

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Modelové systémy pro studium změn energetického metabolismu
u jaterní steatózy asociované s metabolickou dysfunkcí

2025

Bc. Veronika Tejkalová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Tejkalová**
Osobní číslo: **C23319**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Modelové systémy pro studium změn energetického metabolismu u jaterní steatózy asociované s metabolickou dysfunkcí**
Téma práce anglicky: **Model Systems for Studying Energy Metabolism Changes in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Vypracujte literární rešerši na téma jaterní steatóza asociovaná s metabolickou dysfunkcí (MASLD). Popište stádia nemoci, etiopatogenezi se zaměřením na roli mitochondrií a změny v energetickém metabolismu, diagnostiku. Podrobně popište dostupné *in vivo* a *in vitro* modelové systémy pro studium tohoto onemocnění. Zaměřte se také na roli trombocytů jako možného diagnostického markeru MASLD. Ke zpracování literárního přehledu a diskuse využijte elektronické databáze (*Web of Science, PubMed, Science Direct, NCBI*).

Experimentální část:

V rámci praktické části si osvojte metody izolace myších jaterních mitochondrií, myších jaterních hepatocytů, kultivace vybrané buněčné linie (HepG2) a izolace lidských trombocytů. S využitím vysokoúčinné respirometrie (Oxygraph Oroboros-2k) vyhodnoťte mitochondriální respiraci u vybraných modelových systémů a popište eventuální rozdíly. Popište rovněž změny v mitochondriální respiraci u myšičího *in vivo* nutričního modelu MASLD, event. u *in vitro* modelu (HepG2 + palmitát, oleát). Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavla Staňková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

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

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Modelové systémy pro studium změn energetického metabolismu u jaterní steatózy asociované s metabolickou dysfunkcí jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 9.5.2025

Bc. Veronika Tejkalová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Pavle Staňkové, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Dále děkuji své rodině a manželovi za podporu, trpělivost a povzbuzení, které mi velmi pomohly během celého studia i při psaní této práce.

ANOTACE

Diplomová práce se věnuje porovnání mitochondriální respirace u různých modelových systémů v souvislosti se steatotickým jaterním onemocněním spojeným s metabolickou dysfunkcí (MASLD). Úvodní část se zaměřuje na teoretický přehled o struktuře a funkci mitochondrií a jejich roli v patogenezi MASLD. Hlavní část práce se zabývá experimentálním hodnocením respirace izolovaných mitochondrií, jaterních homogenátů, primárních hepatocytů, buněk HepG2 a lidských trombocytů pomocí vysokoúčinné respirometrie. Práce porovnává rozdíly mezi jednotlivými modely z hlediska jejich využitelnosti pro výzkum mitochondriálních dysfunkcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

hepatocyty, HepG2, steatotické jaterní onemocnění spojené s metabolickou dysfunkcí (MASLD), mitochondrie, mitochondriální respirace, respirometrie, trombocyty

TITLE

Model Systems for Studying Energy Metabolism Changes in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease

ANNOTATION

This diploma thesis focuses on the comparison of mitochondrial respiration in various model systems in the context of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). The introductory section provides a theoretical overview of mitochondrial structure and function, as well as their role in the pathogenesis of MASLD. The main part of the thesis is dedicated to the experimental evaluation of respiration in isolated mitochondria, liver homogenates, primary hepatocytes, HepG2 cells, and human platelets using high-resolution respirometry. The work compares the differences between individual models in terms of their applicability for studying mitochondrial dysfunction.

KEYWORDS

hepatocytes, HepG2, metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD), mitochondria, mitochondrial respiration, respirometry, platelets

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Steatotické jaterní onemocnění spojené s metabolickou dysfunkcí.....	16
1.1.1 Stadia nemoci.....	16
1.1.2 Etiopatogeneze.....	18
1.1.2.1 Lipotoxicita	18
1.2 Mitochondrie a jejich role v patogenezi MASLD	19
1.2.1 Původ mitochondrií.....	19
1.2.2 Struktura.....	20
1.2.3 Energetický metabolismus	21
1.2.3.1 TCA.....	21
1.2.3.2 ETC	22
1.2.3.3 Beta-oxidace.....	24
1.2.3.4 ROS.....	26
1.2.3.5 Apoptóza	28
1.2.4 Mitochondriální změny při progresi MASLD	29
1.3 Diagnostika MASLD	30
1.3.1 Krevní testy	30
1.3.2 Zobrazování	32
1.3.3 Biopsie jater	33
1.3.4 Trombocyty jako možný diagnostický marker MASLD	33
1.3.5 Dostupné <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> modelové systémy pro studium MASLD.....	35
1.3.5.1 <i>In vitro</i>	35
1.3.5.2 <i>In vivo</i>	39

1.4	Hodnocení energetického metabolismu pomocí vysokoúčinné respirometrie .	40
1.4.1	Substrát-uncoupler-inhibitor titrace (SUIT)	42
1.4.1.1	SUIT-RP1.....	44
1.4.1.2	SUIT-RP2.....	45
2.	Cíl práce.....	49
3.	Experimentální část.....	50
3.1	Seznam použitých chemikálií:	50
3.2	Příprava roztoků:.....	50
3.2.1	Zásobní a pracovní roztok EGTA.....	50
3.2.2	Roztoky pro izolaci destiček.....	50
3.2.3	Roztoky pro izolaci mitochondrií	51
3.2.4	Roztoky pro izolaci potkaních hepatocytů.....	51
3.2.5	Roztoky pro kultivaci HepG2	52
3.2.6	Respirační substráty a inhibitory	53
3.3	Laboratorní pomůcky, přístroje a software.....	54
3.4	Biologický materiál:	54
	Potkani	54
	Myši	54
	Trombocyty.....	55
	HepG2	55
3.5	Metodiky.....	56
3.5.1	Kultivace buněk	56
3.5.1.1	Rozmrazování buněk.....	56
3.5.1.2	Výměna média	56
3.5.1.3	Pasážování buněk.....	56
3.5.1.4	Stanovení množství buněk pomocí trypanové modře	57
3.5.2	Izolace mitochondrií z jater potkana/myši.....	57

3.5.2.1	Měření proteinu dle Bradforda.....	58
3.5.3	Izolace krevních destiček.....	58
3.5.4	Myší homogenát	59
3.5.5	Izolace hepatocytů	59
3.5.6	Měření spotřeby kyslíku pomocí vysokoúčinné respirometrie.....	60
3.5.7	Statistické vyhodnocení	61
4.	Výsledky	62
4.1	Izolované mitochondrie z jater myší a potkanů	62
4.2	Myší jaterní homogenáty CD a WD	65
4.3	Potkaní hepatocyty.....	69
4.4	Trombocyty.....	69
4.5	Buňky HepG2	71
4.6	Porovnání mitochondriální respirace mezi jednotlivými modely.....	73
5.	Diskuze	75
	ZÁVĚR	80
	POUŽITÁ LITERATURA	81

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Mitochondriální respirace.	26
Obrázek 2: OROBOROS Oxygraph-2k pro vysokoúčinnou respiometrii.	42
Obrázek 3: Schéma řízení spojky/cesty.	47
Obrázek 4: Výstup z přístroje Oroboros Oxygraph-2k.	48
Obrázek 5: Myší dutina břišní.	55
Graf 1: Mitochondriální respirace mitochondrií izolovaných z myších a potkaních jater.	63
Graf 2: Porovnání respirace mitochondrií izolovaných z myších a potkaních jater. ...	64
Graf 3: Mitochondriální respirace myších homogenátů.	66
Graf 4: Mitochondriální respirace jaterních homogenátů myší krměných kontrolní dietou (CD) a dietou západního stylu (WD).	67
Graf 5: Porovnání mitochondriální respirace myšího jaterního homogenitu a izolovaných myších jaterních mitochondrií.	68
Graf 6: Mitochondriální respirace potkaních hepatocytů a trombocytů.	70
Graf 7: Mitochondriální respirace HepG2 kontrolní skupiny a HepG2 obohacené o mastné kyseliny.	72
Graf 8: Porovnání mitochondriální respirace trombocytů, HepG2 a potkaních hepatocytů.	74

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Acetyl-CoA	acetyl-koenzym A
ADP (D)	adenosindifosfát
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
BMI	body mass index
BSA	bovinní sérový albumin
CD	kontrolní dieta
CoA	koenzym A
CPT	karnitin palmitoyltransferáza
cyt c	cytochrom c
DAG	diacylglycerol
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
ETC	elektronový transportní řetězec
ETF	elektrony transportující flavoprotein
FA	mastné kyseliny
FADH₂	flavinadenindinukleotid
FBS	fetální bovinní sérum
FCCP	karbonylkyanid-4-trifluoromethoxyfenylhydrazon
FCE	účinnost regulace toku kyslíku
FCR	řízení toku kyslíku
FFA	volné mastné kyseliny
FIB-4	index fibrózy 4
FLI	index ztukovatění jater
FT	fibrotest
G	glutamát
GGT	gama-glutamyltransferáza

Gp	glycerolfosfát
GPDH	glycerol-3-fosfátdehydrogenázu
HCC	hepatocelulární karcinom
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HLC	buňky podobné hepatocytům
H₂O₂	peroxid vodíku
HRR	vysokoúčinná respirometrie
IMM	vnitřní mitochondriální membrána
INR	mezinárodní normalizovaný poměr
JNK	c-Jun N-terminalní kináza
LOC	liver-on-chip
LPC	lysophosphatidylcholin
MASH	nealkoholická steatohepatitida
MASLD	steatotické jaterní onemocnění spojené s metabolickou dysfunkcí
MPT	přechodový pór mitochondriální membrány
MRI-PDFF	magnetic Resonance Imaging – Proton Density Fat Fraction
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NAFLD	nealkoholické tukové onemocnění jater
NAS	akóre aktivity NAFLD
NFS	skóre rizika NAFLD
NIT	neinvazivní testy
NPC	neparenchymální buňky
O₂⁻	superoxid
OA	kyselina olejová
Oct	oktanoylkarnitin
OXPPOS	oxidační fosforylace
PA	kyselina palmitová
PEEK	polyetheretherketon
PKC	proteinkináza C
POS	polarografický kyslíkový senzor

Q spoj	koenzym Q
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
Rot	rotenon
ROX	reziduální spotřeba kyslíku
RP	respirační protokol
SAF	skóre steatózy – aktivity – fibrózy
SD	směrodatná odchylka
SDH	sukcinátdehydrogenáza
SOD	superoxiddismutáza
SUIT	substrát – uncoupler – inhibitor titrace
SWE	shear wave elastografie
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin
TAG	triacylglycerol
TGF-β	transformující růstový faktor beta
TNF-α	tumor nekrotizující faktor alfa
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
WD	dieta západního stylu

ÚVOD

Játra jsou hlavním metabolickým orgánem s rozsáhlým spektrem funkcí. Hrají klíčovou roli v regulaci metabolismu všech živin, podílejí se na detoxikaci endogenních i exogenních látek, jsou důležitá pro imunitní odpovědi, hemostázu, syntetizují většinu plazmatických proteinů a vykazují exokrinní i endokrinní funkce. Jejich unikátní struktura je přizpůsobena plnění těchto úloh.

Játra jsou zásobena krví ze dvou zdrojů: portální žíla přivádí krev bohatou na živiny a další látky vstřebané ze střeva, zatímco jaterní tepna přináší kyslíkem nasycenou krev z aorty. Anatomicky jsou rozdělena na laloky a segmenty. V játrech se nachází několik typů buněk hepatocyty tvořící hlavní parenchym, Kupfferovy buňky, hvězdčovitě (Itoovy) buňky, sinusoidální endotelové buňky a cholangiocyty, z nichž každá populace plní specifické úkoly v udržování jaterní homeostázy.

Funkční jednotkou jater je jaterní acinus – oblast, v jejímž centru se nachází tzv. portální triáda tvořená interlobulární portální žílou, jaterní tepnou a žlučovodem. Krev z obou cévních zdrojů protéká sinusoidami směrem k centrální žíle, zatímco žluč produkovaná hepatocyty teče opačným směrem do žlučových kanálků. Toto uspořádání umožňuje metabolickou zonaci hepatocytů a diferenciaci jejich funkcí v různých částech acinu.

Játra mají zásadní úlohu v metabolismu sacharidů, lipidů a proteinů – včetně glukoneogeneze, β -oxidace mastných kyselin, syntézy lipoproteinů a metabolismu amoniaku. Mitochondrie, jakožto orgány zajišťující produkci adenosintrifosfátu (ATP) a řízení klíčových metabolických drah, hrají v tomto procesu zásadní roli. Jejich dysfunkce může vést k poruše energetické homeostázy, vzniku oxidačního stresu a aktivaci zánětlivých a fibrotických procesů.

Jaterní steatóza asociovaná s metabolickou dysfunkcí (MASLD, dříve známá jako nealkoholová tuková choroba jater – NAFLD) je v současnosti nejčastějším chronickým onemocněním jater. Onemocnění je charakterizováno nadměrným ukládáním tuku v hepatocytech, často v souvislosti s metabolickým syndromem. Vzhledem k vysoké prevalenci a potenciálu progresu do nealkoholové steatohepatitidy (MASH), fibrózy a cirhózy představuje MASLD závažný zdravotní problém. Mitochondriální dysfunkce je jedním z klíčových patogenetických mechanismů tohoto onemocnění, což otevírá nové možnosti cílené terapie.

K hlubšímu pochopení patogeneze MASLD a role mitochondrií je nezbytné využití kombinace *in vitro* (buněčné a tkáňové modely) a *in vivo* (zvířecí modely) studií. Tyto modely umožňují zkoumat specifické mechanismy na úrovni buněk i celého organismu a představují

zásadní nástroj pro testování nových terapeutických přístupů. Vysokoučinná respirometrie (High-resolution respirometry, HRR) je moderní výzkumná metoda umožňující měření mitochondriální respirace v různých typech mitochondriálních preparátů i živých buňkách pomocí bioenergetického analyzátoru Oroboros O2k. Tato metoda poskytuje základ pro detailní analýzu oxidační fosforylace (OXPHOS).

Cílem této práce bylo popsat a porovnat mitochondriální respiraci u různých modelových systémů – izolovaných mitochondrií, hepatocytů, buněčné linie HepG2 a lidských trombocytů – s využitím vysokoúčinné respirometrie. Změřit a vyhodnotit změny mitochondriální respirace jater u myšího nutričního modelu MASLD. Zavést metodiku izolaci trombocytů pro respirometrické měření.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Steatotické jaterní onemocnění spojené s metabolickou dysfunkcí

MASLD, dříve známé jako nealkoholické tukové onemocnění jater, patří celosvětově mezi nejrozšířenější chronické nemoci jater. Je hlavní příčinou morbidity a mortality spojené s onemocněním jater (Younossi et al., 2016). Tento stav bývá spojen s obezitou a k jeho rozvoji významnou měrou přispěly faktory, jako jsou změny životního stylu, nadměrný příjem potravy a nízká fyzická aktivita (Li et al., 2024). MASLD navíc úzce souvisí s metabolickým syndromem, jehož klíčovými rysy jsou inzulinová rezistence, obezita, diabetes mellitus 2. typu a dyslipidémie (Younossi et al., 2016).

1.1.1 Stadia nemoci

MASLD je metabolické poškození jater charakterizované nadměrným ukládáním triacylglycerolů v hepatocytech. Jedná se o zastřešující termín pro spektrum stavů od jednoduché steatózy přes MASH až po pokročilé formy, jako je fibróza, cirhóza nebo hepatocelulární karcinom (HCC). Většina pacientů zůstává asymptomatická, což ztěžuje včasnou diagnostiku a zvyšuje riziko pokročilých komplikací (Friedman et al., 2018; Li et al., 2024).

Klinicko-patologická definice stanovuje diagnózu MASLD v případě, že dochází k akumulaci tuku ve více než 5 % hepatocytů, a to při vyloučení sekundárních příčin jaterní steatózy – zejména nadměrného příjmu alkoholu (nad 30 g/den u mužů, nad 20 g/den u žen) či užívání léčiv známých svým steatogenním účinkem (např. kortikosteroidy, některá cytostatika a antiretrovirotika). Steatóza je charakterizována nadměrným ukládáním lipidů v jaterní tkáni, které může být doprovázeno pouze minimálním portálním či lobulárním zánětem, bez známek významnějšího poškození hepatocytů nebo fibrotizace. (Mazzolini, 2020).

Steatóza, označovaná také jako prostá steatóza nebo jednoduchá steatóza, je prvním stadiem nemoci. Vyznačuje se nadměrnou akumulací triacylglycerolů (TAG) v hepatocytech bez přítomnosti zánětlivých změn nebo fibrotických procesů. TAG se akumulují v důsledku několika specifických mechanismů, mezi které patří zvýšený příjem mastných kyselin, *de novo* lipogeneze stimulovaná inzulinovou rezistencí a snížená β -oxidace mastných kyselin v mitochondriích. Změnou životního stylu, a to především úpravou stravovacích návyků a zvýšením fyzické aktivity, je ještě možné zvrátit průběh nemoci. (Tilg et al., 2010; Friedman

et al., 2018). Jedná se tedy o reverzibilní fázi za předpokladu, že je eliminována primární příčina, kterou je bezesporu inzulinová rezistence nebo nadměrný kalorický příjem.

MASH představuje pokročilejší stadium MASLD, při kterém dochází k zánětu, balonování hepatocytů a progresi fibrózy. Faktorem odlišujícím MASH od jednoduché steatózy je smrt hepatocytů indukovaná lipotoxicitou. Histologické projevy MASH jsou do značné míry determinovány regenerační schopností jater nahradit usmrcené hepatocyty. Nejprve jsou aktivovány rezidentní stromální buňky a rekrutují se buňky odvozené z kostní dřeně. Tyto buňky pak interagují, aby odstranily mrtvé zbytky a remodelovaly jaterní mikroprostředí, tím podpořily růst a diferenciaci buněk, které nakonec nahradí odumřelé hepatocyty. Hojení poškození tedy vyžaduje zánět, remodelaci jaterní vaskulatury a matrix a růst jaterních progenitorů. MASH je tedy důsledek kombinace poškození/smrti hepatocytů a následného hojícího procesu. Obecně platí, že intenzita hojící reakce odpovídá rozsahu úmrtí hepatocytů. Protože lipotoxicita je hlavní příčinou smrti hepatocytů ve ztučnělých játrech a umírající hepatocyty iniciují MASH, intervence k zabránění vzniku nebo léčení MASH by měly být cílené na potlačení lipotoxicity. (Suzuki et al., 2017).

Fibróza je dalším, stadiem nemoci. Opakované záněty, regenerace a reparace jaterního parenchymu jsou spojeny s ukládáním extracelulární matrix, jehož součástí je kolagen, laminin a další proteiny. Postupně tak dochází k přestavbě jaterní architektury. Za hlavní mechanismus vedoucí k ukládání extracelulární matrix lze označit aktivaci jaterních hvězdicových buněk, které se v reakci na zánětlivé cytokiny, jako je tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) a transformující růstový faktor beta (TGF- β), mění na myofibroblasty. Tyto buňky produkují kolagen typu I a III, což přispívá k fibróze. V pokročilých stádiích fibrózy se začínají objevovat problémy s narušením kapilárního krevního toku a zvýšením portálního tlaku, což může vést k progresi onemocnění směrem k cirhóze. Reverzibilita fibrózy závisí na včasném rozpoznání a eliminaci vyvolávajících faktorů. (Friedman et al., 2018; Tilg et al., 2010).

Cirhóza je posledním stadiem nemoci. Vzniká po dlouhotrvajícím zánětu, vlivem kterého je nahrazen zdravý jaterní parenchym fibrotickou tkání a regeneračními uzly, což vede k portální hypertenzi. Onemocnění přechází z asymptomatické fáze (kompenzovaná cirhóza) do fáze symptomatické (dekompenzovaná cirhóza), jejíž komplikace často vedou k hospitalizaci, zhoršení kvality života a vysoké mortalitě. Progresivní portální hypertenze, systémový zánět a selhání jater ovlivňují prognózu onemocnění. Dlouhodobá cirhóza také významně zvyšuje riziko vzniku hepatocelulárního karcinomu. (Ginès, 2021)

1.1.2 Etiopatogeneze

MASLD představuje důsledek nezdravého životního stylu, při němž nadměrný kalorický příjem v kombinaci s nízkou fyzickou aktivitou vede k narušení metabolické homeostázy v játrech. Následně proto dochází k přetížení jater lipidy a k rozvoji lipotoxicity, která přispívá k rozvoji zánětu, oxidačního stresu a fibrózy. Přebytková energie se ukládá ve formě TAG v podkožní a viscerální tukové tkáni, avšak schopnost tukové tkáně tyto zásoby pojmout je limitována. Po překročení této kapacity, dochází k vzniku zánětu a inzulínové rezistenci v tukové tkáni. To má vliv na produkci adipokinů a zánětlivých cytokinů. Tato nerovnováha vede ke vzniku mírného chronického zánětu. Pokud se tuk začne hromadit mimo tukovou tkáň (např. ve svalech nebo játrech) zhoršuje to inzulínovou rezistenci i v těchto orgánech, což má za následek nerovnováhu v homeostáze metabolismu glukózy a lipidů a játra jsou stále více zatěžována různými substráty. Volné mastné kyseliny jsou metabolizovány prostřednictvím β -oxidací v mitochondriích, ale v důsledku přetížení jsou mitochondrie zahlceny, což vede k rozptážení oxidační fosforylace a ke zvýšení produkce ROS. Kombinací dysfunkční tukové tkáně a endotoxinů ze střeva je v játrech indukováno prozánětlivé a apoptické prostředí, což vede k přechodu od prosté steatózy k MASH (Heyens, 2021).

Mezi další patologické změny podporující vznik jaterní fibrózy, v horším případě cirhózy, patří zvýšená syntéza TGF- β v Kupfferových buňkách, aktivace jaterních hvězdicových buněk a zvýšený vývoj myofibroblastů. Tyto změny jsou indukované ROS a peroxidací lipidů (Ramanathan, 2023).

1.1.2.1 Lipotoxicita

Lipotoxicita představuje souhrn škodlivých buněčných a metabolických účinků způsobených nadměrnou akumulací lipidů a jejich toxických meziproductů v netukových tkáních. V játrech, podobně jako v jiných orgánech, dochází k akumulaci nejen neutrálních TAG, které jsou relativně neškodné, ale především bioaktivních lipidových meziproductů, jako jsou diacylglyceroly (DAG) a ceramidy, jež mají zásadní roli v rozvoji inzulínové rezistence a buněčné dysfunkce.

DAG aktivují proteinkinázu C (PKC), zejména izoformy PKC ϵ a PKC θ , které inhibují inzulínové signální dráhy, což snižuje odpověď na inzulín a přispívá k rozvoji inzulínové rezistence v hepatocytech a dalších tkáních. Ceramidy, vznikající de novo z mastných kyselin nebo jako produkty sfingolipidového metabolismu, inhibují klíčové komponenty inzulínové signalizace, jako je Akt (PKB), a současně podporují apoptózu a oxidační stres.

Další toxické lipidy zahrnují acyl – koenzym A (acyl-CoA), lysophosphatidylcholin (LPC) a další intermediáty syntézy či odbourávání TAG, které narušují buněčné membrány, zvyšují tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) a spouštějí stres endoplazmatického retikula (ER). Tím dochází k aktivaci zánětlivých signálních drah, jako je c-Jun N-terminalní kináza (JNK), a k narušení autofagie a mitochondriálních funkcí.

Mitochondriální dysfunkce pak dále zhoršuje oxidaci mastných kyselin, čímž vzniká bludný kruh akumulace lipidů, zvýšeného oxidačního stresu, poškození organel a apoptózy hepatocytů. Tyto procesy hrají klíčovou roli v progresi prosté steatózy do MASH a následné fibrózy (Liangyou, 2014).

1.2 Mitochondrie a jejich role v patogenezi MASLD

Mitochondrie tvoří přibližně 18 % objemu hepatocytu. Kromě produkce ATP prostřednictvím oxidační fosforylace se mitochondrie podílejí i na buněčné signalizaci především prostřednictvím regulace kalciového homeostázy a generování ROS, které slouží jako signální molekuly v různých fyziologických i patologických procesech. Mitochondriální dysfunkce hraje zásadní roli v rozvoji a progresi MASLD. Postupně dochází ke snížení kapacity β -oxidace, poruchám v elektronovém transportním řetězci (ETC), poklesu hladin ATP a nadměrné tvorbě ROS. Výsledkem je oxidační stres, který poškozuje buněčné komponenty a vede k strukturálním i funkčním změnám mitochondrií. Oxidační poškození mitochondriálních proteinů a lipidů – zejména lipidů vnitřní mitochondriální membrány narušuje integritu a funkci mitochondrií. Tyto změny dále zhoršují oxidativní stres a podporují akumulaci lipidů v hepatocytech, zánětlivé procesy a fibrogenézi. Mitochondrie tak nejen ztrácejí svou ochrannou metabolickou roli, ale aktivně přispívají k progresi MASLD z prosté steatózy do pokročilých forem onemocnění (Ramanathan, 2023).

1.2.1 Původ mitochondrií

Společným znakem celé řady teorií o původu mitochondrií je klíčová role bakterií při jejich vzniku. Předpokládá se, že došlo ke splynutí α -proteobakterie a primitivní eukaryotické buňky. Následným vývojem došlo k přeměně ze symbionta na organelu. Důkazem teorií založených na bakteriích je fakt, že si mitochondrie zachovaly řadu bakteriálních vlastností, jako je například vznik nových mitochondrií pomocí dělení, přítomnost vlastního aparátu pro syntézu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a proteinů, podobnost mitochondriální DNA (mtDNA) a ribosomální ribonukleové kyseliny (RNA) s těmi bakteriálními. (Musilová, 2023).

1.2.2 Struktura

Mitochondrie jsou dynamické buněčné organely, které se přizpůsobují podmínkám prostředí nejen svým tvarem, ale i množstvím. Mohou mít různou délku, ale jejich průměr bývá relativně konstantní (0,5 – 1,0 μm).

Jak je uvedeno v původu mitochondrií, vznikly splynutím dvou organismů, o čemž svědčí i jejich struktura. Mají dvojitou membránu, která odděluje mitochondriální matrix od cytosolu buňky. Obě membrány hrají důležitou roli v mitochondriálních dějích. Tyto membrány se od sebe liší tvarem, složením i fyzikálně – chemickými vlastnosti. (Musilová, 2023).

Vnitřní membrána tvoří hranici mezi matrix a mezimembránovým prostorem. Skládá se do četných záhybů nazývaných kristy, které zvětšují povrch vnitřní membrány. Kristy následně tvoří cisterny nebo váčky připojující se k tzv. vnitřní vazebné membráně pomocí úzkých tubulárních spojů. V této membráně je vysoké množství kardiolipinu a nižší množství cholesterolu. Kardiolipin je unikátní fosfolipid, který hraje zásadní roli ve funkci a dynamice mitochondrií. Zároveň jsou v této membráně proteiny plnící 3 hlavní funkce. První funkcí je transport elektronů a čerpání protonů související s dýchacím řetězcem, jehož enzymové komplexy jsou lokalizovány ve vnitřní membráně. Další skupinou jsou transportní proteiny, které umožňují pohyb metabolitů mezi matrix a mezimembránovým prostorem. Tyto transportéry jsou důležité, jelikož vnitřní membrána není volně propustnou pro ionty a většinu malých molekul. Volně přes ní prochází pouze O_2 , CO_2 a lipofilní látky. Třetí hlavní funkci plní ATP-syntáza, která produkuje ATP do matrix.

Vnější membrána je hranicí mezi mezimembránovým prostorem a cytolem. Tato membrána je bohatá na proteiny, které mají různé složení a funkce (např. enzymy, transportní protein atd.). Důležitou součástí této membrány jsou integrální membránové proteiny nazývané poriny, které prostupují dvojvrstvou fosfolipidů. Jedná se o primární transportní proteiny, které přepravují metabolity, ionty a nukleotidy mezi cytolem a mezimembránovým prostorem. Tyto kanály zajišťují propustnost membrány pro všechny molekuly až do velikosti 5000 Daltonů, včetně malých proteinů. Ačkoliv je tato membrána propustná pro většinu molekul, její narušení vede k úniku faktorů, které mohou vyvolat apoptózu (Protasoni, 2021).

Mezimembránový prostor je mitochondriální oddíl, který má podobné chemické složení jako cytosol, a to díky propustnosti vnější mitochondriální membrány. V mezimembránovém prostoru mitochondrií se nachází několik enzymů, především ty, které se podílejí na přenosu elektronů a metabolických reakcích.

Dalším mitochondriálním oddílem je matrix, která vyplňuje vnitřní část mitochondrie a je ohraničená vnitřní mitochondriální membránou. Matrix je bohatá na proteiny, obsahuje přibližně 70 % mitochondriálních proteinů. Obsahuje také mitochondriální DNA, transferová RNA (tRNA), ribozomy, rRNA a mnoho dalších enzymů zapojených v různých metabolických drahách. (Protasoni, 2021).

