

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Hradci Králové

**Farmakologické a metabolické ovlivnění  
funkce jaterních mitochondrií**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce: MUDr. Ondřej Sobotka

Školitelka: Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.

Školitel konzultant: Doc. MUDr. Otto Kučera, Ph.D.

Hradec Králové

2017

Charles University

Faculty of Medicine in Hradec Kralove

**Pharmacological and metabolic influence on  
liver mitochondrial functions**

PhD Thesis

Author: MUDr. Ondřej Sobotka

Tutor: Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.

Consultant: As. Prof. MUDr. Otto Kučera, Ph.D.

Hradec Kralove

2017

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou dizertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

## Poděkování

Chtěl bych poděkovat své školitelce prof. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc. za vedení, zájem a čas, který mi během mého postgraduálního studia věnovala a také, že mě důsledně a trpělivě motivovala ke splnění všech mých dosavadních povinností. Dále bych chtěl poděkovat svému školiteli konzultantovi doc. MUDr. Otto Kučerovi, Ph.D. za cenné rady v začátcích mé laboratorní praxe a metodologické připomínky, které mi po celou dobu poskytoval. Také bych chtěl poděkovat dvěma velkým bioenergetickým „guru“ RNDr. Zdeňkovi Drahotovi, DrSc. a prof. Erichovi Gnaigerovi za to, že mě přivedli k mitochondriím. Bez nich by tato práce byla zaměřena úplně jiným směrem.

Velké poděkování patří mým rodičům, kteří mě vychovali, dali mi cenné vzdělání a od malička ve mně podněcovali zájem o umění, přírodu a medicínu. Speciální poděkování patří mému otci za to, že mě přivedl k fyziologii a vzbudil ve mně lásku k vědě.

Poděkování patří také celému kolektivu ústavu fyziologie a hlavně současným i bývalým členům skupiny Experimentální hepatologie, se kterými jsem vždycky rád spolupracoval a kteří mi nikdy neváhali pomoci s prováděním experimentů. Jmenovitě jsou to Pavla Staňková, René Endlicher, Vojta Mezera, Halka Lotková, Alča Moravcová, David Rychtrmoc, Jana Ondráková, Majka Vaculová, Monika Pospíšilová a Ivanka Altmannová.

V poslední řadě bych chtěl poděkovat všem mým spolubojovníkům v postgraduálním studiu, kteří mi dodávali tolik potřebnou motivaci vydržet a pokračovat: Pavle, Evčo, Ondro, Tomáši, Ivo, Zdendo, Mossi, Honzo, Timi, András, Caro, Luiz, Hanno, Lisi, Anjo, Kristine, Beáto a Pedro – Díky!

## Seznam zkratek

3BP	- 3-brompyruvát
ACC	- acetyl-CoA karboxyláza
ADP	- adenosindifosfát
AMP	- adenosinmonofosfát
AMPK	- AMP-dependentní proteinkináza
ATP	- adenosintrifosfát
BSA	- bovinní sérový albumin
CoA	- koenzym A
COX	- cytochrom c oxidáza
CPT	- karnitinpalmitoyltransferáza
DMSO	- dimethylsulfoxid
EDTA	- ethylendiaminotetraoctová kyselina
EGTA	- etylenglykoltetraoctová kyselina
$E_h$	- redoxní potenciál
ERR	- z angl. „ <i>estrogen-related receptors</i> “
ETF	- elektron transportující flavoprotein
FABP	- z angl. „ <i>fatty acid binding protein</i> “
FAS	- syntáza mastných kyselin (z angl. „ <i>fatty acid synthase</i> “)
FCCP	- karbonylkyanid-4-(trifluorometoxy)fenylhydrazon
FCR	- z angl. „ <i>flux control ratio</i> “
GPDH	- glycerofosfátdehydrogenáza
HEPES	- N-2-hydroxyetylpiiperazin-N'-2-etansulfová kyselina
HFD	- vysokotuková dieta
ChREBP	- z angl. „ <i>carbohydrate-responsive element binding protein</i> “
IMM	- vnitřní mitochondriální membrána
IMS	- prostor mezi mitochondriálními mebránami
JC-1	- jodid tetraethylbenzimidazolylkarbonyanu
K.I	- komplex I
K.II	- komplex II
K.III	- komplex III
K.IV	- komplex IV

K.V	- ATP syntáza
KC	- Krebsův cyklus
LDH	- laktátdehydrogenáza
MMP	- mitochondriální membránový potenciál
Mr	- molekulární hmotnost
mPTP	- z angl. „ <i>mitochondrial permeability transition pore</i> “
Mt	- mitochondrie
MTTP	- z angl. „ <i>microsomal triglyceride transfer protein</i> “
NAD <sup>+</sup>	- nikotinamidadenindinukleotid oxidovaná forma
NADH	- nikotinamidadenindinukleotid redukovaná forma
NADP <sup>+</sup>	- nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaná forma
NADPH	- nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaná forma
NAFLD	- z angl. „ <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> “
NRF	- z angl. „ <i>nuclear respiratory factor</i> “
OMM	- vnější mitochondriální membrána
PGC-1	- z angl. „ <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator</i> “
PPAR	- z angl. „ <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> “
RCR	- z angl. „ <i>respiratory control ratio</i> “
ROS	- reaktivní formy kyslíku (z angl. „ <i>reactive oxygen species</i> “)
RP	- referenční protokol
SD	- směrodatná odchylka (z angl. „ <i>standard deviation</i> “)
SDH	- sukcinátdehydrogenáza
SREBP-1c	- z angl. „ <i>sterol regulatory element-binding protein – 1c</i> “
TAG	- triacylglyceroly
TOS	- $\alpha$ -tokoferylsukcinát
VLDL	- lipoproteiny s velmi nízkou denzitou (angl. „ <i>very low density lipoproteins</i> “)
VMK	- volné mastné kyseliny
WP	- titrační destičky
WST-1	- tetrazoliová sůl 4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonát

## Obsah

Čestné prohlášení .....	1
Poděkování .....	
Seznam zkratk .....	
Obsah .....	
1. Úvod .....	1
1.1. Játra .....	2
1.1.1. Struktura jater .....	2
1.1.2. Funkce jater .....	5
1.2. Mitochondrie.....	13
1.2.1. Struktura mitochondrií .....	14
1.2.2. Krebsův cyklus a vznik redukčních kofaktorů .....	18
1.2.3. Mitochondriální respirační systém a tvorba ATP .....	21
1.2.4. Apoptóza .....	33
1.2.5. Regulace mitochondriální biogeneze .....	36
1.3. Látky s protinádorovým účinkem cílené na mitochondrie .....	38
1.3.1. 3-Brompyruvát.....	38
1.3.2. $\alpha$ -Tokoferylsukcinát.....	40
1.4. Nealkoholová jaterní steatóza.....	42
1.4.1. Epidemiologie a příčiny nealkoholové jaterní steatózy .....	42
1.4.2. Patofyziologie nealkoholové jaterní steatózy .....	43
Cíle práce: .....	47
2. Metody.....	48
2.1. Použité chemikálie a média .....	48
2.1.1. Roztoky a média použité v dizertační práci .....	48
2.2. Příprava vzorků.....	51

2.2.1.	Zvířata .....	51
2.2.2.	Izolace hepatocytů .....	52
2.2.3.	Příprava jaterního homogenátu a izolace mitochondrií .....	55
2.3.	Buněčné kultury .....	56
2.3.1.	Příprava kultur .....	56
2.3.2.	Biochemické testy na buněčných kulturách .....	57
2.3.3.	Mikroskopické hodnocení buněčných kultur .....	58
2.4.	Laboratorní metody pro zhodnocení mitochondriálních funkcí .....	59
2.4.1.	Hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu .....	59
2.4.2.	Fluorescenční sonda Safranin O .....	59
2.4.3.	Respirometrie.....	60
2.5.	Statistické zpracování naměřených dat .....	66
3.	Výsledky .....	69
3.1.	Vliv 3-brompyruvátu na hepatocyty potkana a myši .....	69
3.1.1.	Toxicita 3-brompyruvátu na hepatocyty potkana .....	69
3.1.2.	Přímý účinek 3-brompyruvátu na funkce jaterních mitochondrií potkana .....	75
3.1.3.	Vliv 3-brompyruvátu na izolované hepatocyty myši.....	83
3.2.	Vliv $\alpha$ -tokoferylsukcinátu na respiraci jaterních mitochondrií.....	86
3.2.1.	Vliv $\alpha$ -tokoferylsukcinátu na kapacitu respirace v OXPHOS a ETS stavu .....	87
3.2.2.	Srovnání účinku $\alpha$ -tokoferolsukcinátu v různých experimentálních modelech .....	87
3.3.	Vliv vysokotukové diety na respiraci jaterních mitochondrií.....	89
3.3.1.	Změny jater po krmení vysokotukovou dietou.....	89
3.3.2.	Vliv vysokotukové diety na respiraci jaterních mitochondrií .....	92
4.	Diskuze .....	102
4.1.	Vliv nových protinádorových látek na jaterní mitochondrie .....	102
4.1.1.	<i>In vitro</i> účinek 3-brompyruvátu na nádorové a nenádorové buňky .....	102
4.1.2.	<i>In vitro</i> účinek $\alpha$ -tokoferylsukcinátu na nádorové a nenádorové buňky.....	105

4.1.3.	Porovnání účinků obou antineoplastických látek .....	106
4.2.	Nealkoholová jaterní steatóza u potkana .....	107
4.2.1.	Vliv vysokotukové diety na respiraci jaterních mitochondrií .....	107
5.	Závěry .....	111
6.	Použitá literatura .....	113

## 1. Úvod

Játra a mitochondrie. Orgán a organela. Dvě nenahraditelné části celku. Jedna na makroskopické úrovni mnohobuněčného organismu, druhá na mikroskopické úrovni každé eukaryotické buňky. Obě jednotky hrají klíčovou roli v udržování buněčných procesů a homeostázy, ať již tuto problematiku budeme posuzovat z pohledu buněčného biologa či lékaře. Není proto divu, že právě funkce jaterních mitochondrií je velmi fascinující problematikou při studiu fyziologie člověka.

Játra jsou vitálním orgánem všech obratlovců a i některých bezobratlých živočichů. Jsou největším parenchymovým orgánem lidského těla a mají nezastupitelnou úlohu v metabolismu většiny substrátů a živin. Zároveň jsou v játrech syntetizovány plazmatické proteiny, které jsou nezbytné pro řadu procesů. Jde zejména o zajištění imunitních funkcí, krevní srážlivosti, transportu mnoha látek endogenního i exogenního původu a správné zajištění regulačních procesů organismu. Játra jsou současně hlavním orgánem biotransformace a detoxikace organismu. V játrech se tvoří i látky potřebné pro správné trávení a resorpci tuků ve střevě. Nenahraditelná je současně role jater, jako místa krvetvorby v počátečním období života.

Mitochondrie jsou organelami eukaryotických buněk, které zastávají ústřední místo v regulaci homeostázy vnitrobuněčného prostředí. V mitochondriích se může tvořit až 90% veškerého buněčného adenosintrifosfátu (ATP). Mitochondrie mají současně i řadu jiných funkcí; do značné míry se podílí na regulaci cytoplazmatické koncentrace vápenatých iontů, hrají důležitou roli v programované smrti buňky, produkují, ale zároveň jsou schopny likvidovat velké množství reaktivních forem kyslíku (ROS). Jaterní mitochondrie tak zastávají ústřední místo nejen v regulaci lokální intracelulární homeostázy hepatocytů, ale následně se i podílejí na metabolickém stavu celého lidského organismu. Z medicínského hlediska může tak metabolické nebo farmakologické ovlivnění funkce jaterních mitochondrií mít přímý vliv na míru toxického poškození jater, na průběh metabolických, gastrointestinálních, nádorových a civilizačních chorob.

Vědecké přístupy používané při studiu mitochondriální fyziologie můžeme rozdělit na metody prováděné *in vivo* a *in vitro*. Přístup ke studiu mitochondrií v podmínkách *in vitro* je finančně a časově méně náročný ve srovnání s experimenty prováděnými *in vivo*.

Práce s izolovanými mitochondriemi *in vitro* však naráží na určité limity. Izolované mitochondrie ztrácejí vzájemný kontakt, který je typický pro uspořádání mitochondrií v buňce. Chybí rovněž vztahy k ostatním organelám, což může významně modulovat mitochondriální funkce v podmínkách *in vitro*. Studie prováděné na izolovaných mitochondriích však mají nezastupitelnou úlohu v pilotních studiích, kdy *in vitro* metody dávají možnost mnoha opakování a modifikací postupů, které jsou v experimentech prováděných *in vivo* nemožné.

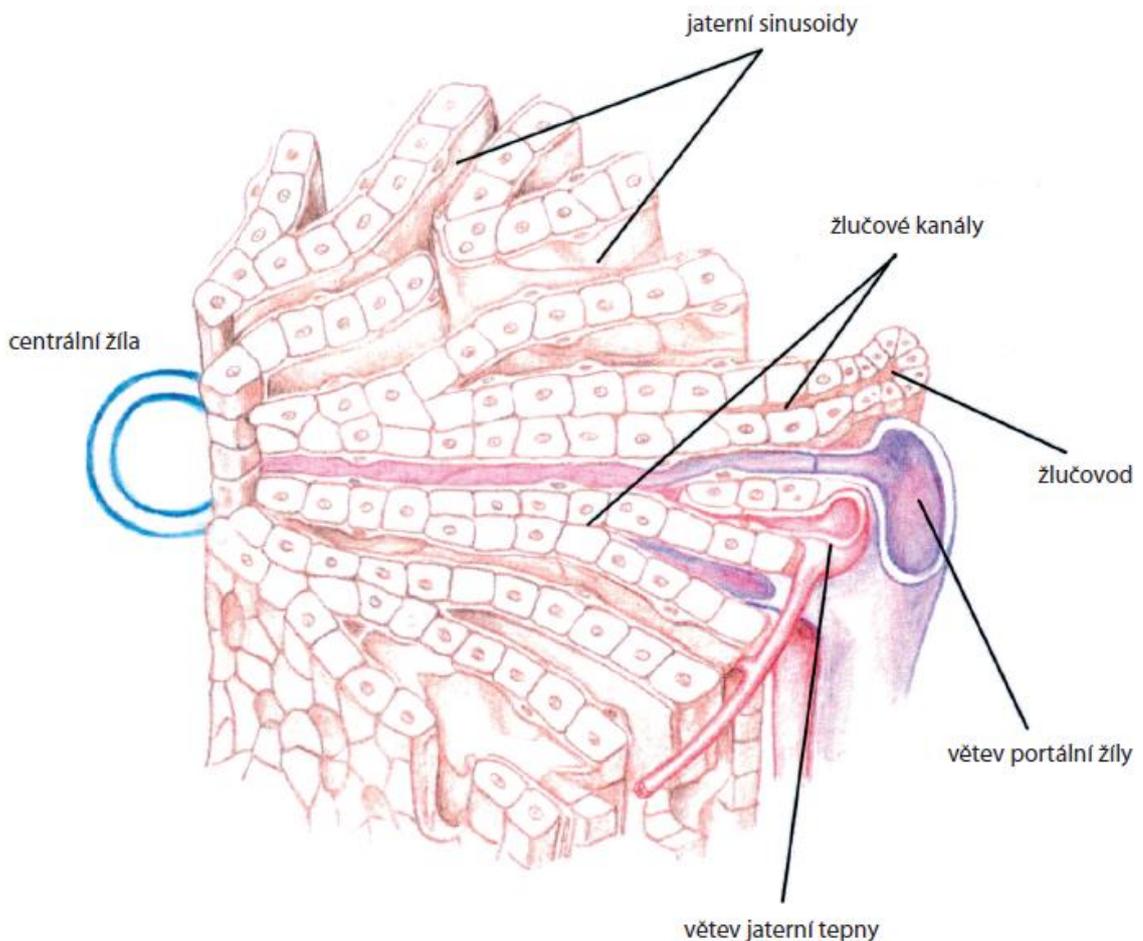
## **1.1. Játro**

Jak ji bylo řečeno v úvodu, játra mají nezastupitelnou úlohu v intermediárním i energetickém metabolismu a podílejí se na metabolické přeměně většiny látek v těle. Svými četnými funkcemi jsou játra nepostradatelná pro řadu život zajišťujících procesů. Kromě klíčové úlohy v metabolismu mezi ně patří tvorba a vylučování žluči, biotransformace a detoxikace látek exogenního a endogenního původu, vaskulární funkce, podíl na zajištění imunitních reakcí, endokrinní funkce, kterou představuje tvorba, skladování a přeměna signálních molekul a neposlední řadě probíhá v játrech ve fetálním období života krvetvorba.

### **1.1.1. Struktura jater**

Játra mají červeno-hnědou barvu a u dospělého člověka tvoří cca 2 – 3 % jeho celkové tělesné hmotnosti (tj. 1,2 – 1,5 kg u ženy a 1,5 – 1,8 kg u muže); to je činní nejtěžším vnitřním orgánem lidského těla a největší žlázou vůbec. Játra mají tvar trojbokého jehlanu uloženého na bok a jsou umístěna intraperitoneálně v pravém horním kvadrantu břišní dutiny, vrchní stranou přiléhají k bránici, zprava k žaludku a spodní stranou na tlusté střevo, dvanáctník a ledvinu s nadledvinou. Téměř po celé své ploše kryje játra peritoneum, které vytváří lesklý serózní povlak zvaný *tunica serosa*, ta je těsně spojena pevným obalem jater – *tunica fibrosa*, neboli *capsula Glissoni*. Tento fibrózní obal poté přechází ve vazivo uvnitř jater a přímo doprovází jaterní triádu, sestávající se z portální žíly, jaterní arterie a žlučových kanálků. Anatomicky odlišujeme na játrech dvě části: *Facies diaphragmatica* (stranu přiloženou k bránici) a *facies visceralis* (stranu obrácenou k břišním orgánům). Játra jsou rozdělena na čtyři hlavní laloky (*lobus dexter*, *lobus sinister*, *lobus quadratus* a *lobus caudatus*) a osm menších segmentů. Důležitou anatomickou strukturou jater je žlučník, ve kterém se koncentruje a střeďá žluč.

Játra jsou zásobena krví ze žilního a tepenného systému (portální žíla a jaterní tepna). Portální systém zajišťuje funkční oběh jater. Portální žíla do jater přivádí žilní krev z viscerální oblasti; portální krev s sebou přináší do jater živiny z trávicího ústrojí, ale i hormony z pankreatu a tkáňové působky a buňky ze sleziny. Tepenný oběh jater je zajištěn *a. hepatica propria*, která se odděluje z *truncus coeliacus* cestou *a. hepatica communis*. Odtok žilní krve z jater je společný pro funkční i nutritivní oběh, které se spojují na úrovni jaterních sinusoid. Jaterní žíly společně ústí do dolní duté žíly na horním pólu jater po asi 1 cm dlouhém úseku mimo jaterní parenchym. Levá a střední jaterní žíla se přitom asi v 70 % případů spojí do společného kmene ještě před vyústěním do dolní duté žíly (Šafka V., 2010). Základní histologickou stavební jednotkou jaterního parenchymu je jaterní lalůček. Jde o strukturu o délce několika milimetrů a o průměru 0,8 – 2 mm, která se skládá z jednotlivých hepatocytů uspořádaných odstředivě od centrální žíly. Játra dospělého člověka obsahují zhruba 50 – 100 tisíc jaterních lalůčků (Červinková Z., 2010). Jaterní lalůček má ve svém středu centrální žílu, která je odstředivě lemována destičkami hepatocytů. Každá destička je tvořena dvěma vrstvami hepatocytů, mezi kterými se nachází žlučový kanálek ústící do žlučovodu na periferii jaterního lalůčku (obrázek 1). V septech mezi jaterními lalůčky se nacházejí i další struktury: terminální portální venuly, terminální jaterní arterioly, lymfatické cévy a nervy. Mezi destičkami hepatocytů vždy na jejich krevním pólu se nacházejí jaterní sinusoidy, ze kterých tok smíšené krve pokračuje směrem k centrální žíle. Jaterní sinusoidy jsou lemovány dvěma typy buněk: Kupfferovými a endotelovými buňkami. Prostor mezi endotelovými buňkami a hepatocyty nazýváme Disseho prostor.



**Obrázek 1. Schéma jaterního lalůčku.**

Převzato z (Červinková Z., 2010)

Z funkčního hlediska tvoří základní jednotku jater portální acinus. Portální acinus je nepravidelný mikroskopický útvar, jehož jednu osu tvoří linie mezi dvěma portálními triádami a druhou spojnice mezi dvěma centrálními žilami (Červinková Z., 2010). Jaterní acinus je zásobován krví ze dvou portálních triád a histologicky a funkčně se dále dělí na tři zóny: zóna I, která je nejbliže přívodným cévám a jako první přichází do styku s okysličenou krví a krví bohatou na živiny; přechodná zóna II; nejvzdálenější zóna III, ve které se nacházejí hepatocyty v blízkosti centrálních žil s progresivně sníženou koncentrací kyslíku a živin. Rozdílné složení mikroprostředí, ve kterém se hepatocyty v jednotlivých zónách nacházejí, má za důsledek rozdíl v aktivitě enzymatického vybavení těchto buněk. V hepatocytech I. periportální zóny (s vyšší koncentrací kyslíku a živin) převažují oxidační děje,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, katabolismus aminokyselin a tvorba močoviny, glykogenolýza, tvorba žluči, atd. Hepatocyty, které se nacházejí v blízkosti

centrální žíly, jsou oproti tomu charakteristické vyšší glykolytickou aktivitou, syntézou glykogenu, lipogenezí, ketogenezí, tvorbou glutaminu a biotransformačními reakcemi.

Histologicky jsou játra tvořena parenchymovými buňkami, hepatocyty, zhruba ze 60 – 80 %. Neparenchymové buňky tvoří zbylých 20 – 40 % z celkového množství buněk. Dělíme je na Kupfferovy buňky ( $\approx 20\%$ ), lymfocyty ( $\approx 25\%$ ), cholangiocyty ( $\approx 5\%$ ), Itovy buňky ( $< 1\%$ ) a zbylých přibližně 50 % tvoří fenestrované endotelové buňky LSEC (z angl. „*liver sinusoidal endothelial cells*“) (Červinková Z., 2010).

### **1.1.2. Funkce jater**

Játra se podílejí na stovkách různých metabolických a fyziologických procesů a jsou tak nenahraditelným orgánem lidského těla. Dojde-li k akutnímu jaternímu selhání, tak bez intenzivní lékařské pomoci smrt nastává během několika hodin. Jedinou spolehlivou náhradou jejich funkce je jaterní transplantace.

Jaterní funkce je možno rozdělit na:

- Syntetické funkce jater (např. tvorba plazmatických proteinů)
- Biotransformační funkce jater (úloha jater v metabolismu hlavních energetických substrátů, tvorba žluči, metabolismus a detoxikace xenobiotik apod.)
- Zásobní funkce jater (zejména stopové prvky a některé vitamíny)

#### **1.1.2.1. Syntetické funkce jater**

Jak již bylo zmiňováno v úvodu, v játrech se syntetizuje celá řada endogenních molekul. Jedná se o látky potřebné v metabolismu živin, které budou více rozebrány v následující kapitole. Dále jsou játra zodpovědná za tvorbu většiny proteinů krevní plazmy, řady hormonů, látek a enzymů potřebných k trávení potravy v gastrointestinálním traktu a také syntézu močoviny, hlavního degradačního produktu proteinů.

Hlavní bílkovinou krevní plazmy produkovanou v játrech je albumin, protein o molekulární hmotnosti 66,5 kDa, který tvoří více než polovinu celkového množství proteinů v plazmě o celkové koncentraci 35 – 50 g/l. Albumin se podílí zásadně na udržování onkotického tlaku plazmy, transportu steroidních hormonů, volných mastných kyselin (VMK), nekonjugovaného bilirubinu, celé řady léků a také kompetitivně váže kalciové ionty. V době fetálního vývoje plodu játra tvoří alfa-fetoprotein, který zastává

podobné funkce jako u narozeného dítěte a dospělého jedince albumin (Hengstler *et al.*, 2005).

Játra dále hrají klíčovou roli při syntéze látek nezbytných jak pro stimulaci srážení krve tak i její inhibici a degradaci krevní sraženiny – fibrinolýzu. Všechny koagulační faktory se tvoří téměř výhradně v játrech s výjimkou faktoru VIII, který se částečně tvoří i v cévním endotelu. Pro tvorbu koagulačních faktorů II, VII, IX a X a antikoagulačně působícího proteinu S a proteinu C je nezbytná přítomnost vitamínu K. Ten funguje jako kofaktor pro enzym katalyzující karboxylaci glutamové kyseliny na kyselinu karboxyglutamovou; karboxylová skupina je nezbytná pro vazbu vápenatého kationtu a následný průběh koagulační kaskády. Vitamín K se během této karboxylace oxiduje. Zpětnou redukci oxidovaného vitamínu K katalyzuje enzym vitamin K-epoxid reduktáza, který tak opět navrácí vitamín K do jeho aktivní formy. Enzym K-epoxid reduktáza je inhibován antikoagulačními látkami, které tvoří skupinu kumarinů (King and Tran, 2015). Výsledkem této inhibice je neschopnost jater syntetizovat funkční faktory koagulační kaskády. Hlavním představitelem kumarinů je warfarin, který je běžně používán jako lék určený pro snížení krevní srážlivosti (Borkowski *et al.*, 2014).

Další skupinou látek syntetizovaných v játrech jsou proteiny, které ovlivňují zánětlivou a imunitní odpověď. Jde především o složky komplementu a proteiny akutní fáze jako  $\alpha$ -1 antitrypsin nebo C-reaktivní protein (CRP). Komplementový systém je součástí nespecifické imunity organismu a reprezentuje skupinu globulinů krevní plazmy, které stimulují zánětlivou reakci tím, že se mohou samy aktivovat v kaskádově probíhajících sekvencích (Janeway, 2001). Komplementový systém zvyšuje efekt protilátek navázaných na antigen a následně umožňuje fagocytům efektivně likvidovat mikroby a odstraňovat poškozené buňky lidského těla. Rovněž stimuluje zánětlivou reakci a také má sám schopnost destruovat bakteriální i somatické buňky perforací jejich membrány (Janeway, 2001). C-reaktivní protein je především důležitý opsonin, na který se váží různé látky typu antigenů nebo imunokomplexů. Vzhledem k tomu že je jeho koncentrace významně ovlivněna zánětlivým procesem, je CRP v klinické medicíně využíván jako indikátor zánětlivé reakce v organismu (Straatman *et al.*, 2015).

V játrech se také tvoří mnoho látek hormonální povahy. Příkladem je trombopoetin, hepcidin, inzulinu podobný růstový faktor, proenzym angiotenzinogen, erythropoetin a další. K důležitým transportním proteinům syntetizovaných v játrech patří

zejména ceruloplasmin, retinol vázající protein, transferin, vitamin D vázající protein a podobně.

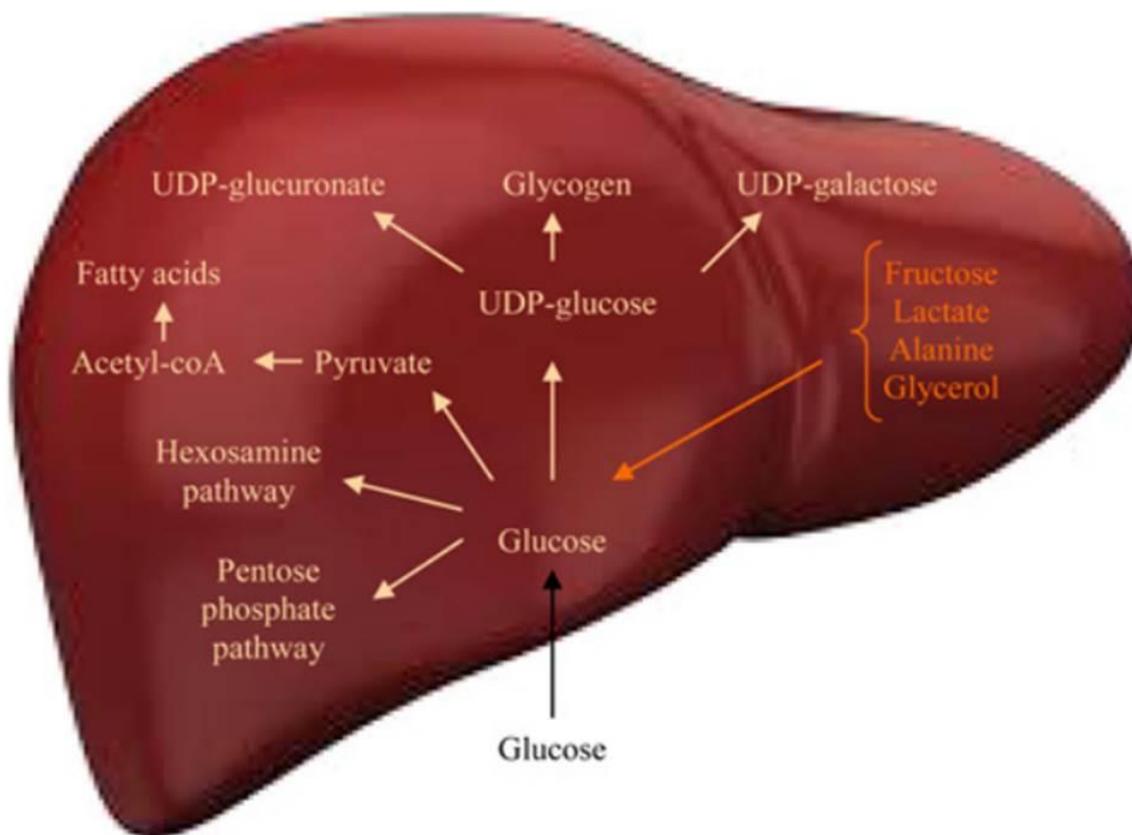
Játra jsou nezbytná pro katabolismus hemu, tvorbu močoviny nebo jsou místem pro tvorbu žlučových kyselin a žluči.

### **1.1.2.2. Metabolická funkce jater**

Játra mají zásadní úlohu při metabolismu jak základních živin, tak i celé řady dalších látek endogenního a exogenního původu. Vzhledem k zaměření této dizertační práce bude v úvodu věnována pozornost zejména těm biochemickým procesům, které se přímo nebo nepřímo týkají energetického metabolismu, a které jsou spojeny s fyziologií jaterních mitochondrií. Proto bude uveden metabolismus cukrů a tuků, zatímco metabolismus ostatních substrátů (aminokyselin, bilirubinu) uveden nebude.

