám normoglykemického (5,5 mM) a hyperglykemického prostředí (30 mM), čímž byl navozen fyziologický a diabetický buněčný stav. Následně byla buněčná viabilita testována prostřednictvím MTT testu. Hyperglykemické HepG2 buňky vykazovaly, oproti normoglykemickým HepG2 buňkám, známky glykooxidativního stresu. Následná buněčná cytotoxicita vedla ke snížení viability hyperglykemických HepG2 buněk na 35,67 %. Nejsme si jistí, zda je transformace buněk v závislosti na hyperglykemickém prostředí reverzibilní či ireverzibilní. Studie těchto skutečností by rovněž mohly poskytnout přínosné informace o tom, jak by bylo vhodné při terapiích hyperglykemických stavů postupovat. [101]

Podobná myšlenka byla použita již v roce 1998, kdy se Victor Nacher spolu se svými kolegy zmiňuje v časopise American Diabetes Association, že chronicky postižené hyperglykemické buněčné prostředí, může být částečně obnoveno na původní buněčnou hmotu. Studie se zabývala transplantací pankreatických ostrůvků. Postižené ostrůvky byly vystaveny chronickým podmínkám hyperglykemického prostředí, čímž byla následně pozměněna i replikační schopnost  $\beta$ -buněk. Transplantací těchto buněk a navozením normoglykemického prostředí byla obnovena replikační odpověď. [102]

Arwa Alnahdi, Annie John a Haider Raza publikovali v roce 2019 studii, která poukazuje na to, že zvýšená dostupnost energetických substrátů jako je například glukóza, podněcuje vznik metabolického, oxidačního a mitochondriálního stresu. Veškeré tyto stavy mohou být doprovázeny záněty a s nimi spojenými chronickými komplikacemi. Předmětem výzkumu byly HepG2 buňky, které byly vystaveny zvýšeným koncentracím glukózy (25 mmol/l) a zvýšeným koncentracím kyseliny palmitové (0,3 mmol/l). Zvýšená hyperglykémie a snížená glukotoxicita měla na buněčnou funkčnost neblahý vliv. Glukotoxicita vedla ke zvýšené tvorbě ROS, poruše mitochondriální membrány a narušení mitochondriální bioenergetiky. Studie poukazuje také na to, že zvýšená dostupnost energetických substrátů iniciuje apoptózu a inhibuje autofagii. [103]

Studie z roku 2022 zkoumala vzájemný vztah mezi protirakovinnými léčivými a hyperglykemickým prostředím. Popisovala, že hyperglykemické prostředí může u HepG2 buněk iniciovat navození hyperosmolárního stresu. Buněčná viabilita byla v tomto případě testována rovněž prostřednictvím MTT testu. Získané výsledky poukázaly na to, že HepG2 buňky v hyperglykemické prostředí následkem metabolické a osmotické dysregulace, snižují svoji životaschopnost na 83,13 %. [104]

Během našich studií se rovněž potvrdilo, že aplikací zvýšené hladiny glukózy (5 g/L) dochází k postupnému snižování viability mezi jednotlivými testovanými fenotypy HepG2 buněk (NG-Col x HG-Col; NG+Col x HG+Col). Rozdílem však bylo, že během našich experimentů byly HepG2 buňky vystaveny dlouhodobé expozici podmínkám normoglykemického a hyperglykemického prostředí. Zjištěné výsledky však vzájemně korelují a poukazují na to, že zvýšená hladina glukózy narušuje hepatocytární buněčnou homeostázu, což vede k následné buněčné apoptóze. V naší studii se testovaly i účinky kolagenu. Dle výsledku jsme zjistili, že kolagenace použitých jamek měla na jednotlivá měření rovněž vliv. Překvapením však bylo, že aplikace kolagenu měla za následek zvýšenou viabilitu u hyperglykemických HepG2 buněk i oproti buňkám normoglykemickým, u kterých kolagen aplikován nebyl. Předpokládali jsme, že zvýšená viabilita HepG2 buněk u HG+Col bude patrná pouze nad HG-Col.

Úpravami kultivačních systémů in vitro je možné regulovat aktivaci specifických jaterních funkcí. Aplikací kolagenního gelu je možné ovlivňovat aktivitu transkripčních jaterních faktorů u HepG2 buněk. Se zjištěnými výsledky koreluje i fakt, že jednovrstvé HepG2 buňky, které jsou kultivované v jamkách, u nichž nebyla provedena kolagenace, nevykazují téměř žádnou aktivitu CYP3A4. [105, 106]

Studie z roku 2001 zkoumala roli superoxidových aniontů v souvislosti s normoglykemickým (5,5 mmol/l) a hyperglykemickým prostředím (28 mmol/l). Sledovalo se, jak je ovlivněna proliferace endoteliálních buněk. Po 48 hodinách došlo k nárůstu hladiny superoxidových aniontů a současně byla snížena i syntéza DNA. Následně po 7 denní kontrole byla v hyperglykemickém kultivačním prostředí detekována i snížená hladina endoteliálních buněk. [107]



V prováděných experimentech jsme využívali jako normoglykemické prostředí koncentraci glukózy 1 g/L. Jako hyperglykemické prostředí jsme využívali koncentraci glukózy 5 g/L. Používané koncentrace v in vitro modelech se běžně liší od optimálních fyziologických hodnot v lidském organismu. Optimální koncentrace glukózy používaná při in vitro experimentech je doporučena na 1 g/L. Bylo by přínosné také zjistit, zda by tato výchozí hodnota normoglykemického prostředí, mohla být rovněž ještě o něco snížena za účelem kompenzace těžších hyperglykemických stavů.

Nejen hyperglykemické stavy jsou celosvětovou problematikou. Některé studie, se rovněž zabývají vzájemnou korelací mezi hyperglykemickými stavy a onkogenezí. Je prokázáno, že například rakovina jater či tlustého střeva, může vzniknout i na základě chronické glukotoxicity. V některých publikacích se rovněž uvádí, že zvýšená hladina glukózy má na nádorové buňky proliferativní vliv. Nádorové buňky jsou vůči hyperglykemickému prostředí senzitivnější. Bohužel přesný mechanismus mezi hyperglykemickým stavem a onkogenezí ještě stále není zcela znám.

Otto Warburg ve svých publikacích popisuje, že nádorové buňky mají při dostatečném množství glukózy, schopnost upřednostnit jakožto zdroj energie glykolýzu před aerobní oxidací. Výsledkem je zvýšená syntéza laktátu a snížená syntéza ATP než je tomu u buněk fyziologických. [108]

Parlo a Coleman předpokládali, že u zvýšené glykolytické aktivity hraje zásadní roli porucha citrátového cyklu, čímž by docházelo i ke snížené oxidativní fosforylaci. Následně však byly publikovány studie, vyvracející tato tvrzení. V roce 1978 byla Pedersenem publikovaná studie zastávající názor, že mitochondriální respirační kapacita je u fyziologických a nádorových buněk stejně funkční. Pedersen poukazoval na to, že problém není v kvalitě, ale v kvantitě. Do popředí se dostala myšlenka, že snížená oxidativní fosforylace je následkem sníženého mitochondriálního počtu, který je pro nádorové buňky typickým. Na základě této teorie se zrodily myšlenky, že zvýšená glykolytická aktivita vzniká v souvislosti s poškozením dýchacího řetězce. [109]

Zvýšení glykolytické kapacity i v přítomnosti dostatečného množství O<sub>2</sub>, je rovněž typickou vlastností nádorových buněk, jak interpretují publikace zveřejněné v roce 2007. [109]

V naší studii prokazovaly HepG2 buňky, u kterých byly měřeny základní parametry z oblasti OCR a ECAR obdobné mechanismy účinku. Hyperglykémie měla na veškeré naměřené respirační parametry neblahý vliv. Výjimkou byly parametry prezentující únik protonů a nemitochondriální spotřebu kyslíku. Respirační porucha hyperglykemických HepG2 buněk byla nejvíce patrná u parametrů bazální respirace, respirace související se syntézou ATP, maximální respirací a rezervní respirační kapacitou. U naměřených glykolytických parametrů je patrné, že nádorový metabolismus měl jak na normoglykemickém, tak hyperglykemickém buňky určitý vliv. U obou typů nádorových buněčných linií byla zvýšená glykolytická aktivita. Nicméně hyperglykemické HepG2 buňky vykazovaly o něco nižší funkčnost.

Aplikací kolagenu byla zajištěna zvýšená funkčnost hyperglykemických HepG2 buněk oproti těm, u kterých kolagen aplikován nebyl. Otázkou by mohlo být, zda by aplikace kolagenu mohla zajistit to, že by hyperglykemické buňky byly schopné obdobně zastupovat role normoglykemických buněk.

Na základě komplexnosti těchto chorob by bylo vhodné, veškeré tyto zjištěné skutečnosti prověřit ještě více do hloubky. Jelikož je tato práce zaměřena pouze na energetický mitochondriální metabolismus a buněčnou viabilitu HepG2 buněk. Bylo by také vhodné prověřit vzájemnou korelaci mezi těmito výsledky a metabolickými dráhami glukózy a to nejen v závislosti na normoglykemickém, ale také v závislosti na hyperglykemickém prostředí. Otázkou také je, zda by aplikace inzulínu či jiných interferujících látek do prostředí in vitro mohla ovlivnit sníženou hepatocytární funkci, která vznikla na základě zvýšené koncentrace glukózy v kultivačním médiu. Prověření těchto skutečností by mohlo vést k poznatkům, jenž by umožnily rychlejší a účinnější predikci mitochondriálních bioenergetických poruch.

## ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá reakcí HepG2 buněk na rozdílné vlastnosti kultivačního prostředí. Byla použita dva různá kultivační média, přičemž jedno z nich obsahovalo koncentraci glukózy 1g/L a druhé obsahovalo koncentraci glukózy 5g/L. Tímto způsobem se transformovaly bioenergetické vlastnosti testovaných buněk.

Cílem bylo zjistit, jakým způsobem se liší buněčná viabilita, mitochondriální aktivita a bioenergetický profil HepG2 buněk v závislosti na typu použitého kultivačního média. Během analýz byla použita i rozdílná příprava jamek mikrotitračních destiček. Na některé jamky byl aplikován kolagen. U ostatních jamek kolagen aplikován nebyl. Zajímalo nás, zda tato rozdílná metodika poskytne i rozdílné výsledky mezi analyzovanými fenotypy.

Viabilita HepG2 buněk byla testována prostřednictvím WST-1 assay. Kvůli velikosti souboru byla analýza rozdělena na celkem tři početní skupiny. U všech tří skupin bylo patrné, že byla buněčná viabilita ovlivněna podmínkami normoglykemického a hyperglykemického prostředí zejména v závislosti na aplikaci kolagenu. Nejnižší viabilita byla u všech tří případů patrná u HG-Col. O něco vyšší viabilita byla u dvou ze tří případů patrná u NG-Col. V jednom ze tří případů se na tomto rozhraní viability pohybovaly spolu s NG-Col i HG+Col. V ostatních případech vykazovaly HG+Col druhý nejvyšší stupeň viability. U všech tří případů byla nejvýše naměřená viabilita patrná u NG-Col. Rovněž bylo potvrzeno, že kolagenace jamek měla na jednotlivá měření příznivý vliv. Díky této metodice byla pozměněna morfologická struktura přilnutých HepG2 buněk a tím byla zajištěna i zvýšená přístupnost kyslíku k buňkám.