1.2.3 Energetický metabolismus

Mitochondriální respirace představuje klíčový proces, který zajišťuje dostatečnou produkci ATP potřebnou pro buněčnou homeostázu a přežití. Hlavní funkcí mitochondrií je tedy tvorba ATP, která vzniká díky propojení cyklu trikarboxylových kyselin (TCA), ETC a OXPHOS (**Obrázek 1**). Oxidace palivových substrátů probíhá uvnitř matrix mitochondrií prostřednictvím TCA, β -oxidací a OXPHOS. TCA a β – oxidace vytvoří redukované molekuly, jako například nikotinamidadeninukleotid (NADH) a flavinadeninukleotid (FADH_2) a ty následně předávají své elektrony do ETC, který použije molární kyslík jako konečný akceptor elektronů. Při tomto procesu dochází k přenosu protonů z matrix do mezimembránového prostoru a k následnému vytvoření elektrochemického gradientu protonů. Následný pohyb protonů zpět do matrix přes enzym ATP syntázu poskytuje energii pro reakci adenosindifosfát (ADP) s anorganickým fosfátem za vzniku molekuly ATP (Das, 2006).

1.2.3.1 TCA

TCA cyklus, známý také jako cyklus kyseliny citronové nebo Krebsův cyklus, je řada chemických reakcí v uzavřené smyčce, která tvoří metabolický motor v aerobních buňkách. TCA cyklus představuje epicentrum buněčného metabolismu, čímž slouží k přeměně energie prostřednictvím oxidace acetyl-koenzymu A (Acetyl-CoA) odvozeného ze sacharidů, mastných kyselin a bílkovin. Reakce TCA cyklu jsou katalyzovány osmi enzymy. Tyto enzymy jsou důležité pro generování meziproductů cyklu TCA – citrátu, iso-citrátu, α -ketoglutarátu, sukcinátu, fumarátu, malátu a oxalacetátu. Cyklus TCA začíná kondenzací acetyl-CoA s oxaloacetátem za vzniku molekuly citrátu. Ve druhém kroku se citrát přemění na svůj izomer, isocitrát. Cyklus pokračuje dvěma oxidačními dekarboxylacemi, při nichž se isocitrát přeměňuje na α -ketoglutarát a následně na sukcinyl-CoA za uvolnění dvou molekul CO_2 a vzniku dvou molekul NADH. Dále se sukcinyl-CoA přeměňuje na sukcinát. Tato reakce je spojena s tvorbou guanosintrifosfátu, který může být následně přeměněn na ATP. Sukcinát se oxiduje za vzniku fumarátu. Při této reakci jsou dva atomy vodíku přeneseny na FAD, čímž vzniká FADH_2 . Důležité je, že enzym, který tento krok katalyzuje, sukcinátdehydrogenáza

(SDH), je také součástí ETC. Poté se fumarát přemění na malát a dále na oxalacetát, který se spojí s další molekulou acetyl-CoA a pokračují v novém TCA cyklu (Martínez-Reyes et al., 2020).

V eukaryotickém systému se TCA cyklus vyskytuje v matrix mitochondrií, která je obklopena mitochondriálními membránami nepropustnými pro polární molekuly. Membrána odděluje reakce transformující energii od reakcí spotřebovávajících energii a zároveň zadržuje meziprodukty cyklu TCA uvnitř mitochondrií. Meziprodukty cyklu TCA zastávají různé metabolické funkce, včetně regulace sekrece inzulínu a syntézy mastných kyselin v mitochondriích. Mohou být také transportovány z mitochondrií různými kyvadlovými mechanismy a zapojeny do řady biologických procesů (Choi et al., 2021).

1.2.3.2 ETC

Mitochondriální elektronový transportní řetězec zahrnuje transmembránové proteinové komplexy I-IV, které jsou zabudované ve vnitřní mitochondriální membráně. Aby komplexy správně fungovaly musí být sestaveny do specificky konfigurovaného superkomplexu (Zhao et al., 2019). Další významnou složkou tohoto řetězce jsou elektronové transportéry ubichinon a cytochrom c (cyt c). Dochází zde k toku elektronů přes dvě transportní dráhy. První dráha zahrnuje komplex I, III, IV a jako substrát zde slouží NADH, druhá dráha obsahuje komplex II, III, IV a substrátem je zde FADH₂. Tento proces je spojen s tvorbou protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně. V gradientu dochází k akumulaci energie, která je využívána komplexem V k tvorbě ATP. Superkoplex (respirazom) spolu s komplexem V (ATP syntáza) jsou základem produkce ATP během oxidativní fosforylace (Zhao et al., 2019).

V ETC dochází k přenosu elektronů z NADH, který je produkován v mitochondriální matrix v TCA cyklu, na transmembránové komplexy ukotvené ve vnitřní mitochondriální membráně (IMM), které vytvářejí transmembránový elektrochemický gradient čerpáním protonů přes membránu. Zpětný tok protonů do matrix je možný díky protonovému kanálu v ATP syntáze (komplexu V) což vede ke konformačním změnám v nukleotidových vazebných kapsách a k tvorbě a uvolnění ATP (Sousa et al., 2018).

Komplex I (NADH dehydrogenáza) hraje důležitou roli v buněčném metabolismu. Jedná se o vstupní bod elektronů do respiračního řetězce, který získává elektrony z molekul NADH. Během každého katalytického cyklu se NADH oxiduje na NAD⁺, přičemž elektrony putují přes řadu Fe-S klastrů až na ubichinon (koenzym Q), který je redukován na ubichinol. Jak se elektrony pohybují řadou Fe-S klastrů, uvolněná energie je využita ke změně konformace komplexu a následnému transportu čtyř protonů přes vnitřní mitochondriální membránu

(Chaban et al., 2014; Nolfi-Donagan et al., 2020; Sousa et al., 2018). Komplex I je enzym ve tvaru písmene L, hydrofobní rameno je začleněno do vnitřní mitochondriální membrány a hydrofilní rameno vyčnívá do mitochondriální matrix. Hydrofilní rameno je tvořeno dehydrogenázovou doménou, která obsahuje kofaktory a podjednotky zapojené do oxidace NADH a přenosu elektronů na ubichinon.

Komplex II (sukcinát dehydrogenáza) je jediným komplexem ETC, který nepumpuje protony přes vnitřní mitochondriální membránu. Jako jediný komplex je také součástí TCA cyklu, kde katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát. Spolu s tím je komplex II zapojen do redukce ubichinonu na ubichinol, a proto tento komplex poskytuje přímé spojení mezi TCA cyklem a ETC. Elektrony ze sukcinátu generují FADH_2 , který zůstává připevněn ke komplexu a přenáší dva elektrony do řady Fe-S klastrů, které je následně přenášejí na ubichinon (Sousa et al., 2018).

Existují i jiné cesty, které přenášejí elektrony na koenzym Q. Například komplex glycerofosfátdehydrogenázy a elektrony transportující flavoprotein (ETF) přenášejí elektrony na koenzym Q (Q spoj) z cytosolického NADH, resp. Při oxidaci mastných kyselin (Banerjee et al., 2022).

Komplex III (cytochrom c oxidoreduktáza) zajišťuje oxidaci ubichinolu zpět na ubichinon, uvolněné elektrony jsou předány do mobilního elektronového nosiče cyt c, který je transportuje na komplex IV. Na každý elektron dochází k přečerpání 2 protonů do mezimembránového prostoru (Chaban et al., 2014; Nolfi-Donagan et al., 2020).

Komplex IV (cytochrom c oxidáza) přenáší elektrony z cyt c na molekulární kyslík. Po navázání elektronů na kyslík vzniká voda. Souběžně s každým přenosem elektronů dochází k absorpci dvou protonů, celkem je tedy do mezimembránového prostoru pumpována pouze polovina protonů odebraných z matrix (celkem je odebráno 8 protonů, ze kterých se polovina používá pro tvorbu vody a další čtyři jsou přečerpány přes membránu) (Sousa et al., 2018).

ATP syntáza (Komplex V) je složena ze dvou podjednotek F_0F_1 , které se skládají z dalších subjednotek. ATP syntáza funguje jako rotační motor, který vytváří ATP pomocí potenciální energie z elektrochemického gradientu generovaného ETC. Doména F_1 je ve vodě nerozpustná a nachází se v mitochondriální matrix. Některé její podjednotky tvoří centrální stopku ATP syntázy. Doména F_0 je lokalizována ve vnitřní mitochondriální membráně a funguje jako protonový kanál, protony přes ni procházejí z mezimembránového prostoru zpět do matrix. F_0 přenáší energii z elektrochemického gradientu protonů do F_1 , na které dojde ke změně konformace a ADP se fosforyluje na ATP (Fillingame, 2003; Walker 2013).

1.2.3.3 Beta-oxidace

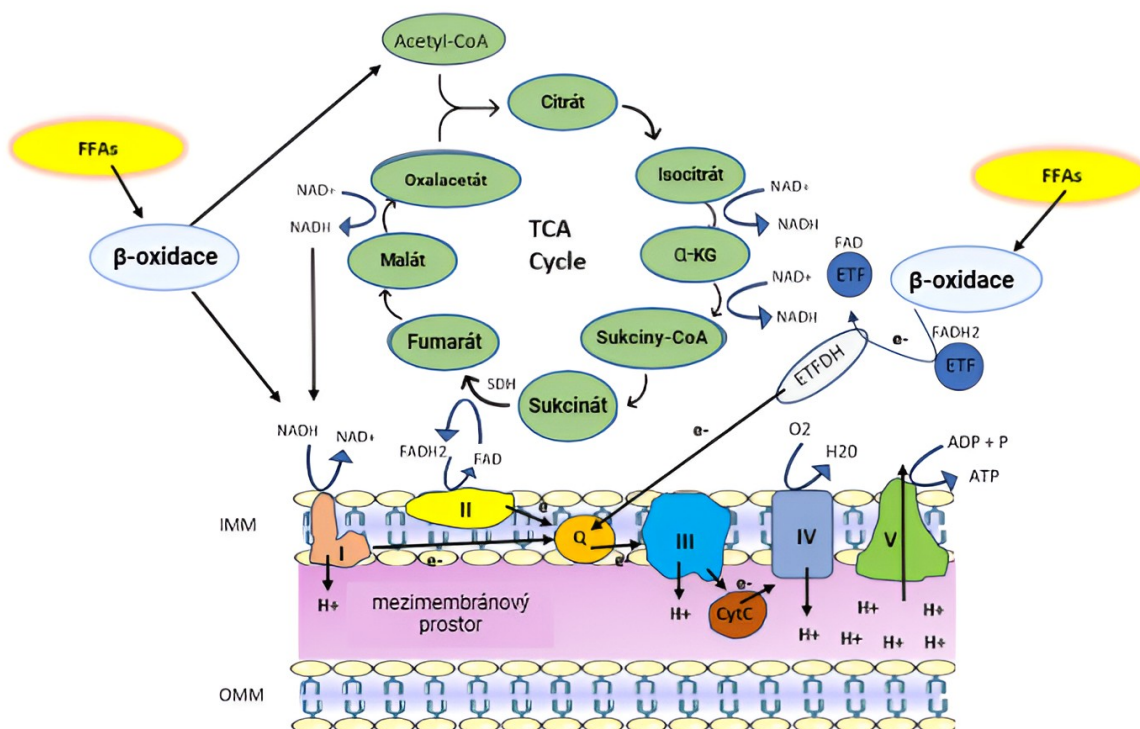
Triacylglyceroly jsou nejprve hydrolyzovány působením lipoproteinové lipázy vázané na endotel. Než dojde k β -oxidaci, musí být volné mastné kyseliny (FFA) s 12 nebo více uhlíky transportovány přes plazmatickou membránu hepatocytů do cytosolu pomocí transportérů (FABPmp, FAT/CD36, FATP a dalších) (Alves-Bezzerra et al., 2017). Transportní proteiny jsou integrální transmembránové proteiny, které mají aktivitu acyl-CoA syntetázy, mastné kyseliny se tak po přenosu přes plazmatickou membránu rychle přeměňují na acyl-CoA. Ovšem mitochondriální membrána je pro acyl-CoA nepropustná, proto pro svůj import do mitochondrií využívají acyl-CoA karnitinový čuněk. Acyl-CoA se přenáší na hydroxylovou skupinu karnitinů pomocí karnitin palmitoyltransferázy 1 (CPT1), která se nachází na cytosolové straně vnější mitochondriální membrány. Jakmile acylkarnitin vstoupí do mitochondrií CPT2, umístěná na vnitřní straně vnitřní mitochondriální membrány, znovu přemění acylkarnitiny na jejich estery CoA, které pak mohou podléhat mitochondriální β -oxidaci.

Jakmile se mastné kyseliny dostanou do mitochondriální matrix ve formě acyl-CoA, dochází k β -oxidaci, při níž se v každém cyklu štěpí dva uhlíky za vzniku acetyl-CoA, FADH₂ a NADH. Reakční sekvence zahrnuje čtyři důležité chemické reakce: dehydrogenaci, hydrataci, dehydrogenaci, thiolýzu. Tyto reakce jsou katalyzovány následujícími enzymy: acyl-CoA dehydrogenáza, enoyl-CoA hydratáza, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza a β -ketothioláza. Výsledný acyl-CoA vstupuje do dalšího cyklu β -oxidace, vzniklý acetyl-CoA vstupuje do TCA cyklu k další oxidaci, zatímco FADH₂ a NADH vstupují do ETC, přímo na koenzym Q, kde jsou rovněž dále oxidovány (Houten et al., 2010). Při přenosu elektronů přes vnitřní mitochondriální membránu jsou pumpovány protony generujícími membránový potenciál a protonmotivní sílu, která se následně používá k řízení syntézy ATP. Ne všechny elektrony jsou využity k úplné redukci O₂ na vodu a unikají z komplexů ETC za vzniku superoxidu, který má krátký poločas rozpadu a je rychle přeměněn superoxidodismutázou (SOD) na peroxid vodíku. Ten je následně detoxikován na vodu za pomoci mitochondriální glutathion peroxidázy a thioredoxin reduktázy ((Zhang et al., 2023).

Rychlost celého procesu β -oxidace je řízena intracelulární koncentrací FFA, která je přímo závislá na jejich koncentraci v krvi (Alves-Bezzerra et al., 2017).

Zvýšený příliv mastných kyselin u MASLD může vyvolat přetíženou β -oxidaci, která bez doprovodné upregulace složek ETC povede k většímu úniku elektronů nejen z komplexu I a III (Zhang et al., 2023). K tomuto úniku přispívá i interakce volných mastných kyselin se složkami ETC, které zpomalují rychlost přenosu elektronů a zvyšují tvorbu superoxidu. Zároveň jejich amfifilní povaha umožňuje začlenění do vnitřní mitochondriální membrány,

což mění fluiditu membrány a usnadňuje únik elektronů (Shi et al., 2021; Zhang et al., 2023). Tento stav vede k nadprodukci ROS. Zároveň klesá koncentrace antioxidantů jako jsou glutathion peroxidázy a thioredoxin reduktázy. Takto způsobená nerovnováha vede k oxidačnímu stresu a následnému poškození mtDNA. mtDNA je zvláště náchylná k oxidačnímu poškození, protože se nachází v matrix mitochondrií poblíž ETC, kde se vytváří většina ROS. Navíc tento typ DNA postrádá ochranné histony a má slabší opravné systémy, takže je náchylnější k poškození. To může mít za následek defekty ETC a narušenou biogenezi, což usnadňuje progresi MASLD. Dalším problémem je, že ROS zapříčiňují přímou oxidaci mitochondriálních proteinů a lipidů, což je spouštěčem pro mitochondriální dysfunkci (Zhang et al., 2023).



Obrázek 1: Mitochondriální respirace.

Vstup FFA do mitochondrií aktivuje β -oxidaci, při níž vznikají molekuly acetyl-CoA, NADH a FADH₂. Acetyl-CoA vzniklý β -oxidací vstupuje do TCA cyklu k další oxidaci, zatímco FADH₂ a NADH vstupují do ETC, kde jsou rovněž dále oxidovány. Reakce TCA cyklu provádí osm enzymů, které oxidují acetyl-CoA na oxid uhličitý a vodu a produkují redukční ekvivalenty přeměnou tří molekul NAD⁺ na tři NADH, jedné molekuly FAD⁺ na jeden FADH₂ a jedné molekuly GDP a anorganického fosfátu na jeden GTP (tato reakce není ve schématu zahrnuta). ETC je místem přenosu elektronů a oxidativní fosforylace, které jsou zodpovědné za tvorbu buněčného ATP. ETC se nachází v IMM a skládá se z více subjednotkových enzymových komplexů (komplexy I-IV) a mobilních nosičů elektronů (ubichinon a cyt c). Komplex I přijímá elektrony z NADH, komplex II ze sukcinátu (FADH₂) a elektrony jsou přenášeny do Q spoje. Spoj Q rovněž přijímá elektrony z ETFDH. Ze spoje Q jsou elektrony přeneseny do komplexu III, poté do cyt c a následně do komplexu IV, který je spojí s O₂ za vzniku H₂O. Komplexy I, III a IV přečerpávají protony přes IMM a vytvářejí tak protonový gradient, který pohání syntézu ATP prostřednictvím komplexu IV.

(α -KG = α -ketoglutarát; cyt c = cytochrom c; ETC = elektronový transportní řetězec; ETFDH = gen pro flavoprotein dehydrogenázu; ETF = flavoproteiny přenášející elektrony; FFA = volné mastné kyseliny; IMM = vnitřní mitochondriální membrána; OMM = vnější mitochondriální membrána; Q = ubichinon; TCA = cyklus kyseliny trikarboxylové).

Zdroj: upravená předloha (Maseko, 2024) od BioRender.com, 2025

1.2.3.4 ROS

Mitochondrie jsou primárními zdroji reaktivních forem kyslíku. Patří sem superoxid (O₂⁻) a peroxid vodíku (H₂O₂). Jejich neustálá tvorba je součástí normálního aerobního metabolismu a zastávají řadu funkcí. Například slouží jako signální molekuly v metabolismu, genové transkripci a translaci, buněčného cyklu a diferenciaci. Nadměrné množství ROS

je odstraňováno antioxidačním systémem. Nerovnováha mezi tímto systémem a produkcí ROS je pro buňky škodlivá. (Shi et al., 2021)

Produkce ROS v mitochondriích je komplexní, protože hlavní producenty ROS ovlivňuje řada faktorů: typy substrátů a jejich koncentrace, koncentrace a redoxní stav producentů ROS, polarita vnitřní mitochondriální membrány, koncentrace kyslíku, typy buněk a systémy používané k měření produkce ROS. Za hlavní zdroje ROS jsou považovány komplex I (flavinové místo a ubichinonové redukční místo), komplex III (ubichinonové oxidační místo) a za jistých okolností komplex II (flavinové vazebné místo) (Brand, 2010).

Komplex I generuje ROS dvěma mechanismy, a to přímým a zpětným přenosem elektronů. Přímý přenos elektronů je závislý na vysokém poměru NADH/NAD^+ , což vede ke zvýšenému přenosu elektronů z NADH na flavinmononukleotid spojeného s únikem elektronů na molekulární kyslík. Faktory, které mohou ovlivnit poměr NADH/NAD^+ v intaktních mitochondriích, a tedy přímo ovlivňovat produkci superoxidu jsou: zvýšený přísun substrátů z potravy, inhibice dýchacího řetězce způsobená poškozením, mutace, ztráta cyt c a nízká spotřeba ATP. Ke zpětnému přenosu elektronů dochází v mitochondriích s vysokým přísunem elektronů na koenzym Q (dodávaných sukcinátem, alfa-glycerolfosfátem nebo ETF za přítomnosti vysokého protonového gradientu přes IMM (Murphy, 2009). Jednoduchým vysvětlením tohoto typu vzniku ROS by mohlo být, že vyšší protonový gradient a koncentrace elektronů v Q spojí nutí elektrony vracet se přes komplex I na flavinové místo, kde elektrony unikají a reagují s molekulárním kyslíkem (Mailloux, 2020).

Komplex III má dvě důležitá vazebná místa Q_o a Q_i , která přijímají elektrony dopravované z komplexu I a II. Vazebné místo Q_o navazuje ubichinol. Pokud je Q_i místo inhibováno antimycinem, pak v přítomnosti ubichinolu komplex III produkuje velké množství superoxidu. Produkce superoxidu komplexem III je za fyziologických podmínek nízká v porovnání s komplexem I (Murphy, 2009).

Rostoucí množství důkazů ukazuje, že respirační komplex II funguje jako významný zdroj a modulátor produkce ROS. Jak jeho funkční ztráta, tak farmakologická inhibice mohou vést k nadměrné produkci ROS. Komplex II se na jejich produkci podílí za fyziologických i patofyziologických podmínek. Role komplexu II v tvorbě ROS je buď přímá, kdy jsou ROS generovány přímo v rámci komplexu, nebo nepřímá, kdy jsou ROS produkovány na jiných místech ETC díky elektronům dodávaných z komplexu II. Při vysokých koncentracích sukcinátu komplex II neprodukuje ROS přímo, ale může přispět k jejich nepřímému generování prostřednictvím reverzního přenosu elektronů, přes koenzym Q na komplex I, jak již bylo zmíněno výše. Při nižších fyziologických koncentracích sukcinátu molekula sukcinátu předává

elektrony na FAD, což vede k vzniku FADH₂. Tento redukovaný FAD následně může reagovat s kyslíkem na neobsazeném sukcinátovém vazebném místě, čímž přímo přispívá k tvorbě ROS. Schopnost redukovaného FAD generovat ROS se významně zvyšuje, pokud je vazebné místo pro ubiquinon (Q) blokováno inhibitorem. Naproti tomu inhibitory zaměřující se na sukcinátová vazebná místa potlačují produkci ROS. Nesprávné sestavení nebo poškození podjednotek komplexu II může vést ke zvýšené tvorbě ROS buď prostřednictvím snížené dostupnosti FAD, nebo díky přesycením FeS center (Hadrava Vaňová, 2020; Starkov, 2008, Liu et al., 2002).

Mimo ETC mohou být ROS produkovány dalšími mitochondriálními flavoenzymy (např. α -ketoglutarátdehydrogenáza, flavoprotein přenosu elektronů, ETF-oxidoreduktáza, glycerolfosfát a pyruvátdehydrogenáza) (Starkov, 2008).

Oxidační stres je považován za jeden z hlavních mechanismů iniciace a progresu MASLD. V rámci tohoto onemocnění byly pozorovány zvýšené hladiny biomarkerů oxidačního stresu, jako jsou produkty poškození lipidů (např. 4-hydroxy-2-nonenal, 8-isoprostan, hydroperoxy, látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, malondialdehyd), produkty oxidace DNA a oxidované proteiny (např. karbonylovaný tyrosin) a snížená koncentrace a aktivita antioxidantních systémů (např. kataláza, glutathionperoxidáza a SOD, α -tokoferol, glutathion, thioredoxinreduktáza a ubiquinon). (Shi et al., 2021; Zhang et al., 2023).

Při oxidačním stresu aktivují mitochondrie řadu obranných mechanismů k zachování své funkčnosti, včetně antioxidantních systémů, oprav poškozené mtDNA, správného skládání proteinů a degradace jejich poškozených forem. Ke kompenzaci mitochondriální dysfunkce slouží mitochondriální biogeneze, fúze a dělení. V případě buněčného poškození mohou být mitochondrie opraveny fúzí se zdravými protějšky, zatímco vážně poškozené mitochondrie podléhají fragmentaci, a nakonec dochází k jejich degradaci mitofágií. Mitofágie je důležitým preventivním mechanismem proti rozvoji a progresi MASLD, protože je zodpovědná za eliminaci poškozených mitochondrií a poruchy mitofágie byly zaznamenány u pacientů s MASLD. (Ramanathan, 2023).

1.2.3.5 Apoptóza

Apoptózu lze definovat jako programovanou buněčnou smrt. Vznikají apoptotická tělíčka, tudíž nedochází k vyelití obsahu buňky. Tělíčka jsou následně fagocytována makrofágy. Tento děj je velice důležitý pro udržení homeostázy tkání a zabránění růstu poškozených či abnormálních buněk (Musilová, 2023). Apoptóza je indukována dvěma základními

cestami: vnější, která je zprostředkována receptory smrti na povrchu buňky, a vnitřní cesta (mitochondriální) (Xu et al., 2024).

Základním rysem vnitřní cesty je uvolňování cyt c z mezimembránového prostoru do cytosolu, závisející na integritě vnější mitochondriální membrány. K její regulaci slouží rovnováha mezi proapoptotickými a antiapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2 (Musilová, 2023). K aktivaci mitochondriální cesty vede poškození DNA (včetně poškození mtDNA), stres ER, lysozomální permeabilizace a oxidační stres. Tyto zmíněné inzulty vedou k aktivaci proteinů rodiny Bcl-2, jako je protein X asociovaný s Bcl-2 (Bax) a homologní antagonist Bcl-2 (Bak) (Alkhouri et al., 2014). Po aktivaci BAX a BAK dochází k jejich oligomerizaci, která následně způsobuje permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. Díky zvýšené propustnosti mohou unikat proapoptotické proteiny (cytochrom c, Smac/Diablo a HtrA2/Omi) do cytoplazmy, kde podníčí apoptózu závislou i nezávislou na kaspáze (Musilová, 2023). Cyt c uvolněný z mezimembránového prostoru tvoří komplex apoptosomu aktivující kaspázu 9, která aktivuje efektorové kaspázy 3 a 7, což vede k indukci apoptózy (Bertheloot et al., 2021). Aktivace kaspázy-8 z vnější apoptotické dráhy může vést ke štěpení proapoptotického proteinu BID, čímž vzniká jeho aktivní forma tBID, která následně spouští vnitřní apoptotickou dráhu prostřednictvím permeabilizace vnější mitochondriální membrány (Xu et al., 2024).

1.2.4 Mitochondriální změny při progresi MASLD

Mitochondrie jsou vysoce adaptivní a mohou zvýšit svůj počet a kapacitu v prostředí s nadbytkem substrátů. K této adaptaci dochází např. během raných fází MASLD, kdy se mitochondrie přizpůsobují zvýšeným nárokům na spotřebu substrátu posílením β -oxidace, mitochondriální respirace a ketogeneze. V případě jednoduché steatózy dochází ke zvýšené aktivitě TCA cyklu. Existuje pozitivní korelace mezi obsahem intrahepatického triacylglycerolu a mitochondriálním oxidačním stresem. Zvýšená mitochondriální respirace může být bioenergeticky neúčinná, a proto může podporovat nadměrnou produkci ROS v játrech, narušovat hepatocelulární redoxní homeostázu a případně vést ke snížení mitochondriální funkčnosti a progresi MASH (Ramanathan, 2023; Zhang et al., 2023).

Následnou progresí v MASH tato adaptivní odpověď mizí, to má za následek mitochondriální dysfunkci charakterizovanou neefektivní β -oxidací, poruchou ketogeneze, sníženou tvorbou ATP a únikem elektronů z ETC. Dalším charakteristickým rysem progresu MASH je smrt hepatocytů způsobená zvýšeným únikem cyt c a dalších proapoptotických látek přes přechodový pór mitochondriální membrány (MPT) (Ramanathan, 2023). Nedávná studie přinesla důkazy o tom, že kapacita oxidace a aktivita enzymů omezujících rychlost při β -oxidaci

byly u pacientů s MASH sníženy přibližně o 40–50 % ve srovnání se štíhlými jedinci. Porovnáním hodnot u jedinců bez MASLD bylo zjištěno, že aktivita mitochondriálních ETC komplexů je u pacientů s MASH nižší o 37 % v komplexu I, 42 % v komplexu II, 30 % v komplexu III, 38 % v komplexu IV a 58 % v komplexu V (Zhang et al., 2023).

1.3 Diagnostika MASLD

Diagnóza MASLD vyžaduje průkaz jaterní steatózy pomocí zobrazovacích metod nebo jaterní biopsie a současný výskyt alespoň jednoho kardiometabolického rizikového faktoru. V současné době zůstává biopsie zlatým standardem pro diagnózu MASH, která je charakterizována kombinací steatózy, lobulárního nebo portálního zánětu a hepatocelulárního balonování. Pro stanovení stadia jaterní fibrózy je stěžejní histologické hodnocení jaterní biopsie. Jaterní biopsie má však svá omezení, mezi něž patří invazivita, riziko komplikací, variabilita odběru vzorků a potenciální neochota pacientů v důsledku její invazivní povahy. Kromě toho se pro přesné stanovení stadia doporučuje biopsie o délce alespoň 25 mm, což není vždy možné (van Erpecum et al., 2024). Kromě invazivní povahy a s ní spojených komplikací patří mezi hlavní nevýhody také nezanedbatelná variabilita mezi jednotlivými hodnoceními (inter-variabilita mezi více patologií a intra-variabilita u jednoho patologa). Dále se projevuje vysoká variabilita při odběru vzorků, kterou lze vysvětlit heterogenní povahou onemocnění. Je třeba zmínit, že jeden bioptický blok představuje zhruba 1/50 000 celých jater. Z tohoto bloku se připravuje přibližně 14 preparátů, přičemž patologové hodnotí pouze jeden preparát barvený hematoxylinem – eosinem a jeden trichomový preparát. Každý z těchto preparátů tedy reprezentuje zhruba 1/700 000 celých jater, což může vést k nesprávné interpretaci výsledků (Harrison et al., 2024). Rostoucí prevalence MASLD a zmíněné limity jaterní biopsie vedly k vývoji několika neinvazivních testů (NIT) pro přesné stanovení stadia a stratifikaci rizika. Patří mezi ně NIT pro diagnostiku steatózy, steatohepatitidy a pro staging jaterní fibrózy. NIT, které byly původně vyvinuty pro staging fibrózy, se také stále častěji používají ke stanovení prognózy související s játry. NIT lze obecně rozdělit na sérové testy, zobrazovací techniky a skóre, která kombinují obě tyto metody (van Erpecum et al., 2024).