#### **1.1.2.2.1. Glykolýza, glukoneogeneze a pentózový cyklus**

Játra se podstatnou mírou podílejí na metabolismu cukrů, zejména glukózy. Jsou orgánem, který zajišťuje udržování hladiny krevní glukózy, která je potřebná pro energetické ale i pro ostatní metabolické děje v organismu. Glukostatická funkce jater spočívá v jejich schopnosti udržovat hladinu glukózy v relativně úzkém fyziologickém koncentračním rozmezí. Játra mají schopnost ukládat glukózu v podobě glykogenu, v případě potřeby glukózu zpětně uvolnit procesem glykogenolýzy. Játra zvyšují hladinu glukózy nejen štěpením jaterního glykogenu, ale také mají schopnost glukózu syntetizovat z jiných substrátů - glukoneogeneze. Jde zejména o laktát (kyselinu mléčnou) ale i o glukoplastické aminokyseliny a glycerol (Adeva-Andany *et al.*, 2016). Syntéza glukózy v játrech může dosahovat až 10 g na kg tělesné hmotnosti denně. V převážné většině jde o tvorbu glukózy z kyseliny mléčné, což je v tomto případě glukoneogeneze Coriho cyklu (Russell and Young, 1990; Suhara *et al.*, 2015; Young, 2005). Obdobný význam má i syntéza glukózy z alaninu (alaninový cyklus) (Adeva-Andany *et al.*, 2016). Neoxidační cyklizace glukózy je patrná i v případě hladovění či diety s nízkým obsahem sacharidů (Coelho *et al.*, 2015) a významně stoupá zejména ve stresové situaci (Sun *et al.*, 2017). Přesný význam tohoto fenoménu nebyl zatím dostatečně objasněn.



**Obrázek 2. Přehled metabolismu glukózy v játrech.**

Převzato z (Adeva-Andany *et al.*, 2016)

Vzhledem k tomu, že proces glukoneogeneze je energeticky náročný, je energie potřebná k tomuto ději získávána převážně z oxidace masných kyselin. Naopak, játra zřejmě glukózu využívají jako energetický substrát pouze v případě, kdy sacharidy tvoří hlavní podíl přijaté stravy. V ostatních případech jsou játra energeticky závislá na tucích a sacharidy (glukózu) využívají k syntetickým procesům, jako je tvorba zásobního glykogenu, aminokyselin, glycerolu, nukleových kyselin a dalších (Adeva-Andany *et al.*, 2016).

Speciální metabolickou cestou glukózy je pentózový cyklus, který se podílí na tvorbě nukleových kyselin (ribóza a deoxyribóza) a NADPH, potřebné pro redukční a tedy anabolické procesy. Příkladem může být syntéza masných kyselin, která vyžaduje redukující ekvivalenty ve formě NADPH a v játrech zastává velké procento utilizace tohoto redukčního kofaktoru. NADPH může být také využit v obraně proti oxidačnímu

stresu, jakožto koncový donor elektronů při redukci oxidovaného glutathionu (GSH). S tímto druhým použitím NADPH se setkáme nejčastěji v erythrocytech (Rizvi *et al.*, 2009).

#### 1.1.2.2.2. $\beta$ -oxidace a lipogeneze

Mastné kyseliny jsou využívány jako zdroj energie v celé řadě buněk organismu. Játra však mají v metabolismu tuků unikátní úlohu hned z několika důvodů:

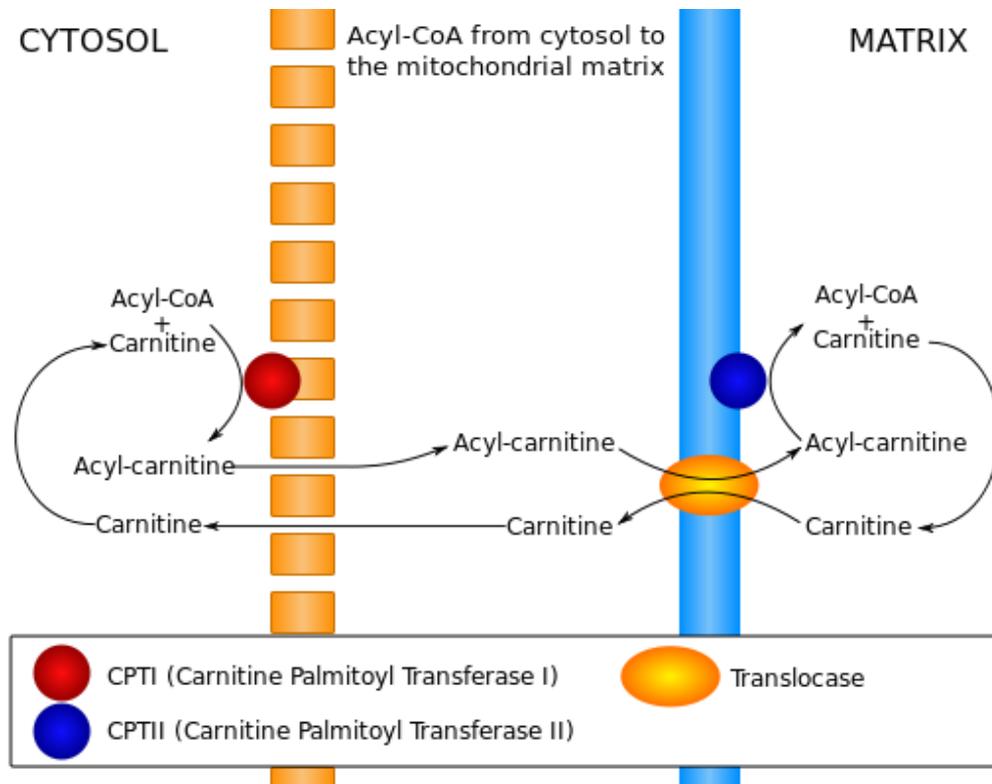
- ✓ Jsou v nich metabolizovány a syntetizovány lipoproteinové partikule
- ✓ Hrají důležitou roli v obratu mastných kyselin – cyklus játra - tuková tkáň
- ✓ Jsou v nich syntetizovány mastné kyseliny z prekursorů (zejména sacharidů) a prodlužovány mastné kyseliny se středním řetězcem
- ✓ Jsou místem produkce ketolátek potřebných pro organismus během hladovění
- ✓ Syntetizují velkou část cholesterolu

V jaterních mitochondriích probíhá  $\beta$ -oxidace masných kyselin, které jsou za normálních podmínek hlavním energetickým substrátem pro jaterní buňku. Při  $\beta$ -oxidaci vzniká z VMK acetyl-CoA, který může být následně utilizován v Krebsově cyklu, použit k syntéze ketolátek, cholesterolu nebo vstupuje do lipogeneze k tvorbě nových VMK (Lehninger *et al.*, 2005).

Pro vstup VMK s řetězcem delším než 12 uhlíků do mitochondrie je potřeba její vazba na karnitin. Tato reakce je rozdělena na tři kroky katalyzované rozdílnými enzymy. Prvním krokem katalyzuje enzym acyl-CoA syntáza, která je specifická pro VMK dle délky jejich řetězce (pro krátké, střední a dlouhé). Vzniklý ester VMK může být následně využit v cytoplasmě k tvorbě lipidových membrán, nebo je transportován do mitochondrie k oxidaci. V druhém případě je nutno využít karnitinový člunek.

Druhým krokem přestupu VMK do mitochondrie je reakce karnitin acyltransferázy, neboli karnitinpalmitoyltransferázy (CPT; podle karnitinpalmitoyl-CoA). CPT je mitochondriální transportér na vnější (izoforma CPT-1) a vnitřní (izoforma CPT-2) mitochondriální membráně. Po navázání acyl-CoA na CPT-1 vzniká acylkarnitin, který vstupuje do mitochondriální matrix facilitovanou difúzí pomocí acylkarnitin/karnitinového přenašeče. CPT-2 na vnitřní mitochondriální membráně následně oddělí karnitin a naváže zpět CoA k VMK, která je tímto připravena k  $\beta$ -oxidaci (Lehninger *et al.*, 2005). Vstup

VMK do mitochondriální matrix pomocí karnitinového přenašeče je rychlost limitujícím krokem v oxidaci mastných kyselin a bude mu věnována pozornost v další části, zaměřené na regulaci energetického metabolismu jater.



**Obrázek 2. Schéma transportu acyl-CoA z cytoplazmy do mitochondriální matrix**

Získáno z veřejně dostupné databáze *Creative Commons*.

Proces  $\beta$ -oxidace mastných kyselin v mitochondriální matrix zahrnuje čtyři hlavní enzymatické reakce: 1. Dehydrogenace; 2. Hydratace; 3. Dehydrogenace; 4. Uvolnění acetyl-CoA (Lehninger *et al.*, 2005). První dehydrogenace je katalyzována acyl-CoA-dehydrogenázou, což je enzym, který má tři izoformy odlišující se délkou řetězce VMK, kterou jsou schopny metabolizovat (s dlouhým, středním a krátkým řetězcem). Během této dehydrogenace se vytvoří dvojitá vazba mezi  $\alpha$  a  $\beta$  uhlíkem acyl-CoA a vznikne *trans*- $\delta^2$ -enoyl-CoA. Elektrony, které jsou při této reakci odebrány, jsou přeneseny na flavinový kofaktor elektron transportujícího flavoproteinu (ETF, viz dále) a pokračují přímo do elektron transportního systému vnitřní mitochondriální membrány s koncovou redukcí kyslíku. V druhém kroku  $\beta$ -oxidace se *trans*- $\delta^2$ -enoyl-CoA hydratuje molekulou vody za vzniku L-  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA, který následně podstupuje druhou dehydrogenaci, čímž se

vytváří  $\beta$ -ketoacyl-CoA a současně vzniká redukční kofaktor NADH. V poslední kroku  $\beta$ -oxidace katalyzovaném enzymem thiolázou se uvolňuje acetyl-CoA a původní acyl-CoA, který do  $\beta$ -oxidace vstupoval, je o dva uhlíky kratší (Lehninger *et al.*, 2005).

Lipogeneze (syntéza mastných kyselin) je proces, který probíhá v játrech a také v tukové tkáni. Základní stavební jednotkou je aktivovaný acetát a vlastní syntéza je podobná obrácené beta-oxidaci. Do procesu lipogeneze však nevstupuje výsledný produkt  $\beta$ -oxidace acetyl-CoA, nýbrž malonyl-CoA, který vzniká karboxylací dvou molekul acetyl-CoA. Tato reakce, katalyzovaná acetyl-CoA-karboxylázou (ACC), je rychlost limitujícím krokem lipogeneze a v hepatocytech je úzce regulovaná. Malonyl-CoA se poté pomocí syntázy mastných kyselin (FAS) přemění na VMK s dlouhým řetězcem (např. palmitát).

#### *1.1.2.2.3. Regulace metabolismu energetických substrátů*

Regulaci metabolismu tuků a cukrů společně s metabolismem bílkovin a ostatních substrátů, zajišťují lokální řídicí mechanismy a nervový a endokrinní systém. Na nervovém řízení metabolismu se podílí hlavně autonomní nervový systém. Hormonální regulaci na celotělové úrovni zajišťují hormony anabolické (inzulin, růstový hormon) a hormony katabolické (glukagon, kortizol a katecholaminy). Po požití smíšené stravy dochází ke zvýšené sekreci inzulínu, zatímco sekrece katabolických hormonů se snižuje. Zvýšená hladina glukózy a inzulínu v krvi pak v játrech potlačuje glukoneogenezi, a stimuluje tvorbu a ukládání glykogenu. Stimulačně na tvorbu glykogenu působí též aktivace parasympatického nervového systému. Pokud je množství sacharidů v dietě vysoké, dojde ke zvýšení *de novo* lipogeneze (Adeva-Andany *et al.*, 2016; Rui, 2014). Inzulin současně potlačuje  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin v mitochondriích a tvorbu ketolátek. Na tomto fenoménu se může podílet i inhibice transportu mastných kyselin do mitochondrií v důsledku zvýšené koncentrace malonyl-CoA, který inhibuje CPT-1. Inzulin snižuje hydrolyzu triacylglycerolů v periferní bílé tukové tkáni, kde naopak aktivuje lipoproteinovou lipázu a tímto mechanismem snižuje tok VMK do jater a naopak zvyšuje se vychytávání mastných kyselin v tukové tkáni (Lehninger *et al.*, 2005).

Zvýšená glykolýza produkuje zvýšené množství pyruvátu, který vstupuje do mitochondrií, kde se přeměňuje za přítomnosti pyruvátdehydrogenázového komplexu na acetyl-CoA a ten vstupuje do Krebsova cyklu. V Krebsově cyklu se spojí s oxalacetátem za současného vzniku trikarboxylové kyseliny citrátu. Pokud je ovšem kapacita Krebsova cyklu přijímat acetyl-CoA vyčerpána, tak je nezbytné regenerovat oxalacetát v cytosolu a

acetyl-CoA se takto dostává ven z mitochondrie, kde se může využít k syntéze VMK. V cytosolu buňky se acetyl-CoA přemění na malonyl-CoA, který následně inhibuje CPT-1 a  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin v mitochondriální matrix. Za tohoto postprandiálního stavu je tedy díky inzulinu acetyl-CoA vytvořený z glykolýzy, či degradací VMK přeměřován do lipogeneze na tvorbu dalších (nových) VMK. VMK, které nevstoupí do  $\beta$ -oxidace z důvodu inhibičního vlivu inzulinu, jsou následně přímo použity pro tvorbu triacylglycerolů a lipoproteinových částic (VLDL). Z dlouhodobého hlediska inzulin také stimuluje expresi metabolicky aktivního transkripčního faktoru SREBP-1c (z angl. „*sterol regulatory element-binding protein*“) a indukci exprese hlavního enzymu lipogeneze ACC.

Při hladovění se zvyšuje hladina glukagonu, katecholaminů a glukokortikoidů, což způsobuje zvýšení aktivity glukoneogenetických enzymů a stimulaci glukoneogeneze. Glukagon na rozdíl od inzulinu inhibuje a inaktivuje ACC prostřednictvím přímé aktivace AMP-dependentní proteinkinázy (AMPK). Toto má za následek inhibici tvorby malonyl-CoA, inhibici lipogeneze a upřednostnění  $\beta$ -oxidace a tvorby ATP z acetyl-CoA uvolněného z VMK. ATP je využito v glukoneogenezi k tvorbě glukózy a zabránění hypoglykemie. Zvýšený vstup VMK do jaterních mitochondrií má také za následek zvýšenou tvorbu ketolátek, a protože pro hrazení energetických potřeb hepatocytu je množství vytvořeného acetyl-CoA v naprostém přebytku, jsou ketolátky využity také pro hrazení energetických potřeb v periferních tkáních včetně mozku (Bak, 2017; Rui, 2014). PPAR $\alpha$  (z angl. „*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*“) je další transkripční faktor nezbytný pro zahájení a iniciaci glukagon dependentní  $\beta$ -oxidace. PPAR $\alpha$  je bohatě zastoupen v játrech a v hnědé tukové tkáni hrající důležitou roli v transkripční regulaci metabolismu tuků a cukrů a pomáhá k expresi genů regulující  $\beta$ -oxidaci (Kersten and Stienstra, 2017).

## 1.2. Mitochondrie

Mitochondrie jsou spojovány především s produkcí energie v buňkách všech eukaryotických buněk a širší veřejnosti jsou dobře známé jako „elektrárny buňky“. Méně známá je skutečnost, že mitochondrie není pouhým místem tvorby vysoce energetického ATP, ale že mitochondrie plní také řadu dalších funkcí důležitých pro každý organismus.

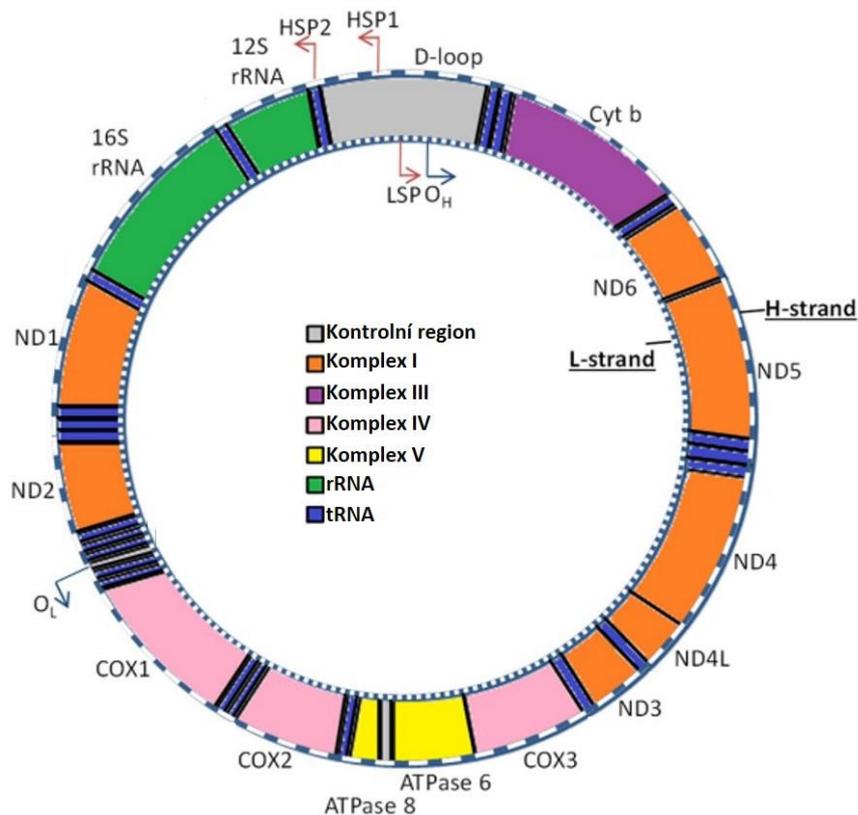
Od dob objevení mitochondrií roku 1840 (Ernster and Schatz, 1981) k prvnímu popisu jakožto „elektrárny buňky“ uplynulo více než sto let (Siekevitz, 1957). Především v posledních několika letech však výzkum fyziologie mitochondrií zažívá renesanci a dostává se do popředí vědeckého zájmu v mnoha biomedicínských oborech. Navzdory faktu, že mitochondrie produkují zhruba 90% veškerého buněčného ATP, byl názor, že náplní jejich funkce je výhradně tvorba ATP oxidativní fosforylací, vyvrácen poměrně nedávno. Recentně bylo prokázáno, že mitochondrie hrají důležitou roli v regulaci ROS (Breitenbach *et al.*, 2014), v homeostáze intracelulárního kalcia (Elustondo *et al.*, 2016; Hurst *et al.*, 2016), v procesu programované buněčné smrti (Green *et al.*, 2014; Van Aken and Van Breusegem, 2015), v intermediárním metabolismu buňky a vzniku některých metabolických chorob (Almeida *et al.*, 2015; Grattagliano *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2010), v procesu stárnutí (Breitenbach *et al.*, 2014), v nádorové transformaci buňky (Johnson and Perkins, 2012; Wallace, 2012; Yan *et al.*, 2015a) a řadě dalších specifických buněčných funkcí.

Jaterní mitochondrie jsou místem citrátového a močovinového cyklu, místem oxidace mastných kyselin a částečně i jejich syntézy a na své vnitřní membráně obsahují systém oxido-redukčně aktivních molekul, které jsou nezbytné nejen pro tvorbu ATP ale také správné plnění dalších mitochondriálních funkcí, které činí tuto buněčnou organelu nepostradatelnou.

V další části teoretického úvodu této dizertační práce se tedy zaměřím na popis struktury mitochondrií a na dílčí přiblížení popisu jejich funkcí. Pokusím zde se rozebrat biologicko-fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých součástí této komplexní organely.

### 1.2.1. Struktura mitochondrií

Mitochondrie jsou zcela jedinečnou organelou buňky; vynikají řadou unikátních strukturních vlastností a mají nezastupitelnou funkci pro jednotlivé buňky i pro celý organismus. Jako jediné buněčné organely disponují vlastní deoxyribonukleovou kyselinou - mtDNA (mitochondriální DNA, obrázek 3). Vzhledem k přítomnosti mtDNA mají mitochondrie k dispozici 37 genů a 16 569 párů bází, které jsou důležité pro syntézu 13 klíčových polypeptidů oxidativní fosforylace, 22 tRNA a dále 12S a 16S podjednotek ribosomální RNA pro syntézu mitochondriálních proteinů (Milane *et al.*, 2015; van der Wijst *et al.*, 2017). Každá mitochondrie obsahuje od dvou do deseti kopií cirkulární mtDNA a v eukaryotické buňce jich můžeme nalézt až pět set. Rozdílný počet mtDNA v jedné eukaryotické buňce nazýváme termínem polyplasmie; variabilitu a rozdíl v množství mitochondrií na jednu buňku zase termínem heteroplasmie (Milane *et al.*, 2015). Heteroplasmie a polyplasmie vytvářejí druhové a tkáňové rozdíly ve funkcích těchto komplexních organel, což je způsobeno tím, že mtDNA se replikuje nejen při dělení buňky, ale zároveň i v průběhu celého jejího života. Vzhledem k vyšší četnosti mutací v mtDNA dochází k fenotypově variabilnímu složení mitochondrií jednotlivých buněk. Tato vyšší četnost mutací je zapříčiněna nižší efektivitou kontrolních a opravných mechanismů ve srovnání s DNA v buněčném jádře. Tyto mutace mohou způsobit poruchu buněčné funkce a následná těžká doživotní onemocnění a ve fetálním období mohou být dokonce příčinou předčasné smrti vyvíjejícího se plodu (Schon *et al.*, 2012).



**Obrázek 3. Mitochondriální DNA.**

Převzato z (van der Wijst *et al.*, 2017)

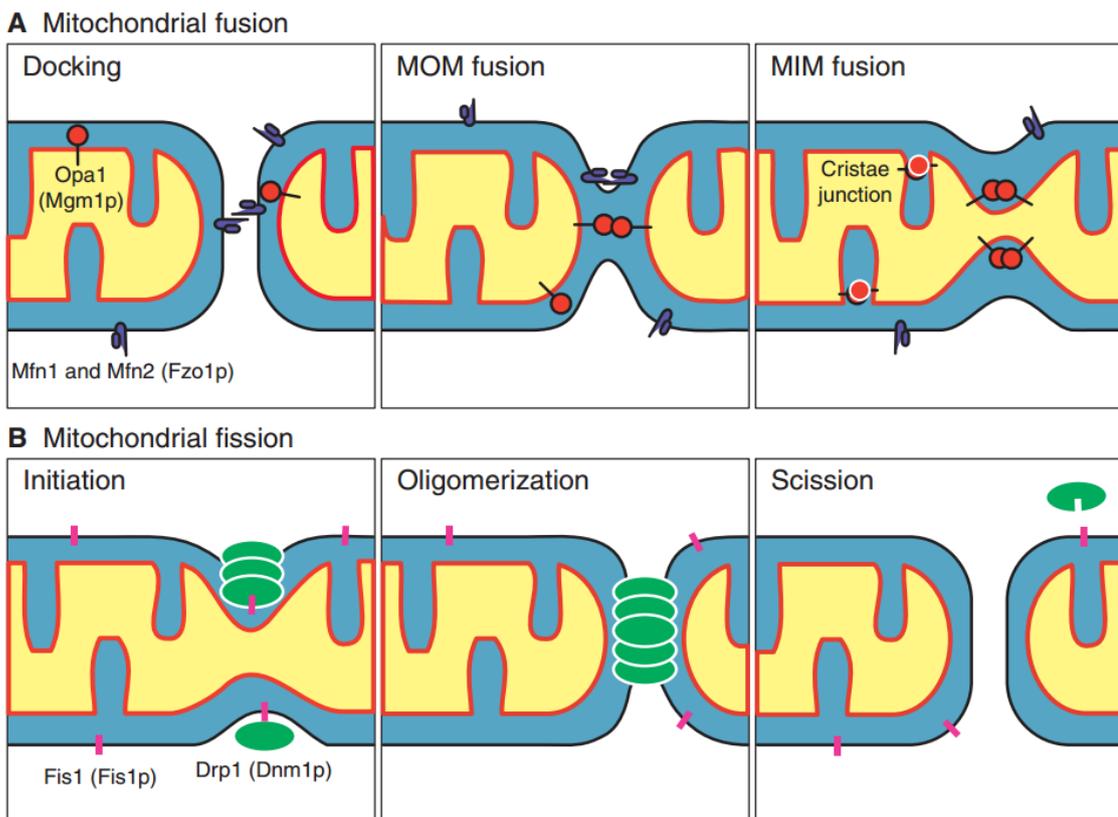
Heteroplasmie mitochondrií ale na druhou stranu kontroluje projev těchto mutací na úrovni buňky či celého organismu, pokud nedojde k patologické mutaci v podstatné části buněčných mitochondrií, které převládnu nad mitochondriemi zdravými, nemusí se nemoc projevit v plném rozsahu, či vůbec (Wilkins *et al.*, 2014). Na tomto místě se nabízí také úvaha, zda heteroplasmie a polyplasmie nepropůjčují mitochondriím jakousi roli v evoluci eukaryotických buněk. Mitochondrie díky drobným mutacím svého genomu získávají schopnosti lepší adaptace na nové podmínky a vzhledem k velkému počtu mitochondrií v buňce a jejich relativně rychlým vznikem a zánikem se může vyselektovat populace s „ideální“ mtDNA, která například získá rezistenci třeba proti protinádorovým lékům (Peng *et al.*, 2017). Tato selekce dovoluje buňce a následně i celému organismu adaptaci na náhle změněné životní podmínky, jako je například jiný zdroj výživy, nižší hladina kyslíku v prostředí nebo i třeba zvýšená fyzická námaha (Jacobs *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2014).

### 1.2.1.1. Mitochondriální membrány

Mitochondrie je dále jediná organela eukaryotické buňky se dvěma fosfolipidovými membránami; zevní mitochondriální membrána (OMM), která je složením velice podobná membráně cytoplazmatické, a pak vnitřní mitochondriální membrána (IMM), která je specifická nejen odlišným lipidovým složením, ale také obsahuje větší podíl membránových proteinů tvořících proteinové superkomplexy. IMM se v mitochondrii zakřivuje, přehýbá a vychlipuje směrem do mitochondriální matrix, čímž vytváří obraz dobře známých mitochondriálních krist patrných při zobrazení v elektronovém mikroskopu. Díky těmto kristám má IMM zajištěn velký povrch, na kterém mohou probíhat biochemické procesy včetně buněčného dýchání s následnou fosforylací ADP a tvorbou ATP. K membránovým specifickým mitochondrií patří i velmi fascinující schopnost jejich ustavičného pohybu. Jednak se mohou mitochondrie přesouvat v rámci buňky obousměrně podél mikrotubulů díky proteinu s GTPázovou aktivitou MIRO a jeho efektoru MILTON (Glater *et al.*, 2006). Mitochondrie spolu v rámci buňky také neustále splývají a rozdělují se, čímž vytvářejí jakousi mitochondriální síť, či podhoubí (Mishra and Chan, 2014). Hovořit proto o mitochondrii, jako o samostatně izolované organelce, lze tedy jen na teoretické úrovni; v živé buňce izolované mitochondrie samy o sobě prakticky neexistují. Přestože přesný mechanismus mitochondriálního splývání a rozdělování, dosud nebyl dostatečně objasněn, je v současnosti známo několik proteinů na IMM, OMM a také v mezimembránovém prostoru (IMS), které v procesu mitochondriálního splývání a mitochondriálního rozdělování hrají důležitou roli (Mishra and Chan, 2014).

Zevní mitochondriální membrána je svým fosfolipidovým a proteinovým složením blíže cytoplazmatické membráně a membránám dalších buněčných organel, se kterými dokonce vytváří přímá spojení (Manfredi and Kawamata, 2016). Pro přehlednost na tomto místě zmíníme strukturní membránový protein Mgm1, který udržuje stabilitu mitochondriálních krist (Meeusen *et al.*, 2006) a mitofusiny Mfn1 a Mfn2, které se podílejí na mitochondriálním splývání (Song *et al.*, 2009); a membránové proteiny *Dynamin related protein* (Drp1), Fis1, Mff, MiD49 a MiD51, které naopak zahajují mitochondriální rozdělování (Loson *et al.*, 2013; Milane *et al.*, 2015; Wada and Nakatsuka, 2016). Mitofusin Mfn2 vytváří také kontakty s hladkým endoplazmatickým retikulem a melanosomy (Manfredi and Kawamata, 2016; Milane *et al.*, 2015). Dalším strukturním proteinem vnitřní mitochondriální membrány, který plní důležitou úlohu v buněčném

splývání, je *Optic atrophy protein 1* (Opa1) (Seo *et al.*, 2010). Vyjma strukturních proteinů obsahuje zevní mitochondriální membrána také důležité metabolické enzymy. Jsou jimi např. hexokináza II a pyruvát dehydrogenázový komplex. Další kategorií proteinů zevní mitochondriální membrány jsou enzymy regulující programovanou buněčnou smrt, apoptózu. Řadíme mezi ně proteiny rodiny Bcl-2 (zkratka podle objevení v buňkách izolovaných z B-buněčného lymfomu, z angl. „*B-cell lymphoma*“): Proapoptotické Bak, Bax, Bid; a antiapoptotické Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> a Mcl-1 a další (Gross, 2016).



**Obrázek 4. Spojování a rozdělování mitochondrií**

Převzato z (Seo *et al.*, 2010)

Vnitřní mitochondriální membrána se oproti zevní mitochondriální membráně a dalším fosfolipidovým membránám eukaryotických buněk odlišuje vyšším procentuálním zastoupením proteinové složky, výskytem specifických fosfolipidů a také svou minimální propustností pro ionty, proteiny apod. čímž vytváří oddělený kompartment. Ze specifických proteinů jsou to obří multienzymové komplexy respiračního systému, o kterých bude řeč v následující kapitole věnované transportu elektronů a tvorbě ATP.