Mitochondriální bioenergetický profil byl testován prostřednictvím analýz zaměřených na respirační a glykolytické parametry. U veškerých analyzovaných parametrů došlo vlivem hyperglykemického prostředí ke změně mitochondriální bioenergetiky. Rovněž i zde aplikace kolagenu měla na jednotlivá měření specifický vliv. Nicméně v porovnání s testy buněčné viability, to nebyly změny až tak významné.

## SUMMARY

Two different culture media were used, one containing a glucose concentration of 1 g/L and the other containing a glucose concentration of 5g/L. In this way, the bioenergetic properties of the tested cells were transformed.

The aim was to determine how cell viability, mitochondrial activity, and the bioenergetic profile of HepG2 cells differ depending on the type of culture medium used. Different preparations of microtiter plate wells were also used during the analysis. Collagen was applied to some wells, while others were not treated with collagen. We were interested in whether this different methodology would provide different results between the analysed phenotypes.

The viability of hepg2 cells was tested using the wst-1 assay. Due to the size of the sample, the analysis was divided into three groups. In all three groups, it was evident that cell viability was influenced by normoglycemic and hyperglycaemic conditions, particularly depending on collagen application. The lowest viability was observed in all three cases with HG-Col. Slightly higher viability was observed in two out of three cases with NG-Col. In one out of three cases, the viability levels were similar between NG-Col and HG+Col. In other cases, HG+Col exhibited the second-highest level of viability. In all three cases, the highest viability was observed with NG-Col. It has also been confirmed that the collagen coating of the wells had a beneficial effect on individual measurements. Thanks to this methodology, the morphological structure of adherent HepG2 cells was altered, thereby ensuring increased oxygen accessibility to the cells.

The mitochondrial bioenergetic profile was tested by analysis focussing on respiratory and glycolytic parameters. Hyperglycemic conditions caused a change in mitochondrial bioenergetics in all parameters analysed. Similarly, the application of collagen had a specific effect on individual measurements. However, compared to cell viability, the changes were not as significant.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Friedman J. R. a Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*, 2014, 505 (7483), 335-343.
- [2] Annesley S. J. a Fisher P. R. Mitochondria in Health and Disease. *Cells*, 2019, (8)7, 1-7.
- [3] Nolfi-Donagan D., Braganza A., Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*, 2020, 37, 1-9.
- [4] Zong W., Rabinowitz J., White E.: Mitochondria and Cancer, *Molecular Cell*, 61 (5): 667 – 676, 2016.
- [5] Owens K. M., Modica-Napolitano J. S. a Singh K. K., Mitochondria and cancer. In Singh K. a Costello L. *Mitochondria and Cancer*, 2009th edition, Springer, 2009, 1-22.
- [6] Bottje W. G.: Oxidative metabolism and efficiency: the balancing act of mitochondria, *Poultry Science*, 98: 4223 – 4230, 2019.
- [7] Protasoni M., Zeviani M.: Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions, *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (2): 586, 2021.
- [8] Murrell, D. a T. Newman. What are mitochondria?. *MedicalNewsToday* [online]. San Francisco: Healthline Media, 2018 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/320875>
- [9] Iovine J., Claypool S., Alder N.: Mitochondrial compartmentalization: emerging themes in structure and function, *Trends in Biochemical Sciences*, 46 (11): 902 – 917, 2021.
- [10] Hara H., Kuwano K. a Araya J. Mitochondrial Quality Control in COPD and IPF. *Cells*, 2018, 7(8), 1-13.
- [11] Krejčíř R., Valík D., Vojtěšek B.: Využití mitochondriálních procesů v cílené terapii nádorových onemocnění, *Klinická Onkologie*, 2: 2S14 – 2S20, 2018.
- [12] Masopust, J. a Průša R. *Patobiochemie buňky*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003.

- [13] Zhang, J., D. Ma a Y. Kim. Mitochondrial apoptosis and proteolytic changes of myofibrillar proteins in two different pork muscles during aging. In: Science Direct [online]. Amstrdam: Elsevier, 2020 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814620304337>
- [14] Hockenbery, D., M. Zutter, W. Hickey, M. Nahm a S. J. Korsmeyer. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U [online]. USA. 1991. s: 1-5 [cit. 2018-02-21]. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/pnas/88/16/6961.full.pdf>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769608623128>
- [15] Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E Heuser, X. Wang a Ch. W. Akey. Three-Dimensional Structure of the Apoptosome. Molecular Cell [online]. 2002. s: 423-432 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00442-2. ISSN 10972765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276502004422>
- [16] 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.
- [17] Duška, F., J. Trnka. Biochemie v souvislostech. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1116-3.
- [18] Holeček, M. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1562-7.
- [19] Studium redukčně-oxidační/redoxní regulace ve fyziologických a patologických procesech buňky a organismu: Úloha mitochondriální fosfolipázy A2 (PLA2) a odpráhuujících proteinů v ochraně před oxidačním stresem za fyziologických podmínek. Fyziologický ústav AV ČR [online]. Praha: Ježek, 2023 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.fgu.cas.cz/articles/193-studium-redukce-oxidacni-redoxni-regulace-ve-fyziologickych-a-patologickych-procesech-bunky-a-organismu>
- [20] Kumari A.: Citric Acid Cycle, Sweet Biochemistry, 7 – 10, 2018.
- [21] Mitochondrie. In: WikiSkripta [online]. Praha: WikiSkripta, 2023 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Mitochondrie>
- [22] Akram M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014, 68(3), 475-478.

- [23] Raimundo N., Baysal B. E. a Shadel G. S. Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation. *Trends in Molecular Medicine*, 2011, 17(11), 641-649.
- [24] Tricarboxylic acid cycle. *Britannica* [online]. Chicago: Encyclopædia Britannica, 2023 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/tricarboxylic-acid-cycle>
- [25] Peña F. J., Ortiz-Rodríguez J. S. a Gaitskell-Phillips G. L. a kol. An integrated overview on the regulation of sperm metabolism (glycolysis-Krebs cycle-oxidative phosphorylation). *Animal Reproduction Science*, 2021, 1-12.
- [26] Dýchací soustava a buněčné dýchání. *Studium biochemie* [online]. Praha: Teplá, 2013 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/dr21.html>
- [27] Federica, T. a G. Antonio. Systematic review of plasma-membrane ecto-ATP synthase: A new player in health and disease. *Science Direct: Experimental and Molecular Pathology*. 2017, 2018(104), 1-12. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014480017304197?via%3Dihub>
- [28] 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.
- [29] Porporato P. E., Filigheddu N., Pedro J. M., et al.: Mitochondrial metabolism and cancer, *Cell Research*, 28: 265 – 280, 2018.
- [30] Solaini G., Sgarbi G. a Baracca A. Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2011, 1807(6), 534-542
- [31] 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
- [32] Mitochondriální fyziologie. *Fyziologický ústav AV ČR* [online]. Praha: Ježek, 2023 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.fgu.cas.cz/departments/mitochondrialni-fyziologie>
- [33] Chen J.-Q. a Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2012, 1826(2), 370-384.
- [34] Ristow M. a Schulz T. J., Warburg and his legacy. In Singh K. a Costello L. *Mitochondria and Cancer*, 2009th edition, Springer, 2009, 23-39.

- [35] Studium specifit mitochondriálního metabolismu u rakovinných buněk: Úloha specifické dráhy Krebsova cyklu, konkrétně reduktivní karboxylace v nádorové biologii. Fyziologický ústav AV ČR [online]. Praha: Ježek, 2023 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.fgu.cas.cz/articles/190-studium-specifit-mitochondrialniho-metabolismu-u-rakovinnych-bunek>
- [36] Hammad, N., M. Rosas-Lemus, . et al.: The Crabtree and Warburg effects: Do metabolite-induced regulations participate in their induction?. Science Direct: Biochimica et Biophysica Acta. 2016, 1863(3), 1-8. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272816300822>
- [37] Kumar V., Abbas A. K., Aster J. C.: Neoplasia, Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 7: 267 – 338.
- [38] Barros L. F., Ruminot I., San Martín A., et al.: Aerobic Glycolysis in the Brain: Warburg and Crabtree Contra Pasteur. Neurochemical Research, 2021, 46(1), 15-22.
- [39] Venkatesh, KV, Darunte, L., Bhat, PJ (2013). Warburgův efekt. In: Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, KH., Yokota, H. (eds) Encyclopedia of Systems Biology. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7\\_703](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_703)
- [40] Chelimsky G., Simpson P., Zhang L., et al.: Impaired Mitochondrial Bioenergetics Function in Pediatric Chronic Overlapping Pain Conditions with Functional Gastrointestinal Disorders. Pain Research and Management, 2021, 1-7.
- [41] Discover the Drivers of Cell Fate, Function, and Fitness: Agilent Seahorse XF analysis platform. In: Agilent [online]. Santa Clara: Agilent, 2022 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/brochure-seahorse-portfolio-5994-1329en-agilent.pdf>
- [42] Kramer, P., B. Chacko, D. George, et al.: Decreased Bioenergetic Health Index in monocytes isolated from the pericardial fluid and blood of post-operative cardiac surgery patients. Bioscience Reports [online]. 2015, 35(4), 1-10 [cit. 2023-05-10]. Dostupné z: [doi:10.1042/BSR20150161](https://doi.org/10.1042/BSR20150161)
- [43] Das B., Ray P. a Raut S., Disease- specific case studies. In Ostojic S. M. Clinical bioenergetics: From pathophysiology to clinical translation, 1st edition, Academic press, 2020, 95-97.
- [44] Brand M. D., Nicholls D. G.: Assessing mitochondrial dysfunction in cells, Biochemical Journal, 435 (2): 297 – 312, 2011.



- [45] Chacko B. K., Kramer P. A., Ravi S., et al.: The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clinical Science*, 2014, 127(6), 367-373.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] Uživatelská příručka k sadě zátěžového testu Agilent Seahorse XF Glycolysis. In: Agilent [online]. Santa Clara: Agilent Technologies, 2019 [cit. 2023-05-08]. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF\\_Glycolysis\\_Stress\\_Test\\_Kit\\_User\\_Guide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Glycolysis_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf)
- [49] Hynes, John, White, C. Logan. A practical guide to measuring glycolytic metabolism in vitro. In: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2021, vol. 2276, s. 17-30.
- [50] Seyfried, T., Shelton, L.. Cancer as a metabolic disease. *Nutrition & Metabolism*, 2010, roč. 7, č. 1, s. 7.
- [51] Cell Proliferation Reagent WST-1. Merck [online]. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/roche/cellproro>
- [52] Cobb, L. Cell Proliferation Assays and Cell Viability Assays. Labome: The world of laboratories [online]. Los Angeles: Labome, 2019 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.labome.com/method/Cell-Proliferation-Assays-and-Cell-Viability-Assays.html>
- [53] Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability. Merck [online]. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cellcounting-and-health-analysis/cell-proliferation-reagent-wst-1>
- [54] XF Analyzers: Seahorse XFe96 Analyzer. In: Agilent [online]. Santa Clara: Agilent, 2023 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-metabolic-analysis/xf-analyzers/seahorse-xfe96-analyzer-740879>
- [55] Bravo Seahorse Assay Workbench. In: Agilent [online]. Santa Clara: Agilent, 2019 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/flyers/public/flyer-bravo-seahorse-assay-workbench-cell-analysis-5994-0699en-agilent.pdf>