1.3.1 Krevní testy

Jedním z prvních úkolů krevních testů je vyloučit jiné původce poškození jater, jelikož může existovat více možností příčin steatózy, např. virová hepatitida, autoimunitní onemocnění, toxiny prostředí nebo konzumace alkoholu. Zároveň jsou rozhodující pro hodnocení rizikových faktorů jako je inzulínová rezistence, diabetes mellitus 2. typu nebo

dyslipidemie (Wong et al., 2017). Krevní biomarkery využívají biochemické a klinické parametry. Jedná se o ekonomicky efektivní přístup k diagnóze MASLD.

Krevní testy mohou pomoci posoudit funkci jater a odhalit zvýšené hodnoty jaterních enzymů. Mezi běžné testy patří: jaterní testy, jako je alaninaminotransferáza (ALT) a aspartátaminotransferáza (AST), které se uvolňují do krve při poškození jaterních buněk, celkový bilirubin a γ -glutamyltransferáza (GGT), která se při zvýšené míře může uvolňovat při některých jaterních onemocněních, včetně steatózy jater; gluko-lipidový profil, včetně hladiny cukru v krvi nalačno, TAG a cholesterolu; apolipoprotein A1; alfa-2-mikroglobulin, haptoglobin. Normální jaterní krevní testy nevyklučují přítomnost MASLD, MASH nebo fibrózy (Zoncapè et al., 2024).

Ačkoliv neexistuje krevní test, který by mohl přímo diagnostikovat MASLD, existuje několik predikčních skóre odvozených z krevních testů a klinických parametrů, které se dají využít v klinické praxi (Zoncapè et al., 2024).

Nejpoužívanější skóre rizika pro steatózu jater jsou index ztukovatění jater (FLI), skóre NAFLD a steatost. Pro fibrózu jater jsou dostupná skóre rizika NAFLD (NFS), index fibrózy-4 (FIB-4), vylepšený panel jaterní fibrózy, fibrotest (FT) a hepascor (Cheah et al., 2017).

Index ztukovatění jater je založen na hodnotě body mass indexu (BMI), obvodu pasu, hladině TAG a GGT. Tento výpočet dokáže s vysokou přesností odhalit přítomnost steatózy, nikoliv však její závažnost.

NAFLD Liver Fat Score (skóre jaterního tuku) je založeno na hodnotách AST, ALT, hladině inzulínu nalačno, přítomnosti T2DM a metabolického syndromu, stejně jako index ztukovatění jater zjišťuje pouze přítomnost, nikoliv závažnost steatózy.

SteatoTest-2: sestaven na základě kombinace 6 složek FibroTest-ActiTestu (GGT, celkový bilirubin, alfa-2-makroglobulin, apolipoprotein A1, haptoglobin, ALT) a BMI, sérového cholesterolu, triacylglycerolů a glukózy upravených podle věku a pohlaví. (Zoncapè et al., 2024).

Pokud jde o zjišťování přítomnosti fibrózy, je nejjednodušším výpočtem AST/ počet trombocytů (APRI). Jedná se o zjednodušený výpočet pro identifikaci infekce hepatitidou C a pokročilou fibrózou.

Index fibrózy-4 díky nízké ceně slouží k preventivní predikci rizikových jedinců, kteří mohou následně profitovat z dalších vyšetření. Stačí zde pouze ALT, AST, počet krevních destiček a věk jedince.

Skóre fibrózy NAFLD vypočítává skóre po změření ALT, AST, počtu krevních destiček a albuminu, algoritmus přihlíží k charakteristikám pacienta včetně věku, BMI a přítomnosti hyperglykémie.

Fibrotický NASH index vypočítává skóre kombinující AST, lipoproteinový cholesterol s vysokou hustotou a hemoglobin A1c pro detekci fibrotické MASH u vysoce rizikových jedinců. Je považován za slibný nástroj pro screening primární zdravotní péče.

Fibrotest kombinuje alfa-2 mikroglobulin, apolipoprotein A1, γ -glutamyltranspeptidázu, haptoglobin, celkový bilirubin a ALT, je zohledněn věk a pohlaví pacienta vytváří skóre, které koreluje s úrovní fibrózy.

U pacientů s cirhózou jsou běžné ukazatele hemostázy, jako je mezinárodní normalizovaný poměr (INR), počet krevních destiček a hladiny fibrinogenu, často změněny v důsledku jaterní dysfunkce, která ovlivňuje syntézu koagulačních faktorů a vede k trombocytopenii. (Hudson et al., 2024).

1.3.2 Zobrazování

K neinvazivní identifikaci MASLD lze použít mnoho radiologických zobrazovacích technik, jako je ultrazvuk břicha, břišní počítačová tomografie nebo magnetická rezonance.

Ultrazvuk břicha je nejpoužívanějším testem této kategorie. Jedná se o subjektivní hodnocení jaterní steatózy, proto je závislé na zkušenosti lékaře. Jde o metodu s dobrou senzitivitou a specificitou při odhalování středně těžké a těžké steatózy, jelikož dokáže posoudit velikost a strukturu jater a odhalit přítomnost tukových ložisek. Ultrazvuk břicha je proto jednoduchá neinvazivní technika, která je obecně rychlejší a levnější než jiné radiologické zobrazovací metody.

Elastografie představuje neinvazivní diagnostický nástroj sloužící k hodnocení jaterní fibrózy. Její výsledky je však třeba vždy interpretovat v kontextu celého diagnostického procesu, který zohledňuje etiologii jaterního onemocnění, klinický stav i komorbidity konkrétního pacienta. Elastografické metody jsou založeny na principu mechanické excitace jaterní tkáně a hodnocení její odpovědi na mechanické podněty, zejména tuhosti tkáně. Nejčastěji používanou metodou je shear wave elastografie (SWE), založená na ultrazvukovém měření rychlosti šíření střížných vln. Po mechanickém impulsu vznikají v játrech střížné vlny, jejichž rychlost propagace, měřená pomocí ultrazvuku, koreluje s tuhostí tkáně – čím vyšší tuhost, tím vyšší rychlost vln, což svědčí pro přítomnost fibrózy. Další metodou je strain elastografie, která je kvazistatická a hodnotí elasticitu jaterní tkáně relativně vzhledem

k okolním strukturám. Specifickým typem elastografie je také transientní elastografie, na jejímž principu fungují přístroje FibroScan®. Tyto přístroje využívají vibrace generované sondou k excitaci tkáně a umožňují kvantifikaci jaterní tuhosti. Moderní verze těchto přístrojů jsou navíc vybaveny modulem pro současné stanovení stupně steatózy pomocí kontrolované atenuace ultrazvuku (CAP – Controlled Attenuation Parameter) (Dvořák, 2019; van Erpecum et al., 2024).

Nejpřesnější zobrazovací metodou v tomto případě je magnetická rezonance. Konkrétně MRI-PDFF (Magnetic Resonance Imaging – Proton Density Fat Fraction), je kvantitativní zobrazovací biomarker, který umožňuje přesné, opakovatelné a reprodukovatelné kvantitativní hodnocení jaterního tuku v rámci celých jater. Jedná se tak o jeden z předních neinvazivních biomarkerů, který je vhodný jako náhrada jaterní biopsie zejména pro hodnocení léčebné odpovědi MASH (Caussy et al., 2018).

1.3.3 Biopsie jater

Biopsie jater je v dnešní době považována za zlatý standard pro diagnostiku a hodnocení progresu MASLD. Vzhledem ke své invazivní povaze není vhodná pro screeningové účely. Proto se s převahou využívá pro pacienty s vysokým rizikem pokročilého jaterního onemocnění. Využívají se různé histologické skórovací systémy pro klasifikaci vzorků jaterní biopsie. Nejpoužívanější je skóre aktivity NAFLD (NAS) a skóre steatózy-aktivity-fibrózy (SAF). SAF je kombinací lobulárního zánětu a balonování (Heyens, 2021). NAS se zaměřuje na rysy, jako je steatóza, lobulární zánět a balonování, vylučuje fibrózu kvůli její nevratné povaze při hodnocení aktivity onemocnění. NAS je v současnosti nejlépe ověřeným a aplikovaným histopatologickým skórovacím systémem, který změnil způsob, jakým patologové kvantifikují aktivitu onemocnění v klinických studiích (Hudson et al., 2024).

Při histologickém vyšetření patří mezi význačné rysy MASLD/MASH převaha centrilobulární zóny 3, steatóza, zánět, balonující degenerace a současné hodnocení závažnosti fibrózy. Mezi další nálezy lze zařadit acidofilní tělíska, ukládání železa, vakuolizovaná jádra, Mallory-Denkova tělíska a cytoplazmatické megamitochondrie v balónkových hepatocytech.

Vzhledem k riziku morbidity, mortality a vysoké ceně se jaterní biopsie při běžné diagnostice pacientů s MASLD provádí jen zřídka (Hudson et al., 2024).

1.3.4 Trombocyty jako možný diagnostický marker MASLD

Krevní destičky neboli trombocyty, představují velmi malé (1,5–2,5 μm) složky periferní krve, které jsou klíčové pro hemostázu. Jejich životnost v krevním oběhu se pohybuje

v rozmezí 7–10 dní. Trombocyty vznikají kontinuálním odštěpováním z megakaryocytů, které se tvoří v kostní dřeni. Odhaduje se, že progenitorové buňky denně produkují přibližně 1×10^8 megakaryocytů, z nichž se následně uvolní kolem 1000 trombocytů. (Westerlund, 2025).

Pacienti s MASLD vykazují změny v charakteristice trombocytů, a to včetně variací v jejich počtu, zvýšeného průměrného objemu a zvýšeného obsahu trombocytů. V pokročilejších stádiích onemocnění naopak dochází k trombocytopenii. Vzhledem k jejich snadné dostupnosti jako biologického materiálu by mohly potenciálně sloužit jako markery pro diagnostiku a monitoring tohoto onemocnění. V rámci rutinní diagnostiky se trombocyty vyhodnocují v rámci kompletního krevního obrazu, kde se posuzuje také jejich morfologie, velikost a další parametry, jako jsou průměrný objem trombocytů, jejich obsah a šířka distribuce. (Yoon et al., 2024).

V periferní krvi se krevní destičky vyskytují v aktivované i neaktivované formě. Větší a reaktivnější trombocyty se pravděpodobně podílejí na progresi MASLD. Neaktivovaný trombocyt má diskoidní, hladký a lehce laločnatý tvar. Po aktivaci destiček různými vnějšími podněty dochází k výrazné změně jejich tvaru, agregaci a shlukování do trombu, čímž se spouští koagulační kaskáda, jejímž finálním cílem je zástava krvácení. Tento proces, který probíhá poměrně rychle, vyžaduje značné množství energie, která je s největší pravděpodobností zajišťována zvýšením aktivity jak anaerobní glykolýzy, tak OXPHOS (Westerlund, 2025). V krevních destičkách, stejně jako v jiných buňkách, jsou procesy OXPHOS a glykolýza vzájemně propojeny tak, že snížení nebo inhibice jednoho procesu vede ke kompenzačnímu zvýšení toho druhého. Řada studií již prokázala, že mitochondriální dysfunkce se vyskytuje u různých běžných patologií. Během agregace destiček za hypoxických podmínek však samotná glykolýza nemůže plně kompenzovat narušenou OXPHOS. Zda se, že krevní destičky v klidovém stavu primárně využívají glykolýzu, zatímco OXPHOS zůstává aktivní v klidovém i aktivovaném stavu a využívá glukózu, glykogen, mastné kyseliny a minimální množství glutaminu (Petrus et al., 2019).

Trombocyty postrádají jádro a jadernou DNA, neboť ta zůstává v megakaryocytech při odštěpení. Obsahují však mtDNA a značné množství jaderné i mitochondriální RNA. Každý trombocyt obsahuje přibližně 5–7 mitochondrií. Ačkoli každý trombocyt obsahuje relativně malý počet mitochondrií, tyto organely tvoří významnou část celkového mitochondriálního objemu. V kontextu periferní krve jsou trombocyty nejpočetnějšími buňkami obsahujícími mitochondrie, a vzhledem k relativní snadnosti odběru krve ve velkých objemech představují trombocyty vhodný zdroj mitochondrií (Westerlund, 2025).

Mitochondriální dysfunkce, metabolické změny a zvýšená aktivace krevních destiček mohou být spojeny s progresí MASLD a mohly by sloužit jako potenciální neinvazivní markery, zejména v pokročilých stádiích MASLD/MASH. V současné době však neexistuje žádný standardizovaný diagnostický test pro hodnocení energetického metabolismu trombocytů v souvislosti s jaterním onemocněním.

1.3.5 Dostupné *in vivo* a *in vitro* modelové systémy pro studium MASLD

1.3.5.1 *In vitro*

Při vývoji *in vitro* modelů MASLD se zvažuje, jaký použít typ substrátů (oleát, palmitát, vysoký obsah glukózy, fruktóza nebo jejich kombinace), jaký typ buněk (primární hepatocyty, buněčné linie jaterního karcinomu, neparenchymové buňky, a pluripotentní kmenové buňky), rozhoduje se mezi uplatněním 2D kultur (monokultury a kokultury) nebo 3D kultur (sféroidy, organoidy, játra na čipu a modely s biologickým potiskem) a zda kultivovat buňky na extracelulární matrix (kolageny, matrixový gel, poly-D-Lysin, fibrin a laminin). V jiných případech mohou výzkumníci do buněčného kultivačního média zahrnout také další ligandy, jako jsou hormony (inzulin, adiponektin) a různé cytokiny (TNF- α , IL-6, TGF- β), aby vyvinuli modely MASLD *in vitro*. Alternativou mohou být genetické manipulace s klíčovými geny regulujícími homeostázu lipidů (Zhou et al., 2016).

Buněčné linie se hojně využívají ve výzkumu a vývoji léčiv. Ve srovnání s modely *in vivo* lze buněčné linie snadno kultivovat ve velkém měřítku a s nižšími náklady. Navíc je lze udržovat déle než současné modely MASLD *ex vivo*, které mají obvyklou životnost ~5-15 dní. Buněčné linie se dělí dle původu na odvozené z nádoru (imortalizované), primární buněčné linie nebo pluripotentní kmenové buňky (Ramos et al., 2022).

Imortalizované lidské buněčné linie jsou získané z resekované nádorové tkáně (např. buněčné linie HepG2, HepaRG nebo HuH7) nebo vytvořené genetickou manipulací primárních jaterních buněk (SV40 large T, hTERT). Hlavní výhody imortalizovaných buněčných linií je jejich neomezený růstový potenciál a stabilní fenotyp po celou dobu kultivace. Použití těchto modelů usnadňují standardizované protokoly a reprodukovatelné studie. Vzhledem k jejich nádorovému fenotypu nebo procesu imortalizace jsou jaterní buněčné linie obecně změněny v určitých metabolických funkcích, které omezují přímé srovnání se situací u člověka (Soret et al., 2021).

Primární lidské hepatocyty jsou považovány za zlatý standard krátkodobého modelu lidských jater *in vitro*. Mohou být izolovány z resekované jaterní tkáně nebo z jaterních tkání nevhodných pro transplantaci nebo kryokonzervovanými od komerčních dodavatelů.

Díky přímé izolaci jsou nejbližším modelem pro napodobení fenotypu hepatocyty *in vivo*, zejména jejich plazmatická membrána udržuje aktivní mechanismy vychytávání/sekrece a metabolismus. Primární lidské hepatocyty vykazují fenotypovou nestabilitu a jejich dostupnost a doba kultivace jsou omezené. Kromě toho odběr lidských vzorků vyžaduje etické povolení a nepatologické tkáně (kontroly) jsou nezbytné a obtížně získatelné v klinické praxi (Soret et al., 2021).

Buňky podobné hepatocytům (Hepatocyte-like cells (HLC)) jsou buňky diferencované z lidských kmenových buněk, včetně jaterních kmenových buněk a embryonálních pluripotentních kmenových buněk. Lidské kmenové buňky lze diferencovat na HLC *in vitro* pomocí kombinované expozice růstovým faktorům a živinám. HLC vykazují morfologické a funkční charakteristiky, které jsou podobné charakteristikám primárních hepatocytů, ale bez omezení doby kultivace. Nicméně použití HLC má také omezení týkající se etického použití embryonálních kmenových buněk, neúplně jaterní diferenciace a chybějícího standardizovaného diferenciačního protokolu, což omezuje reprodukovatelnost studií (Soret et al., 2021, Ramos et al., 2022).

Další rozsáhlou skupinou jsou modely buněčných kultur. 2D monokultury jsou nejrozšířenější *in vitro* modely pro studium. Jejich nízká cena, snadná použitelnost a vhodnost pro vysoce výkonný screening z nich činí atraktivní nástroj pro modelování tohoto onemocnění. Monokultury se osvědčily při zkoumání metabolických a fibrotických drah, hodnocení terapeutického účinku látek a posuzování jaterního metabolismu léčiv. Steatóza se v těchto systémech běžně indukuje přidáním směsi nenasycených a nasycených FFA do kultivačního média. Kyselina olejová (OA) a kyselina palmitová (PA) jsou nejčastěji používané, a to v poměru 1:2 (PA:OA), který napodobuje dietní podmínky pozorované *in vivo*. Tato expozice vede k charakteristickým znakům MASLD-MASH, jako je akumulace triacylglycerolů v hepatocytech, stres ER, zánět a buněčná smrt. Navzdory svým výhodám, 2D monokultury nejsou schopny plně reprodukovat *in vivo* podmínky MASLD, a to kvůli absenci interakcí s neparenchymálními buňkami (NPC) a nedostatkům v extracelulárním prostředí. Tato absence kritických interakcí hepatocyt-NPC omezuje modelování zánětlivých procesů, které vedou k fibrogenzi u MASLD (Soret et al., 2021, Ramos et al., 2022).

Zavedení druhého buněčného typu do *in vitro* MASLD modelů zvyšuje jejich složitost, ale překonává některé nevýhody monokulturních systémů (Müller et al., 2019). 2D kokultivační modely slouží ke studiu vzájemné interakce mezi hepatocyty a NPC *in vitro*. Různé typy buněk rostou společně ve stejném prostředí a steatóza může být indukována přidáním FFA do kultivačního média. Společná kultivace je však poměrně obtížně implementovatelná,

protože je například vyžadována optimalizace růstových faktorů a kultivačního média, které nejlépe udrží různé buněčné populace. Lidské buňky jsou také špatně dostupné, což ke další komplikaci kokultivačních modelů (Soret et al., 2021).

V posledním desetiletí vývoj trojrozměrných (3D) kultivačních modelů dramaticky zvýšil znalosti o buněčných a molekulárních mechanismech v patogenezi jaterních onemocnění, zejména MASLD, a nabízí v tomto kontextu nové možnosti testování léků (Soret et al., 2021).

3D modely monokulturní buňky se objevují jako most mezi snadno použitelnými 2D buněčnými kulturami a složitějšími *in vivo* modely. Jednou z nejběžněji používaných technik je 3D sendvičová kultura, kdy jsou hepatocyty umístěny mezi vrstvy složené z komponent extracelulární matrix (Müller et al., 2019). V tomto modelu jsou hepatocyty umístěné mezi dvě vrstvy kolagenového gelu, což jim umožňuje rekonstruovat buněčnou polaritu normálních jaterních hepatocytů. V této konfiguraci si udržují sendvičové hepatocyty sekreci albuminu, transferinu, fibrinogenu, žlučových kyselin a močoviny po dobu nejméně 6 týdnů, zatímco hepatocyty kultivované na jedné vrstvě kolagenového gelu sekreční schopnost ztrácí mezi 1. a 2. týdnem (Soret et al., 2021). Jiné techniky zahrnují hydrogely, syntetické lešení a sféroidy. 3D buněčná kultura má tu výhodu, že přesněji napodobuje situaci *in vivo* než 2D, což naznačuje větší fyziologickou nebo patofyziologickou relevanci (Müller et al., 2019).

V poslední době se modely pro studium MASLD staly sféroidy a organoidy. Liší se od sebe původem a počtem typů buněk v agregátu, kultivačním prostředím nebo složitostí jejich struktury (Ramos et al., 2022).

Sféroidy nebo 3D buněčné agregáty jsou nyní nejčastěji používaným 3D kultivačním modelem. Jedná se o agregáty hepatocytů obvykle odvozených z jaterních progenitorových buněk, ale také z primárních lidských hepatocytů. Nejjednodušší model jaterních sféroidů obsahuje jeden buněčný typ, obvykle HepG2 nebo jaterní lidské hepatocyty. Primární lidské hepatocyty ve sféroidech zůstávají diferencované po dobu alespoň 3 až 4 týdnů. Po ovlivnění patologickými koncentracemi FFA, sacharidů, cyklosporinu A nebo inzulínu jaterní sféroidy umožnily indukci a zkoumání steatózy po dobu až 5 týdnů (Soret et al., 2021, Ramos et al., 2022). Jaterní steatózu lze navodit doplněním kultivačního média s patologickou koncentrací FFA, sacharidů a inzulínu. Jaterní sféroidy lze vytvářet ve spojení s NPC (např. hvězdicovými a endoteliálními buňkami), čímž vznikají složitější struktury podobné jaterní tkáni, které umožňují studium patogenetických mechanismů rozvoje MASLD/MASH, jako je zánět, aktivace HSC a fibrogenese. (Ramos et al., 2022). U standardních neadhezivních destiček je však obtížné udržet jednotnou velikost sféroidů a mohou se objevit jejich shluky, které

omezují absorpci živin a kyslíku do distálních sféroidů, což vede k buněčné smrti (Soret et al., 2021).

Organoidy jsou uměle vypěstované masy buněk, které připomínají miniaturní orgány. Jaterní organoidy se získávají izolací a expanzí kmenových a progenitorových buněk z jaterních kmenových buněk za vzniku malých samoorganizujících se 3D struktur, které stimulují mnoho funkcí nativních jater. Lidské jaterní organoidy jsou samoorganizované shluky buněk obsahující jaterní epiteliální buňky (cholangiocyty a hepatocyty) a NPC (hvězdíkové, biliární kmenové a Kupfferovy buňky). Po vystavení těchto organoidů FFA došlo k vývoji steatózy a balonovatení, uvolňování prozánětlivých cytokinů a produkci kolagenu, což jsou tři klíčové procesy v MASH. Mimo jiné zde byla zvýšená hladina ROS. Lidské jaterní organoidy se tedy jeví jako slibné nástroje pro patofyziologické studie MASLD. Ve srovnání s 2D buněčnou kulturou může 3D povaha organoidů více napodobovat přirozené fyziologické procesy, včetně diferenciací kmenových buněk, buněčného pohybu a interakcí buňka-buňka. Kromě toho mohou organoidy podstoupit rozsáhlou expanzi a kultivaci a zachovat si stabilitu genomu, což umožňuje dlouhodobé skladování a vysoce výkonný screening (Soret et al., 2021). Zároveň je technologie organoidů slibným nástrojem, zejména pokud je založena na lidských kmenových buňkách díky schopnosti překonat limity zvířecích. Díky zvýšené stabilitě a strukturní složitosti představují organoidy perspektivní modely pro budoucí výzkum. Zavedení nových standardů kryokonzervace a reprodukovatelnosti pomůže využít potenciál organoidů a nabídnout v blízké budoucnosti preklinickou alternativu k zvířecím modelům (Ramos et al., 2022).

Navzdory tomu, co přinesly 3D kultury do výzkumu MASLD a dalších onemocnění, jejich hlavní nevýhodou je nedostatek dlouhodobé kontroly nad smykovým napětím tekutiny, výměnou živin/plynů nebo odstraňování odpadu. Umožnění automatizované kontroly takových faktorů zařídily mikrofluidní technologie a přístupy jater na čipu. Liver-on-chip (LOC) jsou tedy 3D jaterní mikrofyzilogický systém *in vitro*, jehož cílem je rekonstruovat podmínky jaterní tkáně v mikroskopickém měřítku. Ideální LOC jsou schopny napodobit podmínky hepatocytů a dynamickém jaterním prostředí. Pro studium MASLD bylo nedávno navrženo několik systémů LOC. Jedním z takových zařízení je mikrotkáňová platforma integrující NPC v cévní vrstvě tvořené endotelovými buňkami lidských pupečnickových žil a tkáňovými makrofágy, Kupfferovými buňkami a protilehlou jaterní vrstvou tvořenou HSC kokulturovanými s hepatocyty. Každopádně tato mikrofluidní technologie je stále omezena náklady a složitostí (Hassan et al., 2020).

1.3.5.2 *In vivo*

In vivo modely zůstávají před klinickými studii klíčovým nástrojem pro studium MASLD. Větší zvířecí modely jako jsou králíci, opice nebo miniprasata mají s lidmi více shodných znaků. Negativní stránkou jsou určité etické problémy, větší náklady a náročnější podmínky chovu. I když se *in vivo* modely spoléhají spíše na hlodavce, což je z pohledu etiky přijatelnější forma, mají také své značné nevýhody. Význam studií na myších a jejich predikce pro lidi je skutečně omezen druhově specifickou biologií a genetikou, spolu s fyziologickými faktory, které jsou výsledkem růstu v laboratorních podmínkách, na rozdíl od přirozeného prostředí. Zásadně to může ovlivnit jejich mikrobiom, který byl silně spojen s patogenezi MASLD (Ramos et al., 2022).

Studie na zvířatech jsou homogennější než klinické studie a provádějí se na dobře definovaných populacích (druh, kmen, pohlaví, hmotnost nebo věk, laboratorní podmínky, typy stravy atd.). Kromě toho mají hlodavci jedinečné vlastnosti, které ovlivňují vývoj MASLD, což dále brání jednoduché interpretaci dat. Existují dvě hlavní kategorie hlodavčích modelů MASLD *in vivo* a to nutriční a genetická.

Nutriční modely lze klasifikovat podle mechanismu indukce steatózy. První skupina zahrnuje modely se zvýšeným přísunem nebo syntézou lipidů v játrech (diety s vysokým obsahem tuku, diety s vysokým obsahem fruktózy a sacharózy, kombinované diety). Druhá skupina je definována sníženým exportem nebo katabolismem lipidů (dieta s nedostatkem methioninu a cholinu; dieta s nedostatkem cholinu a L-aminokyselin) (Kučera, 2014).

Na rozdíl od *in vitro* modelů, u *in vivo* modelů je možné zkoumat z v různých orgánech, nejen játrech. To zahrnuje např. tukovou tkáň (respirace, zánět, inzulinová rezistence a adipokiny), svalovou tkáň (inzulinová rezistence, myokiny, respirace), mikrobioty a krev (cytokiny, hladiny glukózy, inzulinu a dalších hormonů), které jsou klíčové pro pochopení patogeneze a progresu MASLD. Oproti klinickým studiím na lidech mají *in vivo* modely výhodu v kratším časovém horizontu, v němž dochází k vývoji a progresi MASLD. V průměru může přechod ze steatózy na MASH u lidí trvat více než deset let, zatímco u hlodavců je to pouze několik týdnů. Navíc *in vivo* modely umožňují vytvářet geneticky modifikované varianty, které jsou velmi užitečné pro analýzu specifických biologických drah v patogenezi a progresi MASLD. Mezi běžné genetické modely pro výzkum MASLD patří hlodavci s deficitem leptinu nebo jeho receptorů (např. ob/ob myši, db/db myši či Zuckerovi tlustí potkani), myši s deficitem melanokortinového receptoru 4 a myši se zvýšenou expresí proteinu regulujícího steroly 1 a další. Protože jen málo pacientů s MASLD vykazuje zjevné genetické

defekty, je použití dietních modelů MASLD pro lidské onemocnění relevantnější než genetické modely (Flessa et al., 2022; Kučera, 2014).