Z dalších proteinů jmenujme například adenin nukleotid translokázu (ANT, ADP/ATP translokáza), díky které se dostává ADP z cytosolu do mitochondriální matrix výměnou za ATP tvořené na matrixové straně vnitřní mitochondriální membrány. Dalším transportním proteinem zásobující mitochondrie prekurzory pro tvorbu ATP je fosfát transportující protein (Wohlrab, 2009). Hojně zastoupenou skupinou proteinů IMM tvoří rozpřahovací „*uncoupling*“ proteiny (UCP)(Busiello *et al.*, 2015; Lindquist *et al.*, 2017). Rozpřahovací proteiny jsou často specifické pro určitou tkáň, UCP1 hraje velice důležitou roli ve fyziologické termogenezi hnědé tukové tkáně (Warner and Mittag, 2016) a UCP2 a UCP3 jsou v popředí výzkumu díky jejich zvýšené expresi při oxidačním stresu za různých patologických situací (Jezek *et al.*, 2014; Pei *et al.*, 2016). Má se za to, že UCP způsobují snížení mitochondriální produkce ROS (Jezek *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2007).

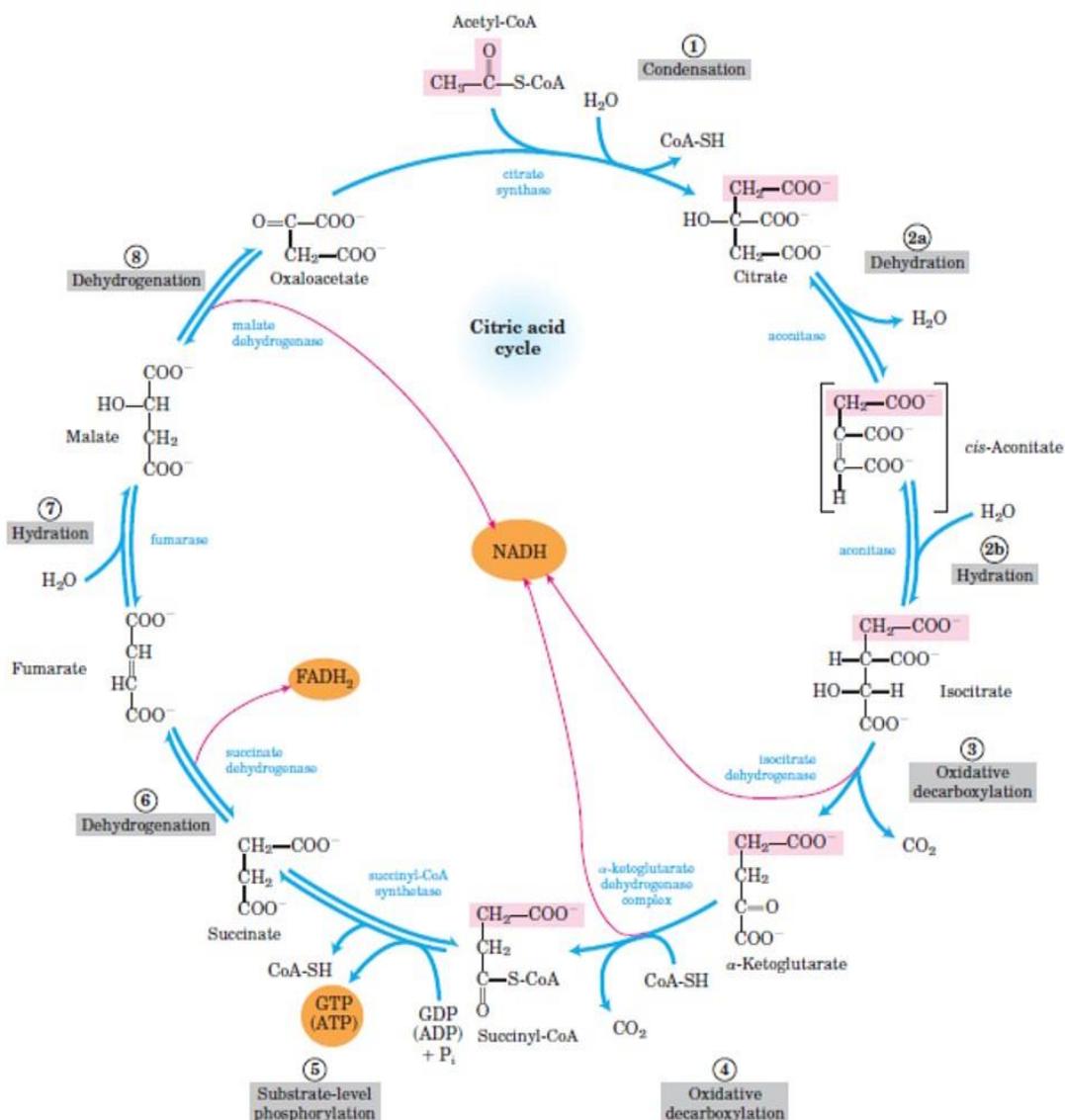
Jedním z nejdůležitějších kanálových proteinů na OMM jsou „*voltage dependent anion channels*“ (VDACs) (Maurya and Mahalakshmi, 2016; Milane *et al.*, 2015). VDACs při vazbě dalších membránových proteinů a enzymů tvoří obří kanály o vnitřním průměru 2 – 4nm, které nazýváme „*mitochondrial permeability transition pore*“ (mPTP; Ponnalagu and Singh, 2016; Wohlrab, 2009). Díky tvorbě těchto kanálů mají VDACs zásadní regulační úlohu v apoptóze, metabolismu, homeostáze kalcia a dalších. VDAC 1 funguje proapoptoticky a k jeho aktivaci v maligně transformovaných buňkách cílí řada nádorových léků (Maldonado, 2017; Pedersen, 2012).

### **1.2.2. Krebsův cyklus a vznik redukčních kofaktorů**

Mitochondrie jsou místem, kde se setkávají hlavní metabolické dráhy cukrů, tuků a bílkovin a společně tak vytvářejí metabolickou „křižovatku“, přes kterou lze přecházet mezi jednotlivými drahami a která také umožňuje tvorbu redukčních kofaktorů. Touto metabolickou „křižovatkou“ je cyklus trikarboxylových kyselin, neboli citrátový čili Krebsův cyklus (obrázek 5). Jedná se vlastně o druhý krok aerobní tvorby vysokoenergetického ATP (prvním krokem je tvorba acetyl-CoA viz výše). Na začátku Krebsova cyklu se acetylová část z acetyl-CoA naváže na oxalacetát a vytvoří citrát. Následně vzniklý citrát projde katalytickým cyklem osmi chemických reakcí za současné tvorby dvou molekul CO<sub>2</sub>, čtyř molekul redukčních kofaktorů (třech NADH a jednoho FADH<sub>2</sub>), jedné molekuly ATP a konečně zpětné regeneraci oxalacetátu, čímž se kruh uzavře a je celý proces opět připraven pro příjem další molekuly acetyl-CoA (Lehninger *et al.*, 2005). Takto se může Krebsův cyklus opakovat do nekonečna, samozřejmě při

dostatku všech potřebných substrátů. Vytvořené redukční kofaktory se dále využívají ve třetí fázi aerobního metabolismu, při transportu vysokoenergetických elektronů po redoxním spádu elektron transportního systému. Při tomto procesu dochází k přeměně energie uvolněné z přechodu elektronů z vyššího do nižšího energetického stavu na energii využitelnou k přenosu protonů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Vzniklý protonový gradient je poté využit ATP-syntázou k fosforylaci molekuly ADP na ATP na matrixové straně vnitřní mitochondriální membrány. Třetí fázi aerobního metabolismu nazýváme oxidativní fosforylace a bude blíže projednána v další kapitole.

Jak již bylo zmíněno, Krebsův cyklus (KC) začíná kondenzační reakcí citrát syntázy (obrázek 5, reakce č. 1). V této reakci se metylový uhlík acetyl-CoA naváže na karbonylový uhlík oxalacetátu za vzniku intermediátu citroyl-CoA, který se rapidně hydrolyticky rozštěpí na citrát a HS-CoA. Zatímco HS-CoA je recyklován pyruvátdehydrogenázovým komplexem pro tvorbu dalšího acetyl-CoA, vzniklý šestiuhlíkatý citrát pokračuje dále v KC. Dalším krokem KC je přeměna citrátu na izocitrát. Tento krok probíhá ve dvou oddělených reakcích: 1) dehydratace citrátu se vznikem desaturovaného akonitátu; 2) hydratace akonitátu a vznik izocitrátu. Tato „dvojitá reakce“ může probíhat, na rozdíl od předchozí reakce citrát syntázy, oboustranně. Fyziologicky je ale odběr izocitrátu v dalším kroku KC tak rapidní, že termodynamika této reakce je za standardních podmínek nakloněna ve směru citrát – izocitrát (Lehninger *et al.*, 2005).



**Obrázek 5. Krebsův cyklus**

Převzato z (Lehninger *et al.*, 2005).

Třetí reakcí KC je reakce dehydrogenační, při které dochází k tvorbě prvního redukčního kofaktoru NADH. Jedná se o oxidativní dekarboxylaci izocitrátu  $\text{NAD}^+$ -dependentním enzymem izocitrát dehydrogenázou. Během této reakce se vytvoří první molekula  $\text{CO}_2$ , jedna molekula  $\alpha$ -ketoglutarátu a jedna molekula NADH, která je následně využita komplexem I respiračního systému. Pětiuhlíkatý  $\alpha$ -ketoglutarát pokračuje v KC a podstoupí další oxidativní dekarboxylaci (Lehninger *et al.*, 2005). Tato reakce, katalyzovaná  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenázovým komplexem, je téměř identická s reakcí

pyruvátu a pyruvátdehydrogenázového komplexu. Oba enzymy si jsou strukturálně podobné a vyžadují stejné kofaktory.  $\alpha$ -ketoglutarát je tedy přeměněn na čtyřuhlíkatý sukcinyl-CoA za současné tvorby jedné molekuly  $\text{CO}_2$  a jedné molekuly redukčního kofaktoru NADH. Tyto dvě po sobě jdoucí dekarboxylace jsou současně s reakcí citrát syntázy nevratné a určují směr KC. Vysokoenergetická vazba thioesteru sukcinyl-CoA je v další chemické reakci odštěpena sukcinátthiokinázou a energie uvolněná z rozštěpení této vazby je využita k fosforylaci a dává vznik jedné molekuly vysokoenergetického GTP. Sukcinát je následně sukcinátdehydrogenázou přeměněn na fumarát za současné tvorby  $\text{FADH}_2$ . Sukcinátdehydrogenáza je jako jediný enzym KC vázán na vnitřní mitochondriální membránu (Cecchini, 2003) a určuje tedy prostorové vymezení KC v mitochondriální matrix. Díky přímé blízkému prostorovému vztahu sukcinát dehydrogenázy a ubichinonu dochází k rychlému přenosu elektronů z  $\text{FADH}_2$  dále elektron transportním systémem a regeneraci FAD kofaktoru (viz dále). Fumarát se posléze hydratuje za pomoci fumaráthydratázy na malát, který se v poslední reakci KC dehydrogenuje zpět na oxalacetát. Obě dvě reakce jsou vratné a reakce malátdehydrogenázy dává vznik třetímu a poslednímu vysokoenergetickému kofaktoru NADH, který je vytvořen v KC.

Energetická výtěžnost KC se dá vypočítat jako počet molekul ATP vytvořených přímo či po finálním využití vysokoenergetických elektronů elektron transportním systémem a tvorbou ATP v oxidativní fosforylaci. V přepočtu, kdy jedna molekula NADH vytvoří přibližně 2,5 molekuly ATP a jedna molekula  $\text{FADH}_2$  1,5 molekuly ATP, je celková výtěžnost Krebsova cyklu 10 molekul ATP.

### **1.2.3. Mitochondriální respirační systém a tvorba ATP**

Jednou z nejdůležitějších struktur na IMM, je respirační neboli elektron transportní systém. Záměrně nebudu v této práci používat pojem respirační řetězec, protože proteinové komplexy nejsou uspořádány lineárně do řetězce, ale tvoří jakousi konvergentní síť, ve které elektrony plynou podle spádu redoxního potenciálu ( $E_h$ ) až na místo koncové redukce molekuly kyslíku. Během tohoto toku elektronů dochází ke konformačním změnám jednotlivých proteinových komplexů, které využívají postupné změny energie k transportu protonů z mitochondriální matrix do IMS. Tímto přesunem vodíkových protonů se vytváří na IMM mitochondriální membránový potenciál (MMP), který následně umožňuje fosforylaci ADP a tvorbu ATP.

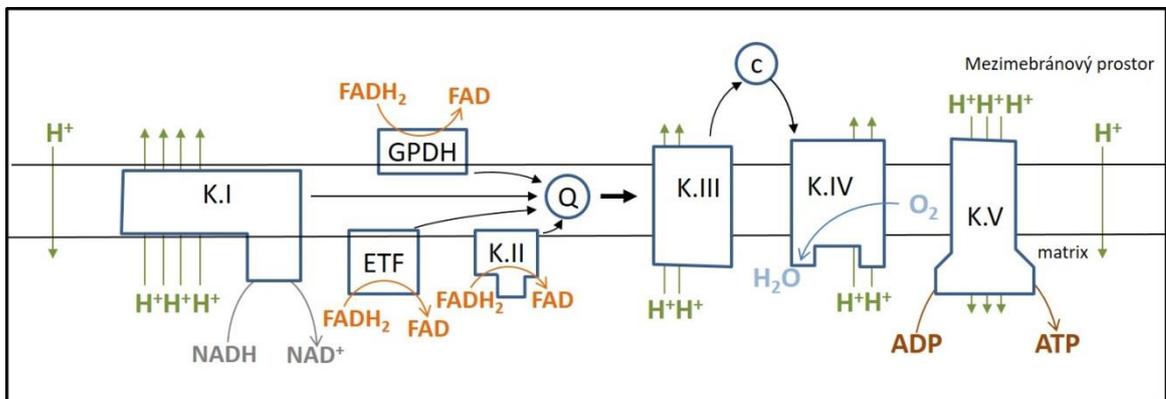
### 1.2.3.1. Transport elektronů na vnitřní mitochondriální membráně

Respirační systém na vnitřní mitochondriální membráně se skládá z více než 20 samostatných elektronových přenašečů schopných navázat a uvolnit proton dle svého  $E_h$ . Tyto přenašeče jsou ukotveny v několika velkých proteinových komplexech, které tento tok elektronů usměrňují. Jedinými pohyblivými přenašeči elektronů jsou v tučích rozpustný ubichinon (Q), který se nachází v IMM, a ve vodě rozpustný cytochrom c v mezimembránovém prostoru. Obě dvě pohyblivé komponenty difundují mezi respiračními komplexy a proto je jejich relativní množství v mírném přebytku nad ostatními elementy elektron transportního systému (Nicholls D.G. and Ferguson S.J., 2013).

Transport elektronů respiračním systémem může být zahájen na několika místech ETS (obrázek 6). Maximální rozdíl redoxních potenciálů ( $E_h$ ) v elektron transportním systému má hodnotu 1,1 V a je tvořen redoxním párem  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ( $E_h = -320$  mV) a redoxním párem  $1/2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  ( $E_h = 780$  mV) (Verkhovskaya *et al.*, 2008). Prvním redoxním párem účastnícím se přenosu elektronů na vnitřní mitochondriální membráně je  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (obr. 7). Tento redoxní pár sice zahajuje transport elektronů, ale strukturně není součástí žádného z multienzymových komplexů. Jeho výhodou je tedy pohyblivost, díky které může spojit dehydrogenázy v matrix ( $E_h = -300$  mV) a elektron transportní systém IMM. NADH je na IMM oxidován obřím proteinovým komplexem NADH/ubichinon-oxidoreduktázou (komplex I; K.I), který zahajuje transport elektronů elektron transportním systémem (obr. 6 a obr. 10).

Dalším vstupem elektronů do respiračního systému mohou být mitochondriální dehydrogenázy s hodnotami  $E_h$  kolem 0 mV, které nemají dostatečný  $E_h$  na redukci  $\text{NAD}^+$ , ale jako redukční ekvivalent využívají FAD. Tyto enzymy transportují elektrony přímo na Q (Nicholls D.G. and Ferguson S.J., 2013). Jedná se o sukcinátdehydrogenázu (SDH; komplex II; K.II), glycerofosfátdehydrogenázu (GPDH) a ETF (obr. 6).

Následuje oxidace ubichinonu ubichinon/cytochrom c oxidoreduktázou (komplex III; K.III), který předává elektrony na cytochrom c. Ten je volně přichycen vodíkovými vazbami k zevní straně IMM a je následně oxidován cytochrom c oxidázou (COX; komplex IV; K.IV) za současné redukce molekuly kyslíku a tvorby dvou molekul vody. S výjimkou komplexu IV se elektrony v rámci mitochondriálního respiračního systému mohou pohybovat reversibilně, tj. oběma směry (Verkhovskaya *et al.*, 2008).

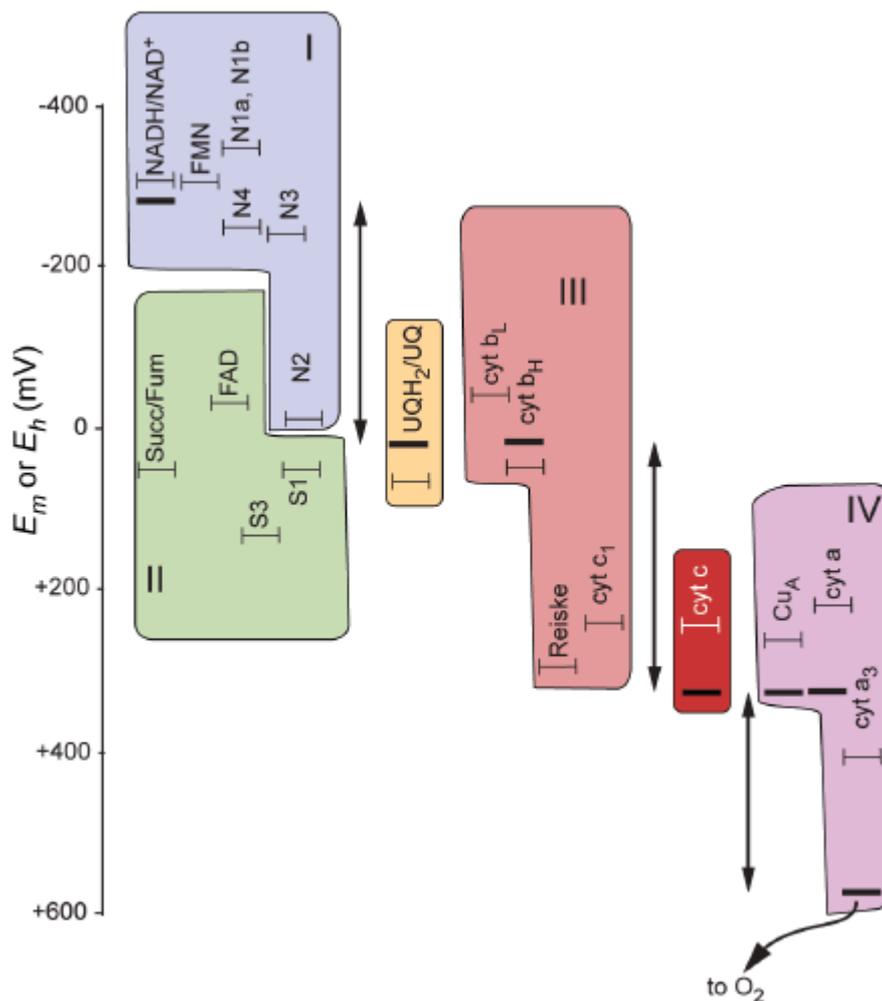


**Obrázek 6. Schéma elektron transportního systému na vnitřní mitochondriální membráně**

Elektronové přenašeče na IMM jsou tvořeny organickými i anorganickými složkami:

- 1) flavinovými kofaktory FAD či FMN
- 2) cytochromy obsahujícími funkční hemovou skupinu
- 3) skupinami obsahujícími síru a železo (Fe-S centra)
- 4) volně rozpuštěným Q v IMM
- 5) atomy mědi vázané v komplexu IV

Orientační hodnoty  $E_h$  jednotlivých složek elektron transportního systému jsou schematicky znázorněny na obrázku 7.



**Obrázek 7. Schematicky znázorněné rozložení redoxních potenciálů jednotlivých součástí elektron transportního systému.**

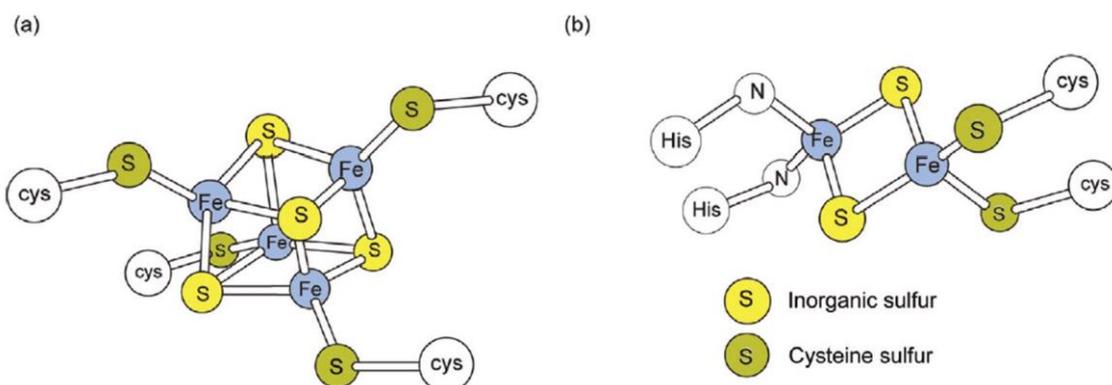
Převzato z (Nicholls D.G. and Ferguson S.J., 2013).

V elektron transportním systému rozlišujeme dva flavinové kofaktory: flavinadenindinukleotid (FAD) a flaviadeninmononukleotid (FMN). FMN je součástí komplexu I a zahajuje transport elektronů respiračním systémem oxidací NADH. FAD je součástí komplexu II, ETF a GPDH. Také je kofaktorem dalších dehydrogenáz mimo elektron transportní systém (např. pyruvátdehydrogenáza,  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenáza, atd.). Flaviny mohou podstoupit jednoelektronovou či dvouelektronovou oxidaci i redukci a existují tak ve třech formách – oxidovaný flavin, redukováný flavin a flavinový radikál.

Cytochromy jsou přenašeče elektronů, které ve své struktuře obsahují hemová jádra a můžeme je detekovat dle jejich absorpčního spektra viditelného světla. Výhodou jejich

detekce je také to, že spektra mění svou vlnovou délku v závislosti na jejich redoxním stavu. Díky tomu, cytochromy přispěly velkou měrou k poznání respiračního systému vnitřní mitochondriální membrány. Cytochromy dělíme dle vlnové délky na tři třídy a-, b- a c-. Na tomto místě chceme vyzdvihnout cytochrom c, který se nalézá v IMS a je volně připojen k zevní straně IMM. Při porušení OMM se cytochrom c dostává mimo mitochondrie a může aktivovat apoptotickou kaskádu. Úniku cytochromu c mimo IMS se také využívá při respirometrickém hodnocení integrity OMM.

Dalšími komponentami podílejícími se na transportu elektronu na vnitřní mitochondriální membráně jsou Fe-S centra (obrázek 8.). Fe-S centra ve své struktuře obsahují 2 – 4 atomy železa a jsou vždy schopna podstoupit pouze jednoelektronovou oxidaci/redukci. Jejich výhodou je, že mají široké spektrum  $E_h$  a ty mohou být navíc značně upravovány okolním prostředím. Ve výsledku tedy hodně záleží na proteinu, ve kterém je Fe-S centrum ukotveno. Respirační systém má dohromady 14 Fe-S center, která se nacházejí v K.I (9 center), K.II (3 centra) a K.III (2 centra).

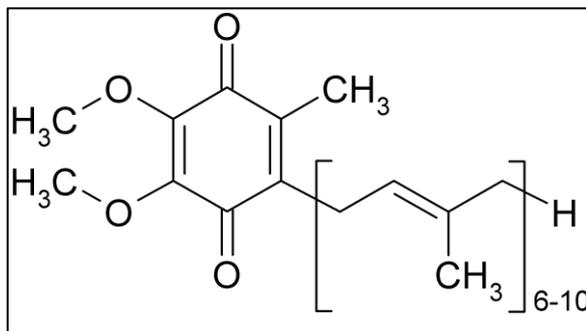


### Obrázek 8. Schematické zobrazení Fe-S center

Převzato z (Nicholls D.G. and Ferguson S.J., 2013)

Ubichinon (Q) je hydrofobní molekula, která obsahuje chinonovou funkční skupinu a postranní alifatický řetězec (strukturní vzorec je znázorněn na obrázku 9). Množství isoprenylových jednotek v postranním řetězci, je druhově závislý a označujeme ho číslem za písmenem Q. Ubichinon savčích mitochondrií má 10 isoprenylových jednotek, a proto se můžeme setkat také se zkratkou Q10. Ubichinon může podstoupit jedno- až

dvouelektronovou oxidaci/redukci a proto rozlišujeme tři formy ubichinon (plně oxidovaný), semichinon a ubichinol (plně redukovaný).



**Obrázek 9. Strukturní vzorec ubichinonu**

Převzat z veřejné databáze *Creative Commons*.

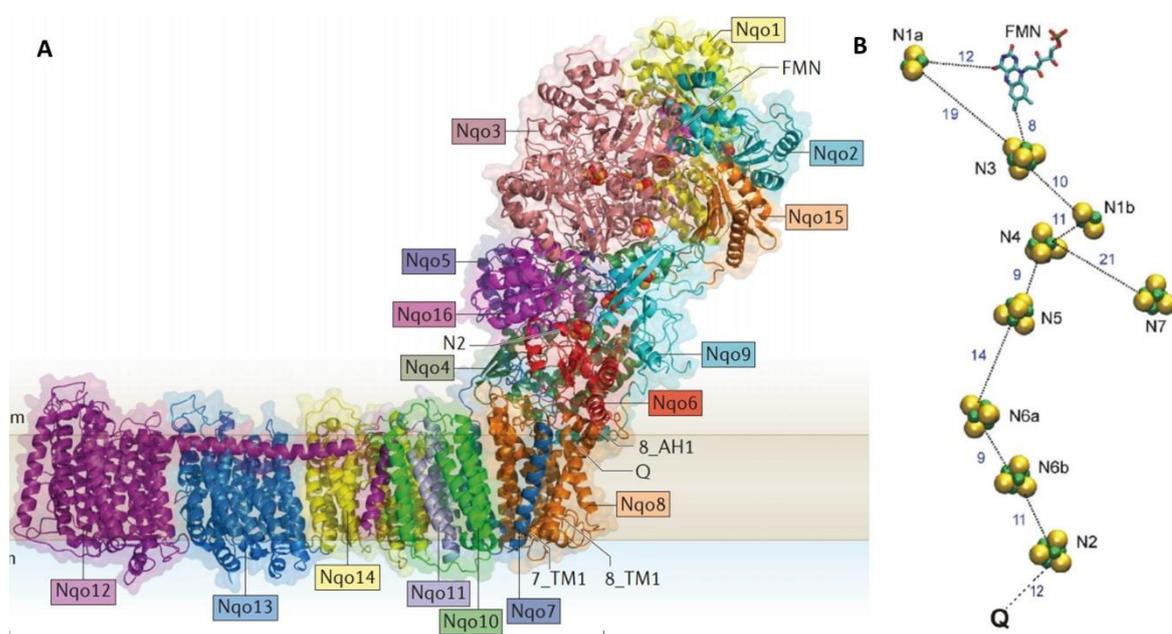
Poslední komponentou elektron transportního systému, která dosud nebyla zmíněna, jsou atomy mědi vázané v komplexu IV. Tyto atomy jsou schopny podstoupit redukci z  $\text{Cu}^{\text{II}}$  na  $\text{Cu}^{\text{I}}$  a jsou využívány jako akceptory elektronů z cytochromu c a při koncové redukci kyslíku.

#### **1.2.3.2. Komplex I**

Kaskádu mitochondriálního respiračního systému zahajuje obří multienzymový komplex NADH-ubichinon oxidoreduktáza neboli komplex I (Sazanov, 2015). Komplex I má velikost přibližně 980kDa a dohromady ho tvoří 45 – 46 podjednotek. Základní jádro komplexu I se skládá ze 14 proteinových podjednotek a patří do třídy [NiFe] hydrogenáz vázaných na membránu, což je třída hydrogenáz spojující oxidaci substrátu a redukci vodíku se současným aktivním transportem vodíkového protonu (Hedderich, 2004). K tomuto jádru komplexu I se během evoluce eukaryotické buňky přidalo přibližně 31 – 32 přídatných podjednotek, čímž komplex I vytváří ten největší proteinový komplex respiračního systému IMM (Cardol, 2011).

Komplex I se dá rozdělit na dvě základní strukturní části: hydrofobní, proton přenášející část umístěnou v IMM a hydrofilní část spojenou pod úhlem cca  $120^\circ$  a obsahující FMN a všechna Fe-S centra, která se účastní transportu elektronů (obrázek 10). Klíčové podjednotky hydrofobní části komplexu I jsou kódovány mtDNA a klíčové podjednotky hydrofilní části jsou kódovány nDNA.

Přenos elektronů na K.I začíná oxidací NADH pomocí FMN na konci hydrofilní části enzymu (obrázek 10). FMN je redukován na FMNH<sub>2</sub> a následně reoxidován dvěma jednoelektronovými kroky kaskádou Fe-S center za současné tvorby FMNH<sup>•</sup> radikálu. Poslední Fe-S centrum (N2) s nejnižším E<sub>h</sub> leží v prostorové blízkosti vazné části Q, který od něj elektrony přijímá. Místo pro navázání Q má tvar lipofilní kapsy a může být blokováno inhibitorem komplexu I – rotenonem. N2 centrum má jako jediné v sekvenci Fe-S center značně snížený E<sub>h</sub> (obrázek 7), a proto při jeho redukci dojde k uvolnění většího množství energie. Tato energie je využita na konformační změny hydrofobní části komplexu k pumpování protonů do IMS (Baradaran *et al.*, 2013).



### Obrázek 10. Komplex I

A) Struktura komplexu I izolovaného z bakterie *Thermus thermophilus* (Baradaran *et al.*, 2013); B) schematické znázornění Fe-S center v hydrofilní části komplexu I (Verkhovskaya *et al.*, 2008).