- [56] Národní zdravotnický informační portál [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2023 [cit. 02.05.2023]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz>. ISSN 2695-0340.
- [57] McMurry, J. (2007). *Organická chemie*. Brno: Vitium; Praha: Vysoká škola chemicko-technologická.
- [58] Ren, Y., J. Chen, P. Chen et al.: Oxidative stress-mediated AMPK inactivation determines the high susceptibility of LKB1-mutant NSCLC cells to glucose starvation. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2021, 166(1), 128-139 [cit. 2023-05-11]. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.02.018
- [59] Klover, P. a R. Mooney. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2004, 36(5), 753-758 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2003.10.002
- [60] Sultana, S. a J. McClure. Intermediary metabolism. *Science Direct: Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2023, 24(139-147), 1-9. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472029922002934>
- [61] Wang, X., K. Guo, B. Huang, et al.: Role of Glucose Transporters in Drug Membrane Transport. *Current Drug Metabolism* [online]. 2020, 21(12), 947-958 [cit. 2023-05-02]. ISSN 13892002. Dostupné z: doi:10.2174/1389200221666200810125924
- [62] Castaneda-Sceppa, C. a F. Castaneda. Sodium-dependent glucose transporter protein as a potential therapeutic target for improving glycemic control in diabetes. *Nutrition Reviews* [online]. 2011, 69(12), 720-729 [cit. 2023-05-02]. ISSN 00296643. Dostupné z: doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00423.x
- [63] Assimacopoulos-Jeannet, F., I. Cusin a et al.: Glucose transporters: structure, function, and regulation. *Biochimie* [online]. 1991, 73(1), 67-70 [cit. 2023-05-11]. Dostupné z: doi:10.1016/0300-9084(91)90076-D
- [64] Karim, S. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2012, 18(46), 1-11 [cit. 2023-05-02]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v18.i46.6771

- [65] Mota, M., B. Banini, S. Cazanave a A. Sanyal. Molecular Mechanisms of Lipotoxicity and Glucotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism: Clinical and experimental* [online]. 2016, 65(8), 1-27 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016%2Fj.metabol.2016.02.014>
- [66] Kraml, J. (1985). Přeměna látek - metabolismus: Metabolismus sacharidů. In J. Duchoň, K. Barna, L. Bergendi, M. Černoch, V. Habermann, J. Homolka, J. Kraml, M. Ledvina, V. Mézeš, J. Musil & J. Slavík, *Lékařská chemie a biochemie: Učebnice pro lékařské fakulty* (s. 427-455). Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství.
- [67] Carter M., Shieh J.: *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Academic Press, 2015, 2, 295-310. ISBN 978-0-12-800511-8.
- [68] Adeva-Andany, M., N. Pérez-felpete, C. Fernández-fernández, C., et al.: Liver glucose metabolism in humans. *Bioscience Reports* [online]. 2016, 36(6), 1-15 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: doi:[10.1042/BSR20160385](https://doi.org/10.1042/BSR20160385)
- [69] Han, H., G. Kang, J. Kim, B. Choi a S. Koo. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine* [online]. 2016, 48(3), 1-10 [cit. 2023-05-03]. ISSN 2092-6413. Dostupné z: doi:[10.1038/emm.2015.122](https://doi.org/10.1038/emm.2015.122)
- [70] Glykolýza. *Studium biochemie* [online]. Praha: Teplá, 2013 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: [http://www.studiumbiochemie.cz/metabolismus\\_sacharidy.html](http://www.studiumbiochemie.cz/metabolismus_sacharidy.html)
- [71] Fernie, A., F. Carrari a L. Sweetlove. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. 2004, 7(3), 254-261 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: doi:[10.1016/j.pbi.2004.03.007](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.007)
- [72] Li X.-b., Gu J.-d., Zhou Q.-h, Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thoracic Cancer*, 2015, 6(1), 17-24.
- [73] Brooks, G. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metabolism* [online]. 2018, 27(4), 757-785 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: doi:[10.1016/j.cmet.2018.03.008](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.008)
- [74] Stincone, A., A. Prigione, T. Cramer, et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews* [online]. 2015, 90(3), 927-963 [cit. 2023-05-02]. ISSN 1464-7931. Dostupné z: doi:[10.1111/brv.12140](https://doi.org/10.1111/brv.12140)
- [75] Glykogenolýza, glykolýza a pentózová fosfátová dráha. In: *Slide player* [online]. Prešov: Osveta, 2018 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://slideplayer.gr/slide/14620013/>

- [76] Judge, A. a M. Dodd. Metabolism. Essays in Biochemistry [online]. 2020, 64(4), 607-647 [cit. 2023-05-02]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20190041
- [77] Sorkina, E., V. Chichkova, I. Sklyanik, et al.: The role of glucose and insulin in the metabolic regulation of growth hormone secretion. Problems of endocrinology [online]. 2021, 67(1), 52-59 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.14341/probl12660
- [78] Jorgensen, J., L. Moller, M. Krag a N. Billestrup. Effects of growth hormone on glucose and fat metabolism in human subjects. Science Direct: Endocrinology and Metabolism Clinics of North America [online]. 2007, 36(1), 75-87 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.ecl.2006.11.005
- [79] Zeigerer, A., R. Sekar, M. Kleinert, et al.: Glucagon's Metabolic Action in Health and Disease. Wiley Online Library [online]. 2021, 11(1), 1759-1783 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/cphy.c200013
- [80] Ha, J., J. Lee, D. Lim, J. Lee, et al.: Association of serum free thyroxine and glucose homeostasis: Korea National Health and Nutrition Examination Survey. The Korean Journal of Internal Medicine [online]. 2021, 36(Suppl 1), 170-179 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: doi:10.3904/kjim.2019.160
- [81] Kuo, T., A. Mcqueen, T. Chen a J. Wang. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. Wang, Jen-Chywan a Charles Harris, ed. Glucocorticoid Signaling [online]. 2015, 872(5), 99-126 [cit. 2023-05-02]. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-1-4939-2894-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2895-8\_5
- [82] Clore, J. a L. Thurby-Hay. Glucocorticoid-Induced Hyperglycemia. Endocrine Practice [online]. 2009, 15(5), 469-474 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: doi:10.4158/EP08331.RAR
- [83] Donato M. T., Tolosa L., Gómez-Lechón M. J.: Culture and Functional Characteriozation of Human Hepatoma HepG2 cells, Protocols in Vitro Hepatocyte Research, 77 – 93, 201
- [84] Aden D. P., Fogel A., Plotkin S., et al.: Controlled synthesis of HbsAg in differentiated liver carcinoma-derived cell line, Natura 282: 615 – 617, 1979.
- [85] ChoI Y.H., Lee H.S., CHung C.K., Kang I.J. et al.: Protective effects of an ethanol extract of Angelica keiskei against acetaminophen-induced hepatotoxicity in HepG2 and HepaRG cells. Nutr Res Pract., 2017, 11(2), 97-104.

- [86] Rodríguez-Antona, C., M. T. Donato, A. Boobis, et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* [online]. 2008, 32(6), s. 505-520. [cit. 2020-05-15]. ISSN 0049-8254. Dostupné z: doi:10.1080/00498250210128675
- [87] 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.
- [88] Arzumanian, V. A., Kiseleva O. I. a Poverennaya E. V. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23), 1-19.
- [89] Javitt, Norman B. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *The FASEB Journal* [online]. 1990, 4(2), s. 161-168. [cit. 2020-04-28]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.4.2.2153592.
- [90] Costantini, S., G. Di Bernardo, M. Cammarota, et al. Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene* [online]. 2013, 518(2), s. 335-345. [cit. 2020-04-28]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2012.12.106.
- [91] Arodin Selenius, Lisa, Marita et al. The Cell Culture Medium Affects Growth, Phenotype Expression and the Response to Selenium Cytotoxicity in A549 and HepG2 Cells. *Antioxidants* [online]. 2019, 8(5) [cit. 2020-06-11]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox8050130.
- [92] Ippolito, Joseph E., Matthew W., et al.: Extracellular pH Modulates Neuroendocrine Prostate Cancer Cell Metabolism and Susceptibility to the Mitochondrial Inhibitor Niclosamide. *PLOS ONE* [online]. 2016, 11(7) [cit. 2020-05-02]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0159675.
- [93] Minimum Essential Medium (MEM). ThermoFischer: Scientific [online]. Paisley: Thermo Fisher Scientific, 2006 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media/mem.html>
- [94] Arora, Meenakshi. Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods* [online]. 2013, 3 [cit. 2020-05-11]. ISSN 2329-5139. Dostupné z: doi:10.13070/mm.en.3.175.
- [95] Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). ThermoFischer: Scientific [online]. Paisley: Thermo Fisher Scientific, 2006 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media/dmem.html>

- [96] Bhatia, Saurabh. Introduction to animal tissue culture science. Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 3 [online]. IOP Publishing, 2019, [cit. 2020-06-02]. ISBN 978-0-7503-1347-6. Dostupné z: doi:10.1088/2053-2563/aafac0ch1
- [97] Murray, R., D. Bender, K. Botham, P. Kennelly, V. Rodwell a P. Weil. Harper's Illustrated Biochemistry. 31st. New York: McGraw-Hill Education, 2009. ISBN 978-1259859818.
- [98] Kompletní protokol pro zátěžový test Seahorse XF Cell Mito. In: Agilent [online]. Santa Clara: Agilent Technologies, 2019 [cit. 2023-05-08]. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF\\_Cell\\_Mito\\_Stress\\_Test\\_Kit\\_User\\_Guide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf)
- [99] Willemsen, N., C. Cheng a et AL. A review of Seahorse XF microplate analyzer and its applications in metabolic research. *Analytica chimica acta*. 2020, 1106(10), 1-16.
- [100] Nagarajan, S., M. Paul-Heng, J. Krycer, et al.: Lipid and glucose metabolism in hepatocyte cell lines and primary mouse hepatocytes: a comprehensive resource for in vitro studies of hepatic metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* [online]. 2019, 316(4), E578-E589 [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: doi:10.1152/ajpendo.00365.2018
- [101] Herrera-Balandrano, D., Z. Chal, R. Hutabarat, et al.: Hypoglycemic and hypolipidemic effects of blueberry anthocyanins by AMPK activation: In vitro and in vivo studies. *Redox Biology* [online]. 2021, 46(102100), 1-13 [cit. 2023-05-08]. ISSN 22132317. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34416477/>
- [102] Nacher, V., J. Merino, M. Raurell, J. Soler a E. Montanya. Normoglycemia Restores  $\beta$ -Cell Replicative Response to Glucose in Transplanted Islets Exposed to Chronic Hyperglycemia. *Diabetes* [online]. 1998, 47(2), 192-196 [cit. 2023-05-08]. Dostupné z: doi:10.2337/diab.47.2.192
- [103] Alnahdi, A., A. John a H. Raza. Augmentation of Glucotoxicity, Oxidative Stress, Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells by Palmitic Acid. *Nutrients* [online]. 2019, 11(9), 1-21 [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: doi:10.3390/nu11091979
- [104] Esawie, M., M. L. Louka, A. Hasanin, et al.: High-glucose-induced hyperosmolar stress sensitizes HepG2 cell lines to sorafenib. *Gene* [online]. 2022, 844(146828) [cit. 2023-05-08]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2022.146828