1.4 Hodnocení energetického metabolismu pomocí vysokoúčinné respirometrie

Vysokoúčinná respirometrie slouží k hodnocení mitochondriální respirace. Tato metoda poskytuje základ pro přesnou analýzu OXPHOS. Kombinuje přístrojovou přesnost a spolehlivost s možností titrací substrát-inhibitor uncoupler (rozpřahovač). Tato metoda spočívá v měření úbytku kyslíku v uzavřené komůrce v důsledku spotřeby O₂ biologickým materiálem. Kombinováním různých substrátů, rozpřahovačů a specifických inhibitorů můžeme analyzovat jednotlivé respirační komplexy a jejich funkce, jako jsou index respirační kontroly, intenzita tvorby ATP a integrita vnější a vnitřní mitochondriální membrány.

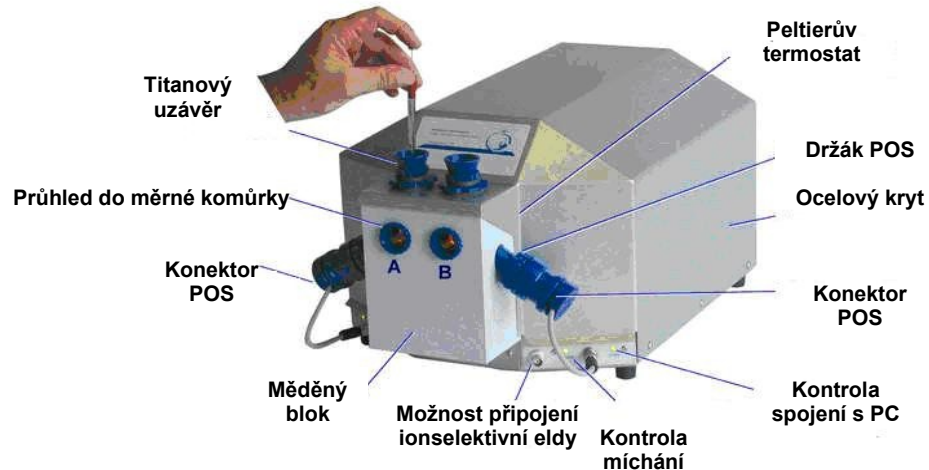
Oxygraf OROBOROS-2k (**Obrázek 2**) se vyznačuje vysokou citlivostí a stabilitou. Díky tomu je možné měřit i velmi nízké koncentrace O₂. Vysoké stability a citlivosti je dosaženo kombinací různých konstrukčních prvků (vhodný materiál, optimální tloušťka membrány, udržování konstantní teploty a konstantní rychlosti míchání, umístění polarografický kyslíkový senzor (POS) atd.). Oroboros-2k je dvoukomorový titračně-injekční respirometr. Obě skleněné komůrky o objemu 2 ml jsou umístěny v termostatovaném měděném bloku, což zajišťuje optimální podmínky pro měření. Komůrky jsou uzavřeny speciálně navrženým titanovým uzávěrem s injekční kapilárou, která brání volné difúzi kyslíku z okolního vzduchu a zároveň umožňuje dávkování biologického materiálu, substrátů a inhibitorů pomocí Hamiltonovy pipety. V každé komůrce je umístěn POS, známý také jako Clarkova kyslíková sonda. Tento senzor se skládá ze zlaté katody a argentochloridové anody, které jsou odděleny od analyzovaného roztoku semipermeabilní membránou. Tato membrána zabraňuje přístupu adsorptivních látek na elektrody a zároveň propouští O₂. Mezi membránou a elektrodami se nachází tenká vrstva elektrolytu (1 M KCl), a při měření je udržován konstantní potenciál (obvykle 0,8 V). Na katodě probíhá redukce kyslíku na vodu, zatímco na anodě dochází k oxidaci stříbra na AgCl. Kyslík difunduje ze vzorku na povrch katody přes nemíchanou vrstvu vzorku, membránu a elektrolyt. Pro minimalizaci této vrstvy vzorku je nezbytné zajistit vysokou a konstantní míru míchání média, což je dosaženo elektromagnetickým míchadlem. Za ustálených podmínek závisí tok kyslíku ke katodě na jeho koncentraci (parciálním tlaku) ve vzorku. Redukce O₂ generuje elektrický proud, který je úměrný rychlosti difuze kyslíku k elektrodě, a tím i koncentraci rozpuštěného kyslíku v měrné komůrce. Tento proud

je kontinuálně monitorován pomocí POS. Zařízení je vybaveno softwarem Matlab, který umožňuje on-line přepočítání koncentrace kyslíku na spotřebu v čase (flux), což představuje první negativní časovou derivaci koncentrace O₂. Ideálně by snížení koncentrace O₂ mělo být způsobeno pouze biologickou spotřebou kyslíku. Avšak v praxi je obtížné dosáhnout zcela uzavřeného systému, takže kyslík z okolí vždy difunduje do média. Tento problém je zejména patrný při nízkých koncentracích O₂ v komůrce, kdy se difúze z okolí zvyšuje. Reakce na elektrodě rovněž přispívají ke spotřebě kyslíku. Naštěstí design a volba materiálů v OROBOROS-2k minimalizují zpětnou difúzi a spotřebu kyslíku elektrodou, a software umožňuje on-line korekci na toto pozadí, čímž se zvyšuje přesnost měření. Kvalitní provedení přístroje a správná volba materiálů jsou klíčové pro minimalizaci artefaktů způsobených difúzí kyslíku, např. použití PEEK (polyetheretherketon) pro míchadla a butylové pryže pro utěsnění senzorů pomáhá udržet vysokou efektivitu měření (Hutter et al., 2006; Gnaiger, 2001).

Analýza OXPHOS v reálném čase využívá respiometrii ke studiu aerobního metabolismu mitochondrií a zaměřuje se na spotřebu kyslíku jako klíčový prvek posuzování stavu mitochondrií. Pro měření lze použít nejen živé buňky, ale i mitochondriální preparáty. Živé buňky hrají klíčovou roli v mitochondriální fyziologii, neboť jejich funkce závisí na správném fungování mitochondrií, zatímco mitochondrie samy vyžadují životaschopné buněčné prostředí. V preparátech s permeabilizovanou nebo odstraněnou plazmatickou membránou zůstává zachována mitochondriální integrita. Existuje několik typů mitochondriálních preparátů, jako jsou izolované mitochondrie, tkáňový homogenát, permeabilizovaná svalová vlákna, permeabilizovaná tkáň a permeabilizované buňky. Permeabilizované tkáně jsou připravovány selektivní permeabilizací plazmatické membrány mechanickými porušením nebo jemnými detergenty, přičemž je zachována integrita mitochondrií a cytoskeletárních struktur. Podobně vznikají permeabilizované buňky, které se vytvářejí selektivní permeabilizací plazmatické membrány digitoninem.

Tkáňový homogenát vzniká mechanickým rozrušením tkáně pomocí různých typů homogenizátorů, jejichž volba závisí na povaze zpracovávané tkáně. Následná centrifugace při nízkých otáčkách slouží k odstranění nerozrušeného materiálu a těžších složek, čímž se získá surový homogenát vhodný pro další izolaci mitochondrií. Pro vlastní izolaci a čištění mitochondrií se následně používá centrifugace při vyšších otáčkách. Další možností je chemická permeabilizace, která vede ke vzniku permeabilizovaných svalových vláken, tkání či buněk, přičemž intracelulární struktury zůstávají zachovány ve vzorku. Po permeabilizaci se rozpustné cytosolické složky buď vymyjí (v případě permeabilizovaných svalových vláken, tkání a buněk), nebo se výrazně naředí v mitochondriálním respiračním médiu (u tkáňového

homogenátu, permeabilizovaných svalových vláken a buněk). Kvalita mitochondriálních preparátů se hodnotí pomocí funkčních testů integrity vnější mitochondriální membrány (Adámková, 2020; Gnaiger, 2020).



Obrázek 2: OROBOROS Oxygraph-2k pro vysokoúčinnou respiometrii.

Obrázek zachycuje stolní mikrorespirometr, který obsahuje dvě nezávislé skleněné komory o objemu 2 ml (A, B) vložené do měděného bloku s elektronicky řízenou konstantní teplotou. Pro diagnostickou analýzu postačuje pouze 200 000 až 2 miliony buněk. Koncentrace kyslíku je v každé komoře průběžně zaznamenávána pomocí POS a data jsou online zpracovávána pro výpočet spotřeby kyslíku intaktními buňkami, permeabilizovanými tkáněmi nebo izolovanými mitochondriemi.

(POS = polarografických kyslíkových senzorů; PC = stolní počítač)

Zdroj: upravená předloha (Hutter et al., 2006).

1.4.1 Substrát-uncoupler-inhibitor titrace (SUIT)

SUIT (Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration) protokoly byly vyvinuty za účelem vytvoření jednotného standardu pro porovnávání respiračních aktivit v mitochondriálních preparátech napříč různými druhy, tkáněmi a buněčnými typy. Tato standardizace je důležitá pro vytvoření databáze, která se zaměřuje na srovnávací mitochondriální fyziologii. Referenční protokol SUIT-RP ((Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titration Reference Protocol) se používá v rámci testu způsobilosti MitoFit, kde zahrnuje široké spektrum chemických látek aplikovaných v různých specifických protokolech. Tyto protokoly jsou následně podrobeny kvalitativní kontrole v rámci uvedeného testu. Během měření jsou ke vzorkům postupně přidávány jednotlivé substráty, inhibitory a uncouplery., což umožňuje důkladnou analýzu různých komponent mitochondriálního dýchacího řetězce a identifikaci specifických defektů nebo omezení oxidační fosforylace (Doerrier et al., 2018). Tento přístup je klíčový pro komplexní charakterizaci mitochondriálních funkcí, protože umožňuje analyzovat různé

respirační stavy mitochondrií, jako jsou LEAK, OXPHOS, elektronového transportního systému (ETS) a reziduální spotřeba kyslíku (ROX) (**Obrázek 3**).

Stav LEAK je definován jako stav, při kterém mitochondrie spotřebovávají kyslík, aniž by produkovaly ATP. V tomto stavu se kyslík využívá k udržení membránového potenciálu mitochondrií prostřednictvím protonového gradientu. ATP syntáza není aktivní, protože ADP není přítomno. Tento stav tedy reflektuje únik protonů přes vnitřní mitochondriální membránu a je klíčovým ukazatelem efektivity mitochondriální respirace a míry uncouplingu (Brand et al., 2011). LEAK stav se určuje v přítomnosti substrátů komplexu I, jako jsou glutamát, malát a pyruvát, nebo po inhibici ATP syntázy pomocí oligomycin.

Na rozdíl od toho, OXPHOS představuje aktivní stav oxidativní fosforylace, při kterém dochází k oxidaci redukovaných substrátů, přenosu elektronů na molekulární kyslík a fosforylaci ADP na ATP. Tento stav bývá indukován přidáním ADP k aktivaci ATP syntázy, respirace je aktivována pomocí různých substrátů (NADH-dependentní substráty, mastné kyseliny, sukcinát, glycerofosfát). K posouzení integrity vnější mitochondriální membrány se využívá přídavek cytochromu c.

OXPHOS stav ukazuje maximální kapacitu mitochondrií k produkci ATP při saturujících koncentracích substrátů a ADP (Hütter et al. 2006) a umožňuje vyhodnotit schopnost mitochondrií efektivně využívat kyslík pro energetickou produkci.

Dalším důležitým sledovaným stavem je ETS, což představuje maximální kapacitu elektronového transportního systému pro přenosu elektronů po rozpřazení fosforylace. Tento stav se indukuje titrací uncouplerem, jako je karbonylkyanid-4-trifluoromethoxyfenylhydrazon (FCCP), který mění permeabilitu vnitřní mitochondriální membrány, čímž narušuje spřažení mezi transportem elektronů a syntézou ATP.

Stav ROX, tedy reziduální spotřeba kyslíku, je vyvolán inhibicí přenosu elektronů skrze elektronový transportní systém, a to například přidáním antimycinu A, což je inhibitor komplexu III. Tento stav odráží zejména nemitochondriální spotřebu kyslíku, kterou způsobují další oxidázy v buňkách, a používá se k odlišení mitochondriální a nemitochondriální respirace.

Titrační protokoly se mohou různě modifikovat v závislosti na metabolismu zkoumané tkáně. Například v orgánech, které zpracovávají mastné kyseliny jako energetický zdroj, je doporučeno testovat kapacitu proteinu ETF, který přenáší elektrony z metabolismu mastných kyselin na komplex II. Odpovídající stavy se pak označují jako OXPHOS FAO nebo ETS FAO.

Byly navrženy dva harmonizované a vzájemně se doplňující SUII-RP: SUII-RP1 a SUII-RP2.

SUIT – respirační protokol 1(RP1) je založen na lineárním průběhu funkčních stavů mitochondrií od LEAK (L), přes OXPHOS (P) až po ETS (E), za přítomnosti substrátů skupiny N (NADH-dependentních, např. pyruvát, malát, glutamát). Tento přístup využívá N-dráhu vedoucí k ubichinonovému (Q) spoji a je závislý na aktivitě komplexu I. Díky tomu je možné oddělit regulační vlivy jednotlivých stavů a přesněji charakterizovat přechod k následnému přidávání substrátů dalších metabolických drah konvergujících na Q spoji (sukcinát, oktanoylkarnitin, glycerofosfát) ve stavu ETS.

Naproti tomu SUIT-RP2 se zaměřuje na kapacitu OXPHOS při oxidaci mastných kyselin (FAO-P) a její porovnání s kapacitou OXPHOS při současné přítomnosti kombinovaných substrátů typu NF (např. pyruvát, malát, palmitoyl-karnitin). Tento protokol dále zahrnuje kroky pro měření maximální kapacity OXPHOS a ETS při využití kombinace substrátů NFSGp (NF + sukcinát, glycerofosfát). Aktivací různých metabolických drah dochází k přísunu elektronů do Q-spoje prostřednictvím komplexu I, ETF-dehydrogenázy, glycerofosfátdehydrogenázy a komplexu II.

Oba protokoly SUIT-RP1 a SUIT-RP2 poskytují komplexní informace o aktivitě jednotlivých enzymových kroků v komplexu IV, který je navázán na Q-spoj. Ideální je měřit oba protokoly paralelně, jelikož se vzájemně doplňují a rozšiřují dosavadní strategie respirometrické analýzy OXPHOS (Doerrier et al., 2018).

1.4.1.1 SUIT-RP1

V rámci protokolů SUIT hrají jednotlivé substráty klíčovou roli v celkovém měření a analýze mitochondriálních funkcí. Každý substrát přispívá k posouzení vlivu na různé metabolické dráhy a jejich vzájemné interakce. Po přidání specifických substrátů se při protokolu RP1 měří parametry jako N_E (4U a 5G), NS_E (6 S), NFS_E (7 Oct), S_E (8 Rot) a SGp_E (9 Gp). Díky harmonizaci mezi těmito protokoly je možné provádět porovnávání v jednotlivých fázích SGp_E , konkrétně RP1:9Gp a RP2:10Rot. Oktanoylkarnitin (Oct) se přidává ve stavu ETS s cílem minimalizovat efekt rozpojení s mastnými kyselinami. Pokud je v přítomnosti Oct pozorována absence jeho vlivu na NSE ($N=PGM$; očekává se u mnoha typů mitochondrií), dosahuje se další harmonizace mezi protokoly ve stavech PMP (RP1:2D) a $PMOct_P$ (RP2:5P).

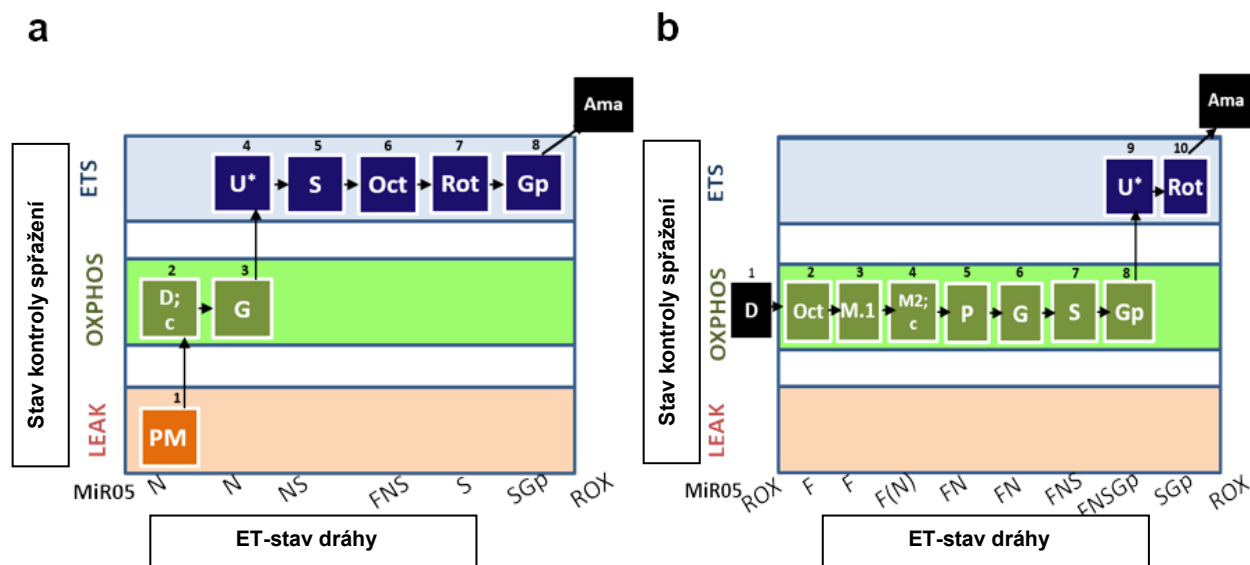
V případě využití mitochondriálních preparátů (**Obrázek 4a**) se do média nejprve přidávají pyruvát a malát, jež předávají elektrony na komplex I, a teprve poté následuje přidání mitochondriálních preparátů. Stav bez přidání substrátů není přesně definován, avšak vykazuje mírně vyšší hodnoty než ROX v důsledku přítomnosti některých endogenních substrátů, přičemž se po inhibici rotenonem (Rot) projevuje mírný pokles respirace

a mitochondriálního membránového potenciálu. V případě použití intaktních buněk se permeabilizace digitoninem provede přímo v komůrce a poté následuje přidavek pyruvátu a malátu. Poté následuje v obou případech přidavek ADP (D), což umožňuje sledovat účinnost spřažení OXPHOS N-dependentní dráhy. Následně probíhá test kontroly integrity vnější mitochondriální membrány prostřednictvím přídávku cyt c. V případě vysoké aktivace respirace cyt c může následovat titrace NADH pro ověření přítomnosti invertovaných mitochondriálních částic a propustnosti IMM. Následně se provádí postupná titrace FCCP až do maximální aktivace respirace pro vyhodnocení toho, jak moc je respirace limitována fosforylací. Následně se přidává Glutamát, který také předává elektrony prostřednictvím NADH na komplex I, kde dochází ke konvergenci NADH-dependentních dehydrogenáz (PGM_E). Jelikož pyruvát není v játrech preferovaným energetickým substrátem (Rui, 2014) protokol jsme mírně modifikovali a glutamát přidali ještě před titrací FCCP (PGM_P). Následně se přidává sukcinát (PGMS_E). Elektrony jsou do Q spoje dodávány jak komplexem I, tak komplexem II. Poté se přidává oktanoylkarnitin (PGMSF_E). Elektrony do Q spoje proudí prostřednictvím komplexu I, komplexu II a ETF-dehydrogenázy. Přidavek Rotenonu inhibuje současně CI a FA, což může vést k delším časovým prodlevám, než se po této inhibici dosáhne ustáleného stavu. Přidání glycerofosfátu (Gp) po rotenonu (SG_{PE}) představuje kompromis pro samostatné hodnocení S_E stavu a maximální ETS kapacita je tak hodnocena v rámci SUIT RP2.

1.4.1.2 SUIT-RP2

Na začátku experimentu probíhá deplece endogenních substrátů pomocí přídávku ADP (D). V případě použití mitochondriálních preparátů se ADP přidává před jejich přídávkem, což urychluje vyčerpání endogenních substrátů. Pokud jsou v experimentu použity buňky (**Obrázek 4b**), je nutné nejprve zajistit jejich permeabilizaci digitoninem podobně jako v SUIT RP1. Až po tomto kroku následuje přidání ADP. Přidavek samotného Oct u většiny mitochondrií výrazně neaktivuje respiraci, protože hromadící se acetyl-CoA bez zdroje oxalacetátu inhibuje β -oxidaci. K výraznější aktivaci respirace dochází až po přídávku nízké koncentrace malátu pro vznik nezbytného množství oxalacetátu. Stimulace OXPHOS samotným Oct v přítomnosti ADP v jaterních mitochondriích je umožněna díky syntéze ketolátek z hromadícího se acetyl-CoA, což odstraňuje jeho inhibiční vliv na β -oxidaci. Malát se přidává postupnou titrací se zvyšující se koncentrací (M.05; M2), kdy při nízké koncentraci hodnotíme FAO, při vyšších FN-dráhu. Stejně jako u protokolu RP1 je integrita vnější mitochondriální membrány hodnocena pomocí přídávku cyt c. Po následném přídávku pyruvátu je M2 nezbytná pro snížení toku přes komplex II (komplex II není nutné inhibovat malonátem),

což umožňuje odhadnout kapacitu N-dependentní OXPHOS bez výrazného přispění S-dependentní respirace. Po přidání glutamátu (G) se dosáhne stavu NF_P (konkrétně $PMGF_P$), po přidání sukcinátu dosáhneme stavu NFS_P . Po přidavku glycerofosfátu dosáhneme v rámci RP2 maximální kapacitu OXPHOS stavu ($NFSG_{PP}$) Následuje titrace FCCP k dosažení maximální kapacity ETS ($NFSG_{PE}$) a hodnotíme tak limitující vliv fosforylace na respiraci. Po přidání rotenonu (Rot) vzniká stav SG_{PE} , který je ve verzích protokolů RP1 a RP2 totožný, a tím pádem umožňuje spojení a harmonizaci obou protokolů, čímž dochází k jejich harmonizaci.

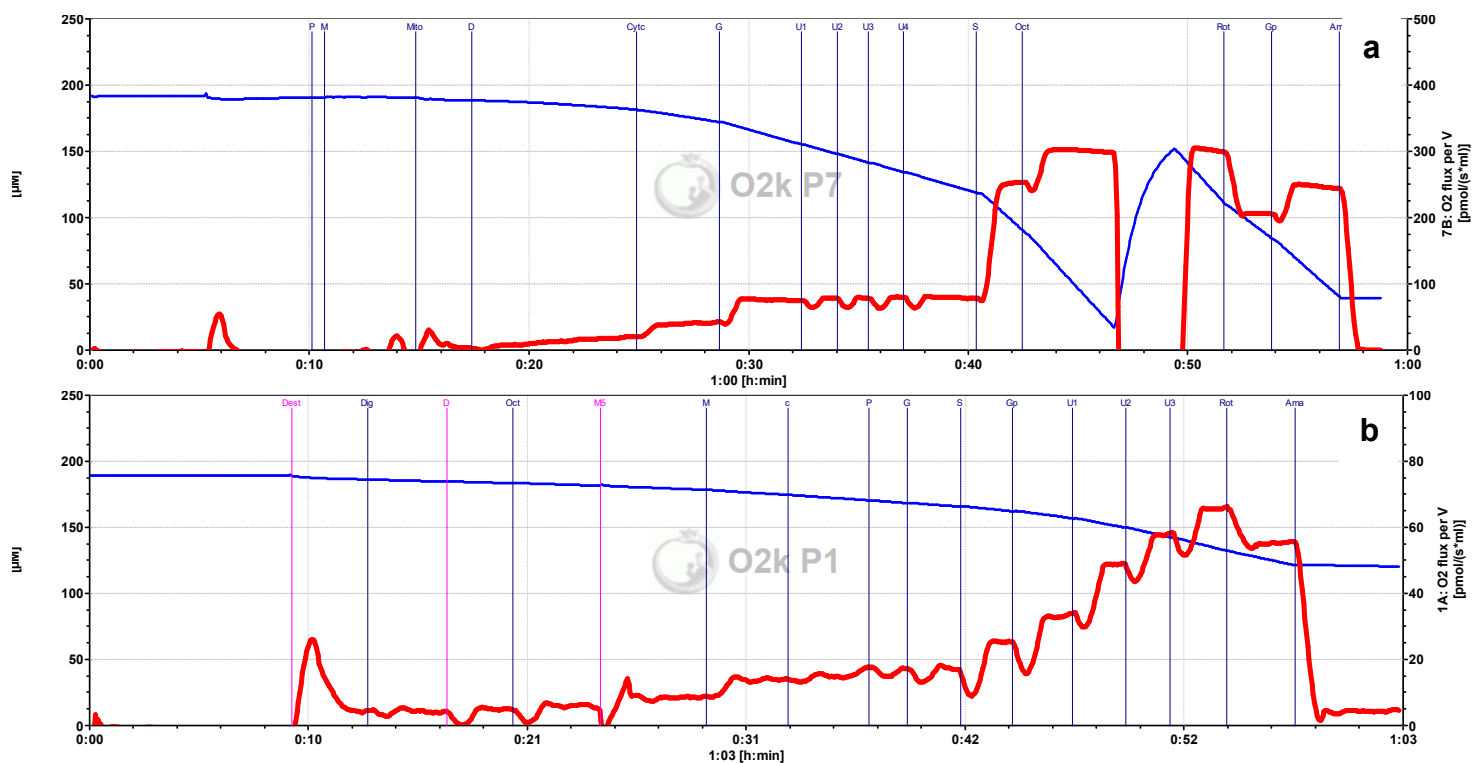


Obrázek 3: Schéma řízení spojky/cesty.

(a) Respirační protokol 1 (RP1). (b) Respirační protokol 2 (RP2). Stav LEAK byl měřen v přítomnosti respiračních substrátů, ale v nepřítomnosti ADP, což představuje tok elektronů spojený s pumpováním protonů pro kompenzaci úniků protonů. Kapacita oxidativní fosforylace (OXPHOS) byla měřena v přítomnosti saturačních koncentrací ADP (D) a definovaných redukováných substrátů. Kapacita elektron transportního systému (ETS) byla měřena jako spotřeba kyslíku v rozpřaženém stavu při optimální koncentraci uncoupleru (U), která byla získána postupnou titrací FCCP pro indukci maximálního toku elektronů na kyslík. Stav ET NADH dráhy (N) byl získán přidáním substrátů spojených s NADH (P, M, G). Sukcinátem indukovaný respirační stav (S) podporoval tok elektronů přes komplex II. Stav řízení oxidační dráhy mastných kyselin (Oct) (F) dodává elektrony na komplex I prostřednictvím NADH a ETF-dehydrogenázový komplex a následně na ubichinon. Komplex glycerofosfátdehydrogenáza oxiduje Gp a dodává elektrony přímo na ubichinon. Reziduální spotřeba kyslíku (ROX) je spotřeba kyslíku nezávislá na respiraci hodnocena buď po inhibici ETC (Rot, inhibitor respiračního komplexu I; Ama, inhibitor komplexu III) nebo v mitochondriálních preparátech inkubovaných bez přidavku energetických substrátů. Integrita vnější mitochondriální membrány byla hodnocena přidáním cytochromu c (c).

(D = ADP (adenosindifosfát), ETS = systém přenosu elektronů, U = uncoupler, P = pyruvát, M = malát, G = glutamát, S = sukcinát, Oct = oktanoylkarnitin, Rot = rotenon, Gp = glycerolfosfát, Ama = antimycin A)

Zdroj: Staňková et al., 2020



Obrázek 4: Výstup z přístroje Oroboros Oxygraph-2k.

(a) Záznam substrát-uncoupler-inhibitor titrace (SUIT) respirační protokol RP1 izolovaných mitochondrií
(b) Záznam SUIT RP2 trombocytů. Modrá křivka značí koncentraci kyslíku, červená je flux – první negativní časová derivace koncentrace kyslíku v tomto případě přepočtena na ml média.

(P = pyruvát, M = malát, Dig = digitonin, D = Adenosindifosfát, c = cytochrom c, G = glutamát, U = karbonylkyanid 4-(trifluormethoxy)fenylhydrazon, S = sukcinát, Oct = oktanoylkarnitin, Rot = rotenon) a Gp = glycerolfosfát, Ama = antimycin A)

2. Cíl práce

- 1) Popsat a porovnat mitochondriální respiraci u různých modelových systémů – izolovaných mitochondrií, hepatocytů, buněčné linie HepG2 a lidských trombocytů – s využitím vysokoúčinné respirometrie.
- 2) Změřit a vyhodnotit změny mitochondriální respirace jater u myšního nutričního modelu MASLD.
- 3) Zavést metodiku izolaci trombocytů pro respirometrické měření.

3. Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií:

Základní chemikálie (p.a.) - NaCl, KCl, MgSO₄.xH₂O, Na₂HPO₄.12 H₂O, NaHCO₃, MgCl₂.6H₂O, KH₂PO₄, KOH byly pořízeny od firmy (Lach-Ner, ČR), ostatní pokud není uvedeno jinak od firmy Sigma-Aldrich (Merck, USA).