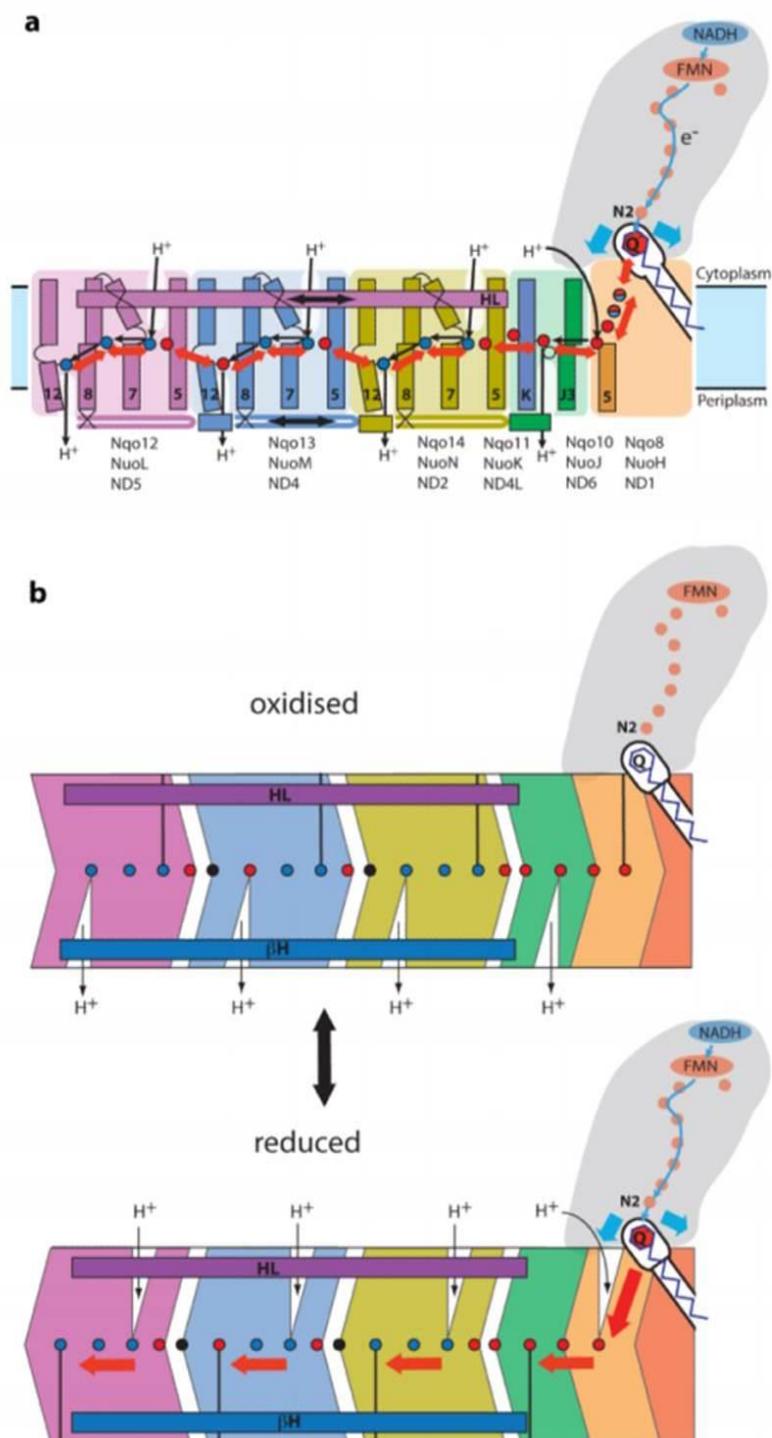
V hydrofobní části komplexu I se nachází 4 páry protonových kanálů. Tyto kanály při konformační změně proteinu „nasají“ proton z matrix mitochondrií a následně při průchodu druhého elektronu se zamknou a otevřou na druhé straně a tím ho vypumpují směrem do mezimembránového prostoru (obrázek 11). Energie je předávána pomocí jednotlivých aminokyselin uspořádaných v centru této hydrofobní podjednotky. Ty vytváří jakousi hydrofilní osu, díky které konformační změna jedné části automaticky způsobí

změnu v celé délce hydrofobní podjednotky komplexu I. Tímto mechanismem je komplex I schopen přenést 4 protony z mitochondriální matrix do IMS při průchodu dvou elektronů na ubichinon (Baradaran *et al.*, 2013; Sazanov, 2015).

#### **1.2.3.3. Komplex II**

Sukcinátdehydrogenáza, neboli komplex II, je protein vázaný na vnitřní stranu IMM o molekulové hmotnosti 128kDa (obrázek 12). Skládá se ze čtyř podjednotek, které jsou kódovány nDNA (Klučková *et al.*, 2013; Van Vranken *et al.*, 2015). Zároveň se jedná o enzym Krebsova cyklu, který je jako jediný vázán na membránu mitochondrií.

Komplex II využívá ke své funkci FAD kofaktor kovalentně vázaný na podjednotku SDHA, která zahajuje přenos elektronů oxidací sukcinátu. Dále obsahuje 3 Fe-S centra v SDHB podjednotce účastníci se transportu elektronů na ubichinon a poslední hemovou skupinu v membránové části enzymu mezi podjednotkami SDHC a SDHD, která ubichinon stabilizuje a zároveň se podílí na jeho dvouelektronové redukci.

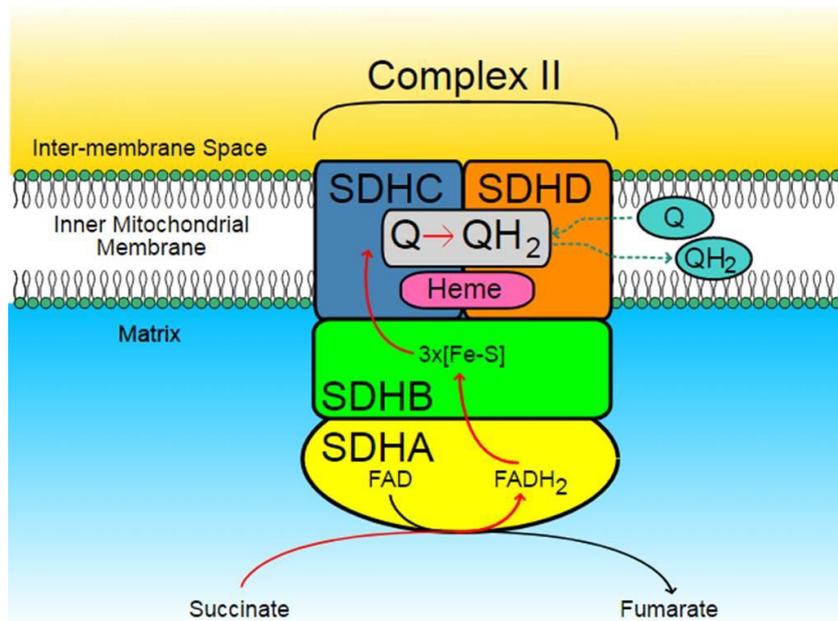


**Obrázek 11. Schéma konformačních změn komplexu I**

a) Znáznorňuje 4 protonové kanály v hydrofobní části komplexu I; b) znázorňuje mechanismus pumpování protonů při průchodu elektronů na ubichinon.

Převzato z (Baradaran *et al.*, 2013).

Komplex II představuje další vstup elektronů do respiračního systému mitochondrií. Ubichinon od něj přijímá 2 elektrony a dále dva protony z matrix, čímž se komplex II nepodílí na vytváření MMP. Sukcinát-dependentní respirace tedy zpravidla může dosahovat větších hodnot oproti NADH-dependentní respiraci, protože poměr přenesených elektronů k poměru transportovaných protonů je vyšší.



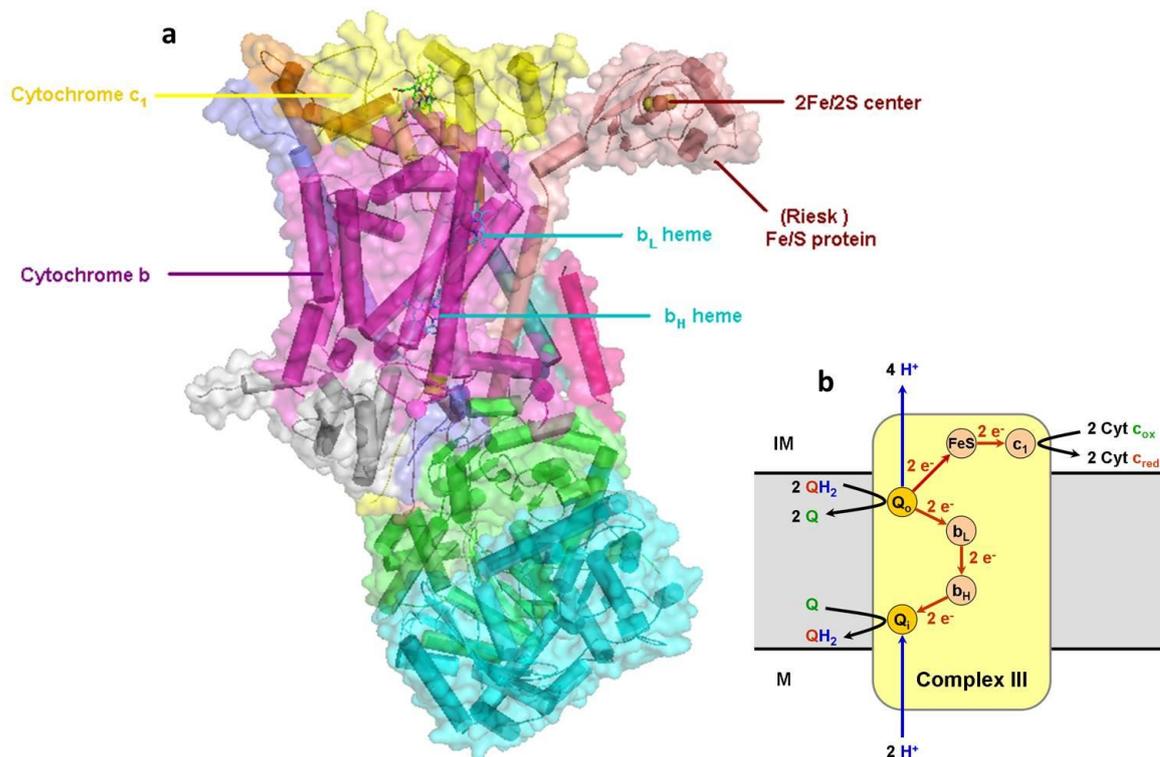
**Obrázek 12. Schéma komplexu II**

Převzato z veřejné databáze *Creative Commons*.

#### 1.2.3.4. Komplex III

Ubichinon-cytochrom c-oxidoreduktáza je třetím multienzymovým komplexem respiračního systému mitochondrií katalyzující přenos elektronů z ubichinonu na cytochrom c se současným přenosem 4 protonů do IMS. Komplex III obsahuje 11 podjednotek a k transportu elektronů využívá dva cytochromy typu b-, dvě Fe-S centra v Rieskeho proteinu a cytochrom c1 (obrázek 13).

Oxidací ubichinonu a následným přenosem elektronů na cytochrom c začíná uniformní cesta všech konvergentních drah elektron transportního systému. Komplex III také produkuje největší množství superoxidového aniontu (Andreyev *et al.*, 2005; Brand, 2016).



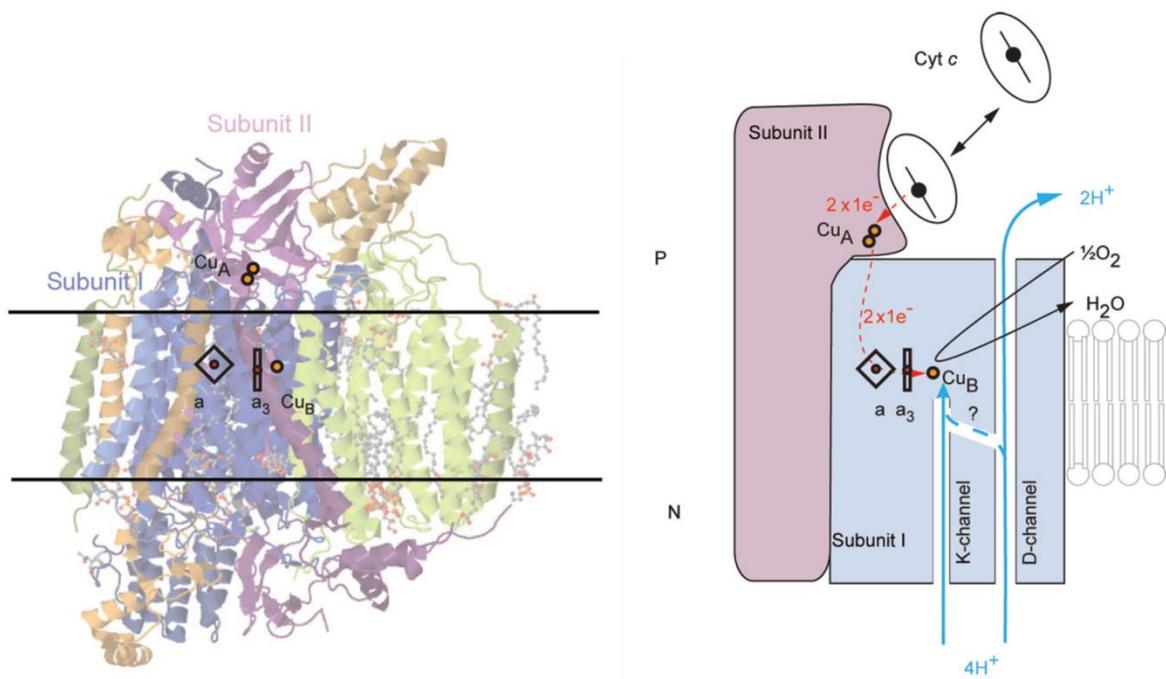
**Obrázek 13. Komplex III**

a) Struktura komplexu III; b) schéma transportu elektronů z ubiquinonu na cytochrom c.

Převzato z veřejné databáze *Creative Commons*.

### 1.2.3.5. Komplex IV

Posledním komplexem elektron transportního systému na vnitřní mitochondriální membráně je cytochrom c oxidáza neboli komplex IV. Na tomto komplexu dochází k závěrečné redukci molekuly kyslíku za vzniku dvou molekul vody. Schéma tohoto procesu je zobrazeno na obrázku 14.



**Obrázek 14. Komplex IV**

Převzato z (Nicholls D.G. and Ferguson S.J., 2013).

#### 1.2.3.6. Další enzymy elektron transportního systému

Mezi další enzymy elektron transportního systému řadíme ETF zastávající důležitou úlohu  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, mitochondriální GPDH katalyzující oxidaci glycerofosfátu a dihydroorotátdehydrogenázu hrající roli při syntéze pyrimidinů.

##### 1.2.3.6.1. Elektron transportující flavoprotein

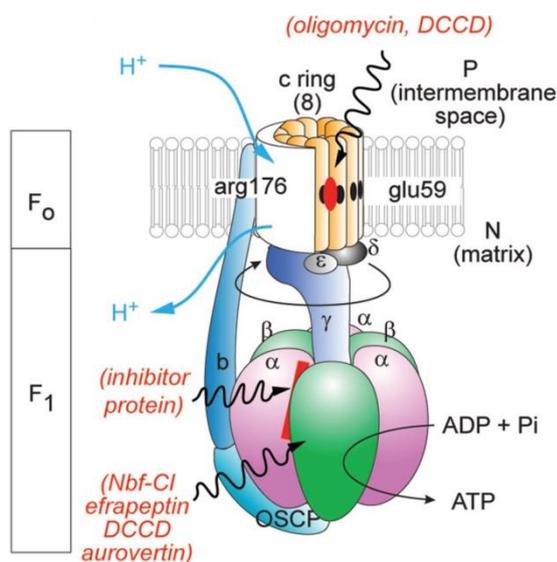
Tento hydrofilní globulární protein katalyzuje reakci rozdělení uhlíkové vazby v průběhu  $\beta$ -oxidace mastných kyselin. ETF je lokalizován v mitochondriální matrix a váže se k vnitřní mitochondriální membráně pomocí jednoho hydrofobního  $\alpha$ -helixu a  $\beta$ -skládaného listu (Nicholls D.G. and Ferguson S.J., 2013). Ve své struktuře obsahuje FAD kofaktor, Fe-S centrum a ubiquinon vázající místo.

##### 1.2.3.6.2. Glycerofosfátdehydrogenáza

Tento enzym přiléhá na vnější stranu vnitřní mitochondriální membrány a obsahuje taktéž flavinovou skupinu FAD a dále minimálně jedno Fe-S centrum. Expres tohoto enzymu se značně liší v závislosti na buněčném typu. Vysoké zastoupení má v hnědé tukové tkáni (Mracek *et al.*, 2014).

### 1.2.3.7. ATP syntáza

Elektrochemický potenciál vytvořený protonovými pumpami (komplexy I, III a IV) využívá poslední obří proteinový komplex ATP syntáza, označovaná jako komplex V. Ta vytváří většinu buněčného ATP na matrixové straně IMM. Pro práci ATP syntázy je za potřebí nejen dostatečný protonový gradient, ale také přítomnost ADP a volného fosfátu  $P_i$ . ATP syntáza se skládá ze dvou velkých podjednotek  $F_o$  a  $F_1$  (obrázek 15). ATP syntáza limituje rychlost oxidativní fosforylace, protože využívá protonový gradient a tím snižuje MMP, proti kterému musí protonové pumpy pracovat. Při experimentálním hodnocení mitochondriální respirace lze navodit stav, kdy nedochází k fosforylaci ADP a to buď tím, že ADP jednoduše nepřidáme do mitochondriální, či buněčné suspenze, nebo přidáním inhibitoru oligomycinu, který se váže na  $F_o$  podjednotku a tím ATP syntázu blokuje.



Obrázek 15. ATP syntáza

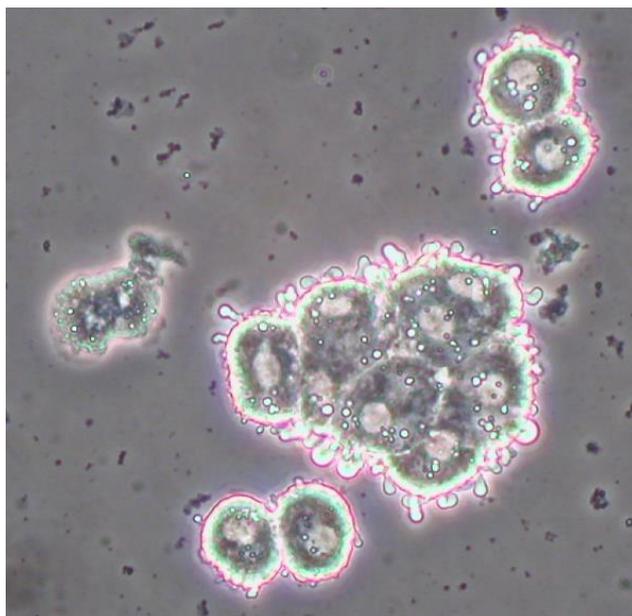
Převzato z (Nicholls D.G. and Ferguson S.J., 2013)

### 1.2.4. Apoptóza

Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt, je řízený proces ukončení života buňky, při kterém dochází k aktivaci buněčných proteáz, fragmentaci jaderné DNA, kondenzaci chromatinu v jádře, odbourání cytoskeletu a jaderného obalu a změnění buněčného povrchu tak, že může okamžitě dojít k destrukci a fagocytóze buňky tkáňovými makrofágy. Tato řízená smrt se vyznačuje tím, že nepoškozuje tkáň v okolí buňky a

nevzniká při ní zánět, jako je tomu u nekrózy. V průměru u dospělého člověka podstoupí apoptózu mezi 50 a 70 miliardami buněk denně, což je přibližně 0,5 % ze všech buněk lidského těla (Alberts, 2015). Na rozdíl od nekrózy je apoptóza vysoce kontrolovaný fyziologický proces, který je velice výhodný pro živý organismus (Eguchi *et al.*, 2014). Při nekróze dochází k vylití obsahu cytoplazmy do okolní tkáně, aktivaci prozánětlivých faktorů a vzniku zánětu, což může mít za následek další poškození okolních struktur a další šíření zánětu. Apoptóza je oproti tomu přísně regulována extracelulárními i intracelulárními signály. Iniciací apoptózy vede ke spuštění apoptotické kaskády a aktivaci buněčných kaspáz, což má za následek zánik buňky. Apoptóza je tedy evolučně velmi selektivní mechanismus, kterým dochází k eliminaci starých či poškozených buněk bez dalšího vedlejšího poškození (Novosad *et al.*, 2001). Apoptóza je významným mechanismem buněčné homeostázy, který zajišťuje optimální počet buněk (v embryogenezi, regeneraci orgánů apod.)

Apoptóza se morfologicky vyznačuje kondenzací jádra a narušením cytoplazmatického obsahu, což je způsobeno aktivací buněčných proteáz, které postupně degradují buněčné organely. Chromatin jaderné DNA se štěpí a vytváří fragmenty, které se opouzdří a kondenzují a které nazýváme apoptotická tělíška. Enzym zodpovědný za toto štěpení je DNáza zvaná CAD (z anglického „Caspase-Activated DNase“) a ta vytváří fragmenty DNA s intervaly o počtu kolem 180 bp (Enari *et al.*, 1998). CAD ale nepracuje sama o sobě a musí jí předcházet aktivace kaspázou 3, což je buněčná proteáza řadící se do skupiny kaspáz (z angl. „*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*“) specifických enzymů s cystein proteázovou aktivitou, které štěpí proteiny u aspartátových reziduí a hrají klíčovou roli v aktivaci programované smrti buňky (McIlwain *et al.*, 2013). Dále je apoptóza charakteristická sraštěním buněčné membrány, zmenšením jejího obsahu a tzv. „blebbingem“, který je typickým rysem takto zanikající buňky. V mikroskopickém obrazu „blebbing“ rozpoznáme jako jakési vypukliny, vyboulení plazmatické membrány (obrázek 16). Ty jsou způsobeny kontrakcí aktinomyozinových vláken cytoskeletu a zvýšením nitrobuněčného tlaku.

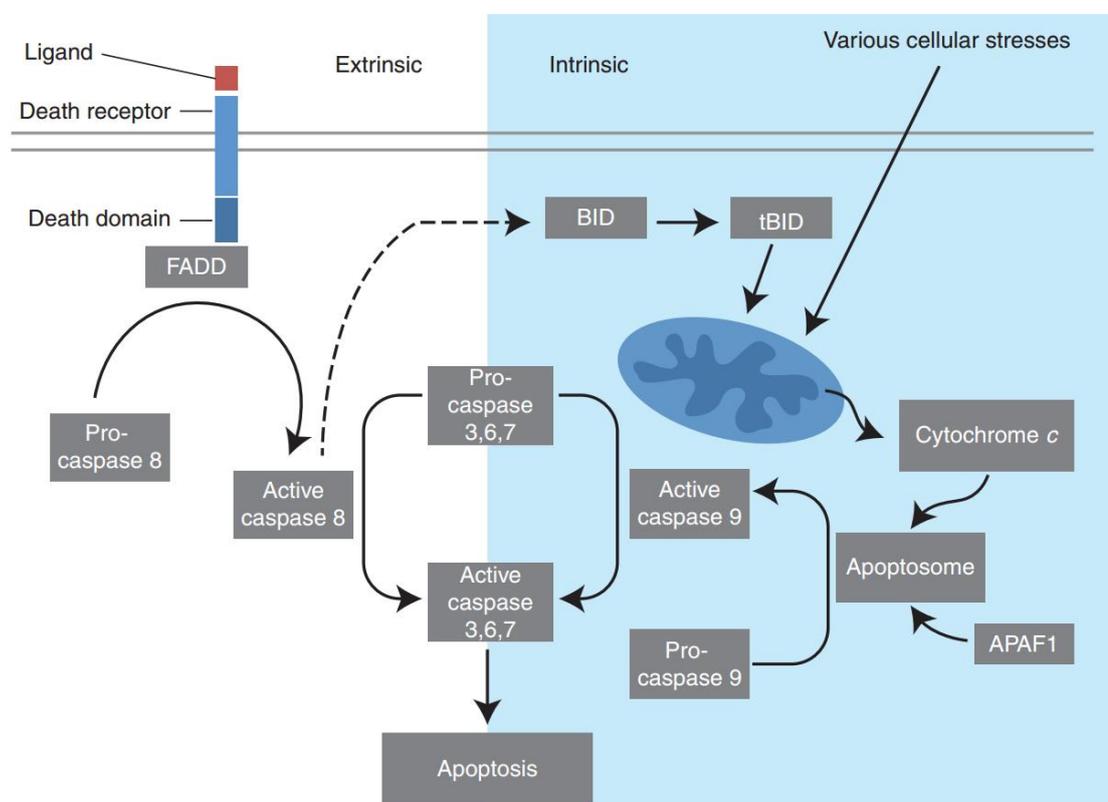


### **Obrázek 16. Blebbing u potkanních hepatocytů**

Fotografie byla pořízena pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem.

Začátek apoptózy a zahájení procesu programované buněčné smrti jsou procesy přísně regulované množstvím signálních molekul. V základním rozdělení odlišujeme dvě aktivační cesty: vnitřní a vnější (obrázek 17). Vnitřní aktivace apoptózy může být vyvolána poruchou intracelulárního prostředí buňky, jako jsou oxidační stres, dysregulace  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázy a zvýšení proapoptotické signalizace (Bax, Bak, Bid apod.) za současného snížení antiapoptotické signalizace (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, apod.) (Gross, 2016; Kroemer *et al.*, 2007). Aktivace vnitřní cesty může být také indukována farmakologicky navázáním glukokortikoidů na jaderné receptory (Kumar *et al.*, 2005) či fyzikálně ozářením, teplem a dalšími faktory (Kumar *et al.*, 2005). Klíčovou událostí je narušení integrity a permeability vnější mitochondriální membrány. To vede k poruše mitochondriálních funkcí, vyplavení cytochromu *c* a *apoptosis inducible factor* (AIF) z mitochondrií (Bejarano *et al.*, 2009; Kroemer *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2010). Cytochrom *c* se po uvolnění do cytoplazmy naváže na Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) a ATP, což má za následek aktivaci kaspázy 9 a zahájení proteolytické kaskády. AIF způsobuje kondenzaci chromatinu v jádře a DNA fragmentaci a jeho uvolnění může vést k apoptóze nezávislé na kaspázách (Hangen *et al.*, 2010).

Vnější cesta zahájení apoptózy je cesta zprostředkovaná „z vnějšku“ jednak pomocí receptorů pro *Tumor necrosis factor* (TNF), TNFR1 a TNFR2 (Guicciardi *et al.*, 2013; Tummers and Green, 2017; Wajant, 2002), které aktivují kaspázu 8 zprostředkovaně přes interakci s membránovým proteinem FADD (*Fas-associated protein with death domain*), nebo přímo pomocí aktivace Fas-receptoru (McIlwain *et al.*, 2013). Aktivace kaspázy 8 má za následek zahájení proteolytické kaskády kaspáz a také aktivaci proteinu BID, který ve výsledku způsobuje translokaci proteinů Bak a Bax na vnější mitochondriální membránu a tvorbu kanálů s VDAC s následným otevřením mPTP, únikem cytochromu c a aktivací apoptózy.



**Obrázek 17. Schéma vnitřní a vnější apoptotické cesty**

Převzato z (McIlwain *et al.*, 2013)

### 1.2.5. Regulace mitochondriální biogeneze

Tvorba nových mitochondrií v buňce závisí z velké části na energetických potřebách v dané situaci. Jeden z nejdůležitějších aktivátorů mitochondriální biogeneze je transkripční faktor PGC-1 (z anglického „*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator*“). Tento aktivátor patří mezi skupinu faktorů, jejichž aktivita závisí na

energetickém stavu buňky a dle něho regulují případnou expresi potřebných genů. Známe tři členy rodiny PGC-1: PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  a PRC („*PGC related cofactor*“) (Villena, 2015). Tyto tři transkripční faktory jsou pro život organismu nezbytné a laboratorní myši s delecí jejich genů umírají krátce po narození (Lai *et al.*, 2008). PGC-1 hrají hlavní úlohu v regulaci oxidativního a energetického metabolismu, regulují tvorbu mitochondrií a mimo to ovlivňují řadu dalších specifických metabolických cest. PGC-1 $\alpha$  zahajuje adaptaci na hladovění, *de novo* glukoneogenezu v játrech, zatímco PGC-1 $\beta$  má zastoupení v regulaci *de novo* lipogeneze cestou aktivace SREBP-1c (Ferre and Foufelle, 2010; Nassir and Ibdah, 2014; Villena, 2015). Selektivní aktivace PGC-1 $\beta$  v játrech má protektivní účinek proti jaterní steatóze a steatohepatitidě s progresí do fibrózy (Bellafante *et al.*, 2013). Bylo prokázáno, že PGC-1 $\beta$  indukuje zvýšení oxidativní fosforylace,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a že zvyšuje sekreci triacylglycerolů (TAG) do krve současně se snížením oxidativního stresu (Bellafante *et al.*, 2013). PGC-1 $\alpha$  interaguje s jadernými receptory PPAR $\alpha$ , HNF4 a FOXO1, které jsou nezbytné pro adaptaci hepatocytů na hladovění (Villena, 2015). Práce transkripčního faktoru PGC-1 $\alpha$  je úzce ovlivňována metabolickými hormony inzulinem a glukagonem. Glukagon prostřednictvím cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) aktivuje transkripční faktor ChREBP (z angl. „*Carbohydrate-responsive element binding protein*“), který je jedním ze základních regulátorů PGC-1 $\alpha$ . Touto aktivací dojde k postupné indukci glukoneogenetických enzymů jako jsou HNF4 či FOXO1. Zvýšená exprese PGC-1 $\alpha$  v hepatocytech potkana v primární kultuře způsobuje tvorbu mitochondriálních proteinů a vystupňování mitochondriálních funkcí (Morris *et al.*, 2012). Fyzická aktivita také vedla k významné expresi PGC-1 $\alpha$  v *in vivo* experimentech na myších (Irahara *et al.*, 2016). Dlouhodobé podávání vysokotukové diety (HFD) snižuje hladiny jaterní PGC-1 $\alpha$  (Hirschey *et al.*, 2011). Další jaderné receptory ovlivňované třídou PGC-1 jsou PPAR, ERR („*estrogen-related receptors*“), NRF1 a NRF2 („*nuclear respiratory factors 1&2*“) které se také podílejí na regulaci  $\beta$ -oxidace a oxidativní fosforylace. V poslední době tedy přetrvává názor, že PGC-1 $\alpha$  řídí oxidativní metabolismus pomocí regulace mitochondriální biogeneze a vnitřních vlastností mitochondrií.