- [105] Oshikata-Miyazaki, A. a T. Takezawa. Development of an oxygenation culture method for activating the liver-specific functions of HepG2 cells utilizing a collagen vitrigel membrane chamber. *Cytotechnology* [online]. 2016, 68(5), 1801-1811 [cit. 2023-05-08]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26660096/>
- [106] Nakai, S., I. Shibata, T. Shitamichi, et al. Collagen vitrigel promotes hepatocytic differentiation of induced pluripotent stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Biology Open* [online]. 2019, 8(7), 1-14 [cit. 2023-05-09]. ISSN 2046-6390. Dostupné z: doi:10.1242/bio.042192
- [107] Zanetti, M., R. Zwacka, J. Engelhardt, et al.: Superoxide Anions and Endothelial Cell Proliferation in Normoglycemia and Hyperglycemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2001, 21(2), 195-200 [cit. 2023-05-08]. Dostupné z: doi:10.1161/01.ATV.21.2.195
- [108] Vander Heiden, M., L. Cantley a C. Thompson. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* [online]. 2009, 324(5930), 1029-1033 [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: doi:10.1126/science.1160809
- [109] Moreno-Sánchez, R., S. Rodríguez-Enríquez, A. et al.: Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal* [online]. 2007, 274(6), 1393-1418 [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x

# **PŘÍLOHY**



**Příloha 1 – WST-1 assay; počet buněk 3 000 až 33 000 buněk na jamku**

NG+COL												
Destička	3 000	6 000	9 000	12 000	15 000	18 000	21 000	24 000	27 000	30 000	33 000	0
1	0,017	0,074	0,137	0,143	0,213	0,264	0,371	0,303	0,451	0,440	0,484	0
2	0,030	0,062	0,099	0,126	0,143	0,176	0,223	0,275	0,308	0,379	0,367	0
3	0,014	0,051	0,094	0,115	0,159	0,220	0,283	0,348	0,419	0,442	0,517	0
4	0,026	0,060	0,088	0,126	0,162	0,208	0,271	0,333	0,365	0,499	0,522	0
5	0,023	0,077	0,135	0,199	0,242	0,487	0,458	0,652	0,637	0,821	0,933	0
6	0,038	0,088	0,141	0,174	0,260	0,437	0,416	0,518	0,600	0,640	0,833	0
NG-COL												
Destička	3 000	6 000	9 000	12 000	15 000	18 000	21 000	24 000	27 000	30 000	33 000	0
1	0,011	0,028	0,059	0,079	0,118	0,146	0,172	0,210	0,215	0,262	0,295	0
2	0,002	0,022	0,033	0,059	0,090	0,101	0,144	0,205	0,257	0,265	0,286	0
3	0,009	0,027	0,041	0,077	0,092	0,117	0,144	0,189	0,235	0,265	0,289	0
4	0,007	0,019	0,038	0,055	0,069	0,094	0,108	0,129	0,165	0,185	0,202	0
HG+COL												
Destička	3 000	6 000	9 000	12 000	15 000	18 000	21 000	24 000	27 000	30 000	33 000	0
1	0,046	0,078	0,081	0,122	0,206	0,213	0,259	0,315	0,360	0,560	0,284	0
2	0,000	0,033	0,050	0,084	0,092	0,134	0,159	0,199	0,222	0,325	0,255	0
3	0,000	0,027	0,046	0,055	0,086	0,112	0,129	0,155	0,227	0,248	0,227	0
4	0,010	0,032	0,045	0,075	0,082	0,130	0,157	0,145	0,222	0,291	0,255	0
5	0,018	0,037	0,117	0,121	0,202	0,303	0,357	0,460	0,551	0,714	0,643	0
6	0,013	0,045	0,123	0,142	0,185	0,253	0,346	0,417	0,475	0,586	0,538	0
HG-COL												
Destička	3 000	6 000	9 000	12 000	15 000	18 000	21 000	24 000	27 000	30 000	33 000	0
1	0,001	0,026	0,040	0,053	0,074	0,098	0,140	0,163	0,184	0,216	0,187	0
2	0,003	0,020	0,026	0,036	0,063	0,083	0,107	0,134	0,186	0,168	0,207	0
3	0,001	0,014	0,042	0,052	0,080	0,105	0,112	0,155	0,199	0,260	0,312	0
4	0,012	0,013	0,050	0,042	0,064	0,087	0,092	0,136	0,142	0,205	0,160	0

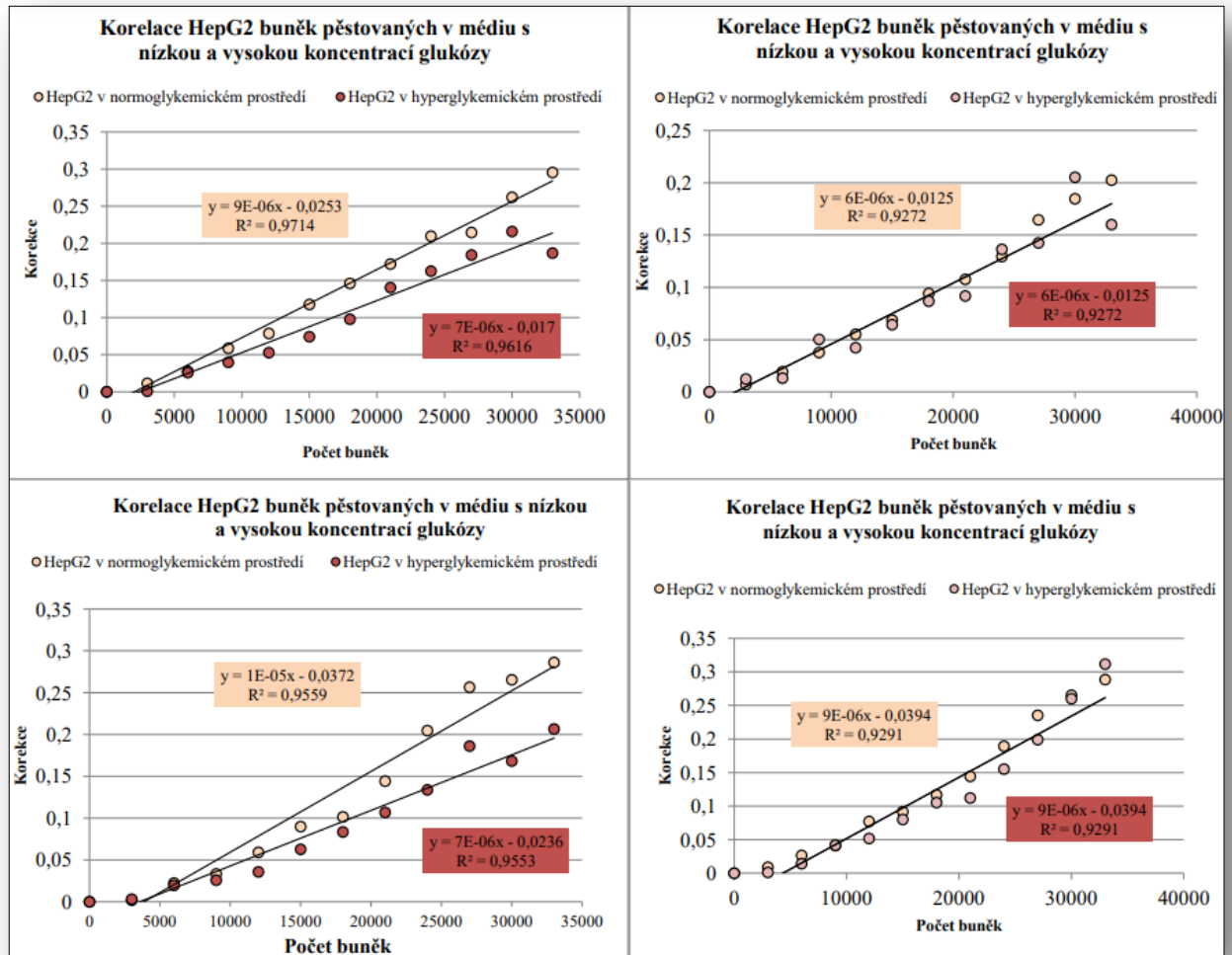
**Příloha 2 – WST-1 assay; počet buněk 4 000 až 44 000 buněk na jamku**

NG+COL												
Destička	4 000	8 000	12 000	16 000	20 000	24 000	28 000	32 000	36 000	40 000	44 000	0
1	0,010	0,064	0,056	0,099	0,146	0,200	0,210	0,282	0,291	0,334	0,446	0
2	0,010	0,063	0,075	0,153	0,145	0,228	0,258	0,332	0,349	0,422	0,417	0
3	0,013	0,061	0,101	0,142	0,145	0,245	0,312	0,318	0,386	0,441	0,435	0
4	0,012	0,061	0,101	0,142	0,143	0,243	0,310	0,315	0,382	0,431	0,434	0
5	0,013	0,048	0,100	0,131	0,156	0,186	0,289	0,272	0,365	0,484	0,508	0
6	0,010	0,046	0,072	0,117	0,172	0,228	0,336	0,291	0,411	0,450	0,480	0
NG-COL												
Destička	4 000	8 000	12 000	16 000	20 000	24 000	28 000	32 000	36 000	40 000	44 000	0
1	0,004	0,027	0,063	0,108	0,125	0,156	0,187	0,221	0,230	0,252	0,291	0
2	0,016	0,020	0,047	0,074	0,098	0,118	0,200	0,161	0,200	0,286	0,265	0
3	0,004	0,027	0,063	0,108	0,125	0,156	0,187	0,221	0,230	0,252	0,291	0
4	0,007	0,024	0,023	0,077	0,061	0,107	0,137	0,134	0,174	0,202	0,198	0
5	0,005	0,017	0,036	0,073	0,120	0,123	0,158	0,146	0,189	0,204	0,274	0
6	0,016	0,038	0,068	0,100	0,141	0,169	0,243	0,229	0,268	0,354	0,358	0
HG+COL												
Destička	4 000	8 000	12 000	16 000	20 000	24 000	28 000	32 000	36 000	40 000	44 000	0
1	0,001	0,030	0,049	0,085	0,100	0,133	0,134	0,199	0,183	0,295	0,257	0
2	0,010	0,028	0,032	0,081	0,090	0,102	0,107	0,139	0,157	0,210	0,179	0
3	0,021	0,043	0,072	0,083	0,113	0,144	0,168	0,178	0,199	0,279	0,242	0
4	0,021	0,043	0,073	0,084	0,115	0,132	0,165	0,167	0,183	0,287	0,239	0
5	0,011	0,045	0,059	0,090	0,094	0,147	0,171	0,258	0,241	0,312	0,354	0
6	0,004	0,024	0,055	0,068	0,089	0,107	0,124	0,157	0,193	0,263	0,257	0
HG-COL												
Destička	4 000	8 000	12 000	16 000	20 000	24 000	28 000	32 000	36 000	40 000	44 000	0
1	0,015	0,025	0,042	0,065	0,087	0,109	0,130	0,154	0,162	0,201	0,165	0
2	0,023	0,013	0,037	0,034	0,057	0,069	0,089	0,097	0,107	0,144	0,119	0
3	0,008	0,019	0,029	0,044	0,078	0,081	0,099	0,113	0,134	0,202	0,172	0
4	0,009	0,016	0,036	0,047	0,068	0,081	0,084	0,104	0,123	0,149	0,130	0
5	0,004	0,024	0,052	0,071	0,093	0,113	0,143	0,164	0,192	0,243	0,236	0
6	0,007	0,020	0,045	0,067	0,088	0,121	0,148	0,169	0,202	0,248	0,244	0