Chemikálie pro přípravu izolačních a měřících roztoků – kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová (EGTA), D-mannitol, sacharóza, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselin (HEPES), D-sacharóza, kyselina laktobionová, taurin, bovinní sérový albumin (BSA, essentialy free fatty acid), BSA Standard protein solution, Coomassie Brilliant Blue (čínidlo Bradford), dimethylsulfoxid (DMSO)

Chemikálie pro izolaci hepatocytů - Surová kolagenáza (SEVAC), heparin (heparin Léciva, 10 ml o koncentraci 5000 m. j./ml).

Respirační substráty a inhibitory - pyruvát, malát, adenosindifosfát (ADP, D), cytochrom c (cyt c), glutamát (G), karbonylkyanid 4-(trifluormethoxy)fenylhydrazon (FCCP), oktanoylkarnitin (oct, TOCRIS Bioscience, UK), rotenon (rot), glycerofosfát (Gp, rac-Glycerol 1-phosphate disodium salt hexahydrate, Santa Cruz Biotechnology, USA), Antimycin A.

Média a suplementy pro kultivace buněk - DMEM (4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukóza, 1 mM pyruvát sodný, and 1500 mg/L bikarbonát sodný); Fetální bovinní sérum (FBS), penicilin (10,000 UI/ml) a streptomycin (10 mg/ml), Trypsin; Trypanová modř (0.4% roztok, sterilně filtrován, vhodný pro buněčné kultury, T8154), oleát sodný (OA), palmitát sodný (PA).

Média pro izolaci destiček - Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), Ficoll-Paque Plus.

3.2 Příprava roztoků:

3.2.1 Zásobní a pracovní roztok EGTA

250 mM EGTA (Mr = 380,35 g/mol) – Pro přípravu 50 ml bylo naváženo 4,7554 g EGTA, doplněno do 40 ml destilovanou vodou, postupně byl přidáván 5 M KOH do rozpuštění, a bylo upraveno pH na 7,4 (HCl) a doplněno destilovanou vodou do 50 ml, roztok byl skladován při 4 °C.

100mM EGTA – Pro přípravu 10 ml byly 4 ml 250 mM EGTA ředěny 6 ml H₂O.

3.2.2 Roztoky pro izolaci destiček

DPBS s přídávkem 10 mM EGTA – Pro přípravu 15 ml bylo do 14,4 ml DPBS napipetováno 0,6 ml 250 mM EGTA.

3.2.3 Roztoky pro izolaci mitochondrií

Zásobní roztok pro izolaci mitochondrií (220 mM D-mannitol, 70 mM sacharóza, 2 mM HEPES) – Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 40,08 g D-mannitolu, 23,96 g sacharózy, 0,477 g HEPES, roztok byl doplněn do 800 ml H₂O, bylo upraveno pH na 7,2 (KOH) a roztok byl doplněn do 1 l a skladován v lednici při 4 °C.

Izolační médium I – 0,125 g BSA bylo rozpuštěno v 250 ml zásobního roztoku pro izolaci mitochondrií (+ 0,5 g/l BSA).

Izolační médium H – Ke 99,6 ml izolačního média I bylo přidáno 0,4 ml 250 mM EGTA (+ 1 mM EGTA).

Zásobní roztok laktobionátu (0,5 M) – 35,83 g kyseliny laktobionové bylo rozpuštěno ve 100 ml H₂O. Následně bylo upraveno pH na 7,0 pomocí 5 M KOH. Roztok byl následně doplněn vodou na 200 ml.

MiR05 (mitochondrial respiration medium) – Do 1000 ml skleněné kádinky bylo odváženo: 0,190 g EGTA; 0,610 g MgCl₂ · 6 H₂O; 2,502 g taurinu; 1,361 g KH₂PO₄; 4,77 g HEPES; 37,65 g D-sacharózy. K naváženým sloučeninám bylo přidáno 800 ml H₂O a za pomoci magnetického míchadla, došlo k úplnému rozpuštění při 30 °C. Po rozpuštění bylo k roztoku přidáno 120 ml zásobního roztoku laktobionátu a pH upraveno na hodnotu 7,1. 1 g BSA byl rozpuštěn v části tohoto roztoku a po rozpuštění byl za jemného míchání převeden zpět do 1000 ml odměrné baňky se zbývajícím roztokem, tak aby se eliminoval vznik pěny. Po doplnění vodou do úplného objemu 1000 ml bylo zkontrolováno a případně dopraveno pH 7,1. Takto připravený roztok byl přepipetován do plastových zkumavek (50 ml) a uchováván při -20 °C.

3.2.4 Roztoky pro izolaci potkaních hepatocytů

Roztok A - 8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,0977 g MgSO₄·xH₂O; 0,1206 g Na₂HPO₄·12H₂O; 0,06 g KH₂PO₄; 2,188 g NaHCO₃; 0,19 g EGTA bylo do 1000 ml doplněno destilovanou vodou, 7 min. syceno karbogenem (95% O₂ + 5% CO₂), aby výsledné pH bylo 7,3 – 7,4.

Roztok B - 4,8 g NaCl; 0,24 g KCl; 0,05862 g MgSO₄·xH₂O; 0,07236 g Na₂HPO₄·12H₂O; 0,036 g KH₂PO₄; 0,3528 g CaCl₂·2H₂O, 1,314 g NaHCO₃; doplněno do 600 ml destilovanou vodou, 7 min. syceno karbogenem (95% O₂ + 5% CO₂), aby výsledné bylo pH 7,3 – 7,40; obvykle používáme 0,055 g surové kolagenázy (SEVAC) do 200 ml recirkulačního roztoku.

Roztok C (Krebs – Henseleitovo médium) - 6,9 g NaCl; 0,36 g KCl; 0,1441 g MgSO₄.xH₂O; 0,13 g KH₂PO₄; 0,374 g CaCl₂.2H₂O; 2 g NaHCO₃; 0,9 g glukózy, doplněný do 1000 ml destilovanou vodou pro infúze.

3.2.5 Roztoky pro kultivaci HepG2

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – Toto médium bylo upraveno přidáním antibiotik (streptomycin/penicilin) a FBS. Antibiotika představují 1 % objemu média, zatímco FBS tvoří 10 %. Pro přípravu 500 ml média byla smíchána 50 ml FBS, 5 ml antibiotik a 445 ml DMEM. Celý postup proběhl v laminárním boxu, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. Připravený objem byl rozpipetován do 50 ml sterilních zkumavek a uchováván v lednici při teplotě 4 °C. Výsledné médium má červenou barvu; pokud zežloutne, může to indikovat bakteriální kontaminaci (žlutá barva naznačuje tvorbu laktátu). Pokud médium zfialoví, je to známka vzniku amoniaku.

BSA – Byl připraven roztok 20% BSA v kultivačním médiu bez FBS. V prvním kroku bylo 20 ml kultivačního média přidáno do 50 ml skleněné kádinky s míchadlem umístěným na míchací desce. K tomu byly kvantitativně převedeny 4 g BSA. Poté byla kádinka 250/500 ml s vodou umístěna na vyhřívanou míchací desku a umístěn teploměr do vodní lázně. Kádinku s roztokem BSA byla zakryta aluminiovou folií a vložena do připravené vodní lázně. Teplota byla upravována dle potřeby přibližně 37 °C, ale nikdy ne vyšší než 40°C. V lázni byl roztok za stálého míchání, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění BSA. Následně byl potřebný 20% roztok BSA (5 ml) odebrán do nové 50 ml kádinky opět s míchadlem. Pro vytvoření 10% roztoku BSA bylo přidáno 2 ml NaOH/NaCl a pH upraveno na hodnotu 7,4. Konečný objem byl upraven na 10 ml kultivačním médiem (3 ml). Tento 10% roztok BSA byl přenesen do laminárního boxu ke sterilní filtraci.

Zásobní roztok s FA (PA/OA) 40 mM volných FA v 0,1 M NaOH – Do 50 ml Erlenmeyerovi baňky bylo napipetováno 12 ml NaOH a kvantitativně přidáno 133,64 mg PA nebo 146,13 mg OA. Baňka byla zakryta parafilmem a vložena do vodní lázně. Ve vodní lázni byla baňka s PA za stálého míchání zahřívána na teplotu 70 °C po dobu přibližně 30 minut. Zatímco baňka s OA byla za stálého míchání zahřívána na teplotu 50-60 °C do vytvoření čirého roztoku (cca 20-30 min).

Konjugace PA/OA a BSA – Spojení PA/OA s 20% BSA probíhá při teplotě 1,5 °C, kdy za stálého míchání bylo přeneseno 2 ml zásobního roztoku PA/OA do 5 ml 20% BSA. Následně byl roztok míchán po dobu 1 hod ve vodní lázni, jejíž teplota byla v rozmezí 35 až 40 °C. Po hodině bylo zkontrolováno pH a upraveno na 7,4. Konečný objem byl upraven

na 10 ml kultivačním médiem bez FBS. Molární poměr PA/OA byl 5,33:1 (8 mMPA/OA a 1,5 mM BSA).

3.2.6 Respirační substráty a inhibitory

Všechny zásobní roztoky respiračních substrátů a inhibitorů byly po přípravě rozděleny do jednotlivých alikvot a uchovávány při teplotě -20°C , pokud není uvedeno jinak.

Zásobní roztok ADP (500 mM) – 501,3 mg ADP (odpovídající 1 mmol) bylo smícháno s 1,2 ml H_2O . Následně bylo přidáno přibližně 450 μl 5 M KOH za účelem neutralizace, po které došlo k rozpuštění ADP. Poté bylo pH upraveno na hodnotu 7,0 a roztok byl doplněn vodou na konečný objem 2 ml. Roztok byl rozaliquotován a uchováván při -80°C .

Zásobní roztok Antimycin A (5 mM) – Navážka 5,4 mg antimycinu A byla rozpuštěna ve 2 ml 99,9% ethanolu.

Zásobní roztok cytochromu c (4 mM) – Bylo naváženo 50 mg cyt c a rozpuštěno v 1 ml H_2O .

Zásobní roztok digitoninu (8,1 mM) – 10 mg digitoninu bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO.

Zásobní roztok FCCP (1 mM) – Navážka 1,27 mg FCCP byla rozpuštěna v 5 ml ethanolu.

Zásobní roztok L-glutamátu sodného (2M) – Bylo odváženo 1,691 g monohydrátu L-glutamátu sodného a následně rozpuštěno ve 3 ml H_2O . pH bylo upraveno na 7 pomocí KOH.

Zásobní roztok glycerolfosfátu (1 M) – Navážka 324 mg glycerolfosfátu byla rozpuštěna v 845 μl H_2O .

Zásobní roztok malátu (800 mM/400 mM) – Bylo naváženo 536,4 mg/268,2 mg kyseliny jablečné (malátu) a rozpuštěno v 3 ml H_2O . Následně byl roztok neutralizován 5 M KOH (přibližně 350 μl). Výsledný objem byl doplněn vodou na 5 ml.

Zásobní roztok oktanoylkarnitinu (100 mM) – Navážka 50 mg oktanoylkarnitinu byla rozpuštěna v 1543 μl H_2O .

Zásobní roztok pyruvátu (2 M) – Bylo odváženo 44 mg kyseliny pyrohroznové (pyruvátu) a rozpuštěno v 0,2 ml H_2O . Roztok je nutné připravovat čerstvý každý den.

Zásobní roztok rotenonu (1 mM) – Navážka 0,39 mg rotenonu byla rozpuštěna v 1 ml 99,9% ethanolu.

Zásobní roztok sukcinátu (1 mM) – Bylo naváženo 1,3505 g sukcinátu a rozpuštěno ve 3 ml H_2O . V případě potřeby bylo upraveno pH na hodnotu 7 pomocí 1 M HCl a následně byl roztok doplněn vodou na konečný objem 5 ml.

3.3 Laboratorní pomůcky, přístroje a software

Běžné laboratorní vypavení (zkumavky Falcon, kádinky, pipety, jednorázové špičky, zkumavky Eppendorf, Pasteurovy pipety, latexové rukavice, gáza, , jednorázové plastové pipety atd.), zkumavky Leucosep™ kónické, 50 ml (Greiner); centrifugační zkumavky; Petriho misky (Nunc™ Cell Culture, 150288), 96 jamkové destičky (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate), sterilní kultivační lahve, počítačí komůrky (Neubauer-Improved CE), Homogenizátor s teflonovým pístem; centrifuga Rotina 380R; Laminární box (Clean air), laboratorní váhy (Kern), Spektrofluorimetr Tecan Infinite M200, Hematologický analyzátor Abacus Junior Vet5, inverzní mikroskop Leica DMI1, Respirometr Oroboros Oxygraph O2k (Austria), DatLab 7, GraphPad Prism 9, Direct-Q® 3 UV Remote Water Purification Systém.

3.4 Biologický materiál:

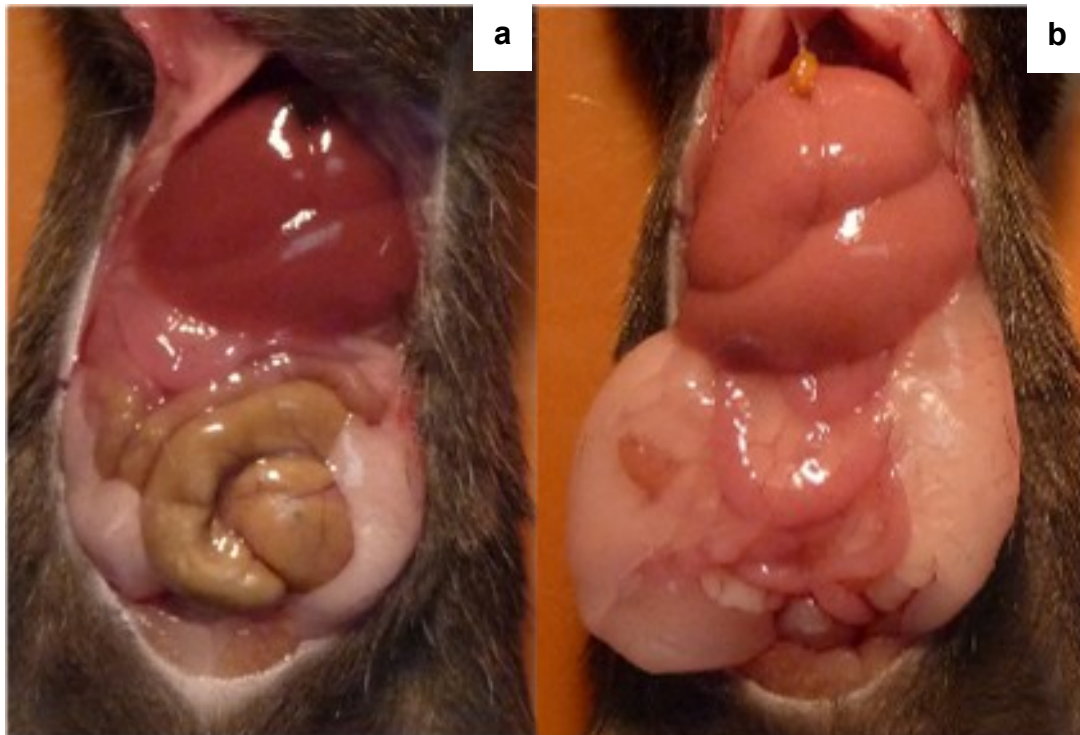
Potkani

Mitochondrie a hepatocyty byly izolován z potkaních samců kmene Wistar, o hmotnosti 200 až 350 g. Potkani byli chováni za standardních podmínek při konstantní teplotě 23 ± 1 °C, relativní vlhkosti vzduchu 55 ± 10 %, výměně vzduchu 12 – 14x za hodinu a při 12hodinovém světelném režimu (6,00 – 18,00 hod.). Potkani byli ustájeni v klecích po 6–10 potkanech. Po celou dobu měli volný přístup k vodě a potravě. Protokoly pokusů byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání podle zákona č. 246/92 Sb. v platném znění, §17, 3c. při Lékařské fakultě v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze.

Myši

Myši (**Obrázek 5**) byly použity pro izolaci mitochondrií pro *in vitro* měření a do *in vivo* pokusu pro navození MASLD pomocí diety západního stylu, kde byl pro měření použit jaterní homogenát. Samci myši kmene C57BL/6J (26 ± 2 g, Velaz, Česká republika) byli chováni v kontrolovaných podmínkách při teplotě 23 ± 1 °C, relativní vlhkosti 55 ± 10 %, výměně vzduchu 12-14krát za hodinu a 12hodinovém cyklu světlo-tma, s volným přístupem k potravě a vodě. Všem zvířatům byla poskytnuta péče v souladu se směrnicemi stanovenými Komisí pro životní podmínky pokusných zvířat Univerzity Karlovy (Praha, CZE).

V *in vivo* experimentu, byla zvířata náhodně zařazena do jedné ze dvou skupin (n = 12-13, každá skupina) a byla krmena ad libitum buď standardní kontrolní dietou (CD, PicoLab RD 20, LabDiet) a vodou z vodovodu, nebo dietou západního typu (WD, AIN-76A WD, TestDiet) a glukózou (18,1 g/l), fruktózou (24 g/l) přidávanou do vody po dobu 30 týdnů. Nutričně dieta PicoLab RD obsahovala 24,651 % proteinů, 13,205 % tuků a 62,144 % sacharidů. Oproti tomu dieta AIN – 76A obsahovala jen 15,5 % proteinů, zato 40,1 % tuků a 44,4 % sacharidů.



Obrázek 5: Myší dutina břišní

(a) Myš krmená kontrolní dietou. Makroskopický pohled na dutinu břišní ukazuje nízký obsah viscerální tukové tkáně a jasně ohraničené orgány dutiny břišní (střeva, játra) (b) Myš krmená dietou západního typu. Makroskopicky je zřejmý překryv orgánů tukovou tkání, která vyplňuje dutinu břišní. Orgány dutiny břišní jsou tedy méně zřetelné.

Trombocyty

Trombocyty byly získány od dobrovolných dárců ve věku 25–45 let různého pohlaví a etnického původu.

HepG2

HepG2 buňky (ECACC85011430, liver cancer cells), 11. a 13. pasáž

3.5 Metodiky

3.5.1 Kultivace buněk

3.5.1.1 Rozmrazování buněk

Nejprve bylo upravené DMEM médium temperováno v termostatu na 37 °C. Tento čas byl využit k přípravě sterilních kultivačních nádob, které byly řádně popsány. Poté byly buněčné linie vyjmuty z Dewarovy nádoby, kde jsou uchovávány v tekutém dusíku při -196 °C. Manipulace s buněčnými liniemi musí být rychlá. Buňky se po vyjmutí z nádob přesunou do termostatu s nastavenou teplotou 37°C. Ihned po jejich rozmražení byly přemístěny do vyhřátého média, které bylo napipetováno do kultivační lahve (objem média závisí na velikosti lahve). Lahev byla jemně promíchána ve tvaru písmene X a mikroskopicky zkontrolována přítomnost buněk v lahvi.

3.5.1.2 Výměna média

Vzhledem k tomu, že při rozmražení je obsažen malý počet buněk, umožňuje výměna média zvýšit jejich počet před pasáží. Tento proces spočívá v odsátí starého média a přidání nového. Nejprve byla mikroskopicky zkontrolována konfluence buněk a jejich životaschopnost. DPBS a upravené DMEM médium byly připraveny v termostatu při 37 °C. Do laminárního boxu byla umístěna odsávačka a nové sterilní kultivační lahve.

Jakmile bylo médium a DPBS nahřáté, opatrně jsme odsáli staré médium tím, že jsme vložili špičku odsávačky k okraji kultivační lahve, abychom se vyhnuli odsátí buněk. Poté jsme do lahve nalévali DPBS, přičemž jsme dbali na to, aby se žádné části lahve nedotkly povrchu. DPBS v kultivační lahvi bylo ponecháno po dobu 1-2 minut, poté bylo odsáto a celý postup opakován 2-3krát. Tímto procesem došlo k odloupenutí a odstranění mrtvých buněk ze dna kultivační lahve. Na závěr bylo přidáno nové médium a provedena závěrečná mikroskopická kontrola, aby bylo zajištěno, že všechny buňky byly zachovány. Lahve byly poté uloženy do inkubátoru.

Den před samotným měřením vysokoúčinné respirometrie byla polovina buněk převedena do média s přídatkem volných FA (palmitát a oleát) vázaných na BSA.

3.5.1.3 Pasážování buněk

Slouží k přemístění jedné populace buněk do nové kultivační lahve o konkrétním množství buněk.

První byla vždy provedena kontrola buněk, mezitím co byli DPBS, médium a trypsin uloženy v termostatu. Celá práce byla provedena v laminárním boxu. Nejprve byli odstraněny mrtvé buňky pomocí DPBS média, které bylo v lahvi ponecháno 1-2 min 2-3krát. Následovala

trypsinizace, kdy byl dle velikosti lahve napipetován trypsin (např. lahev T75 2 ml trypsinu). Lahev s trypsinem se uloží do inkubátoru, na dobu cca 5 minut. Zde je velmi důležitá průběžná kontrola, jelikož trypsin odlepuje buňky ze dna kultivační lahve (čas v závislosti na typu buněk), ale následně je začne usmrcovat, proto je důležitá rychlá manipulace. Ve chvíli, kdy bylo v mikroskopu pozorováno odlepení buněk, byla provedena dezinfekce lahve a v laminárním boxu bylo přidáno několik ml média (opět v závislosti na velikosti kultivační lahve – př. T75 8 ml), tím dojde k inaktivaci trypsinu a buňky se neusmrtí. Následně byl celý objem kultivační lahve kvantitativně přenesen do sterilní tuby pomocí automatické pipety. Takto jsou buňky připravené pro další použití a stanovení.

3.5.1.4 Stanovení množství buněk pomocí trypanové modře

Trypanová modř (sodná sůl toluidin-diazo-diamino-naftol-disulfonové kyseliny) prochází plazmatickou membránou do buňky. Buňky s neporušenou plazmatickou membránou ji vypuzují, zatímco v buňkách, které ztratily vlivem poškození membránový potenciál dochází k její akumulaci.

Měření množství buněk bylo provedeno v C-chipu. Buňky byly smíchány 1:1 s trypanovou modří a napipetovány do C-chipu (20 μ l). Pod mikroskopem byly počítány 2 čtverce z části A a 2 čtverce z části B při zvětšení 100x

3.5.2 Izolace mitochondrií z jater potkana/myši

Následující postup pro izolaci mitochondrií metodou několikanásobné centrifugace s postupně se zvyšujícím počtem otáček je aplikovatelný jak pro myši, tak pro potkany. Liší se pouze v hmotnosti jater a množství použitých roztoků, proto uvádím hmotnosti a objemy platné pro myši v závorkách.

K odběru jater došlo při narkóze potkana/myši (inhalační isofluranová anestezie, RWD systém). Břišní část byla nejprve potřena dezinfekčním roztokem, poté byla kůže a svalovina naříznuta do tvaru písmene V, čímž byla otevřena dutina břišní. Viscerální orgány byly přesunuty k levé straně. Následoval prostřih *v. cava inferior* a odsátí krve pomocí tampónů. Játra byla vystřižena z dutiny břišní a ihned propláchnuta ledovým fyziologickým roztokem, poté byla uložena na led. Na ledě pokračoval celý proces izolace mitochondrií. Po zvážení celých jater byl odebrán vzorek o hmotnosti 3 g (1 g) a opláchnut v ledovém izolačním roztoku H. Tkáň byla vložena do kádinky s 1 ml ledového roztoku H, kde byla játra nakrájena na malé kousky, propláchnuta roztokem H a kvantitativně přenesena do homogenizační zkumavky. Směs byla homogenizována v homogenizátoru s teflonovým pístem při 1500 RPM. Následně byl homogenát naředěn ledovým médiem H na celkový objem 30 ml (10 ml). Dále probíhala

centrifugace homogenátu po dobu 4 minut při 830 g při 4 °C. Vzniklý supernatant byl opatrně přelit do další zkumavky přes vrstvu gázy, doplněn do 30 ml (10 ml) médiem H a centrifugován 15 minut při 5200 g při 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a sediment resuspendován v 30 ml ledového média I. Suspense byla následně centrifugována 10 minut při 11000 g při 4 °C. Tento postup s odstraněním supernatantu byl opakován a sediment byl znovu resuspendován pouze v 15 ml (5 ml) ledového média I. Poslední centrifugace byla provedena při 12000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Finální supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován ve 2 ml (1 ml) ledového média I, čímž byly získány mitochondrie připravené k další analýze.

3.5.2.1 Měření proteinu dle Bradforda.

Při kvantitativním stanovení proteinů je zapotřebí kalibrační řada. Jako blank je využívána destilovaná voda a následně standardy o známé koncentraci (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml a 500 µg/ml), které si naředíme ze standardního roztoku (BSA Standard protein solution 2 mg/ml) a destilované vody. Samotné měření je stejné pro stanovovaný vzorek i standard, kdy se v 96- jamkové desce smíchá 10 µl vzorku/standardu s 300 µl Bradfordova činidla. Vzorky se vždy měří v dubletu. Následuje 10 minutová inkubace ve tmě po které dochází k měření absorbance při 595 nm (Tecan Infinite M200). Zjištění koncentrace proteinů v izolovaných mitochondriích bylo důležité pro správný výpočet pipetovaného objemu k měření respirometrie.

3.5.3 Izolace krevních destiček

Krev byla odebrána dobrovolným dárcům systémem S-Monovette do 2x 9 ml odběrových zkumavek (EDTAK3) a byla analyzována hematologickým analyzátozem. Při izolaci krevních destiček se postupuje podle následujícího protokolu. Do 50 ml zkumavky Leucosep bylo přidáno 15 ml Ficoll-Paque a vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při 1000 g, s využitím swinging bucket rotor (zrychlení 6, brzdy 2) (Rad-173). Mezitím bylo odebráno 12,5 ml plné krve z odběrových zkumavek přeneseno do zkumavky Falcon, kde byl smíchán s 12,5 ml DPBS. Tato naředěná krev byla poté pipetována do horní části polyetylenové bariéry v centrifugované zkumavce Leucosep v objemu 24 ml.

Následovala druhá centrifugace, tentokrát trvající 10 minut při 1000 g a při pokojové teplotě (RT) s akcelerací 6 a brzdou 0. Po centrifugaci byly jednotlivé složky rozděleny podle molekulární hmotnosti: vrchní vrstva tvořena plazmou, pod ní se nacházela jemná vrstva buffy coat, následována Ficoll-Paque a na úplném dně byly erytrocyty. Plazma byla přenesena do nové zkumavky pro pozdější využití.

Buffy coat (5–10 ml) byl opatrně přepipetován do jiné 50 ml Falconovy zkumavky, kam bylo přidáno DPBS do celkového objemu 25 ml. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 10 minut při 120 g a při pokojové teplotě (RT), s akcelerací 6 a brzdou 2. Vzniklý supernatant byl přesunut do nové 50 ml Falconovy zkumavky, kam bylo přidáno 5 ml čisté plazmy a 10 % z celkového objemu (100 mM EGTA), aby výsledná koncentrace EGTA byla 10 mM.

Následovala další centrifugace po dobu 10 minut při 1000 g, s akcelerací 6 a brzdou 2. Supernatant byl odebrán a peleta byla resuspendována v 5 ml DPBS s 10 mM EGTA. Byla provedena závěrečná centrifugace po dobu 5 minut při 1000 g, s akcelerací 6 a brzdou 2. Opět byl odstraněn supernatant a peleta resuspendována v 0,5 ml DPBS s 10 mM EGTA. Takto byly izolované trombocyty připraveny k dalšímu měření.

Pro počítání buněk byly buňky ředěny 10 x v DPBS médiu s 10 mM EGTA (50 μ l suspenze bylo pipetováno k 450 μ l H₂O) a buňky byly počítány v hematologickém analyzátoru Abacus Junior Vet5.

3.5.4 Myši homogenát

Myši byly usmrceny v inhalační anestezii (isofuran) a pro další analýzu byly odebrány vzorky krve, epididymálního tuku a jater, které byly během zpracování uchovávány na ledu nebo zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě -80 °C.

Pro měření mitochondriální respirace byly s použitím pístového teflonového homogenizátoru připraveny 10% jaterní homogenáty (0,2 g jater/2 ml média) v ledovém respiračním médiu MIR05 (0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 60 mM K-laktobionát, 20 mM taurin, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM sacharóza a 1 g/l hovězího sérového albumin bez mastných kyselin).

3.5.5 Izolace hepatocytů

K izolaci hepatocytů byla využita dvoustupňová kolagenázová perfúze jater.