### 1.3. Látky s protinádorovým účinkem cílené na mitochondrie

V dnešní době je moderní medicína schopna řešit řadu onemocnění, na které se dříve umíralo již v mnohem mladším věku. Infekční choroby v žebříčku mortality byly pokořeny vývojem antibiotik a očkováním, smrt v důsledku onemocnění kardiovaskulárního systému, přestože stále zaujímá přední místo, ustupuje díky rozvoji moderních léků a intervenční medicíny, nemoci dýchacího systému a autoimunitní choroby dnes již nejsou tak častou příčinou úmrtí pacienta v západních zemích, jako tomu bylo v nedávné minulosti. Nádorová onemocnění oproti tomu začínají v poslední době dominovat a pro dnešní zdravotnictví tak jejich léčba a prevence představuje velkou výzvu. Není proto divu, že se do popředí dostává výzkum nových protinádorových léků a látek, které dokážou zhoubné buňky úspěšně eliminovat s minimálními nežádoucími účinky. Zavedení nadějného léčiva do klinické praxe představuje dlouhou a nákladnou cestu testování a preklinického výzkumu. V poslední době se ve světle nebývalé popularity mitochondrií objevují také látky, které přímo či nepřímo ovlivňují mitochondriální funkce nádorových buněk a tak mohou velmi selektivně napomáhat likvidaci zhoubného tumoru. Pro tuto kategorii farmak se vžil název Mitocans (z angl. „*Mitochondria cancer agents*“) (Neuzil *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2015a) a pro potřeby mé dizertační práce jsme vybrali dvě látky z této skupiny: 3-brompyruvát a  $\alpha$ -tokoferylsukcinát.

#### 1.3.1. 3-Brompyruvát

##### 1.3.1.1. Mechanismus působení

3-Brompyruvát (3BP) je malá alkylující molekula, původně připravena pro studium funkce proteinů, která se již od začátku nového tisíciletí těší pozornosti řady vědeckých týmů na světě kvůli svému protinádorovému působení (Pedersen, 2012; Sanborn *et al.*, 1971). Bylo prokázáno, že 3BP zastavoval růst implantovaných nádorů na zvířecích modelech a také způsoboval nekrózu a apoptózu řady nádorových linií bez téměř žádných negativních účinků na nenádorovou tkáň (Azevedo-Silva *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2008; Ko *et al.*, 2004; Le *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). V minulosti byla popsána inhibice řady intracelulárních enzymů nádorových buněk vlivem 3BP. Jednalo se mimo jiné o enzymy glykolýzy jako např. hexokináza II (Chen *et al.*, 2009; Rodrigues-Ferreira *et al.*, 2012), glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (Dell'Antone, 2009; Pereira da Silva *et al.*, 2009; Shoshan, 2012), pyruvátdehydrogenáza (Shoshan, 2012) a laktátdehydrogenáza (Le *et al.*, 2010) a další. S ohledem na známou skutečnost, že glykolýza je hlavní

metabolickou drahou pro tvorbu ATP u většiny nádorových buněk (tzv. „Warburgův efekt“; Warburg, 1956; Warmoes and Locasale, 2014), vede inhibice glykolytických enzymů v nádorových buňkách k depleci ATP a energetické krizi s následným zánikem buňky. Protinádorový účinek 3-BP je tedy nejvíce vyjádřen u těch typů nádorů, které jsou na glykolýze nejvíce závislé, což bylo prokázáno nejen *in vitro*, ale také v řadě experimentů *in vivo* na potkanech, myších, králících a dalších pokusných zvířatech (Pedersen, 2012).

#### 1.3.1.1.1. Protinádorové působení *in vivo* a *in vitro*

Nejvíce informací o mechanismu působení 3BP se podařilo získat díky *in vitro* studiím s lidskými nádorovými liniemi: hepatocelulárního karcinomu HepG2, leukemie HL-60/C6F, nádoru prsu MCF-1/ADR, MDA-MB-231, HBL100 a BT549 a ovariálního karcinomu OVCAR5, TOV112D, OVCAR3 a CAO3, nemalobuněčného plicního karcinomu AT549, H1299 a H23 a dalších. Inhibiční účinek 3BP na mitochondriální funkce byl také popsán. 3BP snižoval aktivitu komplexu I, komplexu II a ATP syntázy. Dále byl toxický účinek 3BP spojován se zvýšenou tvorbou ROS. 3BP indukoval oxidační stres dvojitým mechanismem – snižováním redukční obrany, tj. glutathionu (Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2013), a také zvyšováním produkce mitochondriálních volných radikálů přes inhibici komplexu I a II. Nicméně specifická a intenzita všech výše zmiňovaných účinků 3BP se lišila podle terapeutické dávky, způsobu podání v *in vivo* pokusech, studované nádorové tkáně a buněčné linie a ústila buď v autofagický, apoptotický či nekrotický proces zániku buňky.

#### 1.3.1.1.2. Toxicita

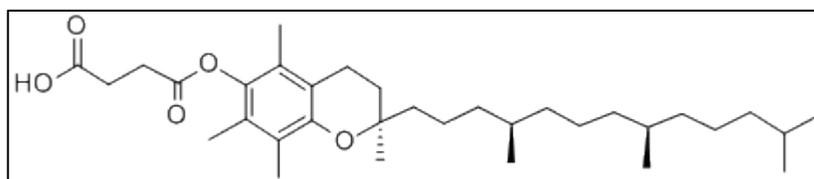
Jelikož použití 3BP v nekončícím souboji s nádorovými buňkami se zdá velmi slibné, je až s podivem že otázka toxicity této látky dosud nebyla uspokojivě zodpovězena. Funkční studie zabývající se účinky 3BP na nenádorovou tkáň chybí. Důležitost této otázky je v dnešní době ještě více umocněna, jelikož již byl jeden pacient léčen 3BP, i když bohužel neúspěšně. Ze studie, ve které tuto léčbu popisují, nelze vyloučit iatrogenní jaterní poškození. Dodnes také nebyla popsána *in vitro* toxicita 3BP na primární nenádorové hepatocyty.

Jedním z cílů mé dizertační práce tedy bylo zjištění účinků 3BP na primární hepatocyty potkana a myši v kultuře a objasnění funkčních důsledků vystavení 3BP na mitochondriální funkce nenádorových jaterních buněk.

### 1.3.2. $\alpha$ -Tokoferylsukcinát

#### 1.3.2.1. *Mechanismus působení*

$\alpha$ -Tokoferylsukcinát (TOS) je sukcinyl ester  $\alpha$ -tokoferolu (obrázek 18).  $\alpha$ -Tokoferol spadá do skupiny antioxidačně působících látek, které souhrnně nazýváme vitamin E (Zingg, 2007). Molekulu  $\alpha$ -tokoferolu můžeme rozdělit na tři funkční části (Neuzil and Massa, 2005): 1) alifatický řetězec, 2) chromanový prstenec, 2) hydroxylová skupina. Díky alifatickému řetězci je molekula vitamínu E rozpustná v tucích, což ji umožňuje uplatnit svou antioxidační funkci v lipidových strukturách buňky. Chromanový prstenec zase umožňuje molekule  $\alpha$ -tokoferolu distribuovat elektron, který jeho molekula přijme od případného oxidačního činidla prostřednictvím třetí funkční části - hydroxylové skupiny.



**Obrázek 18. Vzorec  $\alpha$ -tokoferylsukcinátu**

Převzato z databáze [www.chemicalbook.com](http://www.chemicalbook.com)

Pokud se na tuto funkční skupinu naváže esterovou vazbou nějaká další látka (jako je sukcinát v případě TOS, obrázek 18), nemůže již následně působit jako antioxidant (Angulo-Molina *et al.*, 2013). Nicméně se ukázalo, že právě sukcinát navázaný na molekulu  $\alpha$ -tokoferolu umožňuje molekule TOS inhibovat nádorové bujení. Bylo pozorováno, že TOS zpomaluje tvorbu metastáz a vyvolává apoptózu u nádorových buněk *in vivo* a *in vitro* (Jha *et al.*, 1999; Neuzil *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2002). V řadě přehledových článků publikovaných během posledních let (Angulo-Molina *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2009) autoři poukazují na práce, ve kterých byl využit TOS k eradikaci implantované nádorové tkáně *in vivo*, nebo byla prokázána smrt nádorových buněčných linií *in vitro* ať již nekrotickou či apoptotickou formou. Překvapivě se tyto účinky neprojevily na nenádorových buňkách.

Některé studie na nenádorových buňkách dokonce poukazují na protektivní účinek TOS vůči oxidačnímu poškození. Autoři se domnívají, že v cytoplazmě nenádorových buněk jsou přítomny nespecifické intracelulární esterázy, které štěpí molekulu TOS na

antioxidačně působící  $\alpha$ -tokoferol a sukcinát (Fariss *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Otázka účinku TOS na molekulární úrovni jeho protinádorového působení ovšem dodnes není uspokojivě zodpovězena. V jedné práci byla prokázána inhibice transkripčního faktoru NF $\kappa$ B, což vedlo ke smrti nádorových buněk *in vitro* vlivem oxidačního poškození díky jejich snížené antioxidační kapacitě (Bellezza *et al.*, 2012). Také byla opakovaně prokázána zvýšená propustnost vnější mitochondriální membrány (Prochazka *et al.*, 2010). Je tedy možné, že TOS by na molekulární úrovni mohl působit podobně jako Bcl-2 mimetika. Ty způsobují dimerizaci Bax/Bak kanálu na vnější mitochondriální membráně a tím vedou k vyplavení cytochromu c a k zahájení vnitřní apoptotické kaskády. V neposlední řadě byla v četných *in vitro* pracích na kulturách buněk nádorových linií popsána větší produkce ROS po působení TOS (Fukuzawa *et al.*, 2004; Kogure *et al.*, 2004).

Jeden z možných účinků TOS na molekulární úrovni byl navržen poměrně nedávno. Dong *et al.* (2008) ve své práci předpokládá, že TOS selektivně blokuje ubichinon vázající podjednotku mitochondriálního komplexu II (Dong *et al.*, 2008). Tato inhibice má za následek snížení mitochondriální respirace a zpětný tok elektronů z komplexu II na komplex I mitochondriálního respiračního systému a posléze větší tvorbu ROS. Ty poškozují mitochondrie a další buněčné struktury s následným únikem cytochromu c do cytosolu a aktivací vnitřní apoptotické kaskády (Klučková *et al.*, 2013; Ralph *et al.*, 2011).

Dále bylo navrženo, že nejenom komplex II ale i další komplexy respiračního systému mohou být ovlivněny působením TOS a také se zdá, že inhibiční efekt může být specifický dle buněčného typu. Někteří autoři ve svých pracích popisují také inhibici komplexu I a komplexu III (Gruber *et al.*, 2014). Dos Santos *et al.* (dos Santos *et al.*, 2012) objevil, že TOS v buňkách akutní promyelotické leukémie inhiboval převážně komplex I, zatímco aktivita komplexu II zůstala téměř nezměněna. Dále Rauchová *et al.* (2014) popisuje ve své práci inhibiční efekt TOS na další flavoprotein dependentní enzym GPDH v mitochondriích hnědé tukové tkáně (Rauchová *et al.*, 2014). Rozdílný efekt TOS na respiraci komplexu II u mitochondrií nemaligních buněk byl nedávno popsán Gogvadzem (Gogvadze *et al.*, 2010).

## 1.4. Nealkoholová jaterní steatóza

Nealkoholová jaterní steatóza, neboli NAFLD (z anglického „*non-alcoholic fatty liver disease*“), je charakterizována zvýšenou akumulací lipidů v hepatocytech v množství větším než 5% (Nassir and Ibdah, 2014). Pojem NAFLD tedy pokrývá širokou škálu poruch od nezánettivé prosté steatózy, steatózy spojené se zánětem – steatohepatitida (NASH) a dále zánět přecházející ve fibrózu, cirhózu až po hepatocelulární karcinom.

### 1.4.1. Epidemiologie a příčiny nealkoholové jaterní steatózy

NAFLD postihuje cca 20 – 30 % veškeré populace západního světa, z toho 2 – 3 % přejdou v zánětlivou steatohepatitidu, 5 – 8 % z případů NASH přejde v cirhózu během pěti let (Nassir and Ibdah, 2014; Younossi *et al.*, 2004) a 10 – 30 % během následujících 10 let (Bellentani, 2017; Gusdon *et al.*, 2014). NAFLD může dále progredovat až do hepatocelulárního karcinomu (Younossi *et al.*, 2004) dokonce i bez předcházející jaterní cirhózy (Bellentani, 2017). Tato jaterní porucha se vyskytuje u všech světových ras a je popisována u obou pohlaví častěji u obézních, méně často u štíhlých osob (Weston *et al.*, 2005). Nedávno bylo prokázáno, že dospívajících běloši a hispánci jsou oproti afroameričanům více náchylní k NAFLD (Lee and Kuk, 2017), nicméně statistiky se rozcházejí a závěry jednoznačně neprokazují rasové predispozice (Weston *et al.*, 2005).

Příčiny NAFLD můžeme rozdělit na příčiny genetické, farmakologické, metabolické a smíšené. Vzhledem k zaměření této dizertační práce se v následujícím textu budu věnovat především příčinám metabolickým. Metabolické příčiny NAFLD jsou podobné jako příčiny ostatních dalších metabolických onemocnění jako je obezita, diabetes mellitus druhého typu a metabolický syndrom, které jaterní steatózu velmi často doprovází (Calzadilla Bertot and Adams, 2016; Kučera a Červinková, 2014; Masarone *et al.*, 2014; Nassir and Ibdah, 2014).

Výše uvedené choroby jsou často spojeny se zvýšeným kalorickým příjmem s nadměrným množstvím tuků (převážně nasycených mastných kyselin) a sníženou fyzickou aktivitou doprovázející sedavý způsob života. Důsledkem je ektopická akumulace tuků a současné postižení cévního systému (ateroskleróza, hypertenze), inzulínová rezistence a postižení jater NAFLD a NASH (Bellentani, 2017; Calzadilla Bertot and Adams, 2016; Nassir and Ibdah, 2014). Zvýšená akumulace tuků v játrech souvisí jak se zvýšeným zásobením jater VMK v cirkulaci (59 %), tak i z *de novo* lipogeneze (26 %).

Vzhledem k tomu, že přímá inkorporace mastných kyselin z diety do jaterních lipidů tvoří pouhých 15 % (Donnelly *et al.*, 2005) je pravděpodobné, že při obezitě a nadměrném kalorickém příjmu se na nadměrném ukládání lipidů v játrech podílí zejména zvýšený obrat mastných kyselin mezi periferií (zejména tukovou tkání) a játry a přímá inkorporace z potravy tvoří menší část.

#### 1.4.2. Patofyziologie nealkoholové jaterní steatózy

Porucha, která vede k rozvoji NAFLD, se projevuje na několika úrovních lipidového metabolismu. Na orgánové úrovni jde o zvýšený obrat VMK a VLDL mezi játry a periferními tkáněmi. Na intracelulární úrovni jde o poruchu signalizačních kaskád a zvýšenou či sníženou aktivaci metabolických transkripčních faktorů. V poslední době byla zjištěna i porucha na mitochondriální úrovni; zde dochází ke změnám proteinového a lipidového složení IMM. Většina těchto změn je spojena se současnou inzulinovou rezistencí (Alves *et al.*, 2011; Nassir and Ibdah, 2014).

Příjem potravy vede ke zvýšené tvorbě a vylučování inzulinu. Inzulin jako hlavní anabolický hormon stimuluje transport glukózy do buněk, glykolýzu, tvorbu glykogenu a při velkém nadbytku glukózy také její jaterní přeměnu na mastné kyseliny – *de novo* lipogenezi (Ferre and Foufelle, 2010; Gusdon *et al.*, 2014). Podle posledních výzkumů právě alterace *de novo* lipogeneze hraje důležitou roli v patofyziologii NAFLD. Během tohoto procesu jsou stimulovány transkripčními regulátory lipogeneze v játrech SREBP-1c a ChREBP (Ferre and Foufelle, 2010).

Inzulinová rezistence je stav, kdy je snížena odpověď tkání na inzulin. Dochází při ní k nadměrné sekreci inzulinu a k dalšímu zhoršování postprandiální hyperinzulinémie. Rezistence tukové tkáně k inzulinovému signálu má za následek zvýšenou lipolýzu v periferní tukové tkáni a vystupňované zásobení jater VMK. Ty jsou vycytávány hepatocyty pomocí několika transportních proteinů; jde o FABP („*Fatty acid binding protein*“), FAT/CD36 („*fatty acid translocase*“/CD36) a pro játra specifický přenašeč FATP5 („*fatty acid transporter protein type 5*“). Zvýšená exprese těchto proteinů byla prokázána při konzumaci HFD (Miquilena-Colina *et al.*, 2011).

Naproti tomu porucha inzulinové signalizace na úrovni hepatocytu má za následek snížení *de novo* lipogeneze. Sekrece tuků játry normálně probíhá ve formě VLDL.

VLDL jsou lipoproteinové molekuly s hydrofobním jádrem, TAG; cholesterolovými estery a receptorem apoB100. Tvorba VLDL probíhá v hladkém ER a vyžaduje interakci apoB100 a MTTP („*microsomal triglyceride transfer protein*“), což je proces regulovaný inzulinem. Ten inhibuje posttranslační degradaci apoB100 a ve výsledku vede ke snížené tvorbě TAG a snížené sekreci VLDL játry a zahlcení jater VMK z tukové tkáně (Choi and Ginsberg, 2011). Již dříve bylo prokázáno, že mutace v jedné z těchto dvou složek (MTTP/apoB100) způsobuje zvýšenou akumulaci tuků v játrech (Schonfeld, 2003).

Inzulinová rezistence však sama o sobě nemusí způsobovat NAFLD. V dnešní literatuře se setkáváme se dvěma teoriemi vzniku NAFLD: „*Two-hit theory*“ (Day and James, 1998); popř. novější „*Multi-hit theory*“ (Tilg and Moschen, 2010). Obě dvě teorie předpokládají, že ke vzniku NAFLD je potřeba stavu inzulinové rezistence a následně ještě dalšího patologického impulzu. Těmito impulzy mohou být: oxidační stres (Lewis and Mohanty, 2010; Rolo *et al.*, 2012), mitochondriální dysfunkce (Wei *et al.*, 2008), zvýšená tvorba prozánětlivých cytokinů a zánětlivá reakce (Kučera a Červinková, 2014; Rolo *et al.*, 2012) a podobně. Vzhledem k faktu, že NAFLD přispívá inzulinové resistenci, diabetu a ty zase zvyšují riziko NAFLD, je takto vytvářen jakýsi bludný kruh (Loria *et al.*, 2013).

Zvýšená tvorba prozánětlivých cytokinů a následná aktivace Itových buněk v průběhu NAFLD má dlouhodobě za následek tvorbu a depozici kolagenu v jaterním parenchymu a fibrózu jater (Pellicoro *et al.*, 2014). Deregulace lyzozomálního metabolismu a stres endoplazmatického retikula vede k buněčné nekróze a apoptóze hepatocytů (Kučera a Červinková, 2014). Je však třeba zdůraznit, že přechod NAFLD do zánětlivého NASH je stále předmětem výzkumu a přesný mechanismus dodnes nebyl uspokojivě vyřešen.

Dalším hormonem, jehož funkce a vylučování je narušeno během rozvoje NAFLD, je adiponektin. Adiponektin je hormon secernovaný adipocyty do cirkulace a má protektivní úlohu při rozvoji jaterní steatózy u obézních jedinců. Nižší hladiny adiponektinu jsou nezávislým rizikovým faktorem rozvoje jaterní steatózy (Jung and Choi, 2014). Experimentální léčba adiponektinem u NAFLD myši zvyšovala aktivitu mitochondriálního elektron transportního systému, způsobovala upregulaci UCP2 a snižovala produkci ROS (Zhou *et al.*, 2008).

#### **1.4.2.1. Mitochondriální změny v patofyziologii NAFLD**

Jak již bylo zmíněno v předchozí části, rozvoj NAFLD je úzce spojen s poruchou mitochondriálních funkcí hepatocytů (Gusdon *et al.*, 2014; Cheung and Sanyal, 2008; Ibdah *et al.*, 2005; Nassir and Ibdah, 2016; Rolo *et al.*, 2012). Mitochondriální dysfunkce logicky může přispívat k patofyziologii NAFLD, neboť mitochondrie jsou místem křížení hlavních metabolických drah, probíhá v nich  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, hrají klíčovou úlohu v regulaci oxidačního stresu, apoptózy atd. Byla také prokázána spojitost s mitochondriální dysfunkcí nejen jater, ale i dalších orgánů např. buněk tukové tkáně a příčně pruhované svaloviny (Chow *et al.*, 2010). Otázka, do jaké míry je mitochondriální dysfunkce příčinou nebo i následkem inzulínové rezistence, dodnes nebyla uspokojivě zodpovězena.

Z pohledu morfologie postižených mitochondrií při inzulínové rezistenci se zdá, že je upřednostněno zejména rozpojování mitochondriální sítě, čímž dochází k tvorbě menších separovaných mitochondriálních jednotek (Wada and Nakatsuka, 2016). Rovněž byl popsán výskyt parakrystalických inkluzí v mitochondriální matrix (FF; Sanyal *et al.*, 2001). HFD má vliv na strukturu a kompozici fosfolipidů membrán jaterních mitochondrií (Aoun *et al.*, 2012; Vial *et al.*, 2011). Byla prokázána zvýšená inkorporace kardiolipinu do mitochondriální membrány při jaterní steatóze potkanů (Aoun *et al.*, 2012). Zvýšená akumulace tuků a inzulínová rezistence byly doprovázeny větším oxidačním stresem a změnou dynamiky strukturních mitochondriálních proteinů (Lionetti *et al.*, 2014), autoři této práce prokázali zvýšenou expresi proteinů zahrnutých v procesu mitochondriálního rozpojování Fis1 a DRP-1 a zároveň sníženou expresi proteinu Mfn2, který je jeden z hlavních proteinů mitochondriálního spojování. Některé studie popisují snížení absolutního počtu mitochondrií v přepočtu na buňku (Wada and Nakatsuka, 2016). U potkanů s NAFLD byla prokázána snížená exprese hlavního regulačního faktoru mitochondriální biogeneze *PGC-1 $\alpha$*  a dalších genů aktivovaných tímto transkripčním faktorem, např. NRF1 (Aharoni-Simon *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

V případě buněk příčně pruhované svaloviny se nově ukazuje potencionální role lipoproteinové lipázy a VMK v regulaci množství svalových mitochondrií (Morino *et al.*, 2012). Primární defekt v mitochondriální  $\beta$ -oxidaci způsobuje jaterní inzulínovou rezistenci nezávisle na obezitě či HFD (Ibdah *et al.*, 2005; Nassir and Ibdah, 2014).

Výsledky na svalové i jaterní tkáni tak mohou svědčit o důležité úloze mitochondrií v rozvoji NAFLD a inzulinové resistance.

## **Cíle práce:**

- a) Studium účinku nových protinádorových molekul na izolované hepatocyty potkana a myši
  - Toxicita
  - Vliv na mitochondriální funkce
  
- b) Studium změn mitochondriální respirace jater potkana s nutričně navozenou jaterní steatózou

## 2. Metody

### 2.1. Použité chemikálie a média

Všechny použité chemikálie byly alespoň kvality analytického stupně. Pokud není uvedeno jinak, byly chemikálie pořízeny od společnosti Sigma-Aldrich.

#### 2.1.1. Roztoky a média použité v dizertační práci

##### 2.1.1.1. Roztoky pro izolaci mitochondrií

Pro izolaci mitochondrií byly použity následující izolační roztoky: homogenizační roztok pro přípravu jaterního homogenátu obsahující etylenglykol-bis( $\beta$ -aminoetyler)-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny (EGTA), která je důležitá pro vychytání přítomných  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (**H roztok**), a izolační roztok bez EGTA (**I roztok**).

Pro přípravu **H roztoku** byla použita baňka o objemu 1 litru, do které bylo přidáno 20 g D-manitolu (výsledná koncentrace 220 mmol/l), 12 g sacharózy (70 mmol/l), 120 mg 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonové kyseliny (HEPES; 1 mM) a 190 mg EGTA (1mM) a doplněno do 500 ml deionizovanou vodou. Následně byl roztok důkladně promíchán při pokojové teplotě. Po úplném rozpuštění všech chemikálií bylo přidáno 0,25 g albuminu z bovinního séra (BSA) a ten byl ponechán v roztoku k pozvolnému rozpuštění (bez míchání). Nakonec bylo upraveno pH na hodnotu 7,2 při pokojové teplotě.

Stejný postup byl použit pro přípravu **I roztoku**, ale v tomto případě byl vynechán krok s EGTA a BSA. Hodnota pH tedy byla upravena již po rozpuštění výše zmíněných chemikálií. Složení obou izolačních roztoků je pro větší přehlednost uvedeno v tabulce 1.

Chemikálie	H roztok	I roztok
D-Manitol	220 mM	220 mM
Sacharóza	70 mM	70 mM
HEPES	1 mM	1 mM
EGTA	1 mM	x
BSA	0,5 g/l	x

Tabulka 1. Roztoky pro izolaci jaterních mitochondrií.

### 2.1.1.2. *Roztoky pro izolaci hepatocytů*

Pro izolaci potkaních a myších hepatocytů bylo využito těchto 3 pufrů: Perfúzní roztok pro promytí jater bez přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (**roztok A**), perfúzní recirkulační médium s kolagenázou a  $\text{Ca}^{2+}$  ionty (**roztok B**) a neutralizační roztok s rozpuštěným albuminem pro inaktivaci kolagenázy (**Krebs-Henseleitovo médium**).

Pro přípravu **roztoku A** byla použita baňka o objemu 2,5 litru, do které bylo přidáno 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 98 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 120 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 60 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,188 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,19 g EGTA a doplněno do 1000 ml deionizovanou vodou. Následně byl pufr důkladně promíchán a výsledné pH bylo poté upraveno na 7,3 – 7,4 při pokojové teplotě. Pro jednu izolaci bylo potřeba 250 ml **roztoku A**.

Pro přípravu **roztoku B** byl použit obdobný postup jako u **roztoku A** s vynecháním EGTA. Místo EGTA bylo přidáno 588 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a bylo upraveno pH na 7,3 – 7,4. Do 200 ml **roztoku B** bylo zhruba 5 minut před izolací přidáno 55 mg surové kolagenázy (SEVAC) a ta byla ponechána k volnému rozpuštění bez míchání. Množství použité kolagenázy pro potřeby izolace hepatocytů se může lišit, neboť její aktivita nemusí být u všech šarží stejná a proto je nutno pro novou šarži kolagenázy vždy vytitrovat optimální dávku. Pro jednu izolaci bylo potřeba 200 ml **roztoku B**.

Pro přípravu **Krebs-Henseleitova média (K-H medium)** byla použita baňka o objemu 2,5 litru, do které bylo přidáno 6,9 g NaCl, 0,36 g KCl, 144 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 130 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g  $\text{NaHCO}_3$ , 374 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,9 g glukózy a doplněno do 1000 ml deionizovanou vodou. Následně byl pufr důkladně promíchán. Do 100 ml **K-H média** bylo asi 5 minut před izolací přidáno 1,333 g BSA a ten byl volně rozpuštěn bez míchání. Pro jednu izolaci bylo potřeba 100 ml **K-H média**.

Složení všech roztoků potřebných pro izolaci hepatocytů je pro větší přehlednost uvedeno v tabulce 2.

<b>Chemikálie</b>	<b>Roztok A</b>	<b>Roztok B</b>	<b>K-H medium</b>
NaCl	136,9 mM	136,9 mM	118 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM	4,8 mM
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,7 mM	0,7 mM	1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,45 mM	0,45 mM	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	26 mM	26 mM	23,8 mM
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	x	4,6 mM	2,9 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,35 mM	0,35 mM	x
Glukóza	x	x	5 mM
EGTA	0,5 mM	x	x
Kolagenáza	x	Přidat	x
BSA	x	x	Přidat

**Tabulka 2. Roztoky pro izolaci hepatocytů.**

#### **2.1.1.3. Média a roztoky určené pro měření mitochondriálních funkcí**

Pro kvalitativní měření MMP pomocí fluorescenční sondy Safranin O a pro měření spotřeby kyslíku pomocí respirometrie s vysokým rozlišením byla využita tato respirační média: Jednoduché respirační K<sup>+</sup>-medium bez přidaného albuminu (**K-med**) (Pecinova *et al.*, 2011); a více komplexní respirační médium **MiR05** (Gnaiger *et al.*, 2000), ve kterém je hlavní osmoticky aktivní látkou sacharóza a pro stabilizaci mitochondriální membrány obsahuje také albumin o koncentraci 1 g/l. Složení respiračních médií je pro přehlednost uvedeno v tabulce 3.

#### **2.1.1.4. Roztoky a média určené pro práci s buněčnými kulturami**

Pro kultivaci izolovaných hepatocytů v monolayeru na polystyrenových destičkách bylo využito komerčního **Williamsova média E (WE médium; Baria s.r.o., Praha)** s následujícími aditivy: glutamin (2 mmol/l), penicilin (100.10<sup>3</sup> IU/l), streptomycin (10 mg/ml), inzulin (80 IU/l), dexametazon (0,12 mg/l) a glukagon (8 µg/l).

Chemikálie	K-med	MiR05
KCl	80 mM	x
Sacharóza	x	110 mM
K-laktobionát	x	60 mM
K-HEPES	x	20 mM
Tris	10 mM	x
Taurin	x	20 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM	10 mM
NaCl	x	x
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	x	x
MgCl <sub>2</sub>	3 mM	3 mM
EGTA	x	0,5 mM
EDTA	1 mM	x
BSA	x	1 g/l

**Tabulka 3. Složení respiračních médií**

## 2.2. Příprava vzorků

### 2.2.1. Zvířata

K pokusům uvedeným v této dizertační práci byli použiti samci potkanů kmene Wistar a samci myši kmene C57Bl/6. Pokud není uvedeno jinak, byla hmotnost potkanů  $250 \pm 30$  g a myši  $28 \pm 3$  g. Zvířata byla zakoupena od společnosti Velaz s.r.o. (Lysá nad Labem, Česká republika) a byla krmena standardní dietou zakoupenou od společnosti Velaz (ST-1), nebo nízkotukovou dietou (C 1090-10; 10 % energie ve formě tuků) či vysokotukovou dietou (C 1090-70; 70 % energie ve formě tuků) s přidanými 1,25 % cholesterolu (obě diety byly zakoupeny od společnosti Altromin, Německo). Všechna zvířata byla chována za standardních chovných podmínek při teplotě  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , vlhkosti vzduchu  $55\% \pm 10\%$  s pravidelnou cirkulací vzduchu 12–14x/hod a 12 hodinovým cyklem světlo/tma. Po celou dobu byl pokusným zvířatům umožněn volný přístup k vodě a potravě.