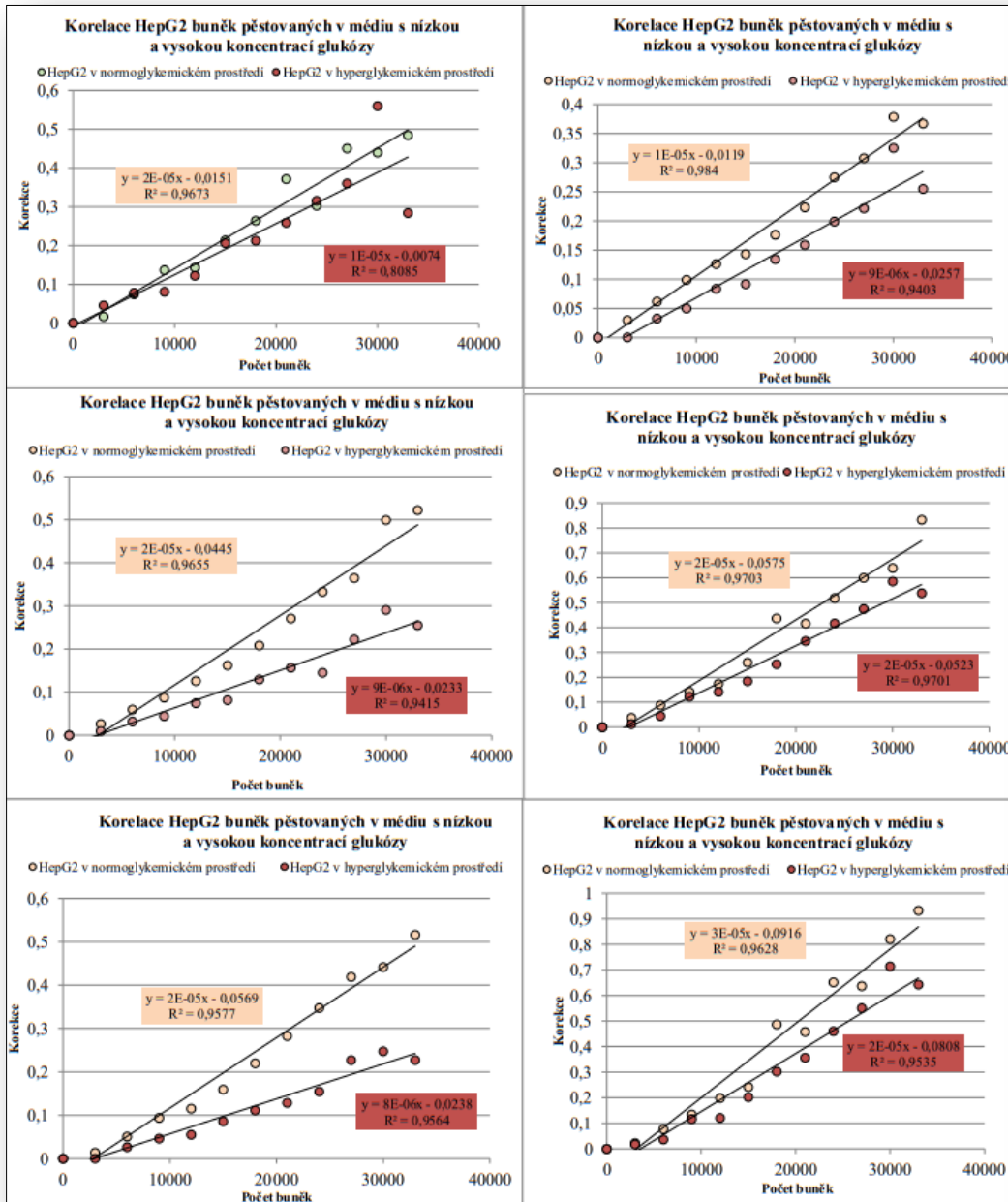
**Příloha 3 – WST-1 assay; počet buněk 5 000 až 55000 buněk na jamku**

<b>NG+COL</b>												
Destička	5 000	10 000	15 000	20 000	25 000	30 000	35 000	40 000	45 000	50 000	55 000	0
1	0,019	0,051	0,089	0,140	0,160	0,209	0,227	0,260	0,323	0,357	0,511	0
2	0,038	0,070	0,118	0,137	0,162	0,222	0,229	0,266	0,332	0,260	0,416	0
3	0,022	0,082	0,206	0,409	0,517	0,648	0,738	1,289	1,633	1,846	2,093	0
4	0,026	0,088	0,154	0,264	0,349	0,485	0,532	0,541	0,737	0,909	0,944	0
5	0,058	0,142	0,206	0,371	0,416	0,427	0,559	0,651	0,898	0,859	1,137	0
6	0,019	0,051	0,089	0,140	0,160	0,209	0,227	0,260	0,323	0,357	0,511	0
<b>NG-COL</b>												
Destička	5 000	10 000	15 000	20 000	25 000	30 000	35 000	40 000	45 000	50 000	55 000	0
1	0,001	0,021	0,038	0,054	0,060	0,085	0,119	0,145	0,137	0,182	0,274	0
2	0,002	0,025	0,041	0,062	0,074	0,105	0,123	0,151	0,173	0,212	0,255	0
3	0,029	0,058	0,124	0,237	0,289	0,439	0,479	0,614	0,931	1,148	1,474	0
4	0,008	0,052	0,089	0,145	0,191	0,247	0,342	0,370	0,555	0,516	0,586	0
5	0,026	0,068	0,111	0,168	0,205	0,278	0,310	0,375	0,474	0,522	0,687	0
6	0,001	0,021	0,038	0,054	0,060	0,085	0,119	0,145	0,137	0,182	0,274	0
<b>HG+COL</b>												
Destička	5 000	10 000	15 000	20 000	25 000	30 000	35 000	40 000	45 000	50 000	55 000	0
1	0,044	0,080	0,107	0,179	0,257	0,228	0,424	0,568	0,591	0,473	0,635	0
2	0,033	0,078	0,104	0,171	0,260	0,284	0,445	0,482	0,516	0,422	0,687	0
3	0,028	0,073	0,121	0,199	0,221	0,287	0,380	0,591	0,548	0,624	0,970	0
4	0,031	0,077	0,140	0,222	0,327	0,344	0,546	0,622	0,808	1,158	1,020	0
5	0,029	0,075	0,100	0,226	0,263	0,410	0,440	0,526	0,643	0,789	1,033	0
6	0,044	0,080	0,107	0,179	0,257	0,228	0,424	0,568	0,591	0,473	0,635	0
<b>HG-COL</b>												
Destička	5 000	10 000	15 000	20 000	25 000	30 000	35 000	40 000	45 000	50 000	55 000	0
1	0,008	0,026	0,029	0,034	0,065	0,082	0,090	0,121	0,132	0,159	0,156	0
2	0,001	0,035	0,034	0,061	0,086	0,094	0,123	0,125	0,159	0,181	0,152	0
3	0,017	0,051	0,077	0,194	0,172	0,196	0,309	0,441	0,477	0,549	0,690	0
4	0,015	0,035	0,067	0,105	0,134	0,163	0,291	0,354	0,404	0,566	1,021	0
5	0,013	0,046	0,082	0,122	0,170	0,200	0,318	0,361	0,437	0,613	0,771	0
6	0,008	0,026	0,029	0,034	0,065	0,082	0,090	0,121	0,132	0,159	0,156	0

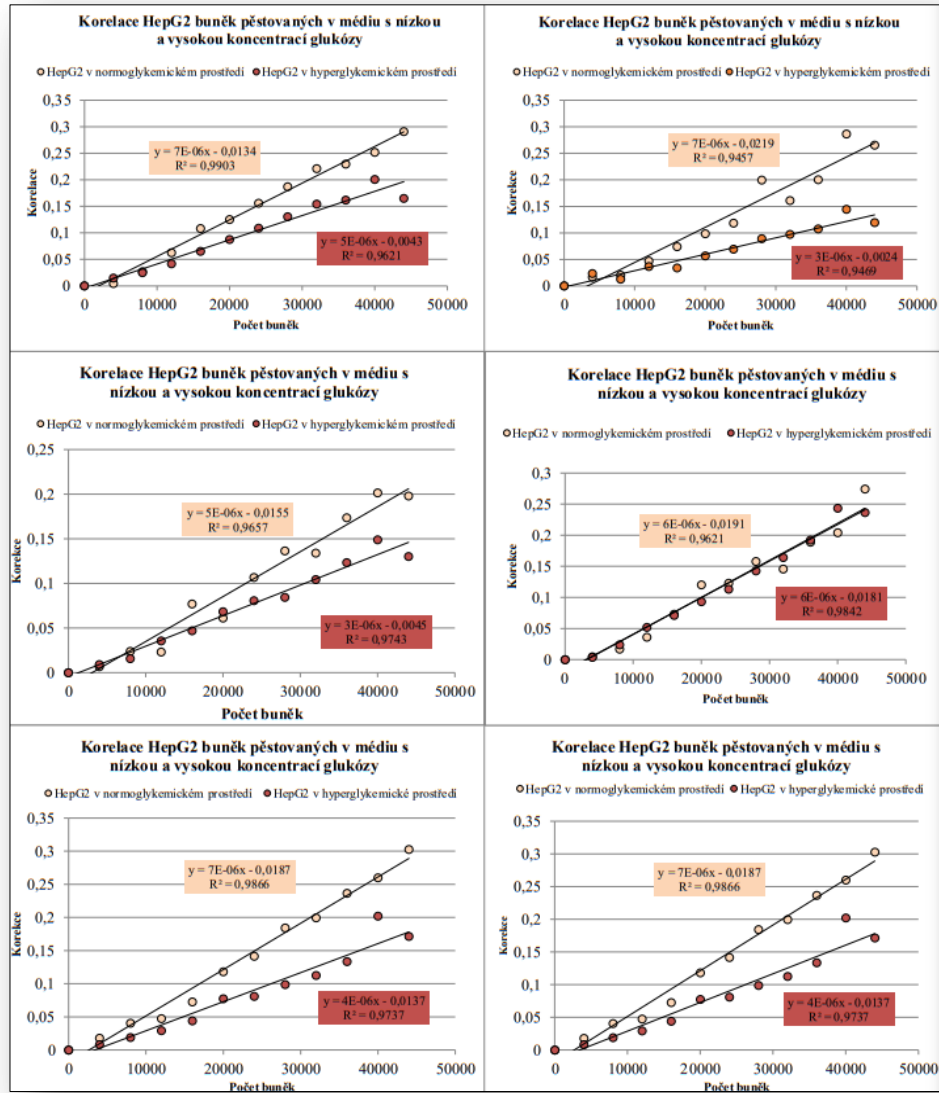
Příloha 4 – Počet buněk 3 000 až 33 000 na jamku; nenakolagenovaná destička; WST-1 assay