Izolace byla provedena v isofuranové narkóze potkana. Břišní část byla potřena dezinfekčním roztokem, nástřihem kůže a svaloviny do tvaru písmene V byla otevřena dutina břišní. Střeva byla odsunuta k levé straně, čímž byl uvolněn přístup k *v. cava inferior*. Do *v. cava inf.* byl aplikován heparin v dávce 0,3 ml o koncentraci 833,33 m. j./ml (heparin Léčiva, 10 ml o koncentraci 5000 m. j./ml, ředěný fyziologickým roztokem). Tupou preparací a za stálého vlhčení terénu fyziologickým roztokem byl uvolněn přístup k *v. portae* a založena pod ní ligatura. Podložená *v. portae* byla nástřižena a dovnitř zavedena kovová kanyla. Kanyla byla upevněna ligaturou a následně připojena k aparatuře (hadicí, která přivádí roztok ze sběrné baňky) a játra propláchnuta *in situ* roztokem A (roztok bez kalcia). O úspěšnosti perfúze

svědčilo odbarvení jater v důsledku vymytí krve izolačním roztokem a mírné zvětšení objemu jater. Poté, co došlo k zvětšení objemu jater, byla prostržena aorta a dolní dutá žíla, aby nenastalo mechanické porušení buněk zvýšeným tlakem. Průplach byl zastaven a co nejrychleji játra z dutiny břišní vystřižena. Další kroky izolace probíhaly v podmínkách *in vitro*. Opět byla zahájena otevřená perfúze roztokem A a játra opláchnuta ponořením do fyziologického roztoku. Játra byla umístěna do speciálního stojánku a stojánek ponořen do roztoku A. Po třech minutách byl zastaven přítok roztoku do sběrné baňky a zbylý roztok nechán samospádem protéct játry. Hadice byla uzavřena svorkou, kterou přitékal roztok do jater a játra ve stojánku přemístěna do kádinky s roztokem B (roztok s kolagenázou). Sběrná baňka byla naplněna roztokem B a hadici vedoucí k játrům byla uvolněna. Následně byl zahájen 15 min. trvající proces recirkulační perfúzi roztokem B. Hladinu v baňce byla udržována ve stejné výšce pro zajištění konstantního perfúzního tlaku. Po ukončení recirkulační perfúze byla játra ponořena do Krebs-Henseleitova média s bovinním sérovým albuminem a jaterní tkáň jemně mechanicky rozvolněna pomocí pinzet. Přítomnost albuminu je nezbytná pro zachování koloidně-osmotických podmínek. Suspenze buněk byla přefiltrována přes sterilní 4x složenou gázu do centrifugační zkumavky a centrifugována po dobu 5 minut (28 g, 15 °C; Rotina 35R, Hettich). Nakonec byl odsát supernatant a buňky několikrát propláchnuty Krebs-Henseleitovým médiem a opět centrifugovány. Centrifugace byla opakována celkem třikrát. Optimální rychlost průtoku játry roztokem A i roztokem B byla stanovena na 40–50 ml/min.

3.5.6 Měření spotřeby kyslíku pomocí vysokoúčinné respirometrie

Před zahájením experimentu bylo nezbytné provést dvoubodovou kalibraci POS. K tomu je třeba znát signál POS při 100% saturaci média kyslíkem a při nulové koncentraci kyslíku v komůrce, stejně jako měřit teplotu, barometrický tlak, nastavenou citlivost signálu, rychlost míchání a rozpustnost kyslíku ve vybraném médiu. Do komůrky byla pipetována část čistého média Mir05, které bylo za konstantního míchání ponecháno v kontaktu se vzdušnou fází. Nulová koncentrace kyslíku byla dosažena ponecháním buněk (eventuálně mitochondrií) v uzavřené komůrce tak, aby měly možnost vydýchat veškerý kyslík. Kalibrace byla prováděna pomocí softwaru DatLab7, který automaticky zaznamenává teplotu a tlak.

Při experimentu bylo do komůrky napipetováno 2,2 ml Mir05 média provedena kalibrace pro 100% saturaci. Komůrka byla uzavřena titanovým uzávěrem a nechal se ustálit signál. Nejdříve byl pomocí Hamiltonovy pipety přes kapiláru uzávěru přidán jaterní homogenát (0,1 mg/ml) nebo trombocyty (100×10^6 buněk/ml) případně HepG2 (1×10^6 buněk/ml).

Izolované trombocyty a HepG2 byly permeabilizovány přidavkem digitoninu (10 $\mu\text{g/ml}$) do komůrky. Dále se postupovalo dle zvoleného protokolu (SUIT-RP1; SUIT-RP2), kdy byli postupně přidávány substráty, uncoupler a inhibitory dle protokolu: P (pyruvát, 5 mM), M (malát, 2 mM), M.1 (malát, 0,1 mM), D (ADP, 2,5 mM), c (cytochrom c, 10 μM), G (glutamát, 10 mM), U (karbonylkyanid 4-(trifluormethoxy)fenylhydrazon, 1,5–2 μM), S (sukcinát, 50 mM), Oct (oktanoylkarnitin, 0,5 mM), Rot (rotenon, 0,5 μM) a Gp (glycerofosfát, 10 mM). Nakonec byl přidán antimycin A (2,5 μM) a data byla korigována na zbytkovou spotřebu kyslíku (ROX) jako výchozí stav. Uvedeny jsou výsledné koncentrace v komůrce. Přidáním substrátů oxidovaných NADH-dependentními dehydrogenázami (malát; glutamát, pyruvát) bylo možné testovat funkci komplexu I. Po přidání ADP byl hodnocen index respirační kontroly. Aktivitu komplexu I lze inhibovat specifickým inhibitorem (rotenon). Po inhibici komplexu I je možné hodnotit respiraci aktivovanou flavoproteinovými substráty (sukcinát, glycerofosfát) a měřit rychlost jejich oxidace po aktivaci ADP. Aktivace respirace NADH a flavoprotein-dependentních substrátů přidáním ADP je přímým indikátorem funkce ATP-syntázy. Přidáním cytochromu c lze hodnotit integritu mitochondriálních membrán. Data byla zpracována pomocí softwaru Datlab 7. Výsledky jsou prezentovány jako první negativní derivace koncentrace kyslíku v čase na množství biologického materiálu – specifický flux ($\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot 10^{-6}$ buněk nebo $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinu).

3.5.7 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9. Normalita dat byla ověřena pomocí Shapiro–Wilkova testu. Pro prezentaci absolutních hodnot respirace byly použity krabicové grafy se zobrazením jednotlivých bodů a vousy znázorňujícími minimální a maximální hodnotu. Pro přehledné porovnání mezi skupinami byly použity sloupcové grafy zobrazující průměr \pm směrodatnou odchylku (SD). Pro porovnání dvou skupin byl aplikován dvouvýběrový t-test s Welchovou korekcí, která zajišťuje robustnost vůči nerovnosti rozptylů a rozdílné velikosti vzorků. V případě porovnání tří skupin byla pro každý substrát použita jednofaktorová analýza rozptylu (one-way ANOVA). Pokud nebyl splněn předpoklad normality, byl použit neparametrický Kruskal–Wallisův test následovaný post hoc analýzou pomocí Dunnova testu.

4. Výsledky

Pro experiment byly použity izolované mitochondrie z hepatocytů myši a potkanů, jaterní homogenáty z myši krmených 30 týdnů kontrolní dietou (CD) a myši krmených dietou západního stylu (WD), potkaní hepatocyty, trombocyty a buňky HepG2. Cílem bylo porovnat mitochondriální respiraci mezi různými modely, zhodnotit vliv stravy či kultivačních podmínek a ověřit vhodnost použití homogenátu. Měření probíhala pomocí vysokoúčinné respirometrie (Oroboros O2k) dle dvou SUIIT protokolů (RP1 a RP2), přičemž protokoly byly upraveny dle specifik jaterní tkáně (např. změna pořadí titrace glutamátu a FCCP).

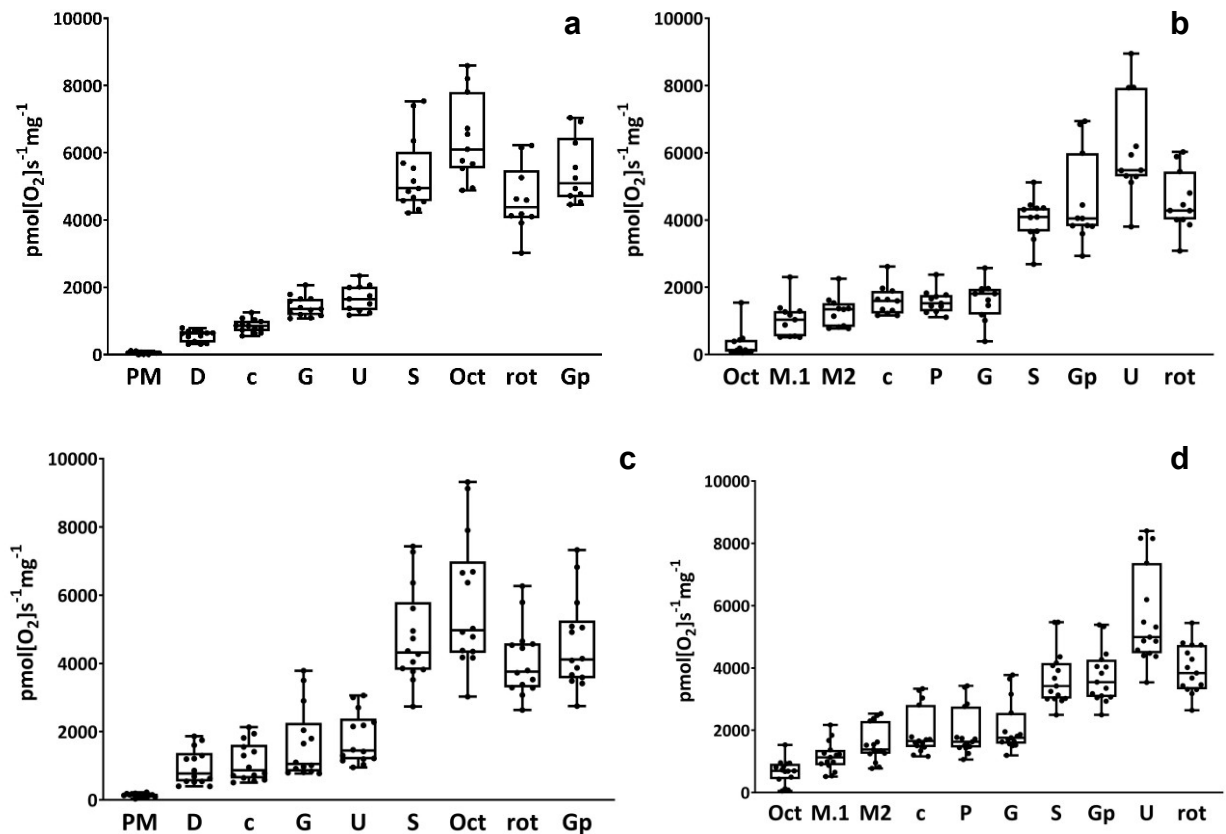
Při analýze byly kromě absolutních hodnot respirační aktivity sledovány i relativní parametry: poměr řízení toku kyslíku (FCR) a účinnost regulace toku kyslíku (FCE) jednotlivými substráty. FCR vyjadřuje tok kyslíku v určitém stavu jako poměr k maximálnímu toku v daném protokolu a umožňuje srovnávat aktivitu jednotlivých drah mezi vzorky bez ohledu na množství mitochondrií. FCE naproti tomu popisuje účinnost změny mezi dvěma specifickými stavy (např. po přidavku ADP versus předchozí stav) a reflektuje efektivitu substrátové odpovědi. Použití těchto parametrů umožňuje eliminaci variability dané množstvím mitochondrií a poskytuje informace o kvalitě a integritě respiračních drah.

Z hlediska vizualizace výsledků byly použity dva typy grafického zobrazení podle charakteru a rozsahu dat. Krabicové grafy byly zvoleny v případech, kdy bylo možné zachytit rozptyl měření uvnitř jednotlivých skupin, což umožňuje lepší představu o variabilitě dat a případných odlehlých hodnotách. Naopak při přímém srovnání experimentálních skupin, zejména tam, kde byl počet měření omezený, byly využity sloupcové grafy s vyznačeným průměrem a směrodatnou odchylkou (SD). Tento přístup zajišťuje přehlednost při zachování základní informace o směru a rozsahu změn a rozložení dat je patrné z krabicových grafů u každého mitochondriálního preparátu. Takto zvolené vyjádření výsledků kombinující různé typy grafického zobrazení s absolutními i relativními ukazateli umožnila nejen kvantifikovat respiraci, ale především identifikovat rozdíly v kvalitě mitochondriálního metabolismu mezi jednotlivými buněčnými typy a experimentálními podmínkami. Výsledky tak přinášejí komplexní pohled na efektivitu substrátového využití i míru adaptace mitochondrií.

4.1 Izolované mitochondrie z jater myši a potkanů

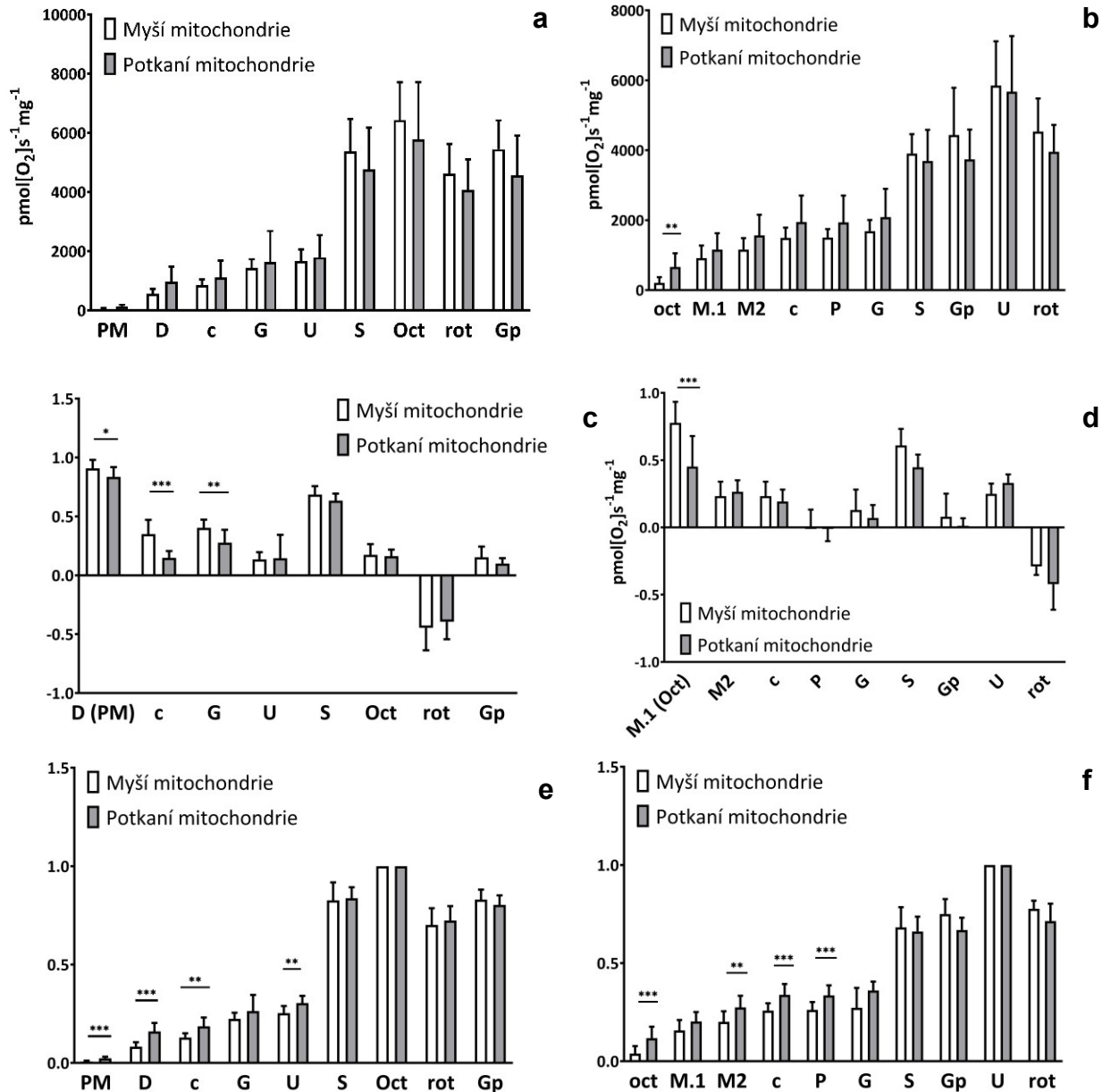
Graf 1 ukazuje srovnání absolutních hodnot spotřeby kyslíku mezi myšimi a potkaními mitochondriemi v protokolech RP1 a RP2. Přestože myši vykazovaly mírně vyšší respiraci po přidavku sukcinátu, rozdíly nebyly statisticky významné. V RP2 byl u potkanů pozorován výraznější nárůst po přidavku Oct, což naznačuje aktivnější ketogenezi.

Graf 2 doplňuje relativní parametry – FCR a FCE – a ukazuje, že rozložení substrátových odpovědí je mezi oběma druhy podobné, přičemž u potkanů je mírně vyšší aktivace oktanoylkarnitinem. Tyto grafy ilustrují nejen kvantitativní, ale i funkční rozdíly v mitochondriálních drahách obou druhů.



Graf 1: Mitochondriální respirace mitochondrií izolovaných z myších a potkaních jater.

(a) Myší mitochondrie respirační protokol 1 (RP1). (b) Myší mitochondrie respirační protokol 2 (RP2). (c) Potkaní mitochondrie RP1 (d) Potkaní mitochondrie RP2. Experimenty byly provedeny ve 2 ml mitochondriálního respiračního média MiR05. Nejprve byl do komůrky pipetován P (pyruvát) a M (malát) v případě RP1 a ADP (D) v případě RP2, poté byly pipetovány izolované mitochondrie (finální koncentrace v komůrce byla 0,05 mg proteinu/ml) a postupně byly přidány ostatní substráty, uncoupler a inhibitory podle protokolu: c (cytochrom c), G (glutamát), U (FCCP), S (sukcinát), Oct (oktanoylkarnitin), Rot (rotenon) a Gp (glycerolfosfát). Nakonec byl přidán antimycin A a data byla korigována na zbytkovou spotřebu kyslíku jako základní stav. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD s rozložením jednotlivých bodů (n=11-13 pro myší mitochondrie RP1; n=11 pro myší mitochondrie RP2; n=14 pro potkaní mitochondrie RP1; n=15 pro potkaní mitochondrie RP2).



Graf 2: Porovnání respirace mitochondrií izolovaných z myších a potkaních jater.

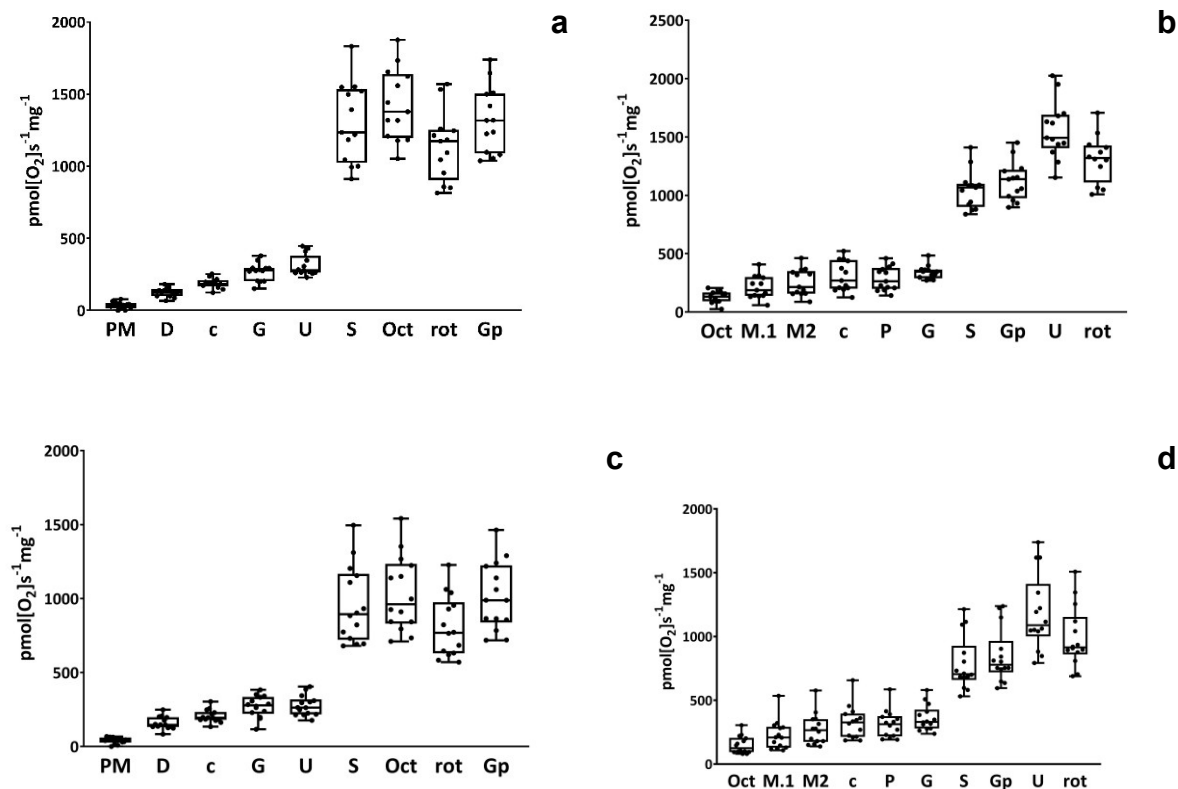
(a) Respirační protokol 1 (RP1) – absolutní hodnoty. (b) RP2 – absolutní hodnoty. (c) Účinnost regulace toku kyslíku (FCE) RP1 (d) FCE RP2 (e) Poměry řízení toku (FCR) RP1 (f) FCR RP2 Experimenty byly provedeny ve 2 ml mitochondriálního respiračního média MiR05. Izolované mitochondrie byly pipetovány v koncentraci 0,05 mg proteinu/ml a postupně byly přidány substráty, uncoupler a inhibitory podle protokolu: P (pyruvát), M (malát), D (ADP), c (cytochrom c), G (glutamat), U (FCCP), S (sukcinát), Oct (oktanoylkarnitin), Rot (rotenon) a Gp (glycerolfosfát). Nakonec byl přidán antimycin A a data byla korigována na zbytkovou spotřebu kyslíku jako základní stav. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ($n=11-13$ pro myší mitochondrie RP1; $n=11$ pro myší mitochondrie RP2; $n=14$ pro potkaní mitochondrie RP1; $n=15$ pro potkaní mitochondrie RP2).

4.2 Myší jaterní homogenáty CD a WD

Graf 3 znázorňuje rozdíly v absolutních hodnotách mitochondriální respirace mezi myšmi krmenými CD a WD.

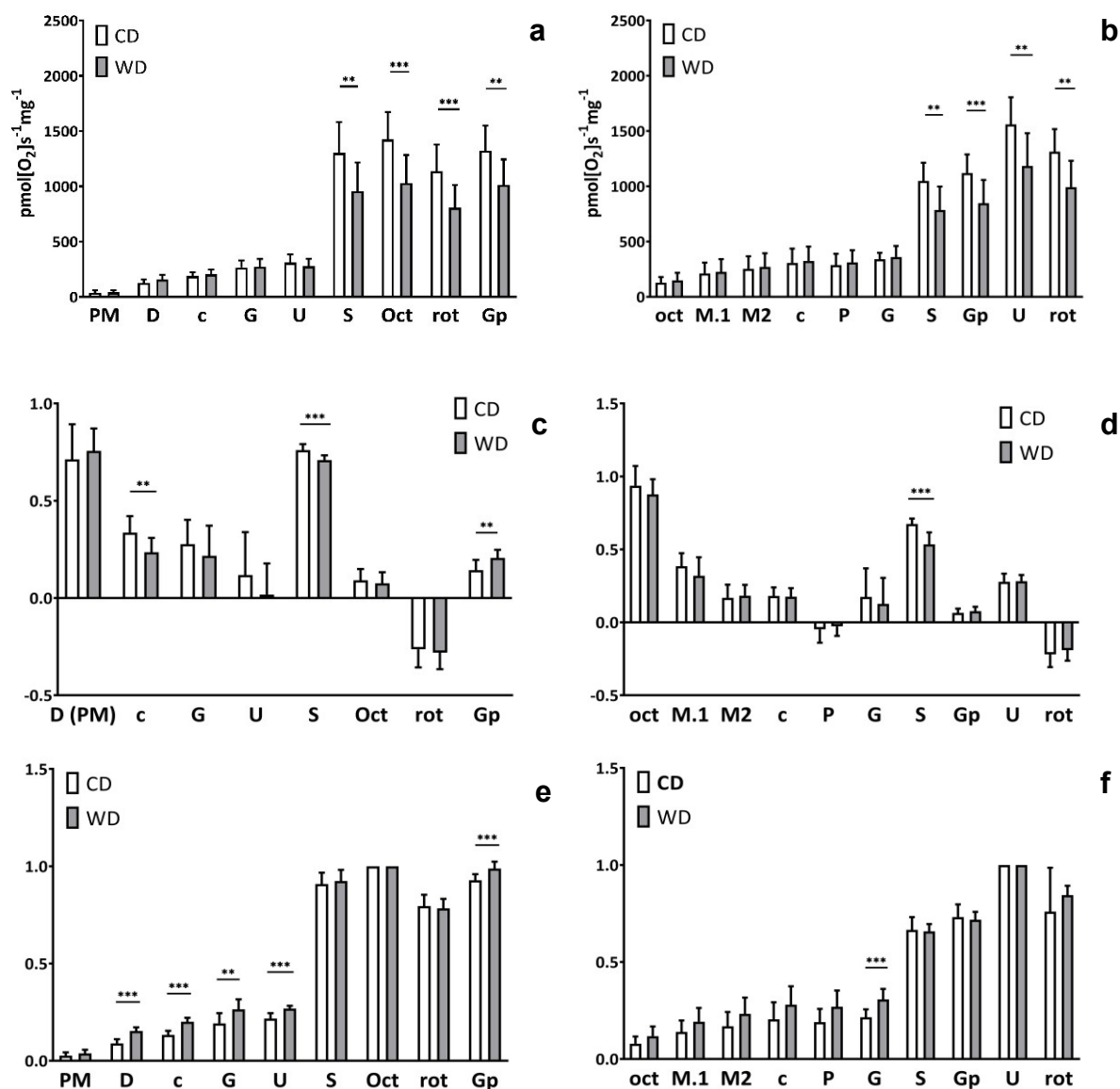
Graf 4 porovnává absolutní (a) a relativní hodnoty pomocí FCE (b) a FCR (c). Myši na WD vykazovaly respiraci, především po přidavku sukcinátu, a to v obou protokolech RP1 i RP2 a snížená respirace aktivovaná sukcinátem byla potvrzena i pomocí FCE pro sukcinát. Tento pokles naznačuje narušení aktivity sukcinátdehydrogenázy v důsledku dietních změn. Jde o statisticky významný rozdíl ve spotřebě kyslíku $p < 0,01$, což naznačuje negativní ovlivnění mitochondriálních funkcí a efektivity energetického metabolismu západní dietou. U CD byl zaznamenán vyšší efekt cytochromu c, který může naznačovat vyšší poškození vnější mitochondriální membrány, které bylo patrně způsobené homogenizací.

Graf 5 porovnává relativní parametry mezi homogenáty a izolovanými mitochondriemi. Výsledky ukazují, že hodnoty FCR a FCE jsou velmi podobné, což potvrzuje, že homogenát může být spolehlivou alternativou k izolovaným mitochondriím. Výhodou homogenátu je, že umožňuje zachytit kompletní mitochondriální populaci a snižuje ztráty spojené s izolací. Další výhodou je nižší časová náročnost na přípravu, což je důležité zejména u větších *in vivo* experimentů. Proto se jeho použití jeví jako vhodná volba zejména pro *in vivo* experimenty.