Experimentální protokoly byly schváleny Odbornou komisí pro dobré životní podmínky pokusných zvířat Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy a Rezortní komisí Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy. Všechny invazivní postupy

byly provedeny pod celkovou anestezií éterem (v digestoři) u potkanů a ketamin-xylozínovou anestezií u myši (Narketan 1  $\mu$ l + Rometar 0,5  $\mu$ l na 1 g hmotnosti myši).

## 2.2.2. Izolace hepatocytů

### 2.2.2.1. Postup izolace

Potkaní hepatocyty byly izolovány modifikovanou metodou dvoustupňové kolagenázové perfúze dle (Berry M.N. *et al.*, 1991). Proces izolace hepatocytů z jater potkana byl proveden v těchto následujících krocích:

- Potkan/myš byl uveden do celkové anestezie (viz výše).
- Anestetizované zvíře bylo připevněno za horní a dolní končetiny na operační stůl.
- Břišní část byla potřena dezinfekčním roztokem a dutina břišní byla otevřena stříhem do tvaru písmene V.
- Střeva byla odsunuta k levé straně zvířete, čímž došlo k uvolnění přístupu k dolní duté žíle.
- Do dolní duté žíly bylo aplikováno 0,3 ml heparinu o koncentraci 833,3 mj/ml (Heparin Léčiva, 10 ml o koncentraci 5000 m.j./ml, ředěný fyziologickým roztokem).
- Tupou preparací a za stálého vlhčení dutiny břišní byl uvolněn přístup k portální žíle.
- Pod portální žílu byla založena volná ligatura.
- Portální žíla byla nastřížena a dovnitř byla vsunuta kovová perfúzní kanyla, která byla následně zajištěna připravenou ligaturou.
- Kanyla byla připojena k perfúzní aparatuře (obrázek 19) a játra byla propláchnuta *in situ* **roztokem A**. (pozn. o úspěšnosti kanylace svědčí mírné zvětšení a odbarvení jater vlivem toku perfúzního roztoku a vymytím krve z jater)
- Z důvodu zamezení mechanického poškození hepatocytů zvýšeným intrahepatálním tlakem byla prostříhnuta dolní dutá žíla.
- Játra byla vystřížena z dutiny břišní.

- Po promytí jater perfúzním roztokem, byla játra s kanylou umístěna do speciálního stojánku a umístěna do kádinky s **roztokem B**.
- Poté byla zahájena 14 minutová recirkulační perfuze jater **roztokem B** obsahujícím kolagenázu (pozn.: hladina **roztoku B** v zásobníku musí být udržována stále ve stejné výšce k zajištění konstantního perfúzního tlaku).
- Optimální rychlost perfúze byla stanovena na 40 – 50 ml/min (Lotková, 2000).
- Následně byla játra umístěna do **K-H média**, kde byla jemně mechanicky rozvolněna krouživými pohyby o stěnu kádinky.
- Vzniklá tkáňová suspenze byla přefiltrována přes 4 vrstvy sterilní gázy do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugována po dobu 5 minut při 4 °C (28g, *Rotina 35R*).
- Supernatant byl odsán a buňky byly znovu propláchnuty **K-H médiem** a opět centrifugovány za stejných podmínek.
- Centrifugace byla opakována celkem třikrát.
- Bezprostředně po izolaci byla stanovena viabilita a denzita izolovaných hepatocytů.

#### **2.2.2.2. Počítání a stanovení viability hepatocytů**

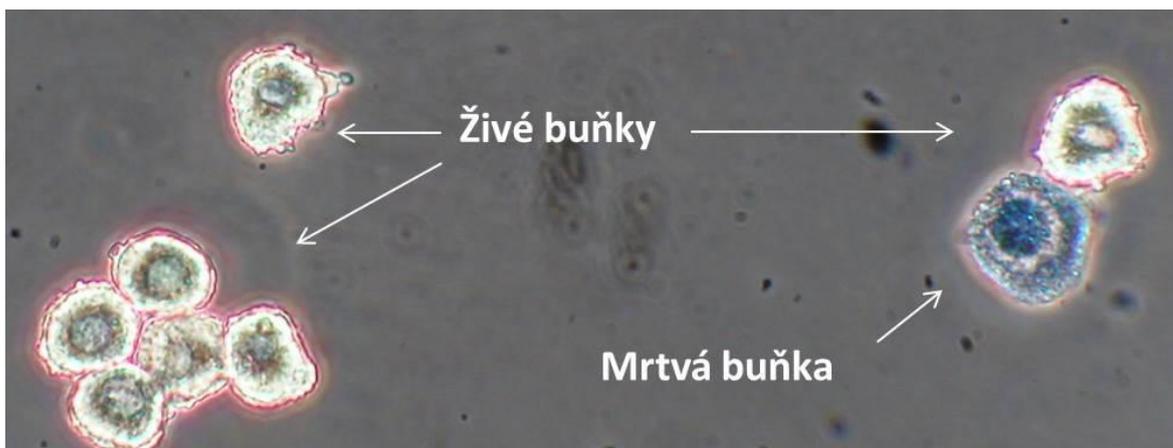
Pro stanovení viability čerstvě naizolovaných hepatocytů bylo využito barvení trypanovou modří (sodná sůl toluidin-diazo-diamino-naftol-disulfidové kyseliny). Viabilní hepatocyty jsou schopny udržovat negativní membránový potenciál cytoplazmatické membrány a tím držet trypanovou modř mimo cytoplazmu. Toto neplatí v případě neviabilních hepatocytů, které nejsou metabolicky aktivní a proto akumulují trypanovou modř a pod mikroskopem jsou modře zbarvené. Provedení této metody spočívá v tom, že 10 µl buněčné suspenze je smícháno s 10 µl trypanové modři na podložním sklíčku. Následně vzniklou směs přikryjeme krycím sklíčkem a viabilitu ihned odečítáme pod mikroskopem. Obarvené buňky jsou buňky mrtvé a buňky neobarvené jsou viabilní (obrázek 20). Pro správné zhodnocení viability je nutno spočítat buňky minimálně v 10 zorných polích s alespoň 15 buňkami na jedno zorné pole. Celkovou viabilitu izolovaných hepatocytů vyjádříme v procentech. V našich experimentech jsme

používali pouze buňky z izolace s více než 90% viabilitou pro hepatocyty izolované z jater potkanů a více než 80% viabilitou hepatocytů myší.



**Obrázek 19. Operační stůl a perfúzní aparatura na izolaci hepatocytů.**

1 – operační stůl pro připevnění laboratorního zvířete; 2 – chirurgické nástroje; 3 – perfúzní pumpa; 4 – zásobník na perfúzní roztok; 5 – vodní lázeň s roztoky a nádobami pro perfúzi jater; 6 – lahve s připravenými izolačními médii.



**Obrázek 20. Test viability pomocí barvení hepatocytů trypanovou modří.**

Počítání denzity buněk provádíme automaticky pomocí přístroje Cellometer (Nexcelom Bioscience LLC., MA, USA) ve 100x zředěné suspenzi izolovaných hepatocytů.

### **2.2.3. Příprava jaterního homogenátu a izolace mitochondrií**

#### **2.2.3.1. Izolace mitochondrií pomocí diferenční centrifugace**

Jaterní mitochondrie byly izolovány metodou diferenční centrifugace podle dříve popsáního protokolu (Bustamante *et al.*, 1977) s modifikacemi (Drahota *et al.*, 2012; Pecinova *et al.*, 2011). Proces izolace jaterních mitochondrií probíhá v několika následujících krocích:

1. Játra po vyjmutí opláchneme v homogenizačním **H roztoku** a zvážíme.
2. Odebereme 3 g jaterní tkáň a homogenizujeme pomocí teflonového homogenizátoru při teplotě 0 °C v **H roztoku**.
3. Jaterní homogenát (10%) následně centrifugujeme po dobu 10 minut při teplotě 4°C rychlostí 800g.
4. Supernatant přefiltrujeme přes sterilní gázu, doplníme opět **H roztokem** do daného objemu a centrifugujeme po dobu 10 minut při teplotě 4°C rychlostí 8000g.

5. Supernatant po druhé centrifugaci odstraníme a vzniklou peletu pomalu resuspendujeme v izolačním **I roztoku**. Při tomto kroku musíme dbát na to, abychom špičkou pipety nepoškodili mitochondrie v peletě a proto musíme eliminovat veškerý přímý styk pelety a špičky pipety. Po resuspendování centrifugujeme po dobu 10 minut opět při teplotě 4°C rychlostí 8000g.
6. Po třetí centrifugaci mitochondrie v peletě opět opatrně resuspendujeme ve zhruba 2 až 3 ml izolačního **I roztoku** na výslednou koncentraci 20 – 30 mg proteinu/ml.
7. V izolovaných mitochondriích stanovíme množství celkového proteinu a uchováváme je při teplotě 0°C. Doba spotřeby takto izolovaných mitochondrií záleží na metodě, kterou budeme aplikovat. Pro respiometrii a měření MMP je můžeme použít po dobu maximálně 6 hodin pro zachování jejich kvality a kvality měření.

#### **2.2.3.2. Stanovení množství proteinů dle Bradfordovy metody**

Pro stanovení množství proteinů v buněčné kultuře, homogenátu, či mitochondriální suspenzi bylo využito Bradfordovy metody (Bradford, 1976) s použitím BSA jako standard. Jedná se o kolorimetrickou metodu, jejíž podstatou je navázání reakčního činidla (Coomasie Brilliantová modř G 250) v kyselém prostředí na argininové skupiny proteinů. S proteiny takto vytváří stabilní komplexy s absorbcí 465 nm a 595 nm. Absorbance byla měřena pomocí spektrofotometru TECAN infinite M200 (Tecan Group AG, Männedorf, Švýcarsko).

### **2.3. Buněčné kultury**

#### **2.3.1. Příprava kultur**

Izolované hepatocyty byly nasazeny na titrační destičky potažené kolagenem. Pro naše pokusy byly k inkubaci využity 6-jamkové ( $1 \times 10^6$  buněk/jamka, objem 1 ml), 12-jamkové ( $2.5 \times 10^5$  buněk/jamka, objem 0,5 ml), nebo 96-jamkové ( $3.3 \times 10^4$  buněk/jamka, objem 0,1 ml) destičky (NUNC, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Buňky byly inkubovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C ve vlhčeném vzduchu obohaceným 5% CO<sub>2</sub>. Buněčné kultury byly napřed ponechány dvě hodiny pro přichycení hepatocytů ke kolagenovému povrchu v přítomnosti **WE média** s aditivou, doplněným o 6% fetální bovinní sérum (Merck-Millipore, Berlin, Germany). Poté, bylo médium vyměněno za **WE**

**médium** bez fetálního séra, které již obsahovalo námi studované toxické látky, a buňky byly kultivovány dle stanovených protokolů.

### **2.3.2. Biochemické testy na buněčných kulturách**

#### **2.3.2.1. Test aktivity laktátdehydrogenázy kultivovaných hepatocytů**

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytoplazmatický enzym, který katalyzuje obousměrnou reakci pyruvátu na laktát za oxidace NADH a tvorby NAD<sup>+</sup>. LDH je intracelulární enzym, který z buňky uniká po poškození plazmatické membrány. Aktivita LDH v EC tekutině proto vždy znamená narušení určitého procenta buněk v kultuře. Vyšší hodnoty svědčí o poškození integrity cytoplazmatické membrány u více buněk, výsledné poškození buněk v kultuře je tedy vyšší. Z naměřených hodnot IC a EC aktivit LDH můžeme vyjádřit *LDH leakage*. Ten odráží procento buněk v kultuře, které zanikly během inkubace. Pro měření LDH si nejdříve připravíme komerčně prodávaný biochemický set dle návodu výrobce (Abcam PLC, Connecticut, US). Po přidání reakčního činidla k měřenému vzorku hodnotíme úbytek absorbance ve spektrofotometru při vlnové délce 340 nm. Vyšší změna absorbance vyjadřuje vyšší aktivitu LDH.

#### **2.3.2.2. Test aktivity buněčných dehydrogenáz (WST-1 test)**

Test aktivity buněčných dehydrogenáz byl použit jako další test viability kultivovaných hepatocytů. V tomto testu dochází ke konverzi tetrazoliové soli WST-1 na barevný formazán s absorpčním maximem při vlnové délce 440 nm. Na začátku tohoto měření nejprve odebereme kultivační medium z buněčné kultury, přidáme **WE médium** s přidaným WST-1 činidlem (10:1) a následně změříme absorbanci při 440 nm vlnové délky. Destičku poté necháme v CO<sub>2</sub> inkubátoru po dobu 90 minut a pak změříme absorbanci znovu. Nárůst absorbance při této vlnové délce během devadesáti minut odpovídá aktivitě těchto dehydrogenáz v buněčné kultuře. V kulturách se sníženou viabilitou buněk resp. sníženou aktivitou dehydrogenáz nalezneme tedy pokles v porovnání s kontrolní skupinou.

#### **2.3.2.3. Test aktivity kaspázy 3**

Aktivita kaspázy 3 jako markeru apoptózy byla měřena v lyzovaných buňkách po přidání speciálního pufru (Cell Lysis Buffer, Cell Signaling Technology Inc., MA, USA). Do lyzátu byl následně přidán specifický substrát pro kaspázu-3 N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylkumarin (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). Aktivity byly

měřeny ve fluorescenčním módu spektrofluorometru TECAN Infinite M200. Excitační a emisní vlnové délky byly 350 nm a 460 nm.

#### **2.3.2.4. Měření produkce albuminu**

Měření produkce albuminu, jako ukazatelé funkční kapacity hepatocytů, bylo stanoveno ELISA metodou s použitím protilátek proti potkanímu albuminu (Baria s.r.o., Praha). Množství albuminu bylo měřeno v extracelulárním médiu buněčných kultur po 20 hodinové inkubaci a porovnávalo s kontrolními vzorky v daném časovém intervalu. Metoda ELISA byla prováděna podle instrukcí dodavatele.

#### **2.3.2.5. Hodnocení produkce reaktivních forem kyslíku pomocí H<sub>2</sub>DCFDA**

Produkce ROS byla hodnocena za využití kvalitativní metody 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetátu (H<sub>2</sub>DCFDA). Tato metoda je založena na využití fluorescenční sondy H<sub>2</sub>DCFDA jak již bylo popsáno ve dřívějších pracích našeho ústavu (Kučera *et al.*, 2014). Ve zkratce fluorescenční sonda H<sub>2</sub>DCFDA může být oxidována vlivem ROS za tvorby fluorescenční látky 2',7'-dichlorofluoresceinu (DCF). Fluorescence DCF byla následně detekována pomocí přístroje TECAN Infinite M200 spektrofluorometer s excitačními a emisními vlnovými délkami 495 respektive 520 nm.

#### **2.3.3. Mikroskopické hodnocení buněčných kultur**

Fotografie kultur hepatocytů byly pořízeny pomocí mikroskopu Olympus IX51 a fotoaparátu E-600 Digital Camera (Olympus Corp., Tokyo, Japan) a s využitím softwaru Quick Photo Camera 3.0 (Promicra, s.r.o., Prague, Czech Republic). Měřítka (50 μm) byly přidány pomocí softwaru Quick PhotoCamera, žádné jiné změny, kromě změny velikosti obrázku, nebyly provedeny. V této dizertační práci byly použity dva typy vizualizace: fázový kontrast a fluorescenční barvení JC-1 (Kučera *et al.*, 2012). Pro hodnocení buněk jsme využili zvětšení objektivu 10x, 20x a 40x.

##### **2.3.3.1. Fluorescenční barvení JC-1**

K vizualizaci MMP kultivovaných hepatocytů bylo použito fluorescenční barvení JC-1. Fluorescenční sonda JC-1 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) se rozpustí v DMSO a vytvoří se zásobní roztok o koncentraci 2 mg/ml. Následně se ze zásobního roztoku odebere 50 μl a ty se přidají k předeřátému Willamsovu mediu E bez FBS o objemu 10 ml čímž docílíme výsledné koncentrace 10 μM. Je nutno mít temperované Willamsovo medium E a dbát o dobré rozpuštění JC-1 sondy, jelikož má tendenci

precipitovat a poté může dojít k nedokonalému obarvení. Když docílíme kvalitního rozpuštění JC-1, vyklepeme kultivační médium z destičky a přidáme Williamsovo medium E s přidanou sondou JC-1. Takto ošetřené buňky necháme inkubovat po dobu 30 – 40 minut v CO<sub>2</sub> inkubátoru (Kučera *et al.*, 2014). Abychom zabránili rozdílným časům inkubace s JC-1 sondou při focení různých skupin a tím pádem falešně pozitivním výsledkům, můžeme Williamsovo medium E s rozpuštěnou JC-1 sondou přidávat do jednotlivých jamek na destičce se zpožděním. Musíme ovšem pečlivě dbát na to, aby nedocházelo k vystavení roztoku či destičky světlu. Pro statistické vyhodnocení MMP hepatocytů v kultuře jsme počítali buňky vždy minimálně z deseti zorných polí a z nejméně čtyř různých izolací.

## **2.4. Laboratorní metody pro zhodnocení mitochondriálních funkcí**

### **2.4.1. Hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu**

Kromě výše zmíněného hodnocení MMP v buněčných kulturách bylo v dizertační práci využito sledování změn MMP v suspenzích izolovaných mitochondrií. Takto měřený MMP může být kvantitativní nebo kvalitativní. Kvantitativně sledujeme přesnou hodnotu MMP pomocí kationtů, jako je např. trimetyl tetrafosfoniový kationt, vyjádřenou v jednotkách napětí. Kvalitativně můžeme sledovat pouze relativní změnu, tedy zvýšení, či snížení. V této dizertační práci byla využita fluorescenční sonda Safranin O pro kvalitativní hodnocení změn MMP vyvolaných toxickými agens.

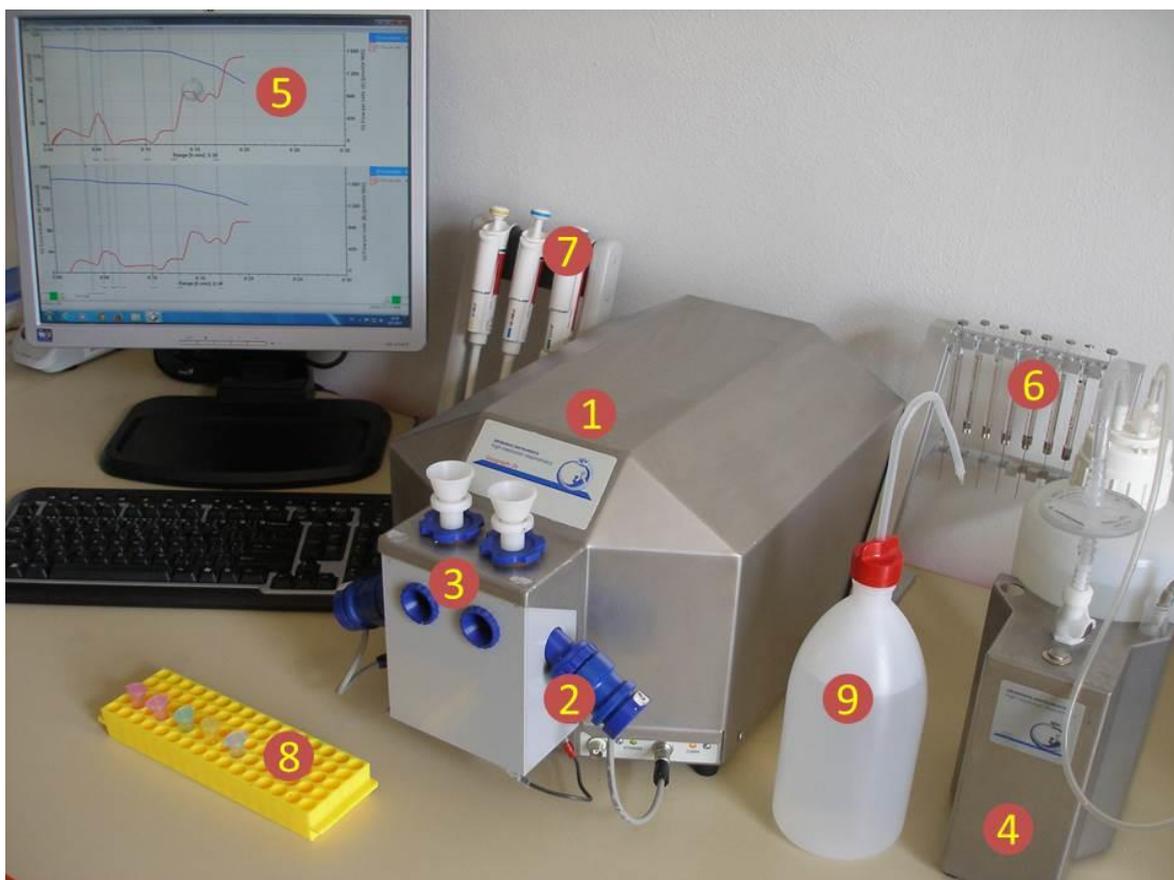
### **2.4.2. Fluorescenční sonda Safranin O**

MMP byl kvalitativně hodnocen pomocí fluorescenční sondy Safranin O dle dříve popsané metody (Akerman and Wikstrom, 1976). Ve zkratce se fluorescenční kationtová sonda akumuluje v mitochondriální matrix, ve které se udržuje negativní náboj, díky přenosu vodíkových kationtů mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránu. Takto udržovaný MMP lze detekovat jako pokles fluorescence Safraninu O po přidání mitochondrií do média s fluorescenční sondou. Při porušení integrity vnitřní mitochondriální membrány, nebo při narušení transportu protonů přes membránu dochází k poklesu MMP a fluorescence začne opět stoupat. Změny MMP jsme detekovali na spektrofotometru AMINCO-Bowman Series 2 při 30°C v kvetě o objemu 1 ml. Koncentrace mitochondriálního proteinu byla v průměru 0,1 mg/ml, měření bylo prováděno v K-mediu a excitační a emisní vlnové délky byly 495 resp. 586 nm.

### **2.4.3. Respirometrie**

#### **2.4.3.1. Představení metody**

Pro zhodnocení mitochondriální respirace jsme využili Oxygrafu-2k od společnosti OROBOROS (Innsbruck, Rakousko). Tento systém byl speciálně vyvinut pro detekci minimálních změn koncentrace kyslíku v uzavřeném systému. Oxygraf-2k obsahuje dva polarografické kyslíkové sensory (obrázek 21) se zlatou a stříbrnou katodou resp. anodou, upevněné v oddělených komůrkách o kalibrovaném objemu 2 ml. Tyto komůrky jsou speciálně zkonstruované z duranového skla a izolované od okolního prostředí materiály, které umožňují pouze minimální difúzi kyslíku do média a velmi přesnou kontrolu teploty až na 0,001°C. Tyto vlastnosti umožňují Oxygrafu-2k zachovat velice stabilní signál pro rozpoznání rozdílů v koncentraci rozpuštěného kyslíku o hodnotě až 50 nM a být proto jedinečným přístrojem pro studium mitochondriální fyziologie (Pesta and Gnaiger, 2012).



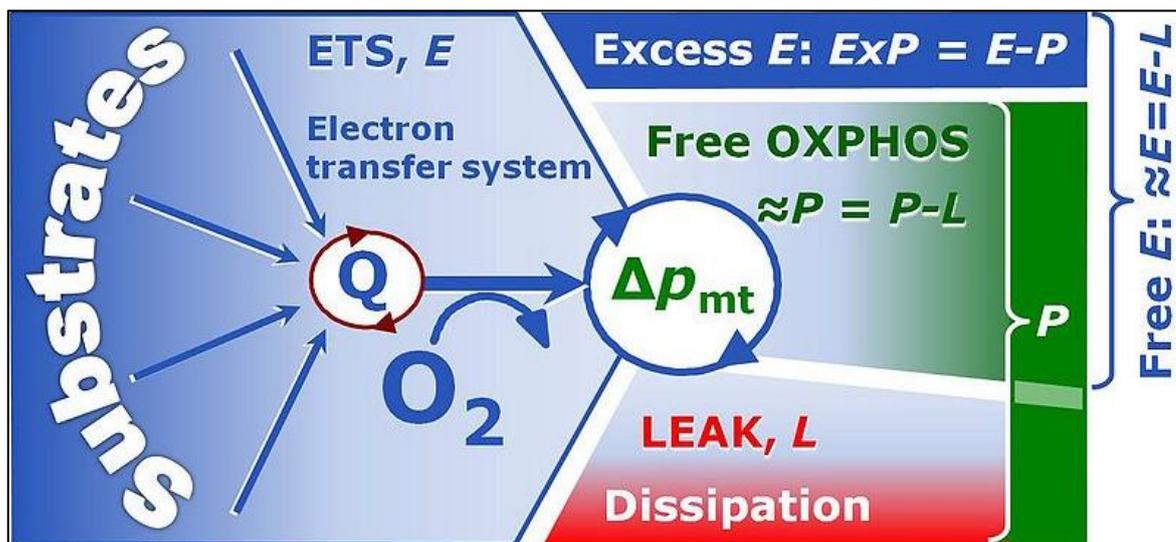
**Obrázek 21. Respirometr s vysokým rozlišením OROBOROS Oxygraph-2k.**

1 – Oxygraf-2k; 2 – polarografický sensor; 3 – komůrky oxygrafu pro měřený vzorek; 4 – pumpa určená pro čištění komůrek; 5 – monitor počítače s právě probíhajícím měřením pomocí softwaru DatLab; 6 – Hamiltonovy stříkačky určené pro titraci substrátů a inhibitorů do komůrky oxygrafu; 7 – pipety; 8 – zkumavky se substráty; 9 – nádoba s etanolem pro čištění a konzervaci komůrek.

#### **2.4.3.2. Respirační stavy mitochondrií**

V této dizertační práci budeme užívat nejnovější mezinárodní terminologii, která byla vyvinuta za účelem standardizace v oblasti komparativní mitochondriální fyziologie. Pro popis mitochondriální respirace užíváme několik respiračních stavů (obrázek 22). V klasické práci z roku 1955 Chance a Willams popisují pět respiračních stavů (Chance and Williams, 1955). Tyto respirační stavy jsou dodnes uznávány jako základní kameny mitochondriální fyziologie, nicméně s dnes již rozšířeným poznáním a metodologií bylo nutno toto rozdělení více specifikovat. Nové názvosloví, které budeme využívat i v této práci, navrhl a začal používat tým prof. Gnaigera z Rakouska (Gnaiger, 2014). V této práci

tedy budeme hovořit o respiračních stavech popisujících aktuální spřažení/rozpřažení oxidativní fosforylace a sice LEAK, OXPHOS a ETS (obrázek 22).



**Obrázek 22. Schéma respiračních stavů dle názvosloví MITOEAGLE.**

Převzato z (Gnaiger, 2014).

#### 2.4.3.2.1. LEAK respirace

Stav LEAK (z anglického slova „leak“ – propouštět) je spřaženým respiračním stavem, ve kterém je spotřeba kyslíku na IMM nejmenší. Tohoto respiračního stavu můžeme dosáhnout při absenci ADP, když do mitochondriální suspenze přidáme substráty pro tvorbu redukčních kofaktorů. LEAK tím pádem vyjadřuje situaci s nejvyšším MMP na IMM, kdy spotřeba kyslíku a transport vodíkových protonů kompenzuje protony, které unikají či prosakují skrz IMM do mitochondriální matrix nezávisle na ATP syntáze. Zároveň se v LEAK stavu k těmto unikajícím protonům řadí ty, které jsou využity pro nefosforylační reakce na IMM (transport látek, apod.). Stav LEAK navodíme přidáním substrátů pro tvorbu redukčních kofaktorů a zahájením transportu elektronů v systému mitochondriálních respiračních proteinů. Více o substrátové kontrole bude uvedeno v další části práce, zaměřené na mitochondriální substráty.

#### 2.4.3.2.2. OXPHOS respirace

Další respirační stav OXPHOS (zkratka anglického „oxidative phosphorylation“ – oxidativní fosforylace) reprezentuje situaci na IMM, ve které již dochází k fosforylaci ADP na ATP. Tato fosforylace vyžaduje funkční enzym ATP syntázu a probíhá za

současného přesunu vodíkových iontů z IMS do mitochondriální matrix. Tímto přesunem protonů dle elektrochemického gradientu dojde ke snížení MMP s následným zrychlením transportu protonů jednotlivými respiračními komplexy, zrychlením toku elektronů respiračním systémem a ve výsledku zvýšenou spotřebou kyslíku v komůrce, kterou zaznamenáme pomocí polarografického sensoru.

#### 2.4.3.2.3. *ETS respirace*

Stav ETS, či ETS respirace, ETS kapacita (z anglického „*electron transfer system*“ – elektron transportující systém) představuje stav mitochondriální respirace, při kterém jednotlivé komplexy respiračního systému pracují při maximální možné rychlosti, a proto výsledná spotřeba kyslíku vyjadřuje maximální kapacitu přenášet elektrony skrz elektron transportující systém. Pro dosažení ETS stavu musíme použít tzv. rozpřahovače, které způsobí rozpřažení oxidativní a fosforylační složky mitochondriálního respiračního systému. Tyto rozpřahovače mají velice často charakter protonoforů, neboli chemických molekul, které snadno přijímají a uvolňují vodíkový proton a zároveň se mohou díky své lipofilní povaze implementovat do mitochondriální membrány. Titrace saturačního množství protonoforu do mitochondriální suspenze způsobí přestup vodíkových iontů dle koncentračního gradientu a tedy kompletní zánik MMP. Této situace je potřeba dosáhnout, chceme-li zajistit maximální kapacitu komplexů elektron transportního systému pumpovat vodíkové protony a dosáhnout celkové kapacity toku elektronů skrz respirační systém vyjádřené konzumpcí kyslíku.