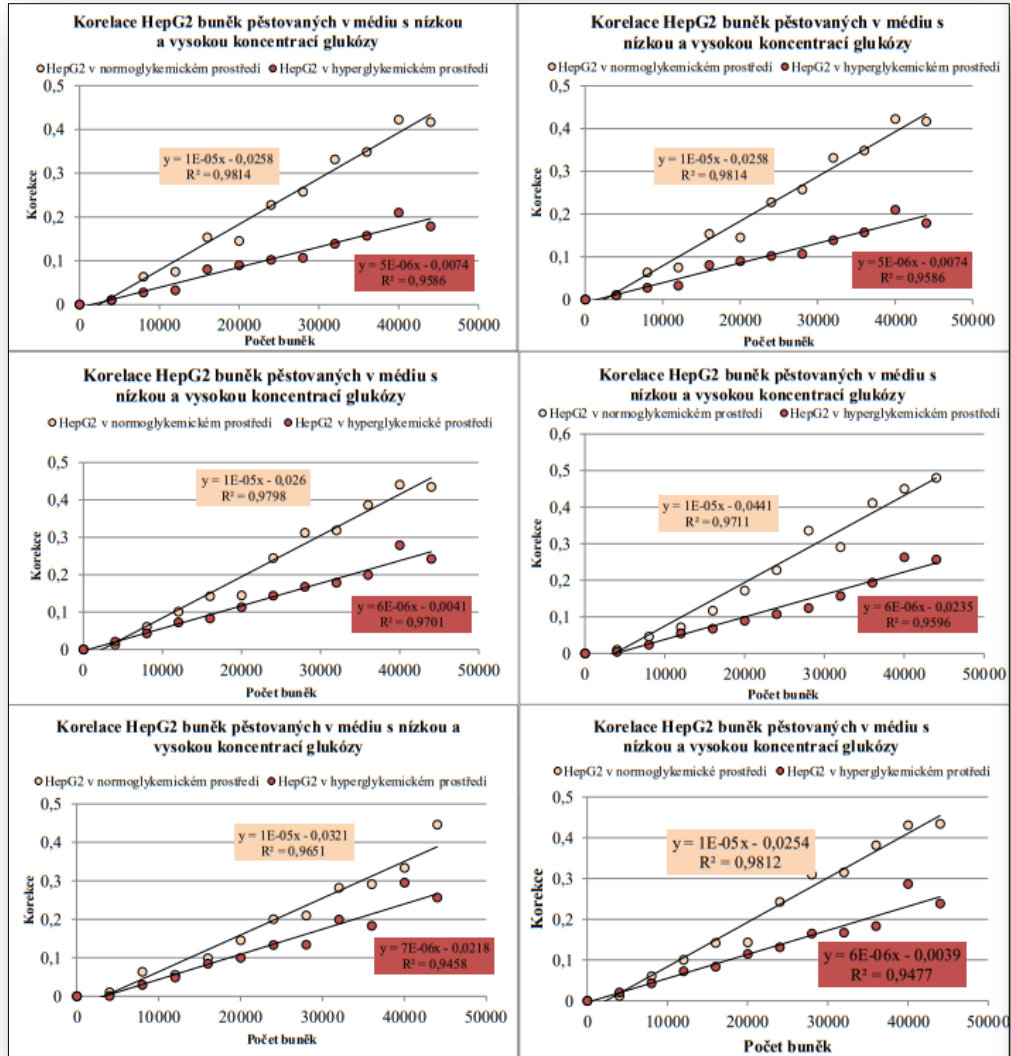
Příloha 5 – Počet buněk 3 000 až 33 000 na jamku; nakolagenovaná destička; WST-1 assay



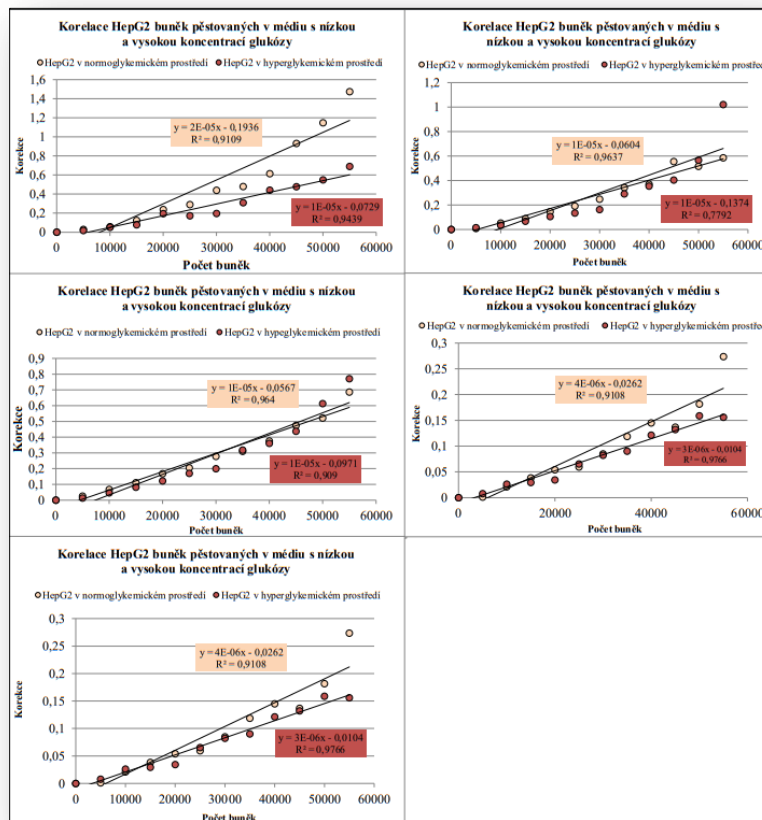
Příloha 6 – Počet buněk 4 000 až 44 000 na jamku; nenakolagenovaná destička; WST-1 assay



Příloha 7 – Počet buněk 4 000 až 44 000 na jamku; nakolagenovaná destička; WST-1 assay

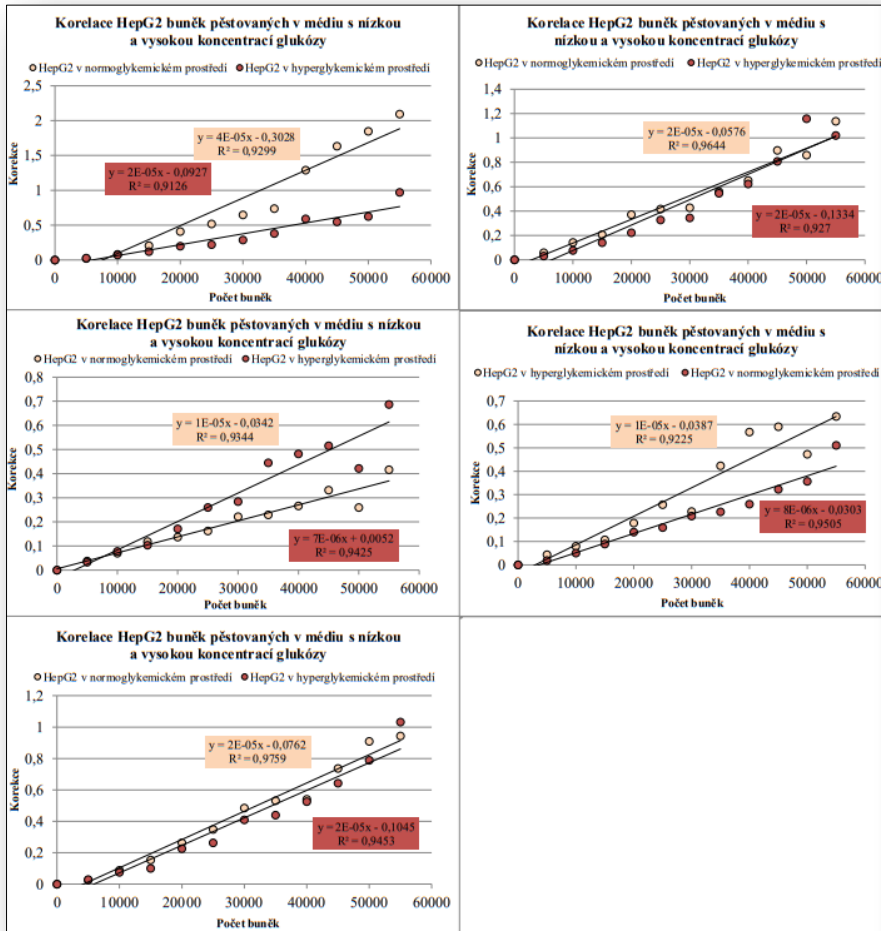


Příloha 8 – Počet buněk 5 000 až 55 000 na jamku; nenakolagenovaná destička; WST-1 assay





Příloha 9 – Počet buněk 5 000 až 55 000 na jamku; nakolagenovaná destička; WST-1 assay



**Příloha 10 – Informace o NG-Col získané prostřednictvím Glycolytic Rate Assay**

<b>Basal Glycolysis (pmol/min)</b>	<b>Basal Proton Efflux Rate (pmol/min)</b>	<b>Compensatory Glycolysis (pmol/min)</b>	<b>Post 2-DG Acidification (pmol/min)</b>
251,265	297,826	454,980	140,037
251,333	295,906	443,733	135,551
263,697	310,112	457,864	159,919
287,292	335,215	492,800	161,022
207,737	265,267	420,098	127,642
110,595	159,274	271,261	81,550
230,454	277,741	429,885	126,356
325,405	373,965	531,149	178,252
270,157	316,659	471,357	148,833
227,165	272,805	415,814	126,703
190,784	243,328	396,327	111,436
114,501	160,578	280,824	79,699
280,170	333,474	523,117	172,479
193,752	248,017	418,432	114,093
262,000	312,659	494,475	159,343
231,130	291,180	461,875	144,039
168,165	226,362	398,779	109,135
93,853	138,831	245,135	66,458
131,191	184,135	333,588	97,391
118,473	171,297	306,827	78,575
132,438	185,387	324,533	93,822
110,223	155,345	277,539	82,247
100,557	144,889	257,633	81,213

**Příloha 11 – Informace o HG-Col získané prostřednictvím Glycolytic Rate Assay**

<b>Basal Glycolysis (pmol/min)</b>	<b>Basal Proton Efflux Rate (pmol/min)</b>	<b>Compensatory Glycolysis (pmol/min)</b>	<b>Post 2-DG Acidification (pmol/min)</b>
137,869	172,398	274,663	57,897
146,082	186,064	298,306	63,863
178,263	218,918	340,181	80,545
150,074	186,075	273,088	59,926
167,856	205,576	314,039	71,121
141,131	178,620	271,426	56,057
123,607	147,605	224,723	54,862
131,730	169,718	267,552	58,382
187,833	227,559	350,476	93,758
198,368	236,844	351,589	89,161
176,480	215,946	337,075	89,778
172,104	208,355	330,707	77,857
95,582	117,379	177,754	44,738
129,999	163,773	255,482	56,379
156,447	196,173	304,917	68,472
152,583	186,237	289,222	68,084
162,562	199,835	312,638	84,351
145,821	181,528	285,590	63,240
118,388	147,001	231,373	57,456
159,044	196,055	305,068	79,588
149,068	182,059	276,746	73,079
141,781	176,955	276,727	78,277
131,366	166,063	267,752	61,945