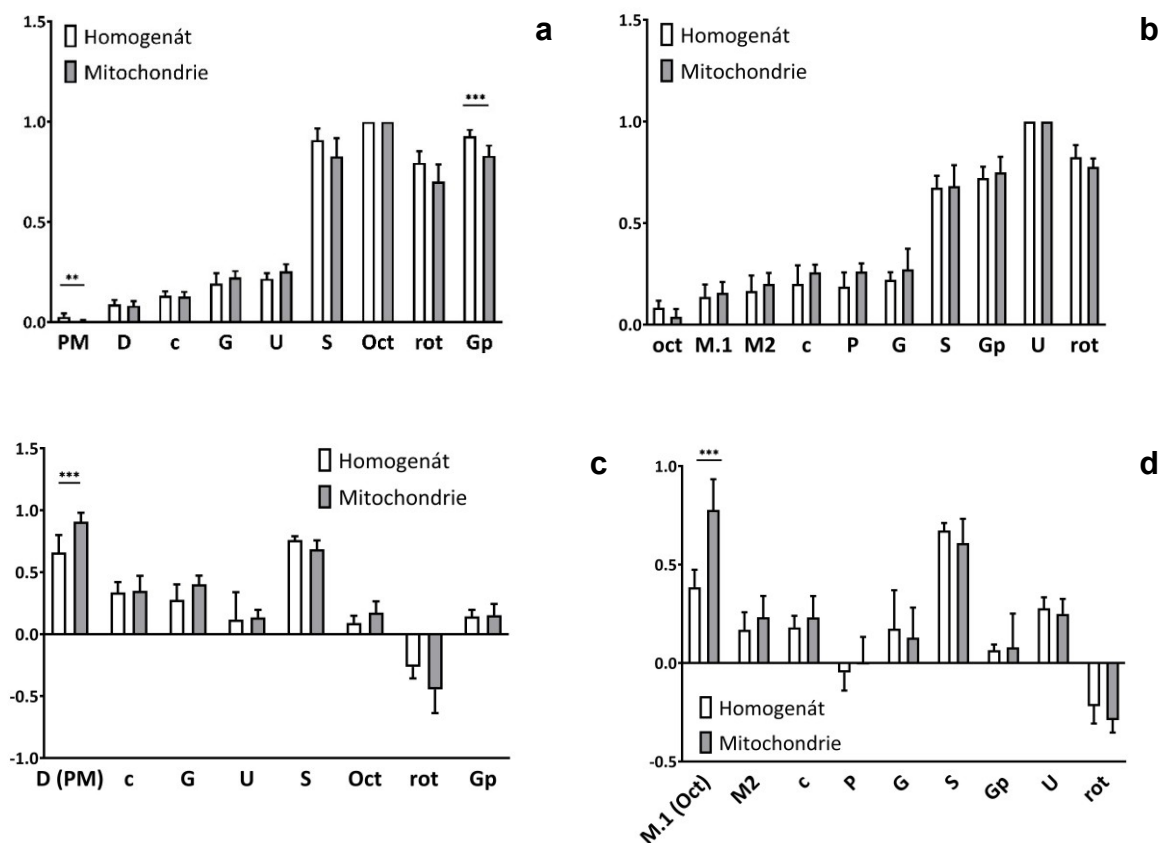
Graf 3: Mitochondriální respirace myších homogenátů.

(a) Homogenát myši krmených kontrolní dietou (CD) respirační protokol 1 (RP1). (b) Homogenát myši krmených kontrolní dietou (RP2). (c) Homogenát myši krmených západní dietou (WD) (RP1). (d) Homogenát myši krmených západní dietou (RP2). Experimenty byly provedeny ve 2 ml mitochondriálního respiračního média MiR05. Po přidání P (pyruvát) a M (malátu), resp. D (ADP) byly do komůrky pipetovány jaterní homogenáty (0,2 mg proteinu/ml) a postupně byly přidány další substráty, uncoupler a inhibitory podle protokolu P (pyruvát), M (malát), D (ADP), c (cytochrom c), G (glutamat), U (FCCP), S (sukcinát), Oct (oktanoylkarnitin), Rot (rotenon) a Gp (glycerolfosfát). Nakonec byl přidán antimycin A a data byla korigována na zbytkovou spotřebu kyslíku jako základní stav. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD s rozložením jednotlivých bodů (n=13 pro CD; n=14 WD).



Graf 4: Mitochondriální respirace jaterních homogenátů myši krmených kontrolní dietou (CD) a dietou západního stylu (WD).

a) Respirační protokol 1 (RP1) – absolutní hodnoty. (b) RP2 – absolutní hodnoty. (c) Účinnost regulace toku (FCE) RP1. (d) FCE RP2. (e) Poměry řízení toku (FCR) RP1. (f) FCR RP2. Po přidavku P (pyruvátu) a M (malátu), resp. D (ADP) byly do komůrky pipetovány jaterní homogenáty (0,2 mg proteinu/ml) a postupně byly přidány další substráty, uncoupler a inhibitory podle protokolu P (pyruvát), M (malát), D (ADP), c (cytochrom c), G (glutamát), U (FCCP), S (sukcinát), Oct (oktanoylkarnitin), Rot (rotenon) a Gp (glycerolfosfát). Nakonec byl přidán antimycin A a data byla korigována na zbytkovou spotřebu kyslíku jako základní stav. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (n=13 pro CD; n=14 WD).



Graf 5: Porovnání mitochondriální respirace myšního jaterního homogenátu a izolovaných myších jaterních mitochondrií.

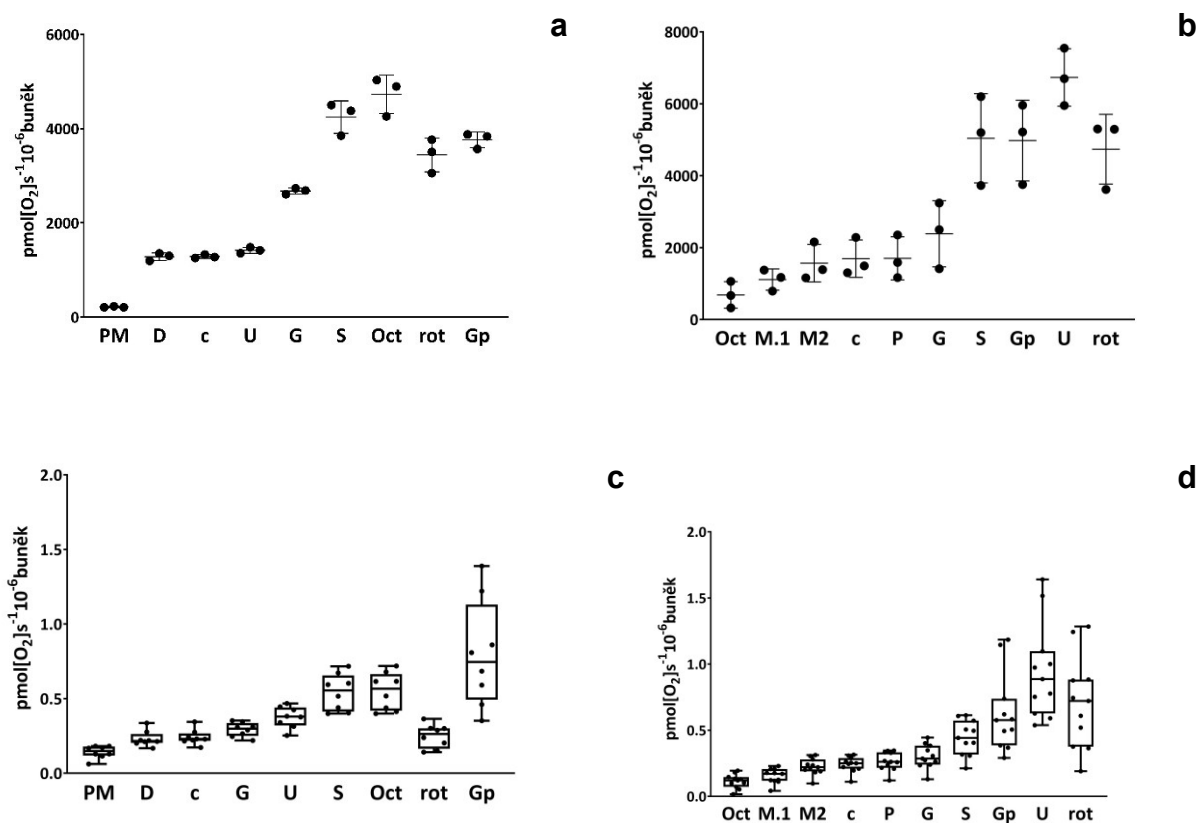
(a) Poměry řízení toku (FCR) respirační protokol 1(RP1). (b) FCR (RP2). (c) Účinnost regulace toku (FCE) (RP1). (d) FCE (RP2). Po přidavku P (pyruvátu) a M (malátu), resp. D (ADP) byly do komůrky pipetovány jaterní homogenáty (0,2 mg proteinu/ml) a izolované mitochondrie (0,05 mg proteinu/ml). Postupně byly přidány další substráty, uncoupler a inhibitory podle protokolu P (pyruvát), M (malát), D (ADP), c (cytochrom c), G (glutamát), U (FCCP), S (sukcinát), Oct (oktanoylkarnitin), Rot (rotenon) a Gp (glycerolfosfát). Nakonec byl přidán antimycin A a data byla korigována na zbytkovou spotřebu kyslíku jako základní stav. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ($n=11-13$ pro myší mitochondrie RP1; $n=11$ pro myší mitochondrie RP2; $n=13$ pro myší homogenát).

4.3 Potkaní hepatocyty

Graf 6a, b ukazuje respiraci primárních hepatocytů izolovaných z potkanů, které mají velmi aktivní mitochondriální respiraci. Po přidání substrátů, jako je sukcinát nebo oktanoylkarnitin, byla patrná výrazná odezva, která naznačuje, že buňky jsou schopné efektivně využívat meziprodukty odvozené od glukózového metabolismu, tak mastné kyseliny. Aktivace respirace po přidavku oktanoylkarnitinu bez přítomnosti malátu odráží schopnost ketogeneze. Tyto výsledky potvrzují vysokou funkční kapacitu mitochondrií a odpovídají fyziologické roli jater v energetickém metabolismu.

4.4 Trombocyty

Ze všech testovaných buněk měly trombocyty nejnižší absolutní spotřebu kyslíku, jak ukazují výsledky v **Graf 6c, d**. Tento fakt odpovídá poměrně nízkému počtu mitochondrií a celkově nižší metabolické aktivitě v neaktivovaném stavu. Analýza relativních parametrů – FCR a FCE (**Graf 8**) – ukázala vysoký podíl glycerolfosfátu na celkové respiraci. I přes nízkou úroveň spotřeby kyslíku tak Gp tvoří významnou složku respiračního toku. To naznačuje, že trombocyty preferují glukózový metabolismus, jako hlavní zdroj energie. Rovněž je patrná nízká spotřeba kyslíku aktivovaná oktanoylkarnitinem bez přítomnosti malátu v RP2 protokolu, což potvrzuje neaktivní ketogenezi.

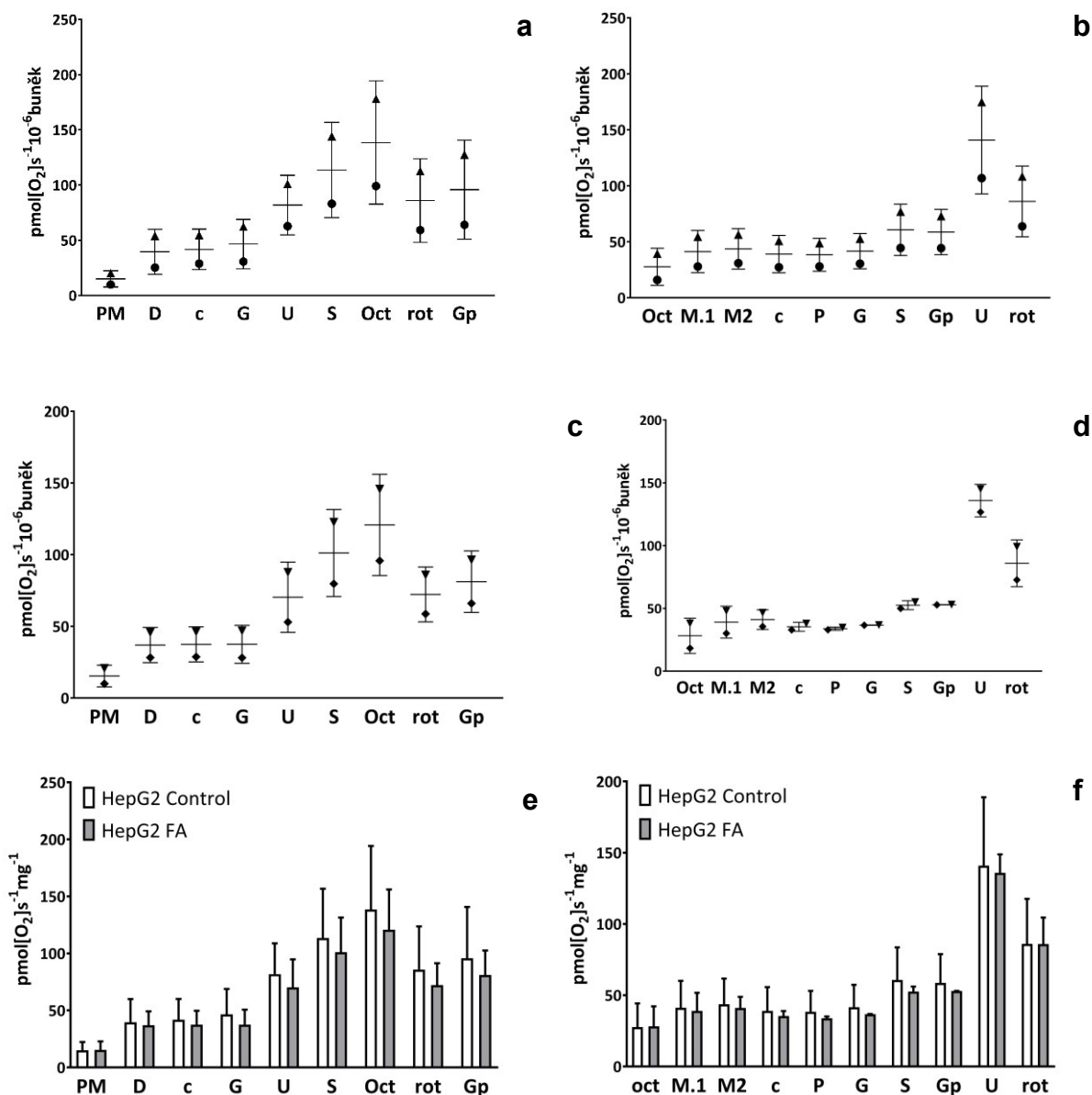


Graf 6: Mitochondriální respirace potkaních hepatocytů a trombocytů.

(a) Potkaní hepatocyty respirační protokol 1(RP1) (b) Potkaní hepatocyty (RP2). (c) Trombocyty (RP1). (d) Trombocyty (RP2). Experimenty byly provedeny ve 2 ml mitochondriálního respiračního média MiR05. Nejprve byly napipetovány buňky (koncentrace trombocytů v komůrce byla $100 \cdot 10^6$ buněk/ml a potkaních hepatocytů $0,25 \cdot 10^6$ buněk/ml), následoval přidavek digitoninu (permeabilizace plazmatické membrány) a postupně byly přidány substráty, uncoupler a inhibitory podle protokolu: protokolu P (pyruvát), M (malát), D (ADP), c (cytochrom c), G (glutamát), U (FCCP), S (sukcinát), Oct (oktanoylkarnitin), Rot (rotenon) a Gp (glycerolfosfát). Nakonec byl přidán antimycin A a data byla korigována na zbytkovou spotřebu kyslíku jako základní stav. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n=3$ pro potkaní hepatocyty v obou protokolech; $n=8$ trombocyty RP1; $n=11$ trombocyty RP2).

4.5 Buňky HepG2

Buněčná linie HepG2 vykazovala v porovnání s potkaními hepatocyty nízkou mitochondriální aktivitu, nicméně výrazně vyšší než v případě trombocytů. Jak je patrné z grafu **Graf 7**, tato nízká aktivita byla pozorována u kontrolních i FA ošetřených vzorků. Po přidání substrátů, jako je glycerolfosfát a sukcinát, byla odezva HepG2 buněk relativně nižší ve srovnání s primárními hepatocyty (**Graf 8**). Ošetření mastnými kyselinami vedlo k dalšímu poklesu aktivity, nicméně kvůli nízkému počtu měření nebylo možné výsledky statisticky vyhodnotit. Přesto tato data vizuálně ukazují na sníženou mitochondriální plasticitu u HepG2 buněk, což je v souladu s jejich nádorovým charakterem a známou preferencí glykolytického metabolismu na úkor oxidativní fosforylace.



Graf 7: Mitochondriální respirace HepG2 kontrolní skupiny a HepG2 obohacené o mastné kyseliny.

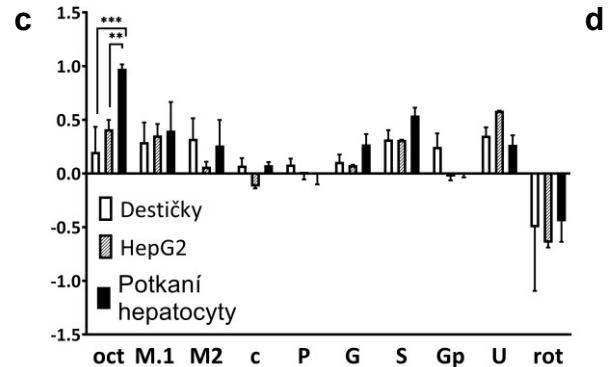
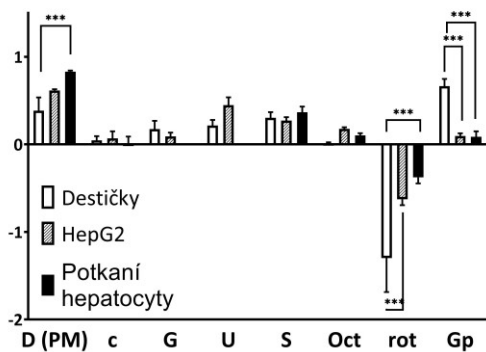
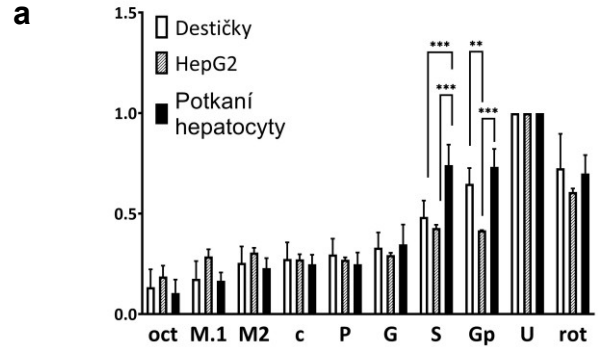
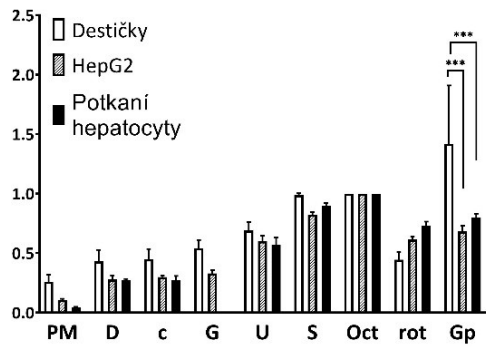
(a) HepG2 kontrolní skupina respirační protokol 1 (RP1). (b) HepG2 kontrolní skupina (RP2). (c) HepG2 obohacené o mastné kyseliny (FA) (RP1). (d) HepG2 obohacené o FA (RP2). (e) Porovnání HepG2 kontrolní skupiny a skupiny obohacené o FA (RP1). (f) Porovnání HepG2 kontrolní skupiny a skupiny obohacené o FA (RP2). Experimenty byly provedeny ve 2 ml mitochondriálního respiračního média MiR05. Nejprve byly napipetovány buňky (HepG2 v koncentraci $1 \cdot 10^6$ buněk/ml), následoval přidavek digitoninu (permeabilizace plazmatické membrány) a postupně byly přidány substráty, uncoupler a inhibitory podle protokolu: protokolu P (pyruvát), M (malát), D (ADP), c (cytochrom c), G (glutamát), U (FCCP), S (sukcinát), Oct (oktanoylkarnitin), Rot (rotenon) a Gp (glycerolfosfát). Nakonec byl přidán antimycin A a data byla korigována na zbytkovou spotřebu kyslíku (ROX). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD s rozložením jednotlivých bodů (n=8 trombocyty RP1; n=11 trombocyty RP2; n=2 HepG2 oba protokoly).

4.6 Porovnání mitochondriální respirace mezi jednotlivými modely

Porovnání **Graf 8** a **Graf 6** ukazují, že potkaní hepatocyty vykazují výrazně vyšší absolutní hodnoty mitochondriální respirace než ostatní sledované modely. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny po přidavku glycerolfosfátu a FCCP (U) v rámci protokolu RP2, což odráží maximální kapacitu respirace v ETS stavu. Průměrná maximální kapacita respirace ukazuje, že aktivita v hepatocytech byla přibližně 7950× vyšší než u trombocytů. Výrazný rozdíl byl zaznamenán také při srovnání s buněčnou linií HepG2, kde respirace potkaních hepatocytů dosáhla přibližně 48násobku hodnot HepG2 buněk. V protokolu RP1 nebyl glutamát přidán před rozpřažením (U), kvůli použití obecné verze protokolu. Protokol byl modifikován následně.

Graf 8

Souhrnný přehled relativních hodnot FCR a FCE pak doplňuje absolutní výsledky. Vyšší FCR pro Gp u trombocytů poukazuje na význam glycerolfosfátové dráhy v trombocytech. Naopak hepatocyty vykazovaly vyšší FCE (RP2) u substrátu glutamátu, což vypovídá o jejich roli v metabolismu bílkovin. U HepG2 buněk byla nižší ketogenní kapacita a FCE pro glutamát (RP2) nižší, i když v tomto případě nebyly rozdíly vzhledem k nízkému počtu měření ve skupině signifikantní. To svědčí o změně v metabolismu HepG2 oproti primárním hepatocytům.



Graf 8: Porovnání mitochondriální respirace trombocytů, HepG2 a potkaních hepatocytů.

(a) Poměry řízení toku (FCR) respirační protokol 1(RP1) (b) FCR (RP2). (c) Účinnost regulace toku (FCE) (RP1). (d) FCE (RP2). Experimenty byly provedeny ve 2 ml mitochondriálního respiračního média MiR05. Nejprve byly napipetovány buňky (koncentrace trombocytů v komůrce byla $100 \cdot 10^6$ buněk/ml; potkaních hepatocytů $0,25 \cdot 10^6$ buněk/ml; HepG2 $1 \cdot 10^6$ buněk/ml), následoval přidavek digitoninu (permeabilizace plazmatické membrány) a postupně byly přidány substráty, uncoupler a inhibitory podle protokolu: protokolu P (pyruvát), M (malát), D (ADP), c (cytochrom c), G (glutamát), U (FCCP), S (sukcinát), Oct (oktanoylkarnitin), Rot (rotenon) a Gp (glycerolfosfát). Nakonec byl přidán antimycin A a data byla korigována na zbytkovou spotřebu kyslíku jako základní stav. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ($n=3$ pro potkaní hepatocyty v obou protokolech; $n=8$ trombocyty RP1; $n=11$ trombocyty RP2; $n=2$ HepG2 oba protokoly).

5. Diskuze

Z dat vyplývá, že intenzita mitochondriální respirace mezi primárními hepatocyty, nádorovými liniemi a krevními destičkami je velmi rozdílná. Mezi hepatocyty a trombocyty je rozdíl v maximální kapacitě ETS několik řádů. Takto velké kvantitativní rozdíly odráží fyziologickou specializaci jednotlivých tkání, ale zároveň znemožňují přímé porovnání bez vhodné normalizace. Z tohoto důvodu jsme pro porovnání respirace zvolili relativní ukazatele, jako jsou FCR (Flux Control Ratio) a FCE (Flux Control Efficiency). FCR vyjadřuje relativní intenzitu respirace v daném stavu poměrově k referenčnímu stavu, obvykle nejvyšší hodnotě respirace. Výhodou je, že takto získaná hodnota je nezávislá na množství mitochondrií a typu mitochondriálního preparátu, což umožňuje objektivní srovnání mezi vzorky nebo skupinami. FCE pak hodnotí změnu respiračního toku mezi dvěma stavy, tedy efekt daného metabolického zásahu (např. přidání ADP) na zvýšení respirace. Je to rozdíl respirace dvou sousedních stavů, normalizovaný vůči stimulovanému stavu. Díky tomu FCE ukazuje, jak účinně mitochondrie využívají příslušný substrát, tedy o kolik procentlepší daný substrát respiraci oproti výchozímu stavu. Tento přístup je vhodný zejména tehdy, když chceme porovnat účinnost aktivace nebo inhibice respirace mezi různými buněčnými typy, mitochondriálními preparáty či podmínkami. Oba tyto parametry umožňují analýzu i v případech, kdy jsou absolutní hodnoty velmi rozdílné. Z praktického hlediska tedy platí, že FCR se používá pro porovnání „profilu“ respirace mezi skupinami (stav vůči maximu) a FCE je užitečný k porovnání účinku specifického zásahu (změna vůči výchozímu stavu). Zavedení těchto standardizovaných parametrů je klíčové pro hodnocení bioenergetických rozdílů, zejména v komplexních modelech zahrnujících různé tkáně nebo buněčné systémy (Gnaiger, 2020).

Mitochondrie jsou hlavním místem buněčného metabolismu, ale jejich struktura, funkce a počet se výrazně liší podle toho, o jaký typ tkáně se jedná. Každá tkáň má jiné nároky na energii a specifické metabolické dráhy. Například srdeční sval potřebuje stálý vysoký přísun energie, a proto je bohatý na mitochondrie a oxidační fosforylace je pro jejich funkci naprosto esenciální. Kardiomyocyty obsahují tisíce mitochondrií, které tvoří až 30–40 % buněčného objemu. Z hlediska enzymatické výbavy vynikají vysokou aktivitou cytochrom-c oxidázy (komplex IV) a karnitin-palmitoyltransferázy I, což podporuje efektivní β -oxidaci mastných kyselin – hlavního zdroje energie srdečního svalu (Fernández-Vizarra et al., 2011). Zvláštní postavení mají játra, která se přizpůsobují různým metabolickým stavům organismu a regulují množství živin v krvi. Při hladovění, jaterní mitochondrie oxidují ve zvýšené míře mastné kyseliny a z acetylkoenzymu A syntetizují ketolátky, probíhá zde také glykogenolýza

a glukoneogeneze Po jídle zpracovávají přijatou glukózu, syntetizují glykogen, TAG a lipoprotein o velmi nízké hustotě. Kromě toho se podílejí na odstraňování amoniaku prostřednictvím cyklu kyseliny močové. Mitochondrie v játrech fungují jako regulační uzly, které pomáhají udržovat homeostázu. Vysoké zastoupení enzymů jako je glutamátdehydrogenáza a ornithin transkarbamoyláza je pro hepatocyty typické (Herbers et al., 2019). Specifický roli hrají i mitochondrie mozku. Neurony jsou citlivé na výkyvy v zásobování ATP a jejich metabolismus se liší od podpůrných buněk, jako jsou astrocyty. Ty využívají více glykolýzu, zatímco neurony spoléhají na oxidaci glukózy a laktátu. To vytváří metabolickou spolupráci, která je typická právě pro mozkovou tkáň. Neurální mitochondrie vykazují vysokou aktivitu komplexu I (NADH dehydrogenázy), která je však současně i zdrojem zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku (Carinci et al., 2021). Kosterní svalovina má rozlišné typy vláken – oxidativní typ I (pomalejší, vytrvalostní) má vyšší obsah mitochondrií a enzymů jako je citrátsyntáza, zatímco glykolytická vlákna (typ II) spoléhají více na anaerobní metabolismus a mají mitochondrií méně (Fernández-Vizarra et al., 2011). Trombocyty nemají jádro, ale obsahují několik mitochondrií (obvykle 5–7 na jednu buňku), které jim umožňují produkovat ATP a regulovat aktivaci, agregaci i apoptózu. Jsou metabolicky velmi aktivní a flexibilní, co se týká preference energetických substrátů. Jejich metabolismus je relativně jednoduchý, ale velmi účelný – využívají jak glykolýzu, tak oxidativní fosforylaci v závislosti na dostupnosti kyslíku a energetické potřebě. V jejich mitochondriích je aktivní například cytochrom c oxidáza i ATP-syntáza, přestože v menším množství než v energeticky náročných tkáních (Picard, 2021). Mitochondrie destiček mají také poměrně malé množství respiračního komplexu III a IV, takže i nepatrné poškození může mít zásadní význam pro jejich funkci (Petrus et al., 2019). Rozdíly mezi tkáněmi se tedy projevují nejen v počtu mitochondrií, ale i v jejich metabolické výbavě a schopnosti pružně reagovat na měnící se podmínky. Tato přirozená variabilita je klíčem k pochopení fyziologických i patologických procesů.

V rámci této práce byly porovnány respirační parametry izolovaných mitochondrií a jaterního homogenátu s využitím SUIIT RP1 a RP2. Velmi důležitým zjištěním je, že homogenát vykazuje s mitochondriemi srovnatelnou respirační aktivitu. Příprava homogenátu je výrazně jednodušší a nevede ke ztrátám mitochondriálních subpopulací. To je v souladu s výsledky Kondrashova et al. (2001), kteří prokázali, že mitochondrie v jaterním homogenátu zůstávají uspořádány do funkčně významných filament a zachovávají si stabilní oxidativní fosforylaci, membránový potenciál i substrátovou fosforylaci. Pecinová et al. (2011) navíc ukazují, že homogenát zachycuje prakticky veškerou mitochondriální biomasu, na rozdíl od klasické izolace, při níž může dojít ke ztrátě až 60–90 % mitochondrií.