#### 2.4.3.3. *Substrátová kontrola mitochondriální respirace*

K zajištění mitochondriální respirace je jako základní předpoklad dodat k mitochondriální suspenzi potřebné substráty pro jednotlivé komplexy a pro tvorbu redukčních kofaktorů, díky kterým začnou proudit elektrony respiračním systémem. Takovýmto substrátem je svým způsobem i samotný kyslík, bez kterého samozřejmě respirace bude nulová. Za situace kdy dojde ke spotřebě či ztrátě všech endogenních intracelulárních substrátů, jako je tomu např. při permeabilizaci buněk, získáváme suspenzi mitochondrií či buněk volně propustných pro molekuly, které by se jinak do vnitrobuněčného kompartmentu nedostaly. Při dosažení této situace můžeme proud elektronů kontrolovat postupným přidáváním substrátů či inhibitorů respiračních komplexů. Zde hovoříme o tzv. substrátové kontrole mitochondriální respirace. Zkratky a koncentrace jednotlivých respiračních substrátů a inhibitorů jsou uvedeny v tabulce 4.

Glutamát, malát a pyruvát jsou substráty, které cestou dehydrogenace tvoří jako kofaktor NADH a hovoříme tedy o substrátech pro komplex I. Sukcinát je dehydrogenován na fumarát přímo komplexem II, neboli sukcinátdehydrogenázou. Dalšími substráty pro ETS jsou glycerofosfát pro GPDH a karnitin deriváty mastných kyselin, které tvoří substráty pro ETF. Takto můžeme hodnotit tok respiračním systémem pomocí několika vstupů elektronů na Q a dále dle redoxního spádu.

<b>Substráty</b>		
<i>Název</i>	<i>Zkratka</i>	<i>finální koncentrace</i>
Pyruvát	P	5 mM
Malát	M	0,1/2 mM
Glutamát	G	10 mM
Sukcinát	S	10/50 mM
Oktanoylkarnitin	Oct	0,2 mM
Askorbát	As	2 mM
TMPD	Tm	0,5 mM
Cytochrom c	c	10 mM
Adenosindifosfát	ADP/D	3,5 mM
<b>Inhibitory</b>		
<i>Název</i>	<i>Zkratka</i>	<i>finální koncentrace</i>
Rotenon	Rot	1 mM
Antimycin A	Ama	2,5 mM
Azid Sodný	Azd	100 mM
Oligomycin	Omy	2,5 mM
<b>Ostatní</b>		
<i>Název</i>	<i>Zkratka</i>	<i>finální koncentrace</i>
Mitochondrie	Mt	0,1 mg/ml
Digitonin	Dig	10 µg/mil. buněk
FCCP	U/FCCP	kroky po 0,5 mM

**Tabulka 4. Názvy a finální koncentrace substrátů, inhibitorů a dalších chemikálií používaných při měření mitochondriální respirace pomocí Oxygrafu-2k.**

V tabulce jsou také uvedeny zkratky, které jsou použity u reprezentativních měření.

#### 2.4.3.4. Respirační protokoly

Pro komplexní zhodnocení kvality jednotlivých složek elektron transportujícího systému jsou využívány speciální respirační SUIIT protokoly (z anglického „*Substrate, Uncoupler, Inhibitor Titration*“), založené na postupném přidávání jednotlivých substrátů,

inhibitorů a rozpřahovačů do komůrky oxygrafu. Tyto SUIIT protokoly mohou být krátké a jednoduché, založené na titraci jednoho či dvou substrátů anebo také velice komplexní, více než hodinu trvající protokoly, zahrnující přidávání několika substrátů a inhibitorů pro více enzymových komplexů a sledování mitochondriální respirace ve více respiračních stavech. V této dizertační práci byly využity jak komplexní mezinárodně uznávané SUIIT protokoly, navržené pro celkové zhodnocení kvality respiračního systému a IMM, tak i protokoly jednodušší pro sledování vlivu toxických agens na mitochondriální respiraci.

#### 2.4.3.4.1. *Protokoly pro sledování toxicity látky a přepočet na procenta kontrol*

Pro hodnocení účinku jednotlivých látek na mitochondriální respiraci bylo využito našich dřívějších protokolů (Endlicher *et al.*, 2009) s drobnými modifikacemi. Ve zkratce, po kyslíkové kalibraci oxygrafu bylo do komůrky přidáno předem stanovené množství biologického vzorku. Poté byly přidány substráty pro sledovaný komplex respiračního systému, čímž bylo docíleno LEAK respirace. Následně byl buď stimulován stav OXPHOS přidáním ADP a cytochromu c, nebo stav ETS přidáním cytochromu c a titrováním optimální koncentrace rozpřahovače FCCP. Cytochrom c byl dodán v obou stavech pro vyloučení poruchy integrity OMM (viz výše). Po dosažení maximální kapacity OXPHOS či ETS respirace, byla přidána toxická látka a po pěti až patnácti minutách byl odečítán účinek sledovaného farmaka na respiraci jaterních mitochondrií v porovnání s kontrolní skupinou. Reprezentativní měření jednotlivých pokusů jsou zobrazena vždy v příslušném místě u uvedených výsledků v následující kapitole.

#### 2.4.3.4.2. *Referenční protokoly*

Referenční protokoly jsou respirační protokoly, které byly navrženy pro komplexní zhodnocení kvality elektron transportního systému a jejich komparativní analýzu mezi různými buněčnými typy, živočišnými druhy a podobně. Jelikož se dá velmi těžko pouze jedním protokolem komplexně popsat kvalitativní vlastnosti mitochondriálního respiračního systému v různých respiračních stavech, byly vyvinuty dva referenční protokoly – RP1 a RP2 (z anglického „*reference protocol*“). Referenční protokoly zahrnují kaskádu titrací několika substrátů a inhibitorů pro studium co možná nejvíce respiračních stavů. Podrobnou analýzou těchto dvou referenčních protokolů lze poté získat potřebná komplexní data vypovídající ať již o kvalitě sledovaného vzorku (o integritě IMM a OMM, kvalitě elektron transportujícího systému, atd.), ale také lze vyloučit chybná měření, artefakty a celkově zlepšit metodiku a kvalitu naměřených výsledků. Referenční protokoly

se v době psaní této dizertační práce stále vyvíjely, proto nelze vyloučit drobné změny v jejich budoucí podobě. V systematickém schématu na obrázku 23 je zobrazena sekvence jednotlivých přídavků referenčních protokolů, podle které jsme postupovali. Reprezentativní měření je znázorněno na obrázku 24.

## **2.5. Statistické zpracování naměřených dat**

Ke zhodnocení, zda naměřená data spadají do Gaussova rozložení, bylo použito těchto testů normality: Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov a D'Agostino-Pearson. Soubor dat, který vykazoval normální rozdělení dat ve všech skupinách alespoň u jednoho z výše uvedených testů, byl vyhodnocen parametrickým testem ANOVA a rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly porovnány pomocí Tukey-Krammerova testu. V případě dat, která neprošla testem normality a nespádala tak do Gaussova rozložení, byl použit Kruskalův-Wallisův test pro neparametrické rozložení a dále Dunnův post-test. Statistické zpracování výsledků bylo provedeno za pomoci softwaru GraphPad Prism 6 a grafy a tabulky uvedené v textu byly vypracovány pomocí programu MS Office Excel.

**a** PM+mt: NFSGpTm\_1PM 2D 3c 4U 5G 6S 7Oct 8Rot 9Gp 10Ama 11Tm 12Azd

<b>E</b>	4U	5G	6S	7Oct	8Rot	9Gp	10Ama	11Tm	12Azd
<b>P</b>	2D+c								
<b>L</b>	1PM								
	N	N	NS	NFS	S	SGp	ROX	Tm	ROX
	CI	CI	CI&II	CI&II &FAO	CII	CII &GpDH	ROX	CIV	ROX

**b** D+mt: NFSGpTm\_1D 2Oct 3M 4c 5P 6G 7S 8Gp 9U 10Rot 11Ama 12Tm 13Azd

<b>E</b>						9U	10Rot	11Ama	12Tm	13Azd	
<b>P</b>	1D	2Oct	3M+c	5P	6G	7S	8Gp				
<b>L</b>											
	ROX	F	F	NF	NF	NFS	NFSGp	SGp	ROX	Tm	ROX
	ROX	FAO	FAO	CI &FAO	CI &FAO	CI&II &FAO	CI&II &FAO&Gp	CII &Gp	ROX	CIV	ROX

**Obrázek 23. Schéma jednotlivých kroků referenčních protokolů.**

a) Referenční protokol 1; b) Referenční protokol 2.

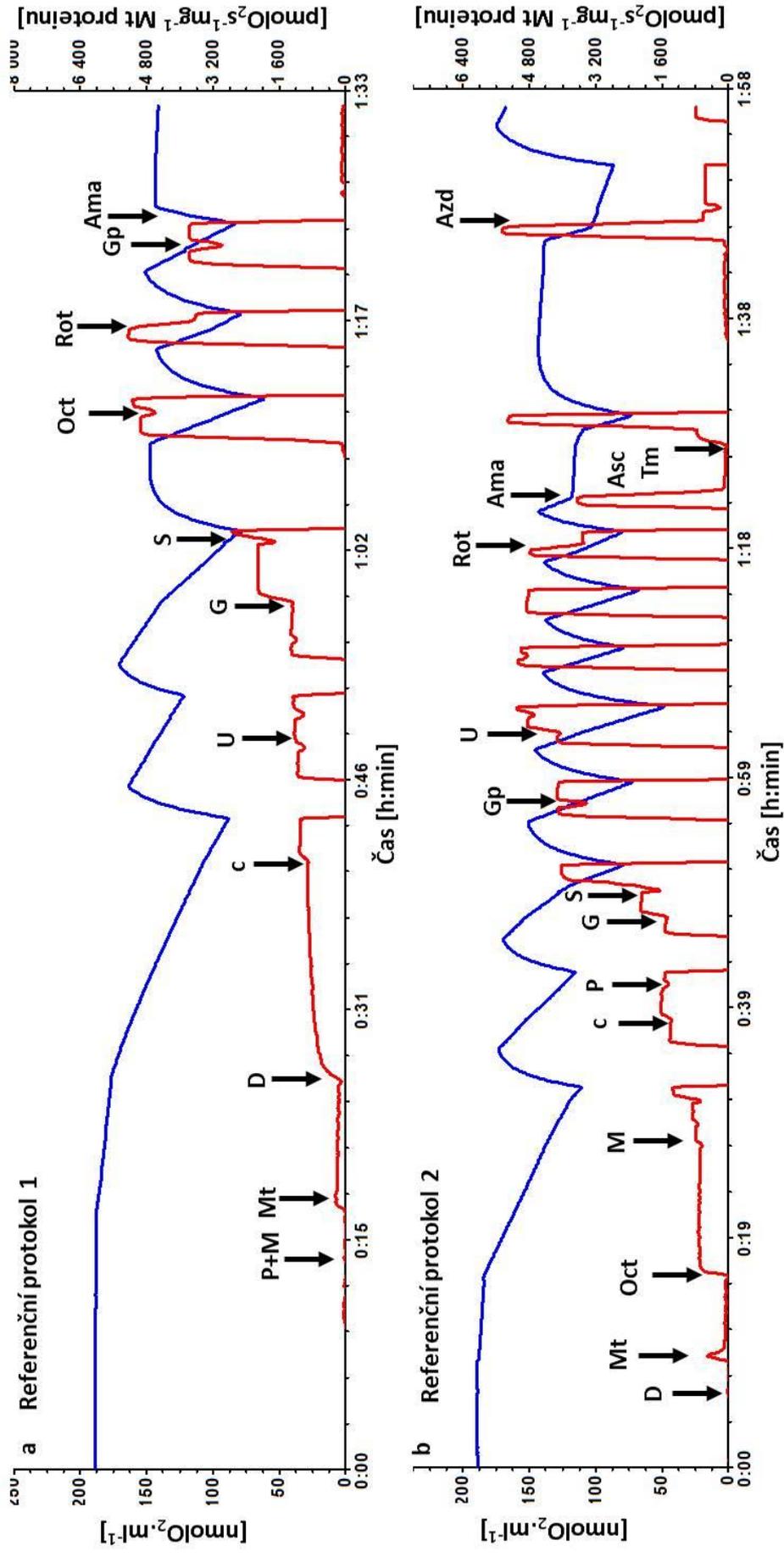
Pro a) i b): Na schématu nahoře, je vždy nadepsána zahajovací kombinace a souhrn všech studovaných substrátových cest (pro Referenční protokol 1 je to „PM+mt: NFSGpTm“, tzn. Zahájení pyruvátem a malátem s přidáním mitochondriemi, se studovanými respiračními cestami NFSGpTm - viz dále). Vedle toho je uvedena sekvence jednotlivých titračních kroků a barevně je odlišeno v jakém respiračním stavu se studované mitochondrie právě nachází. Červená znamená LEAK stav, zelená OXPHOS a modrá ETS stav; černě se v tomto případě odlišuje reziduální konzumpce kyslíku, která není způsobena respiračním systémem.

Schématu dominuje tabulka se třemi úrovněmi podle stavu spřažení/rozpřažení mitochondrií. Jsou jimi **L** – LEAK, **P** – OXPHOS, **E** – ETS. Číslo v tabulce vyjadřuje titrační krok a chemikálie, které mají být v daném kroku přidány do komůrky.

Ve spodní části schématu je zapsána substrátová respirační cesta, která je v danou chvíli aktivována: N – NADH; S – sukcinát; F – mastné kyseliny (z angl. „fatty acid“); Gp – Glycerofosfát, Tm – TMPD; ROX – reziduální konzumpce kyslíku, nepatřící k respiračnímu systému.

Pod substrátovou cestou je v posledních dvou řádcích uveden enzymový komplex, který zahajuje v dané chvíli přenos elektronů: CI – komplex I; CII – komplex II; CIV – komplex IV; FAO – oxidace mastných kyselin pomocí ETF; Gp – GPDH.

Se souhlasem převzato z [www.bioblast.at](http://www.bioblast.at), OROBOROS Instruments, Innsbruck, AT.



**Obrázek 24. Reprezentativní měření referenčních protokolů pomocí Oxygrafu-2k.**

Popis viz. tabulka 4 a obrázek 23. Modrá křivka znázorňuje koncentraci kyslíku v komůrce, červená rychlost respirace.

### **3. Výsledky**

#### **3.1. Vliv 3-brompyruvátu na hepatocyty potkana a myši**

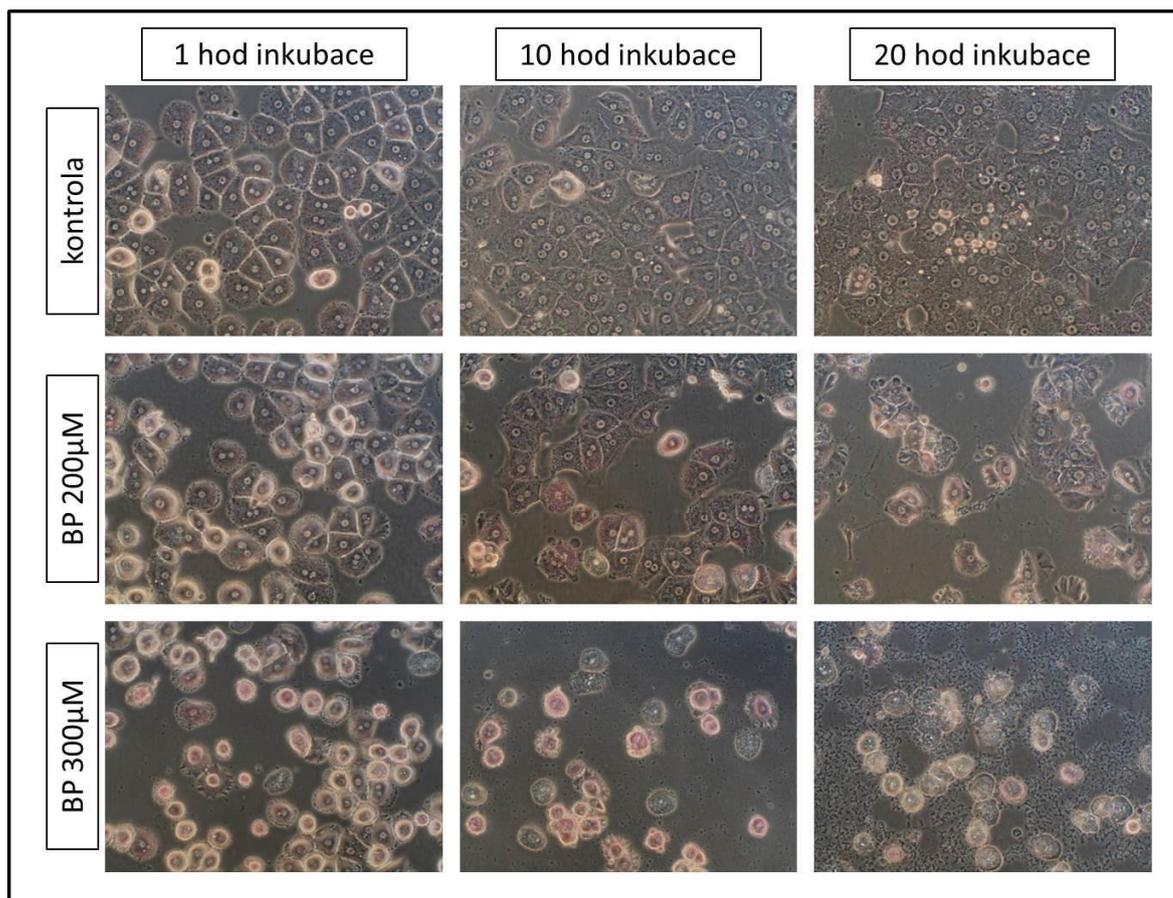
Vliv 3BP na hepatocyty potkana byl sledován v primárních kulturách po dobu 1 až 20 hodin. Pro studium vlivu 3BP na mitochondriální funkce byly inkubovány permeabilizované hepatocyty a izolované jaterní mitochondrie v suspenzi po dobu maximálně 10 minut za současného přidání substrátů pro sledování mitochondriální respirace.

##### **3.1.1. Toxicita 3-brompyruvátu na hepatocyty potkana**

Prvním krokem bylo stanovení toxické dávky 3BP v primární kultuře potkaních hepatocytů izolovaných z jater potkana. Morfologické změny kultury byly studovány pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem, strukturní integrita buněčné membrány pomocí stanovení aktivity LDH v kultivačním médiu, funkční viabilita buněk pomocí testu aktivity buněčných dehydrogenáz, funkční kapacita hepatocytů za 20 hodin, produkce ROS za 1 hodinu inkubace s 3BP a apoptóza pomocí měření aktivity kaspázy 3. Poslední metodou použitou v primárních kulturách byla vizualizace funkčních mitochondrií pomocí fluorescenční sondy JC-1.

##### **3.1.1.1. Zhodnocení buněčných kultur pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem**

Na obrázku 25 jsou kultury potkaních hepatocytů ve fázovém kontrastu po působení 3BP. Za jednu hodinu inkubace došlo k částečnému poškození hepatocytů, tyto změny byly následně zvýrazněny po deseti a dvaceti hodinách inkubace. Změny v morfologii buněčné kultury byly závislé jak na koncentraci, tak na délce inkubace s 3BP. Dvacetihodinová inkubace s maximální koncentrací 300  $\mu$ M 3BP vedla k téměř kompletní destrukci kultivovaných jaterních buněk.



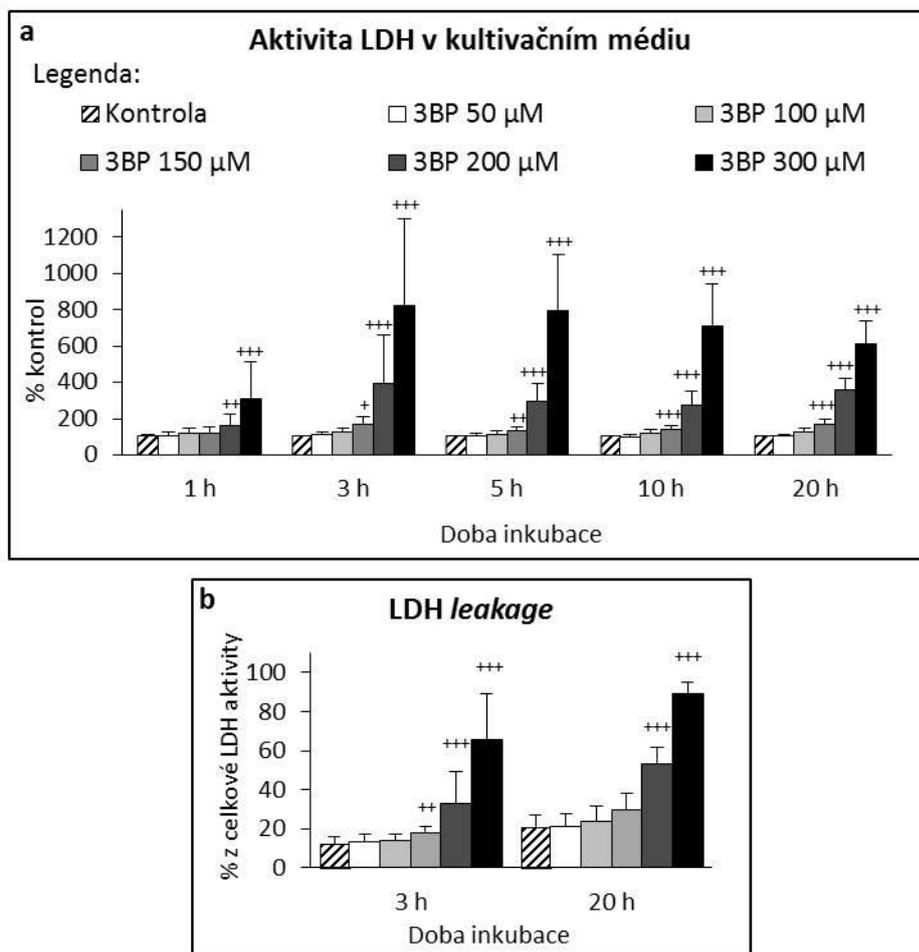
**Obrázek 25. Fázový kontrast primárních kultur potkaních hepatocytů po působení 3BP.**

Reprezentativní fotografie pořízené během mikroskopie s fázovým kontrastem (zvětšení objektivu 40x).

### 3.1.1.2. Vliv 3-brompyruvátu na aktivitu LDH v kultivačním médiu

Přidání 3BP způsobilo zvýšení aktivity LDH v kultivačním médiu primárních kultur potkaních hepatocytů (Graf 1a). Z výsledku je patrné, že ke statisticky významným změnám nedocházelo u koncentrací 3BP < 100 µM ani během dvacetihodinové inkubace. Naproti tomu již jedna hodina kultivace s koncentrací vyšší než 200 µM 3BP způsobovala signifikantní zvýšení aktivity LDH v extracelulárním prostředí vyjadřujícím narušení integrity buněčné membrány. Tento efekt je ve shodě s morfologickým nálezem (změny byly pozorovány až při koncentraci 200 µM) a současně potvrdil časovou a koncentrační závislost toxického působení této látky. 3BP byl toxický od koncentrace 150 µM, ve které byl toxický vliv pozorován až po třech hodinách. Výsledky byly dále potvrzeny

stanovením úniku LDH z buněk (*LDH leakage*) který přímo souvisí s procentem poškozených hepatocytů v buněčné kultuře (Graf 1b).



**Graf 1a) Aktivita LDH v kultivačním médiu u potkana; b) LDH leakage po 3 a 20 hodinách inkubace.**

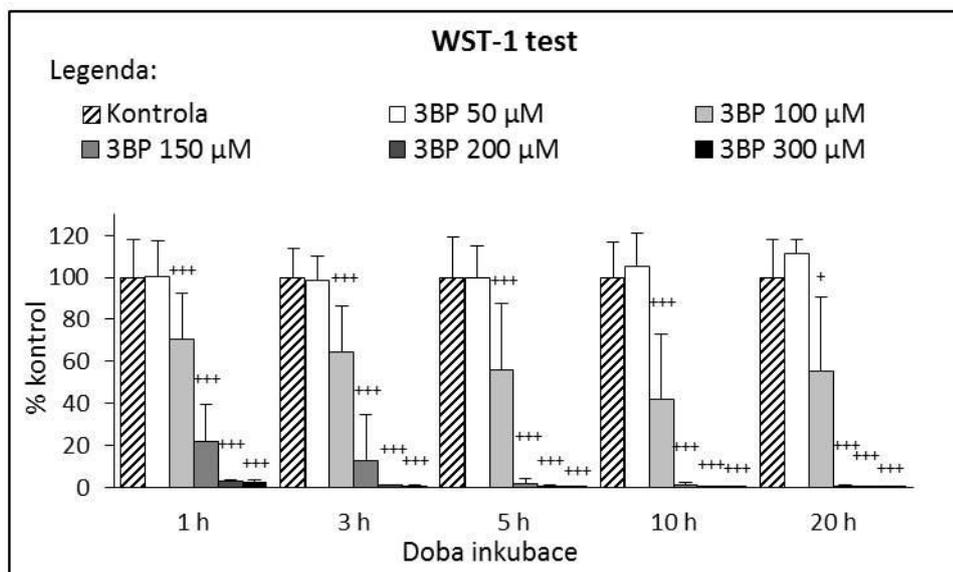
Výsledky v 1a jsou vyjádřeny v procentech kontrol v daném časovém intervalu. V grafech je zobrazen vždy průměr  $\pm$  SD;  $n = 23-24$ ;

+  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  vs kontrola.

### 3.1.1.3. Aktivita buněčných dehydrogenáz (*WST-1 test*)

Výsledky měření aktivity buněčných dehydrogenáz jsou zobrazeny v Grafu 2. Po celou dobu našeho sledování nebyla aktivita buněčných dehydrogenáz změněna pouze u dávky 3BP 50  $\mu\text{M}$  a nižší. Již od koncentrace 100  $\mu\text{M}$  došlo po jedné hodině k signifikantnímu poklesu aktivity buněčných dehydrogenáz ( $p < 0,001$ ). Při použití 3BP o

koncentraci vyšší než 100  $\mu\text{M}$  byla pak zřejmá jak koncentrační tak i časová závislost toxických účinků této látky (Graf 2).



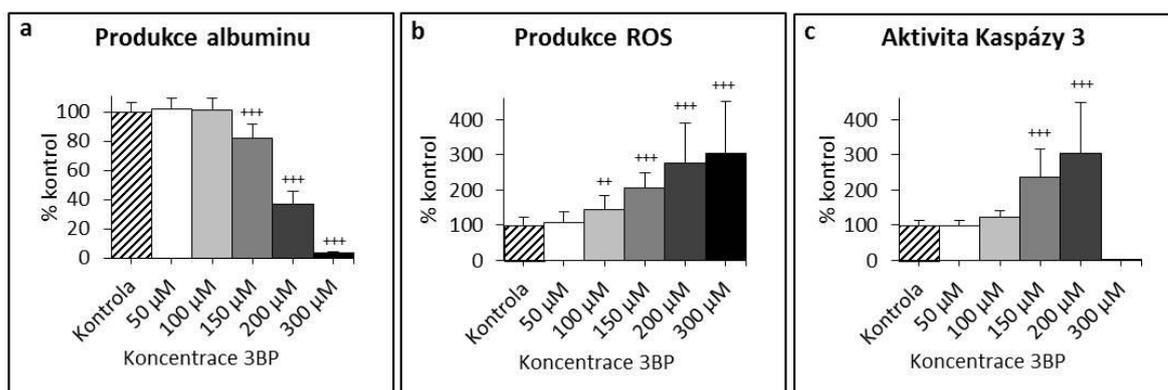
**Graf 2. Test aktivity buněčných dehydrogenáz u potkana.**

V grafech je zobrazen průměr  $\pm$  SD;  $n = 15 - 72$ ;

+  $p < 0,05$ ; +++  $p < 0,001$  vs kontrola.

#### 3.1.1.4. Funkční stav hepatocytů

Výsledky funkčního stavu buněk po kultivaci s testovanými koncentracemi 3BP jsou zobrazeny v Grafu 3a. Opět nebyly pozorovány signifikantní změny u koncentrací 3BP 100  $\mu\text{M}$  a nižších ani po 20 hodinovém působení. U koncentrací vyšších než 150  $\mu\text{M}$  vedlo podání 3BP ke statisticky významnému snížení tvorby albuminu v primární kultuře potkaních hepatocytů při 20 hodinové inkubaci ( $p < 0,001$ ; Graf 3a).



### Graf 3a-c. Funkční parametry hepatocytů potkana v kultuře.

- a) Produkce albuminu potkaních hepatocytů po expozici různým koncentracím 3BP po dobu 20 hodin. b) Produkce ROS v kultuře hepatocytů potkana po 1 hodině působení 3BP. c) Aktivita kaspázy 3 v primárních kulturách po 20 hodinách kultivace;  $n = 17 - 18$ . V grafech je zobrazen průměr  $\pm$  SD; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  ve srovnání s kontrolou.

#### 3.1.1.5. Vliv 3-brompyruvátu na hladinu ROS v primární kultuře

Po jedné hodině kultivace vedly ke zvýšené produkci ROS koncentrace 3BP 100  $\mu$ M a vyšší. Naopak, zvýšené hladiny ROS nebyly pozorovány u koncentrace 50  $\mu$ M 3BP a nižší oproti kontrole (graf 3b).