**Příloha 12 – Informace o NG+Col získané prostřednictvím Glycolytic Rate Assay**

<b>Basal Glycolysis (pmol/min)</b>	<b>Basal Proton Efflux Rate (pmol/min)</b>	<b>Compensatory Glycolysis (pmol/min)</b>	<b>Post 2-DG Acidification (pmol/min)</b>
123,328	180,326	334,955	67,928
106,834	156,467	297,031	57,246
116,479	166,882	295,782	62,600
122,133	177,885	330,003	69,427
126,086	182,070	337,621	76,093
203,478	265,177	458,939	121,237
205,362	261,387	441,967	104,323
199,602	263,494	466,086	126,648
210,153	275,237	481,303	118,903
172,581	233,269	423,022	110,907
118,334	171,749	314,194	76,191
211,553	271,113	463,497	126,681
227,434	288,421	478,740	133,211
217,120	275,235	468,274	133,932
214,567	278,968	473,183	131,495
187,901	253,085	452,716	124,694
124,258	183,830	332,990	79,678
257,966	305,918	481,242	150,292
238,839	284,131	441,356	138,603
275,749	324,995	497,428	163,137
273,053	325,918	508,886	153,838
238,486	292,017	481,071	142,223
115,420	176,693	323,926	92,029

**Příloha 13 – Informace o HG+Col získané prostřednictvím Glycolytic Rate Assay**

<b>Basal Glycolysis (pmol/min)</b>	<b>Basal Proton Efflux Rate (pmol/min)</b>	<b>Compensatory Glycolysis (pmol/min)</b>	<b>Post 2-DG Acidification (pmol/min)</b>
112,758	146,429	240,120	49,809
134,209	173,052	277,431	53,110
112,646	146,723	237,414	40,497
138,903	179,297	300,535	62,632
141,944	183,008	307,672	65,087
144,171	183,452	298,233	68,600
138,896	179,265	299,157	55,342
213,513	270,073	441,447	101,396
116,674	150,657	238,424	41,962
172,595	227,459	381,998	81,353
152,197	192,494	318,155	61,859
132,555	168,289	277,996	78,023
153,569	202,688	341,010	74,819
176,484	227,433	372,993	87,654
178,177	230,353	366,397	84,569
164,372	213,704	362,944	92,127
159,437	203,869	333,617	70,196
142,743	181,329	297,358	79,128
134,311	172,230	293,193	68,716
175,808	221,161	355,646	84,382
141,975	176,756	269,520	65,270
191,728	232,707	362,916	99,280
190,561	235,611	381,914	92,071

**Příloha 14 – Informace o NG-Col získané prostřednictvím Mito Cell Test**

<b>Nemitochondriální spotřeba kyslíku (pmol/min)</b>	<b>Bazální respirace (pmol/min)</b>	<b>Maximální respirace (pmol/min)</b>	<b>Únik protonů (pmol/min)</b>	<b>Respirace související se syntézou ATP (pmol/min)</b>	<b>Rezervní respirační kapacita (pmol/min)</b>
20,67	60,06	103,15	14,07	45,99	43,09
32,31	133,69	302,81	52,64	81,05	169,12
23,92	73,38	129,08	19,05	54,33	55,70
21,71	60,28	107,52	15,31	44,97	47,24
24,57	72,20	133,56	17,61	54,58	61,36
19,67	48,64	82,51	13,64	35,00	33,87
29,62	78,25	108,33	19,24	59,01	30,08
32,18	78,11	124,01	18,74	59,37	45,90
31,50	85,49	139,96	22,86	62,63	54,47
30,42	83,40	136,97	21,50	61,90	53,57
30,88	82,53	135,61	20,74	61,80	53,08
23,76	59,50	111,01	15,75	43,75	51,51
35,59	97,80	164,95	23,24	74,55	67,15
35,10	81,68	153,32	20,51	61,18	71,63
37,27	88,42	155,42	23,03	65,39	67,00
36,28	95,35	157,53	24,69	70,66	62,18
40,57	89,90	153,25	21,94	67,96	63,35
23,81	60,78	112,50	15,54	45,24	51,72
35,89	67,06	117,03	16,95	50,11	49,97
37,45	67,29	131,22	16,91	50,38	63,93
38,24	83,10	140,54	19,50	63,60	57,44
37,94	86,82	146,10	20,76	66,05	59,29
34,98	79,41	126,54	26,72	52,69	47,13

20,68	66,41	104,10	15,21	51,20	37,69
28,17	78,58	125,71	19,26	59,32	47,13
30,84	90,75	146,70	21,28	69,48	55,95
26,69	80,73	122,90	19,53	61,20	42,16
28,21	77,42	128,39	19,64	57,78	50,97
23,73	80,73	125,61	20,48	60,24	44,89
32,78	97,75	160,49	23,97	73,79	62,74
33,26	95,12	154,37	21,76	73,36	59,25
38,34	102,28	162,41	25,17	77,11	60,13
38,23	93,58	144,10	23,73	69,85	50,52
37,27	90,15	144,48	23,31	66,85	54,32
27,90	80,54	114,66	20,49	60,05	34,12
36,10	102,55	170,43	23,55	78,99	67,89
38,13	98,08	171,84	24,18	73,90	73,76
41,57	101,24	159,16	24,60	76,64	57,92
45,04	108,76	193,38	30,89	77,87	84,62
51,35	138,82	290,43	47,93	90,89	151,61
19,70	68,94	118,16	16,48	52,46	49,22
35,31	104,59	174,12	28,10	76,50	69,53
38,74	98,11	181,63	25,00	73,11	83,52
39,11	97,19	157,04	24,00	73,19	59,84
39,55	84,01	139,99	21,86	62,14	55,98
41,38	90,66	138,83	23,87	66,79	48,17

25,97	77,48	121,52	19,41	58,07	44,04
23,87	76,31	118,19	20,33	55,97	41,88
28,40	75,55	116,43	19,24	56,31	40,88
20,49	86,31	134,07	22,26	64,05	47,76
25,99	81,34	134,43	20,32	61,02	53,09
27,53	76,01	123,27	19,79	56,23	47,26
34,59	111,86	181,38	29,42	82,44	69,52
38,34	106,54	173,28	27,55	78,99	66,74
40,27	98,51	152,69	24,52	73,99	54,18
38,63	106,13	161,93	25,30	80,83	55,81
37,27	101,11	164,58	25,26	75,84	63,47
30,76	83,54	144,85	21,20	62,34	61,31
38,94	108,22	181,91	26,50	81,73	73,69
41,20	105,32	194,26	25,08	80,25	88,94
41,41	105,43	175,95	26,35	79,07	70,52
41,39	112,26	191,68	28,80	83,46	79,42
40,82	111,04	184,78	26,39	84,66	73,73
26,64	82,34	137,87	20,68	61,66	55,53
44,76	123,85	251,01	47,01	76,84	127,16
40,95	93,23	181,23	25,34	67,89	88,00
39,77	99,86	181,21	26,80	73,06	81,35
41,20	105,46	183,80	25,85	79,61	78,34
39,24	92,14	161,24	24,61	67,54	69,10



**Příloha 15 – Informace o NG+Col získané prostřednictvím Mito Cell Test**

<b>Nemitochondriální spotřeba kyslíku (pmol/min)</b>	<b>Bazální respirace (pmol/min)</b>	<b>Maximální respirace (pmol/min)</b>	<b>Únik protonů (pmol/min)</b>	<b>Respirace související se syntézou ATP (pmol/min)</b>	<b>Rezervní respirační kapacita (pmol/min)</b>
28,07	79,35	139,74	18,08	61,26	60,40
38,59	77,86	155,64	17,99	59,87	77,78
33,51	72,69	140,67	18,83	53,86	67,99
32,73	76,84	139,74	24,74	52,10	62,90
37,53	100,72	162,37	26,30	74,42	61,64
37,06	90,02	144,55	20,09	69,93	54,53
24,06	65,15	117,48	15,18	49,97	52,33
33,22	82,59	145,07	19,28	63,31	62,49
35,23	78,18	154,22	19,89	58,29	76,04
33,92	78,08	138,55	20,21	57,87	60,47
34,76	83,41	148,62	21,26	62,15	65,21
34,90	86,41	155,88	20,50	65,92	69,46
11,75	46,65	78,21	11,18	35,47	31,56
27,73	75,95	130,48	17,51	58,43	54,54
31,99	85,80	154,58	20,49	65,31	68,77
31,86	77,44	136,96	17,50	59,94	59,52
28,33	72,38	121,47	17,76	54,62	49,09
30,89	79,17	141,78	18,19	60,98	62,61
20,72	51,56	90,80	11,54	40,02	39,24
24,78	65,79	115,44	13,58	52,21	49,65
25,93	59,33	108,84	13,61	45,72	49,51
24,46	63,76	114,63	14,80	48,96	50,87
24,88	65,86	117,85	15,38	50,48	51,99

27,89	89,93	156,28	19,66	70,26	66,36
38,34	108,77	186,42	24,84	83,93	77,65
40,94	102,07	178,58	25,15	76,92	76,51
42,03	109,82	184,46	25,52	84,30	74,64
39,84	96,11	165,39	23,38	72,73	69,28
43,66	104,52	179,29	25,42	79,09	74,78
27,46	85,44	148,12	19,08	66,36	62,68
35,00	96,83	177,09	23,13	73,70	80,25
35,92	90,73	166,67	23,13	67,60	75,94
39,31	98,04	175,08	23,00	75,04	77,04
39,09	84,86	157,68	21,14	63,72	72,82
41,55	90,49	160,48	23,64	66,84	70,00
24,35	79,00	135,93	17,85	61,15	56,92
43,50	146,20	308,79	74,69	71,51	162,59
37,88	100,85	174,99	24,87	75,98	74,14
35,89	90,53	160,48	22,16	68,37	69,96
39,30	97,48	160,37	25,03	72,45	62,89
42,38	106,69	192,49	28,34	78,35	85,81
28,38	93,96	158,08	19,82	74,14	64,12
30,23	85,74	143,61	20,53	65,21	57,87
28,99	84,45	134,89	18,91	65,55	50,43
30,99	92,74	160,32	22,18	70,56	67,59
32,27	90,27	157,51	20,04	70,24	67,24

30,98	99,31	175,67	23,87	75,44	76,37
38,42	108,18	183,67	27,91	80,27	75,49
41,31	114,09	204,79	29,50	84,59	90,69
39,73	104,55	169,06	28,25	76,30	64,51
41,01	114,67	189,30	27,74	86,93	74,63
39,86	96,35	165,22	25,95	70,40	68,88
32,28	99,93	171,58	24,34	75,59	71,65
35,29	109,61	192,91	28,24	81,37	83,30
38,56	103,72	192,27	28,38	75,33	88,56
38,49	101,48	183,36	25,82	75,66	81,87
38,60	105,71	193,24	27,41	78,30	87,54
45,06	113,39	215,12	38,41	74,97	101,73
24,61	82,92	141,35	19,88	63,04	58,43
32,13	108,83	183,34	26,50	82,33	74,51
37,10	109,33	194,30	28,82	80,51	84,97
36,48	101,75	173,17	25,50	76,25	71,42
36,88	107,56	185,87	26,62	80,94	78,31
34,52	105,00	184,04	27,23	77,77	79,03
26,57	75,39	124,59	19,18	56,21	49,19
29,37	86,28	146,34	21,39	64,90	60,06
30,55	83,03	133,75	21,79	61,24	50,72
27,38	87,30	149,12	19,90	67,41	61,82
29,42	84,63	145,08	20,00	64,64	60,45