Na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že jaterní homogenát je plně použitelný pro hodnocení mitochondriálních funkcí. Výsledky potvrzují, že použití homogenátu nevede k podhodnocení respirační aktivity a zároveň umožňuje zachytit mitochondrie všechny subpopulace mitochondrií.

Výsledky této práce potvrdily, že dieta západního stylu významně snižuje mitochondriální respiraci aktivovanou sukcinátem v jaterních homogenátech myší ve srovnání s kontrolní dietou ($p < 0,001$). Respirační aktivita aktivovaná sukcinátem odráží funkční stav SDH, respiračního komplexu II mitochondriálního respiračního řetězce, který hraje klíčovou roli v přímém propojení Krebsova cyklu s oxidativní fosforylací a je ideálním místem pro regulaci obou na sobě úzce závislých drah. Pokles respirace tedy naznačuje možnou dysfunkci SDH v játrech myší vystavených WD dietě. Tyto výsledky odpovídají pozorováním Staňkové et al. (2021, 2020), kteří popsali podobné snížení respirace aktivované sukcinátem v játrech myší s MASLD indukované dietou západního stylu. Autoři rovněž prokázali, že krmení myší WD dietou snížilo aktivitu sukcinátdehydrogenázy a genovou i proteinovou expresi podjednotek SDH a vedlo k akumulaci sukcinátu. Sukcinát je dnes považován za signální prozánětlivou a profibrogenní molekulu a onkometabolit a tento mechanismus může významně přispívat k progresi MASLD (Tretter et al., 2016; Bezawork-Geleta et al., 2017). Získané výsledky jsou v souladu s výsledky těchto studií a podporují hypotézu, že dieta západního stylu bohatá na tuky a cukry vede k významnému narušení jaterních mitochondriálních funkcí, konkrétně aktivity SDH. Tato skutečnost zdůrazňuje význam mitochondriální dysfunkce jako kritického faktoru v rozvoji obezity a metabolických onemocnění a naznačuje potenciální terapeutické cíle zaměřené na mitochondrie.

Srovnání mitochondriální respirace mezi HepG2 buňkami, potkaními hepatocyty a lidskými krevními destičkami odhalilo výrazné rozdíly v aktivitě respiračního řetězce a ve využití jednotlivých substrátů. Potkaní hepatocyty vykazovaly nejvyšší hodnoty respirace, zejména při oxidaci sukcinátu, což odráží vysokou aktivitu komplexu II (SDH) typickou pro jaterní tkáň. Tato vysoká aktivita SDH je v souladu s fyziologickou funkcí jater v oxidativním metabolismu (Kondrashova et al., 2013). Oproti tomu HepG2 buňky, jakožto nádorová linie, měly výrazně nižší aktivitu komplexu II a celkově nižší oxidační kapacitu. Tyto buňky upřednostňují glykolýzu a postrádají schopnost adaptovat se na metabolickou zátěž podobně jako normální hepatocyty. Studie Maseko et al., 2024 ukázala, že zatímco HepaRG a primární hepatocyty reagují na expozici volným mastným kyselinám zvýšením aktivity komplexů I a II a stimulací β -oxidace, u HepG2 buněk tento efekt pozorován nebyl. Krevní destičky, přestože mají relativně nízkou celkovou oxidační kapacitu, vykazují vyšší relativní aktivaci respirace

po přidavku NADH-dependentních substrátů (malát, pyruvát, glutamát) než HepG2 buňky. Z toho vyplývá, že u destiček funguje komplex I efektivněji než u HepG2, a že schopnost oxidovat NADH hraje důležitou roli při jejich mitochondriální aktivitě. Destičky navíc využívají glycerol-3-fosfátdehydrogenázu (GPDH), která přenáší elektrony přímo na koenzym Q a tím obchází komplex I. Tento alternativní vstup elektronů je v destičkách aktivní a přispívá k jejich mitochondriální respiraci (Siewiera et al. 2021). V hepatocytech je rovněž v porovnání s HepG2 buňkami signifikantně výraznější kapacita ketogeneze (**Graf 8d**, FCE – RP2 oct, $p < 0,01$). FCR pro oktanolykarnitin v protokolu RP2, který odráží kapacitu ketogeneze však u hepatocytů vyšší nebylo, z důvodu vysoké aktivity sukcinátdehydrogenázy a respirace aktivované sukcinátem (**Graf 8b**), což zároveň demonstruje důležitost použití obou relativních parametrů v hodnocení mitochondriální respirace u různých typů vzorků. nebylo u hepatocyty. Absolutní hodnoty respirace v hepatocytech byly nejvyšší ze všech typů buněk. U HepG2 buněk byla respirace výrazně nižší a respirace aktivovaná sukcinátem zde nebyla dominantní, jako v případě hepatocytů. HepG2 mají tedy v porovnání s primárními hepatocyty omezenou oxidační kapacitou a rozdílný metabolismus mastných kyselin, což limituje jejich využití jako modelového systému pro studium MASLD. Destičky sice vykazovaly nízké absolutní hodnoty respirace, z důvodu výrazně nižšího počtu mitochondrií, a je zde patrná dominance NADH-dependentních substrátů. Prokázali jsme, že destičky vykazují v porovnání s jaterními mitochondriálními preparáty relativně vysokou respiraci aktivovanou glycerofosfátem (**Graf 8**). Zdá se, že mitochondrie destiček jsou schopné dynamicky reagovat na dostupný substrát, i když v omezeném rozsahu (Siewiera et al. 2021). Z výsledků vyplývá, že krevní destičky vykazují zvýšenou aktivitu GPDH, která umožňuje přenos elektronů z cytosolického NADH do mitochondriálního dýchacího řetězce prostřednictvím FADH₂. Tato cesta – známá jako glycerol-3-fosfátový člunek obchází komplex I, a tudíž může být v destičkách aktivována i v případě, že je tento komplex inhibován (Lin et al., 2020). Relativně vyšší aktivace NADH-dependentních substrátů a GP v těchto buňkách naznačuje, že GPDH hraje v destičkách důležitou roli při zajištění mitochondriální respirace. Tento předpoklad byl potvrzen srovnáním dvou substrátových protokolů (RP1 a RP2), které se lišily pořadím přidání glycerol-3-fosfátu a rotenonu, specifického inhibitoru komplexu I. V RP1, kde byl rotenon přidán před GP, došlo k výrazné inhibici respirace. Naproti tomu v RP2, kde byl GP přidán dříve, byla inhibice dýchací aktivity rotenonem nižší a výsledky nebyly statisticky významné. Tento rozdíl lze vysvětlit tím, že GP je v destičkách efektivně metabolizován GPDH, která není rotenonem inhibována. Přítomnost GP v RP2 tedy umožňuje pokračující tok elektronů do dýchacího řetězce i přes inhibici komplexu I. Význam glycerol-3-fosfátového člunku byl prokázán

i v klinických studiích. Lin et al. (2020) popsali, že cyklistický trénink u pacientů s periferním arteriálním onemocněním zvyšuje mitochondriální bioenergetiku destiček, pravděpodobně i díky většímu zapojení GPDH. Palacka et al. (2022) ukázali, že u pacientů s urotheliálním karcinomem dochází ke změnám mitochondriální respirace a přestavbě bioenergetiky destiček. Na tyto poznatky navazuje i práce Hsu et al. (2019), kde bylo prokázáno, že pohybová intervence zlepšuje funkční stav mitochondrií v destičkách pacientů po cévní mozkové příhodě. Všechny tyto studie naznačují, že destičky vykazují vysokou metabolickou plasticitu a schopnost adaptace, která může zahrnovat právě aktivaci GPDH jako náhradního mechanismu při poruše komplexu I. Souhrnně lze říci, že mezi jednotlivými buněčnými typy existují zásadní rozdíly ve využití substrátů. Hepatocyty mají vysokou aktivitu komplexu II a kapacitu pro ketogenezi, HepG2 buňky preferují spíše NADH-dependentní substráty a vykazují omezenou oxidační kapacitu. Destičky, ač respiračně méně výkonné, jsou schopny efektivně aktivovat mitochondriální respiraci přes NADH-dependentní substráty a GPDH. Tyto rozdíly je třeba zohlednit při hodnocení dat a výběru vhodného buněčného modelu pro studium mitochondriální funkce.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na porovnání mitochondriální respirace u různých modelových systémů v kontextu steatotického jaterního onemocnění spojeného s metabolickou dysfunkcí (MASLD). Mitochondrie hrají zásadní roli v buněčném energetickém metabolismu a jejich dysfunkce je považována za jeden z hlavních patogenetických mechanismů MASLD. Cílem této práce bylo zjistit, jak se mitochondriální aktivita liší mezi jednotlivými modely z hlediska jejich možného využití pro studium tohoto onemocnění

Pomocí vysokoúčinné respirometrie byla hodnocena respirace u izolovaných mitochondrií, jaterních homogenátů, primárních hepatocytů, buněčné linie HepG2 a lidských trombocytů. Všechny stanovené cíle se podařilo naplnit. Výsledky ukázaly, že jednotlivé modely se výrazně liší ve schopnosti oxidace substrátů a v aktivitě jednotlivých respiračních komplexů. Bylo potvrzeno, že dieta západního typu má negativní vliv na mitochondriální respiraci, zejména v oblasti komplexu II. Zároveň se potvrdilo, že homogenáty jater mohou sloužit jako praktická alternativa k izolovaným mitochondriím při analýze mitochondriální respirace, protože zachovávají jejich funkční charakteristiky a umožňují jednodušší manipulaci.

Z hlediska buněčných modelů vykazovaly nejvyšší respirační aktivitu primární hepatocyty, zatímco HepG2 buňky jsou méně aktivní a mají odlišný metabolický profil. Popsali jsme rovněž energetický profil trombocytů, což je důležité zejména v kontextu jejich možného využití jako snadno dostupného a neinvazivního modelu pro sledování změn mitochondriálních funkcí u různých systémových onemocnění včetně MASLD.

V průběhu experimentů bylo nutné optimalizovat některé metodické postupy, zejména izolaci trombocytů.

Získané poznatky mohou přispět k lepšímu pochopení patofyziologie MASLD a k rozvoji nových diagnostických či terapeutických strategií zaměřených na mitochondrie.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ALKHOURI, N.; CARTER-KENT, Ch. a FELDSTEIN, A. E.: Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. **2014**, roč. 5, č. 2, s. 201-212. ISSN 1747-4124. Dostupné z: <https://doi.org/10.1586/egh.11.6>.
2. ALVES-BEZERRA, M.; COHEN, D. E.: Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol*. **2017**, roč. 8, č. 1, s. 1-8. PMID: 29357123; PMCID: PMC6376873. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>.
3. BANERJEE, R.; PURHONEN, J. a KALLIJÄRVI, J.: The mitochondrial coenzyme Q junction and complex III: biochemistry and pathophysiology. *The FEBS Journal*. **2022**, roč. 289, č. 22, s. 6936-6958. ISSN 1742-464X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/febs.16164>.
4. BEZAWORK-GELETA, A.; ROHLENA, J.; DONG, L.; PACAK, K.; et al.: Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. *Trends in Biochemical Sciences*. **2017**, roč. 42, č. 4, s. 312-325. ISSN 09680004. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.003>.
5. BERTHELOOT, D., E. LATZ a B. S. FRANKLIN.: Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*. **2021**, roč. 18, č. 5, s. 1106-1121 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1672-7681. Dostupné z: [doi:10.1038/s41423-020-00630-3](https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3).
6. BRAND, M. D.: The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*. **2010**, roč. 45, č. 7-8, s. 466-472. ISSN 05315565. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>.
7. BRAND, M. D. a NICHOLLS, D. G.: Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*. **2011**, roč. 435, č. 2, s. 297-312. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>.
8. CARINCI, M.; VEZZANI, B.; PATERGNANI, S.; LUDEWIG, et al.: Different Roles of Mitochondria in Cell Death and Inflammation: Focusing on Mitochondrial Quality Control in Ischemic Stroke and Reperfusion. *Biomedicines*. **2021**, roč. 9, č. 2. ISSN 2227-9059. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020169>.
9. CAUSSY, C.; REEDER, S. B.; SIRLIN, C. B. a LOOMBA, R.: Noninvasive, Quantitative Assessment of Liver Fat by MRI-PDF as an Endpoint in NASH Trials. *Hepatology*. **2018**, roč. 68, č. 2, s. 763-772. ISSN 0270-9139. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/hep.29797>.

10. DAS, J.: The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *BioEssays*. **2006**, roč. 28, č. 9, s. 890-901. ISSN 0265-9247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bies.20463>.
11. DOERRIER, C.; GARCIA-SOUZA, L. F.; KRUMSCHNABEL, G.; WOHLFARTER, Y.; et al.: High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria. *Mitochondrial Bioenergetics. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, **2018**, s. 31-70. ISBN 978-1-4939-7830-4. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_3.
12. DVOŘÁK, K.: Noninvasive diagnostics of liver diseases - imaging methods. *Vnitřní lékařství*. **2019**, roč. 65, č. 9, s. 539-545. ISSN 0042773X. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/vnl.2019.094>.
13. FERNÁNDEZ-VIZARRA, E.; ENRÍQUEZ, J. A.; PÉREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J. a FERNÁNDEZ-SILVA, P.: Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. *Mitochondrion*. **2011**, roč. 11, č. 1, s. 207-213. ISSN 15677249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.011>.
14. FILLINGAME, R. H.; ANGEVINE, Ch. M. a DMITRIEV, O. Y.: Mechanics of coupling proton movements to c -ring rotation in ATP synthase. *FEBS Letters*. **2003**, roč. 555, č. 1, s. 29-34. ISSN 0014-5793. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01101-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01101-3).
15. FLESSA, Ch.; NASIRI-ANSARI, N.; KYROU, I.; LECA, B. M.; et al.: Genetic and Diet-Induced Animal Models for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Research. *International Journal of Molecular Sciences*. **2022**, roč. 23, č. 24. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms232415791> .
16. FRIEDMAN, S. L.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; RINELLA, M. a SANYAL, A. J.: Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*. **2018**, roč. 24, č. 7, s. 908-922. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>.
17. GINÈS, P.; KRAG, A.; ABRALDES, J. G; SOLÀ, E.; et al.: Liver cirrhosis. *The Lancet*. **2021**, roč. 398, č. 10308, s. 1359-1376. ISSN 01406736. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01374-X).
18. GNAIGER, E.: Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respiration Physiology*.

- 2001**, roč. 128, č. 3, s. 277-297. ISSN 00345687. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00307-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00307-3).
19. GNAIGER, E.: Mitochondrial pathways and respiratory control: An introduction to OXPHOS analysis. *Bioenergetics Communications*. **2020**, roč. 2, s. 1–36. Dostupné z: <https://doi.org/10.26124/bec:2020-0002>. ISSN 2409-1180.
20. HADRAVA VÁŇOVÁ, K.; KRAUS, M.; NEUŽIL, J. a ROHLENA, J.: Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy. *Redox Report*. **2020**, roč. 25, č. 1, s. 26-32. ISSN 1351-0002. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/13510002.2020.1752002>.
21. HARRISON, S. A. a DUBOURG, J.: Liver biopsy evaluation in MASH drug development: Think thrice, act wise. *Journal of Hepatology*. **2024**, roč. 81, č. 5, s. 886-894. ISSN 01688278. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.06.008>.
22. HASSAN, S.; SEBASTIAN, S.; MAHARJAN, S.; LESHA, A.; et al.: Liver-on-a-Chip Models of Fatty Liver Disease. *Hepatology*. **2020**, roč. 71, č. 2, s. 733-740. ISSN 0270-9139. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/hep.31106>.
23. HERBERS, E.; KEKÄLÄINEN, N. J.; HANGAS, A.; POHJOISMÄKI, J. L. a GOFFART, S.: Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression. *Mitochondrion*. **2019**, roč. 44, s. 85-92. ISSN 15677249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.01.004> .
24. HEYENS, L. JM; BUSSCHOTS, D.; KOEK, G. H.; ROBAEYS, G. a FRANQCUE, S.: Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment. *Frontiers in Medicine*. **2021**, roč. 8. ISSN 2296-858X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.615978> .
25. HOUTEN, S. M. a WANDERS, R. J. A.: A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. **2010**, roč. 33, č. 5, s. 469-477. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9061-2>.
26. HUDSON, D.; AFZAAL, T.; BAULBANAT, H.; ALRAMDÁN, R.; et al.: Modernizing metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease diagnostics: the progressive shift from liver biopsy to noninvasive techniques. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. **2024**, roč. 17. ISSN 1756-2848. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/17562848241276334> .

27. HUTTER, E.; UNTERLUGGAUER, H.; GAREDEW, A.; JANSENDURR, P. a GNAIGER, E.: High-resolution respirometry—a modern tool in aging research. *Experimental Gerontology*. **2006**, roč. 41, č. 1, s. 103-109. ISSN 05315565. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.09.011>.
28. HSU, Ch.; TSAI, H.; FU, T. a WANG, J.: Exercise Training Enhances Platelet Mitochondrial Bioenergetics in Stroke Patients: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Medicine*. **2019**, roč. 8, č. 12. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm8122186>.
29. CHABAN, Y., E. J. BOEKEMA a N. V. DUDKINA.: Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. **2014**, 1837(4), 418-426. ISSN 00052728. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bbabi.2013.10.004.
30. CHEAH, M. CC; MCCULLOUGH, A. J. a GOH, G. B.: Current Modalities of Fibrosis Assessment in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. **2017**, roč. 20, č. 20, s. 1-11. ISSN 2225-0719. Dostupné z: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2017.00009>.
31. CHOI, I.; SON, H. a BAEK, J.: Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle Intermediates: Regulators of Immune Responses. *Life*. **2021**, roč. 11, č. 1. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life11010069>.
32. KONDRASHOVA, M.N.; FEDOTCHEVA, N.I.; SAAKYAN, I.R.; SIROTA, T.V.; et al.: Preservation of native properties of mitochondria in rat liver homogenate. *Mitochondrion*. **2001**, roč. 1, č. 3, s. 249-267. ISSN 15677249. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(01\)00025-3](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(01)00025-3).
33. KUČERA, O.: Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World Journal of Gastroenterology*. **2014**, roč. 20, č. 26. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i26.8364>.
34. LI, Y.; YANG, P.; YE, J.; XU, Q.; et al.: Updated mechanisms of MASLD pathogenesis. *Lipids in Health and Disease*. 2024, roč. 23, č. 1. ISSN 1476-511X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12944-024-02108-x>.
35. LIN, M.; FU, T.; HSU, C.; HUANG, S.; LIN, Y.; WANG, J.: Cycling exercise training enhances mitochondrial bioenergetics of platelets in patients with peripheral arterial disease: A randomized controlled trial. *Preprints*, 2020070567. **2020**. Dostupné z: <https://doi.org/10.20944/preprints202007.0567.v1>

36. MAILLOUX, R. J.: An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants*. **2020**, roč. 9, č. 6. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox9060472>.
37. MARTÍNEZ-REYES, I. a CHANDEL, N. S.: Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*. **2020**, roč. 11, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>.
38. MASEKO, T.; ELKALAF, M.; PETEROVÁ, E.; LOTKOVÁ, H.; et al.: Comparison of HepaRG and HepG2 cell lines to model mitochondrial respiratory adaptations in non-alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Medicine*. **2023**, roč. 53, č. 2. ISSN 1107-3756. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2023.5342>.
39. MAZZOLINI, G.; SOWA, J.; ATORRASAGASTI, C.; KÜCÜKOGLU, Ö; et al.: Significance of Simple Steatosis: An Update on the Clinical and Molecular Evidence. *Cells*. **2020**, roč. 9, č. 11. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells9112458>.
40. MOTA, M.; BANINI, B. A.; CAZANAVE, S. C. a SANYAL, A. J.: Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. **2016**, roč. 65, č. 8, s. 1049-1061. ISSN 00260495. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.014>.
41. MÜLLER, F. A. a STURLA, S. J.: Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Toxicology*. **2019**, roč. 16, s. 9-16. ISSN 24682020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.03.001>.
42. MURPHY, M. P.: How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. **2009**, roč. 417, č. 1, s. 1-13. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
43. MUSILOVÁ, V.: Tkáňově specifické rozdíly mitochondrií. Bakalářská práce, vedoucí Mgr. Pavla Staňková, Ph.D. Univerzita Pardubice Studentská 95 532 10 Pardubice 2: Univerzita Pardubice, **2023**.
44. NOLFI-DONEGAN, D., A. BRAGANZA a S. SHIVA.: Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*. **2020**, ISSN 22132317. Dostupné z: doi: 10.1016/j.redox.2020.101674.
45. PALACKA, P.; GVOZDJÁKOVÁ, A.; RAUSOVÁ, Z.; KUCHARSKÁ, J.; et al.: Platelet Mitochondrial Bioenergetics Reprogramming in Patients with Urothelial Carcinoma.

- International Journal of Molecular Sciences. **2022**, roč. 23, č. 1. ISSN 1422-0067.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23010388>.
46. PECINOVÁ, A.; ALÁN, L.; BRÁZDOVÁ, A.; VRBACKÝ, M.; et al.: Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase in Metabolic Adaptations of Prostate Cancer. *Cells*. **2020**, roč. 9, č. 8. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells9081764> .
47. PECINOVÁ, A.; DRAHOTA, Z.; NŮSKOVÁ, H.; PECINA, P. a HOUŠTĚK, J.: Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion*. **2011**, roč. 11, č. 5, s. 722-728. ISSN 15677249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.05.006>.
48. PETRUŞ, A.; LIGHEZAN, D.; DĂNILĂ, M.; DUICU, O.; et al.: Assessment of Platelet Respiration as Emerging Biomarker of Disease. *Physiological Research*. **2019**, s. 347-363. ISSN 1802-9973. Dostupné z: <https://doi.org/10.33549/physiolres.934032>.
49. PICARD, M.: Blood mitochondrial DNA copy number: What are we counting? *Mitochondrion*. **2021**, roč. 60, s. 1-11. ISSN 15677249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.06.010>.
50. PIEL, S.; EHINGER, J. K.; CHAMKHA, I.; FROSTNER, E. Å.; et al.: Bioenergetic bypass using cell-permeable succinate, but not methylene blue, attenuates metformin-induced lactate production. *Intensive Care Medicine Experimental*. **2018**, roč. 6, č. 1. ISSN 2197-425X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40635-018-0186-1> .
51. PROTASONI, M. a ZEVIANI, M.: Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, roč. 22, č. 2. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22020586>.
52. RAMANATHAN, R.; PATWA, S. A.; ALI, A. H. a IBDAH, J. A.: Thyroid Hormone and Mitochondrial Dysfunction: Therapeutic Implications for Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD). *Cells*. **2023**, roč. 12, č. 24. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells12242806>.
53. RAMOS, M. J.; BANDIERA, L.; MENOLASCINA, F. a FALLOWFIELD, J. A.: In vitro models for non-alcoholic fatty liver disease: Emerging platforms and their applications. *Science*. **2022**, roč. 25, č. 1. ISSN 25890042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103549>.
54. RUI, L.: Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*. **2014**, roč.4, č. 1, s. 177–197. ISSN 2040-4603. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>.

55. SHI, S.; WANG, L.; VAN DER LAAN, L.; PAN, Q. a VERSTEGEN, M.: Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Liver Transplantation and Underlying Diseases: New Insights and Therapeutics. *Transplantation*. **2021**, roč. 105, č. 11, s. 2362-2373. ISSN 0041-1337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003691> .
56. SIEWIERA, K.; LABIENIEC-WATALA, M.; WOLSKA, N.; KASSASSIR, H. a WATALA, C.: Sample Preparation as a Critical Aspect of Blood Platelet Mitochondrial Respiration Measurements—The Impact of Platelet Activation on Mitochondrial Respiration. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, roč. 22, č. 17. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22179332> .
57. SORET, P.; MAGUSTO, J.; HOUSSET, Ch. a GAUTHERON, J.: In Vitro and In Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Critical Appraisal. *Journal of Clinical Medicine*. **2021**, roč. 10, č. 1. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm10010036>.
58. SOUSA, J. S.; D'IMPRIMA, E. a VONCK, J.: Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Membrane Protein Complexes: Structure and Function. Subcellular Biochemistry*. Singapore: Springer Singapore, **2018**, s. 167-227. ISBN 978-981-10-7756-2. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7.
59. STAŇKOVÁ, P.; KUČERA, O.; PETEROVÁ, E.; ELKALAF, M.; et al.: Western Diet Decreases the Liver Mitochondrial Oxidative Flux of Succinate: Insight from a Murine NAFLD Model. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, roč. 22, č. 13. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22136908>.
60. STAŇKOVÁ, P.; KUČERA, O.; PETEROVÁ, E.; LOTKOVÁ, H.; et al.: Adaptation of Mitochondrial Substrate Flux in a Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, roč. 21, č. 3. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21031101> .
61. SUZUKI, A. a DIEHL, A. M.: Nonalcoholic Steatohepatitis. *Annual Review of Medicine*. **2017**, roč. 68, č. 1, s. 85-98. ISSN 0066-4219. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051215-031109>.
62. TILG, H. a MOSCHEN, A. R.: Evolution of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Multiple Parallel Hits Hypothesis. *Hepatology*. **2010**, roč. 52, č. 5, s. 1836-1846. ISSN 0270-9139. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/hep.24001>.
63. TRETTER, L.; PATOCS, A. a CHINOPOULOS, Ch.: Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. **2016**, roč. 1857, č. 8, s. 1086-1101. ISSN 00052728. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2016.03.012>.
64. VAN ERPECUM, K. J. a DALEKOS, G. N.: New horizons in the diagnosis and management of patients with MASLD. *European Journal of Internal Medicine*. **2024**, roč. 122, s. 1-2. ISSN 09536205. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2024.01.038>.
65. WALKER, J. E.: The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*. **2013**, 41(1), 1-16 [cit. 2023-05-05]. ISSN 0300-5127. Dostupné z: [doi:10.1042/BST20110773](https://doi.org/10.1042/BST20110773).
66. WEISSGERBER, T. L.; MILIC, N. M.; WINHAM, S. J. a GAROVIC, V. D.: Beyond Bar and Line Graphs: Time for a New Data Presentation Paradigm. *PLOS Biology*. **2015**, roč. 13, č. 4. ISSN 1545-7885. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002128>.
67. WESTERLUND, E.: Clinical tests of metabolic dysfunction: with focus on blood respirometry and lactate. Disertační práce. Faculty of Medicine at Lund University: Lund University. **2025**. Dostupné z: https://portal.research.lu.se/files/209185020/Thesis_LU_2025_25_Westerlund_without_paper_IV_and_appendix.pdf.
68. WONG, V. W.; CHAN, W.; CHITTURI, S.; CHAWLA, Y.; et al.: Asia-Pacific Working Party on Non-alcoholic Fatty Liver Disease guidelines 2017—Part 1: Definition, risk factors and assessment. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **2018**, roč. 33, č. 1, s. 70-85. ISSN 0815-9319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jgh.13857>.
69. XU, H.; WAN, S.; AN, Y.; WU, Q.; et al.: Targeting cell death in NAFLD: mechanisms and targeted therapies. *Cell Death Discovery*. **2024**, roč. 10, č. 1. ISSN 2058-7716. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02168-z>.
70. YAZICI, D. a SEZER, H.: Obesity and Lipotoxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing. **2017**, s. 277-304. ISBN 978-3-319-48380-1. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_12.
71. YOON, I.; HAN, J. H. a JEON, H.: Advances in Platelet-Dysfunction Diagnostic Technologies. *Biomolecules*. **2024**, roč. 14, č. 6. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom14060714>.
72. YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; et al.: Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. **2016**, roč. 64, č. 1, s. 73-84. ISSN 0270-9139. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.

73. ZAKHARCHENKO, M. V.; ZAKHARCHENKO, A. V.; KHUNDERYAKOVA, N. V.; TUTUKINA, M. N.; et al.: Burst of succinate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase activity in concert with the expression of genes coding for respiratory chain proteins underlies short-term beneficial physiological stress in mitochondria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **2013**, roč. 45, č. 1, s. 190-200. ISSN 13572725. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.07.003> .
74. ZHANG, T.; NIE, Y. a WANG, J.: The emerging significance of mitochondrial targeted strategies in NAFLD treatment. *Life Sciences*. **2023**, roč. 329. ISSN 00243205. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121943>.
75. ZHAO, R.; JIANG, S.; ZHANG, L. a YU, Z.: Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. **2019**. ISSN 1107-3756. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>.
76. ZHOU, T.; OREŠIČ, M.; LEIVONĚN, M.; GOPALACHARYULU, P.; et al.: Noninvasive Detection of Nonalcoholic Steatohepatitis Using Clinical Markers and Circulating Levels of Lipids and Metabolites. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. **2016**, roč. 14, č. 10, s. 1463-1472.e6. ISSN 15423565. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.05.046> .
77. ZONCAPÈ, M.; LIGUORI, A. a TSOCHATZIS, E. A.: Non-invasive testing and risk-stratification in patients with MASLD. *European Journal of Internal Medicine*. **2024**, roč. 122, s. 11-19. ISSN 09536205. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2024.01.013>.