**Příloha 16 – Informace o HG-Col získané prostřednictvím Mito Cell Test**

<b>Nemitochondriální spotřeba kyslíku (pmol/min)</b>	<b>Bazální respirace (pmol/min)</b>	<b>Maximální respirace (pmol/min)</b>	<b>Únik protonů (pmol/min)</b>	<b>Respirace související se syntézou ATP (pmol/min)</b>	<b>Rezervní respirační kapacita (pmol/min)</b>
15,71	33,46	55,41	14,27	19,20	21,95
16,36	29,86	55,16	9,30	20,56	25,30
13,17	30,24	52,97	9,88	20,36	22,72
14,67	25,84	42,92	7,98	17,87	17,08
15,24	18,96	36,60	6,41	12,55	17,63
20,71	34,00	57,36	12,60	21,40	23,36
21,28	33,14	49,68	13,74	19,41	16,53
18,24	28,84	44,41	20,98	7,85	15,57
24,52	30,29	56,97	10,83	19,46	26,68
14,53	26,38	35,75	15,49	10,89	9,37
13,14	23,22	41,67	9,02	14,20	18,45
25,28	40,52	75,35	15,39	25,13	34,84
27,59	42,99	76,22	16,06	26,92	33,23
24,97	29,73	54,75	11,08	18,66	25,01
23,41	37,36	73,60	15,13	22,23	36,24
21,10	26,05	50,47	8,73	17,31	24,42
13,64	29,34	54,85	10,25	19,09	25,51
25,95	31,40	54,83	10,96	20,44	23,43
28,00	30,97	65,77	12,36	18,61	34,80
24,09	32,08	46,29	9,61	22,48	14,21
27,60	26,01	47,02	13,95	12,06	21,01
22,11	34,45	56,58	11,54	22,91	22,14
16,56	31,16	49,98	8,70	22,46	18,82

22,08	48,53	78,84	16,31	32,23	30,31
24,17	45,12	74,01	13,19	31,92	28,90
23,07	51,30	82,10	17,13	34,17	30,80
20,65	47,32	73,86	14,21	33,10	26,54
17,72	43,72	64,73	14,21	29,51	21,01
27,25	58,11	89,09	20,69	37,42	30,99
28,35	48,87	69,07	16,24	32,63	20,20
25,77	54,10	87,81	18,60	35,50	33,71
26,01	50,90	72,46	19,76	31,14	21,56
22,86	49,83	66,67	12,57	37,26	16,85
15,76	32,63	48,36	11,33	21,30	15,73
32,65	56,88	83,77	18,74	38,13	26,89
34,83	63,12	95,52	19,22	43,90	32,40
31,02	55,39	90,36	19,50	35,89	34,97
29,35	56,41	84,11	18,58	37,83	27,69
27,00	55,09	78,08	18,29	36,81	22,99
17,63	43,13	61,94	14,84	28,29	18,80
32,21	54,81	83,19	18,58	36,24	28,37
31,92	59,13	78,59	18,08	41,04	19,47
31,36	52,53	76,46	18,16	34,37	23,93
29,74	51,84	81,27	17,20	34,64	29,43
26,33	47,17	68,66	15,63	31,54	21,49
18,89	44,79	69,86	14,09	30,70	25,07

21,45	49,10	66,00	17,63	31,48	16,90
26,85	53,65	95,95	16,45	37,20	42,30
21,07	52,37	82,62	20,16	32,22	30,25
21,64	50,98	85,66	16,35	34,63	34,68
19,82	51,08	75,95	18,73	32,35	24,87
29,51	53,05	84,81	19,80	33,25	31,77
29,36	61,48	94,88	21,53	39,95	33,40
29,17	57,31	83,16	21,17	36,14	25,85
31,10	61,17	92,39	20,82	40,36	31,21
27,98	62,73	97,28	21,65	41,07	34,55
20,06	34,92	49,36	12,21	22,71	14,44
31,13	58,49	81,69	18,41	40,08	23,21
34,28	64,74	106,91	22,17	42,57	42,18
35,23	63,08	106,04	23,61	39,47	42,96
35,27	65,19	99,43	22,02	43,17	34,24
30,21	62,53	95,92	21,69	40,84	33,39
21,20	46,73	72,27	16,30	30,43	25,54
32,97	66,05	102,62	21,22	44,83	36,57
33,07	63,02	87,89	22,02	41,00	24,87
32,60	62,93	99,09	22,22	40,71	36,15
32,08	58,88	84,91	21,13	37,74	26,03
31,35	68,44	100,54	22,92	45,52	32,10
22,20	43,94	63,09	15,29	28,65	19,15

**Příloha 17 – Informace o HG+Col získané prostřednictvím Mito Cell Test**

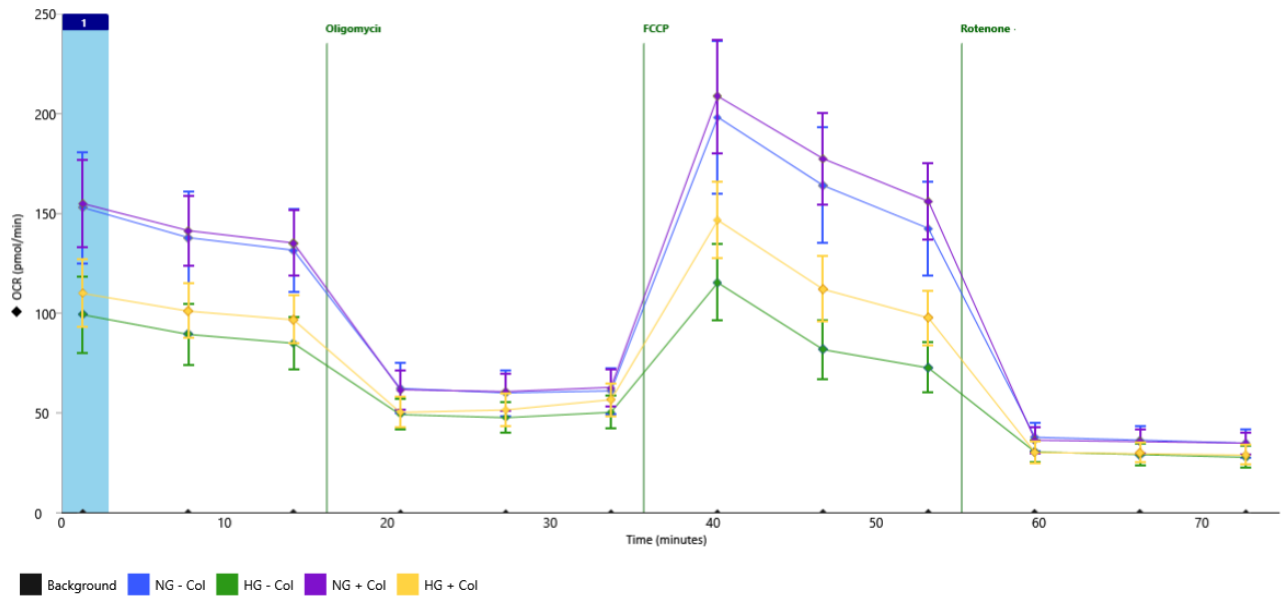
<b>Nemitochondriální spotřeba kyslíku (pmol/min)</b>	<b>Bazální respirace (pmol/min)</b>	<b>Maximální respirace (pmol/min)</b>	<b>Únik protonů (pmol/min)</b>	<b>Respirace související se syntézou ATP (pmol/min)</b>	<b>Rezervní respirační kapacita (pmol/min)</b>
31,61	48,75	76,77	12,22	36,54	28,02
28,35	50,90	91,79	16,35	34,55	40,89
26,37	39,16	68,63	12,68	26,48	29,47
27,11	56,85	85,74	16,78	40,07	28,89
24,74	41,81	68,81	13,04	28,77	27,00
19,95	46,51	88,48	13,91	32,60	41,97
20,02	42,03	72,86	13,89	28,14	30,83
26,57	47,83	86,64	15,10	32,74	38,81
26,40	48,25	86,35	16,08	32,17	38,09
24,79	43,19	83,44	14,47	28,72	40,25
21,18	45,18	82,71	14,49	30,69	37,54
18,60	32,24	64,38	9,06	23,18	32,15
22,35	43,51	83,59	13,77	29,75	40,08
22,25	39,40	65,28	13,47	25,93	25,88
19,40	32,02	61,55	9,94	22,09	29,52
10,97	31,74	51,47	13,13	18,62	19,73
19,49	37,60	64,78	14,01	23,59	27,18
13,07	35,82	67,21	10,91	24,91	31,39
20,09	37,36	71,69	11,55	25,81	34,33
16,63	38,54	67,80	11,96	26,58	29,26
19,89	38,57	76,09	12,49	26,08	37,52
17,18	42,03	85,22	11,26	30,77	43,19
16,52	41,67	84,19	11,38	30,30	42,52

35,86	72,40	117,61	26,68	45,72	45,21
37,88	81,18	123,22	21,07	60,11	42,04
33,33	63,84	102,67	17,81	46,03	38,83
32,03	66,29	107,08	20,19	46,10	40,79
29,74	64,49	105,57	20,17	44,31	41,08
21,65	53,04	93,07	15,41	37,63	40,03
34,19	62,18	103,11	19,81	42,37	40,93
32,86	67,98	107,48	18,80	49,19	39,50
31,98	58,07	96,25	18,32	39,75	38,19
36,76	72,32	129,60	28,46	43,86	57,28
28,32	53,29	95,72	17,12	36,17	42,43
18,54	46,93	81,23	14,34	32,59	34,29
31,38	58,42	99,83	19,23	39,19	41,41
32,37	71,57	115,76	20,08	51,49	44,19
30,36	59,43	102,62	16,61	42,82	43,20
28,55	65,41	117,74	20,89	44,52	52,33
29,82	69,96	131,34	26,77	43,19	61,38
14,57	45,46	79,40	13,46	32,00	33,94
24,15	61,42	110,27	21,13	40,29	48,85
23,90	66,01	115,30	18,93	47,08	49,29
21,33	50,12	89,65	14,71	35,41	39,53
21,95	56,56	92,98	14,19	42,37	36,42
21,37	55,07	104,68	15,91	39,17	49,61



32,95	62,52	91,84	20,26	42,26	29,32
35,27	69,78	115,33	21,32	48,47	45,55
33,54	77,13	126,06	25,57	51,55	48,93
34,57	71,44	119,32	24,32	47,12	47,88
32,83	74,49	123,88	25,29	49,20	49,39
23,91	51,88	87,59	16,33	35,55	35,70
35,19	72,65	129,00	26,26	46,39	56,35
33,36	73,45	124,99	22,75	50,70	51,54
33,88	68,74	119,69	21,15	47,59	50,95
32,10	71,05	116,10	24,97	46,08	45,04
30,58	71,38	139,37	23,20	48,18	67,99
24,62	58,25	103,91	16,49	41,76	45,66
31,69	79,15	144,86	25,41	53,74	65,71
31,03	74,79	138,60	23,33	51,46	63,81
29,06	75,56	130,73	22,64	52,92	55,17
36,85	69,21	120,19	19,80	49,40	50,98
26,20	76,39	140,24	23,62	52,77	63,85
21,37	54,87	93,86	15,74	39,13	38,99
24,37	66,40	118,21	21,49	44,92	51,81
23,28	57,51	102,93	18,48	39,03	45,41
23,37	55,75	98,66	17,75	38,00	42,91
23,14	61,40	114,36	17,52	43,88	52,96
21,06	62,81	101,58	17,69	45,12	38,77

### Příloha 18 – Obecný protokol Cell Mito Stress Test



### Příloha 19 – Obecný protokol Glycolytic Rate Assay