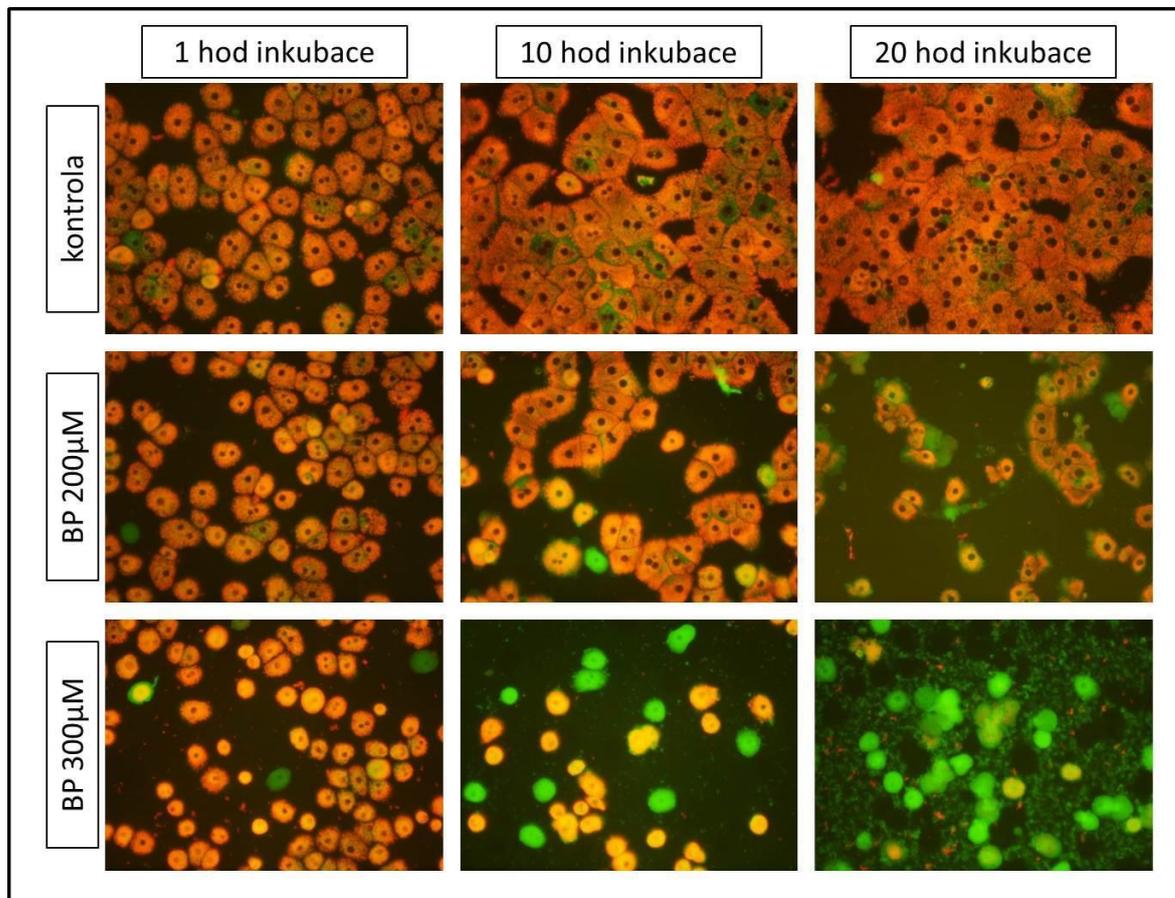
#### 3.1.1.6. Zhodnocení vlivu 3-brompyruvátu na apoptózu

V grafu 3c jsou zobrazeny výsledky měření aktivity kaspázy 3 v lyzovaných buňkách primárních kultur po 20 hodinové inkubaci s různými koncentracemi 3BP. Statisticky významné zvýšení hladiny kaspázy 3 u 150 a 200  $\mu$ M 3BP svědčí o podílu apoptotické buněčné smrti. Překvapivě nebyla aktivita kaspázy 3 zaznamenána u koncentrace 300  $\mu$ M 3BP; to zřejmě svědčí o neapoptotické tedy nekrotické formě buněčné smrti.

#### 3.1.1.7. Vliv 3-brompyruvátu na mitochondriální membránový potenciál hepatocytů v buněčné kultuře

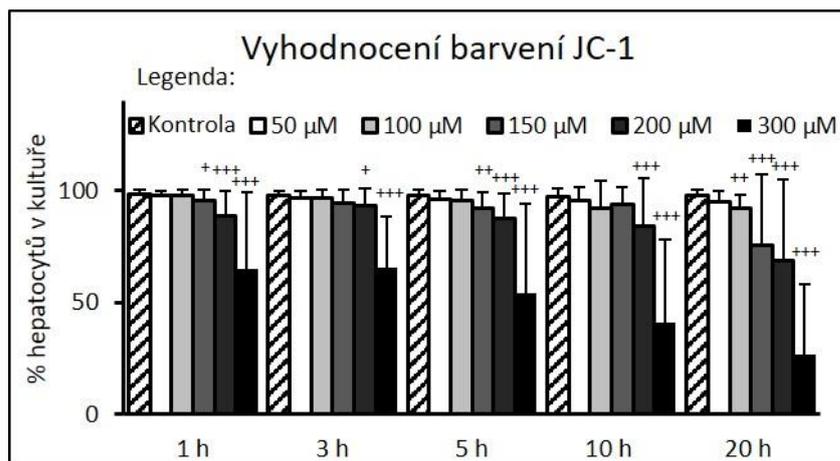
Na obrázku 26 jsou buněčné kultury obarvené fluorescenční sondou JC-1. Toto fluorescenční barvení označuje mitochondrie s vysokým MMP - červeně a mitochondrie s nízkým či žádným MMP - zeleně. Tímto způsobem lze odlišit hepatocyty se zachovalými mitochondriálními funkcemi od buněk, v nichž jsou mitochondriální funkce zaniklé. Procento buněk s funkčními mitochondriemi je uvedeno v grafu 4. Podání 3BP vedlo k

signifikantnímu snížení MMP kultivovaných hepatocytů od koncentrace 100  $\mu\text{M}$  po 20 hodinách.



**Obrázek 26. Primární kultury hepatocytů potkana po obarvení fluorescenční sondou JC-1.**

Na jednotlivých obrázcích jsou zobrazeny primární kultury hepatocytů v různých časech od zahájení inkubace s 3BP. Mitochondrie v těchto buňkách jsou obarveny dle svého MMP: červeně jsou zobrazeny mitochondrie funkční se zachovaným vysokým MMP, zeleně mitochondrie nefunkční bez MMP (zvětšení objektivu 40x).



**Graf 4. Vliv 3BP na MMP hepatocytů v kultuře.**

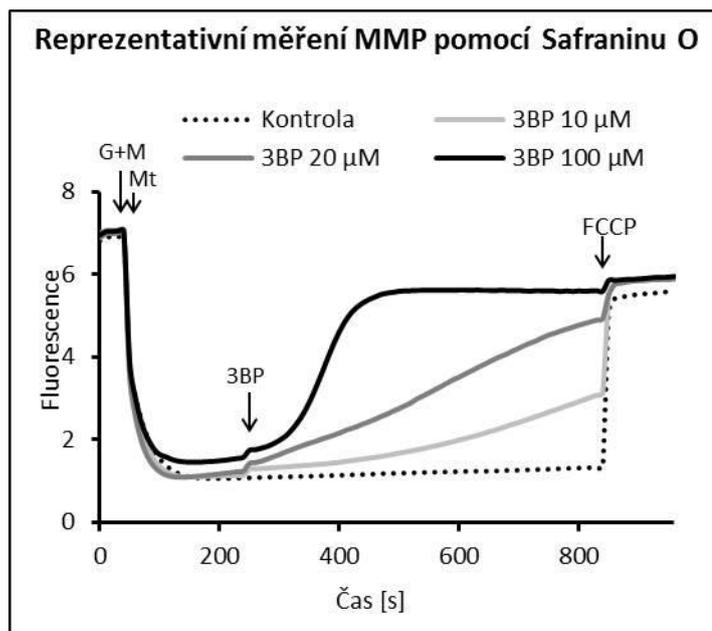
Statistické vyhodnocení fluorescenčního barvení JC-1 v primárních kulturách hepatocytů potkana. V grafu jsou zobrazeny průměry z jednotlivých časových intervalů se směrodatnou odchylkou;  $n = 4$ ; +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  vs příslušná kontrola.

### 3.1.2. Přímý účinek 3-brompyruvátu na funkce jaterních mitochondrií potkana

Z výsledků získaných na primárních kulturách je patrné, že 3BP působí negativně na kultivované hepatocyty i jejich mitochondrie. V další části byl sledován přímý vliv 3BP na mitochondriální funkce hepatocytů permeabilizovaných digitoninem a nebo na izolované jaterní mitochondrie.

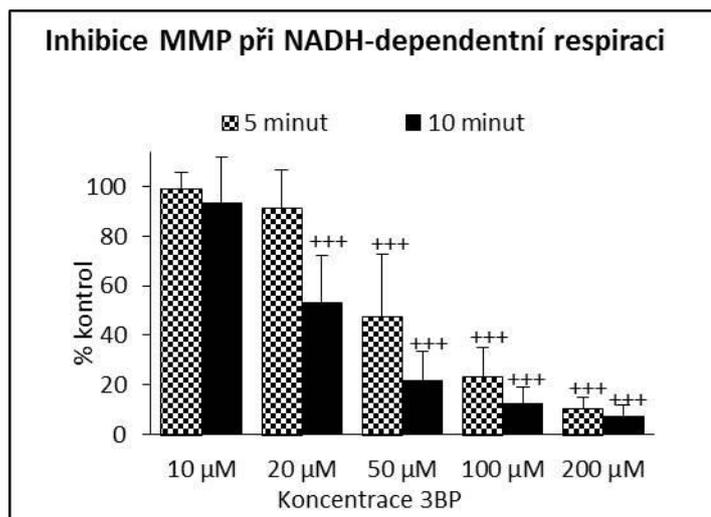
#### 3.1.2.1. Vliv 3-brompyruvátu na MMP izolovaných mitochondrií

Obrázek 27 zobrazuje reprezentativní měření vlivu 3BP na MMP izolovaných jaterních mitochondrií energizovaných substráty pro komplex I glutamátem a malátem. Obdobný protokol byl využit pro sledování vlivu 3BP na MMP při použití sukcinátu jako respiračního substrátu pro komplex II a rotenonu pro inhibici komplexu I. Změny MMP byly hodnoceny po pěti a deseti minutách inkubace. U mitochondrií energizovaných glutamátem a malátem byl pozorován signifikantní pokles MMP po deseti minutách inkubace s  $\geq 20 \mu\text{M}$  3BP a po pěti minutách inkubace s  $\geq 50 \mu\text{M}$  3-BP ( $p < 0,001$ ; graf 5). Pro mitochondrie energizované sukcinátem byly tyto změny významné již při nižších koncentracích 3BP a to od  $10\mu\text{M}$  a  $20\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) po 5 respektive 10 minutách inkubace (graf 6).



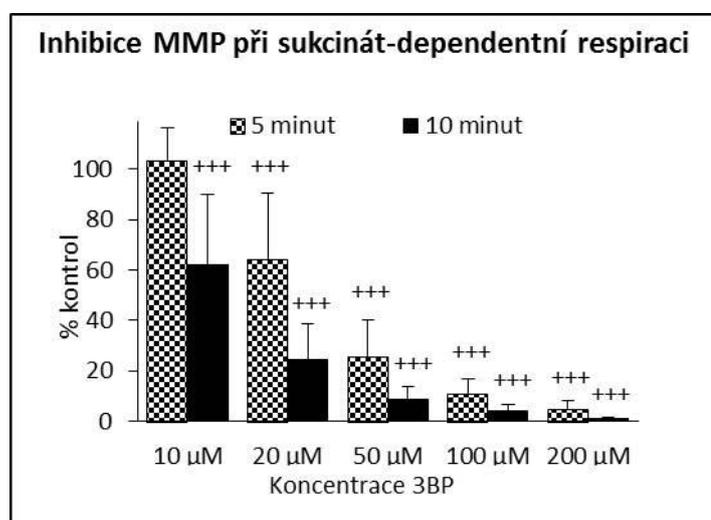
**Obrázek 27. Reprezentativní měření účinku 3BP na MMP pomocí fluorescenční sondy Safranin O.**

Kationtová fluorescenční sonda Safranin O se po přidání mitochondrií do kyvety transportuje v závislosti na elektrickém potenciálu mitochondriální membrány do negativně nabitě mitochondriální matrix. Současně z důvodu alkalického pH v matrix přestane Safranin O excitovat světlo a fluorescenční signál poklesne. Po přidání 3BP do mitochondriální suspenze (označeno šipkou) dojde k poklesu MMP a tím pádem k uvolnění Safraninu O do média a k opětovnému zvýšení fluorescenčního signálu. Pro potvrzení kvality naší kontroly jsme po deseti minutách do mitochondriální suspenze přidali rozpřahovač FCCP, čímž došlo ke kompletnímu zrušení MMP a maximální fluorescenci. Na obrázku je znázorněn výsledek reprezentativního měření, které bylo opakováno minimálně třikrát s obdobným výsledkem. Mt – mitochondrie, 3BP – 3-brompyruvát, G – glutamát, M – malát, FCCP – Karbonyl kyanid-4-(trifluorometoxy)-fenyldrazon



**Graf 5. Výsledky vlivu 3BP na MMP jaterních mitochondrií potkana v NADH-dependentní LEAK respiraci.**

V grafech je zobrazeno procento kontrol ve stanovené době inkubace od přidání 3BP. V grafu je zobrazen průměr  $\pm$  SD;  $n = 3 - 6$ ; +++  $p < 0,001$  vs příslušná kontrola v daném čase bez přidaného 3BP.

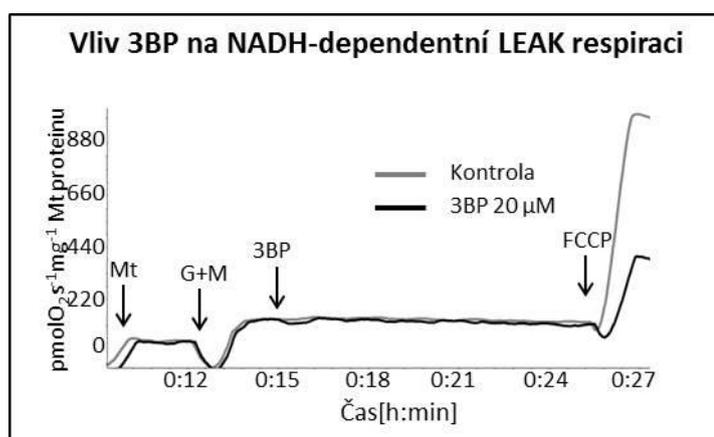


**Graf 6. Výsledky vlivu 3BP na MMP jaterních mitochondrií potkana v sukcinát-dependentní LEAK respiraci.**

V grafech je zobrazeno procento kontroly ve stanovené době inkubace od přidání 3BP. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontrol, zobrazeny jsou průměry  $\pm$  SD;  $n = 3 - 6$ ; +++  $p < 0,001$  vs příslušná kontrola v daném čase bez přidaného 3BP.

### 3.1.2.2. Vliv 3-brompyruvátu na mitochondriální respiraci hepatocytů potkana

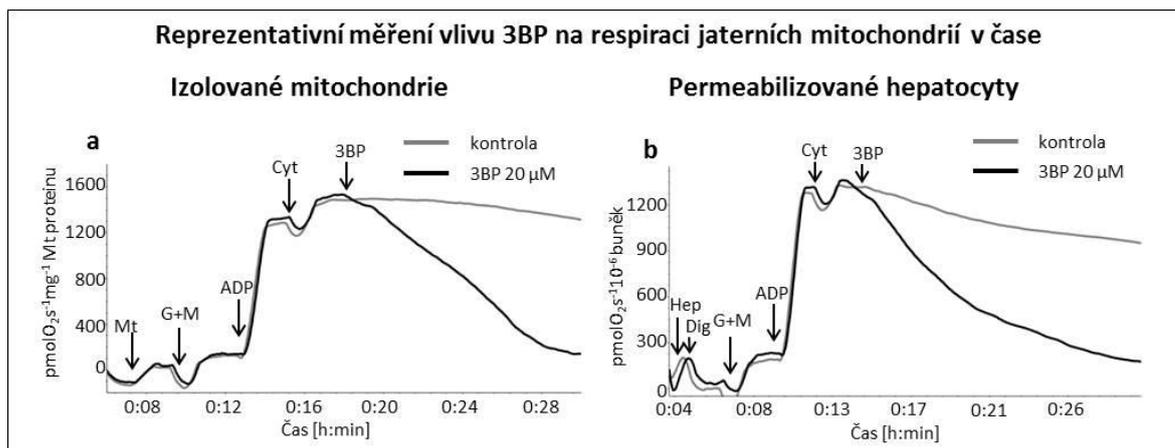
Na obrázku 28 jsou zobrazeny výsledky reprezentativního měření účinku 3BP na LEAK respiraci izolovaných jaterních mitochondrií. Navzdory negativnímu účinku 3BP na MMP v tomto respiračním stavu nebyla pozorována inhibice respirace, ani rozpražení mitochondriálního respiračního systému, které by mohlo vysvětlovat snížení MMP. Snížení stupně maximální respirace po následném rozpražení mitochondrií pomocí FCCP však může svědčit o tom, že maximální respirační kapacita je přidaným 3BP signifikantně snížena.



**Obrázek 28. Vliv 3BP na NADH-dependentní LEAK respiraci.**

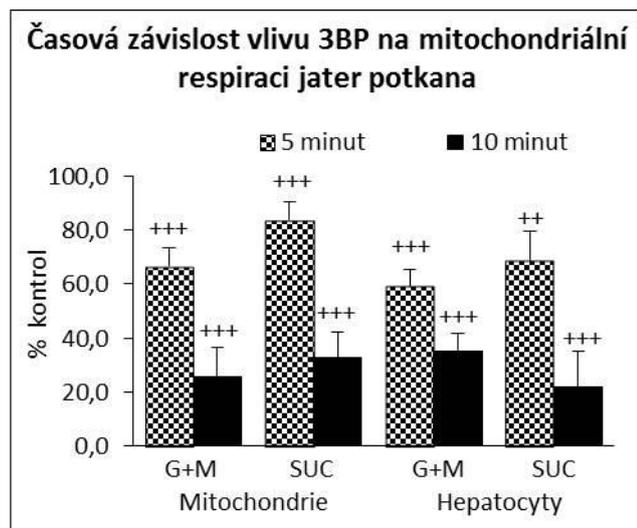
Na obrázku je ilustrován výsledek reprezentativního měření na oxygrafu po přidání glutamátu a malátu jako substrátů pro tvorbu NADH. Černá křivka znázorňuje měření po přidání 20 μM 3BP, šedá křivka znázorňuje kontrolní měření (po přidání odpovídajícího množství destilované vody). Měření bylo opakováno třikrát se stejným výsledkem. Mt – mitochondrie, 3BP – 3-brompyruvát, G – glutamát, M – malát, FCCP – Karbonylkyanid-4-(trifluorometoxy)fenylhydrazon

Reprezentativní měření časové závislosti účinku 3BP na OXPHOS kapacitu mitochondriální respirace izolovaných jaterních mitochondrií potkana je znázorněn na Obrázku 29a. Inkubace izolovaných mitochondrií s 20 μM 3BP po dobu pěti a deseti minut měla za výsledek snížení OXPHOS respirace o 23 %, respektive 74 % v případě použití NADH-dependentních substrátů a 16 % respektive 67 % při použití sukcinátu (graf 7). Stejná časová závislost účinků 3BP na izolovaných jaterních mitochondriích byla potvrzena také při studiu permeabilizovaných hepatocytů potkana za totožných experimentálních podmínek (obr. 29b; graf 7).



**Obrázek 29a, b. Časová závislost účinku 3BP na respiraci jaterních mitochondrií v OXPHOS stavu.**

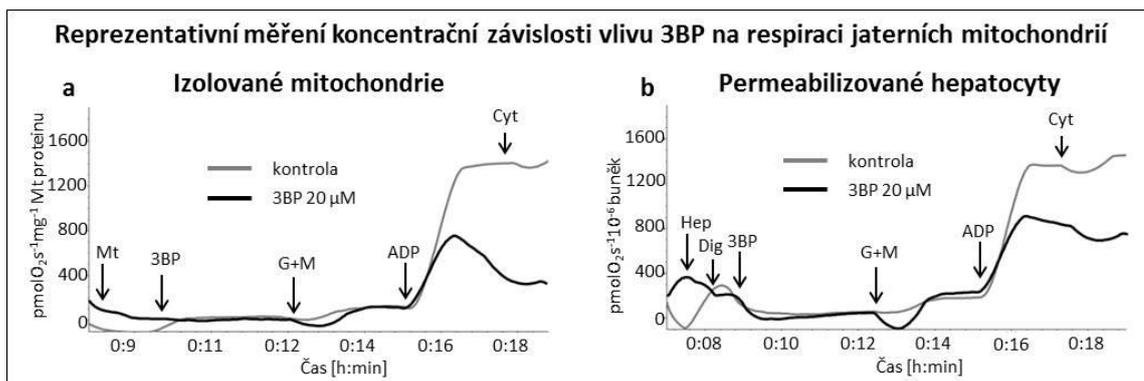
Na obrázku jsou zobrazena reprezentativní měření vlivu 20  $\mu\text{M}$  3BP na mitochondriální respiraci jaterních mitochondrií ve dvou experimentálních modelech: a) v modelu izolovaných mitochondrií; b) v modelu permeabilizovaných hepatocytů. V obou případech došlo k poklesu OXPHOS respirace po přidání 3BP, který byl závislý na době působení tohoto agens. Obdobné výsledky jsme pozorovali v případě sukcinát-dependentní respirace. Mt – mitochondrie, hep – hepatocyty, Dig – digitonin, 3BP – 3-brompyruvát, G – glutamát, M – malát, Cyt – cytochrom c.



**Graf 7. Výsledky časové závislosti vlivu 20  $\mu$ M 3BP na respiraci jaterních mitochondrií v OXPHOS stavu.**

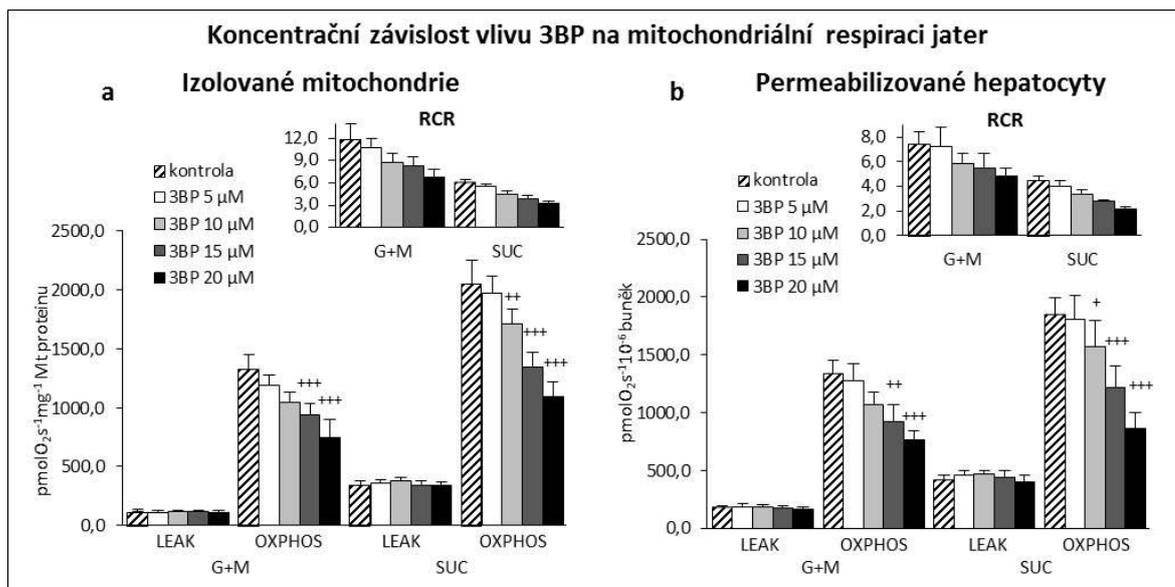
V grafu jsou zobrazeny výsledky při použití NADH produkujících substrátů glutamátu (G) a malátu (M) pro zhodnocení působení 3BP na K.I, nebo sukcinátu (SUC) a rotenonu pro zhodnocení účinku 3BP na K.II. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontrol, zobrazeny jsou průměry  $\pm$  SD;  $n = 5$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  vs příslušná kontrola v daném čase bez přidaného 3BP.

Výsledky koncentrační závislosti 3BP na respiraci v LEAK a OXPHOS stavu izolovaných jaterních mitochondrií a permeabilizovaných hepatocytů jsou zobrazeny v grafu 8. 3BP do koncentrace 20  $\mu$ M nezpůsobil žádné změny LEAK respirace jak při použití NADH-dependentních substrátů tak při použití sukcinátu po dobu deseti minut. Oproti tomu v OXPHOS stavu jsme pozorovali signifikantní koncentračně závislý efekt této látky. Přidáním cytochromu c na konci respiračního protokolu se nám podařilo vyloučit, že by tento pokles v respiraci byl způsoben poškozením integrity zevní mitochondriální membrány a únikem cytochromu c do respiračního média (obr. 30a,b).



**Obrázek 30a, b. Koncentrační závislost účinku 3BP na respiraci jaterních mitochondrií v OXPHOS stavu.**

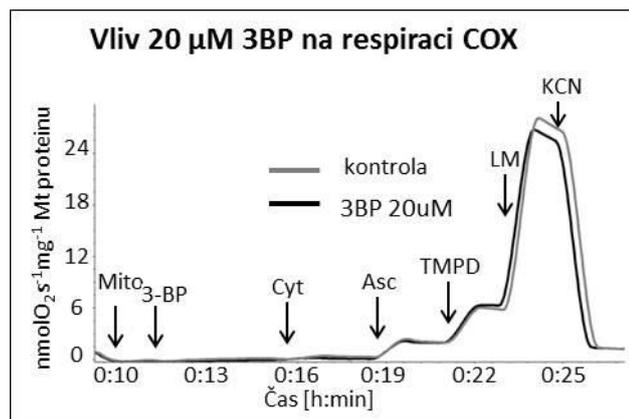
Na obrázku jsou zobrazena reprezentativní měření vlivu 20  $\mu\text{M}$  3BP na mitochondriální respiraci jaterních mitochondrií ve dvou experimentálních modelech: a) v modelu izolovaných mitochondrií; b) v modelu permeabilizovaných hepatocytů. Obdobné výsledky jsme pozorovali v případě sukcinát-dependentní respirace. Mt – mitochondrie, hep – hepatocyty, Dig – digitonin, 3BP – 3-brompyruvát, G – glutamát, M – malát, Cyt – cytochrom c.



**Graf 8a, b. Výsledky koncentrační závislosti vlivu 3BP na respiraci jaterních mitochondrií v LEAK a OXPHOS stavu.**

V grafu jsou zobrazeny výsledky při použití NADH produkujících substrátů glutamátu (G) a malátu (M) pro zhodnocení působení 3BP na CI, nebo sukcinátu (SUC) a rotenonu pro zhodnocení účinku 3BP na CII. V části a) jsou uvedeny výsledky naměřené na izolovaných mitochondriích a v části b) výsledky na permeabilizovaných hepatocytech. Z naměřených hodnot byl vždy vypočítán index *Respirator Control Ratio* (RCR) pro zhodnocení efektivity oxidativní fosforylace. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontrol, zobrazeny jsou průměry  $\pm$  SD;  $n = 5$ ; +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  vs příslušná kontrola.

Dle našich výsledků neměl 3BP ani v koncentraci 50  $\mu$ M žádný negativní účinek na komplex IV respiračního systému. Reprezentativní měření je zobrazeno na obrázku 31.



**Obrázek 31. Reprezentativní měření vlivu 3BP na aktivitu cytochrom c oxidázy.**

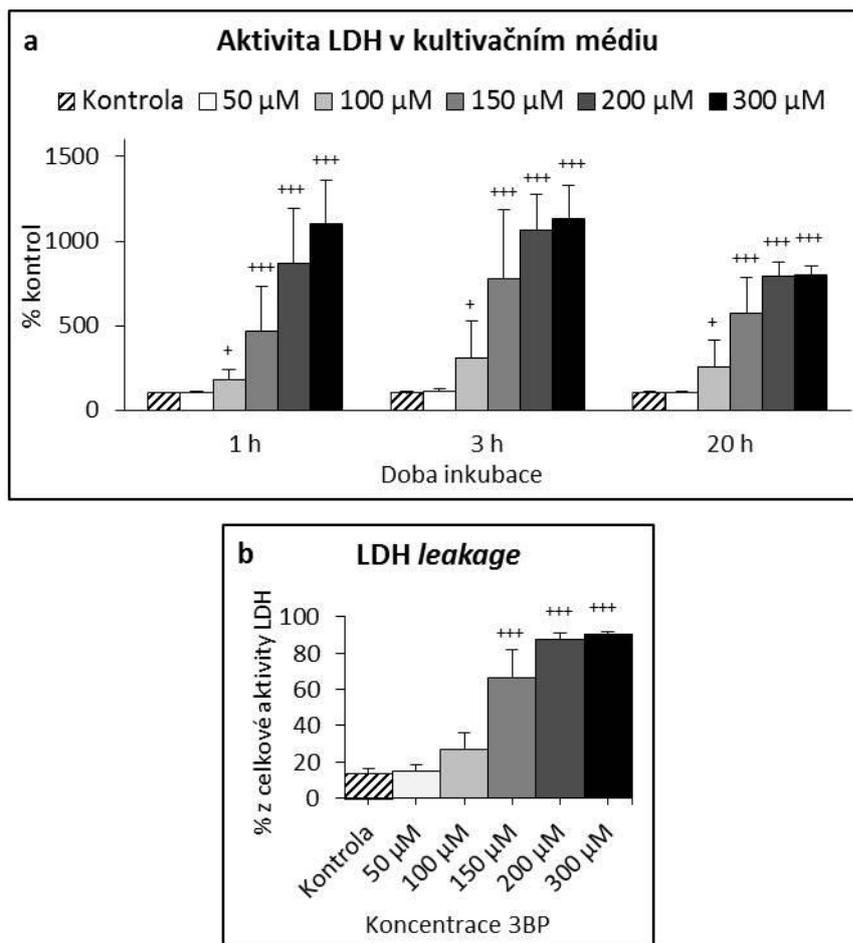
Na obrázku je znázorněno reprezentativní měření vlivu 3BP na aktivitu COX zhodnocenou pomocí respirometrie po přidání cytochromu c (Cyt) askorbátu (Asc), TMPD a lauryl maltosidu (LM). COX byla následně zablokována po přidání kyanidu draselného (KCN). Měření bylo opakováno třikrát se stejným výsledkem.

### 3.1.3. Vliv 3-brompyruvátu na izolované hepatocyty myši

Pro odlišení, zda je *in vitro* hepatotoxický účinek 3BP druhově specifický, či zda se jedná o mezidruhový fenomén, jsme zopakovali klíčové experimenty na hepatocytech izolovaných z jater myši.

#### 3.1.3.1. Aktivita LDH v kultivačním médiu a LDH leakage

Výsledky měření aktivity LDH v kultivačním médiu myších hepatocytů je zobrazena v grafu 9. Po jedné hodině došlo k signifikantnímu zvýšení oproti kontrolní kultuře již od koncentrace 100 µM 3BP a tento výsledek byl potvrzen stanovením *LDH leakage* po 20 hodinách.

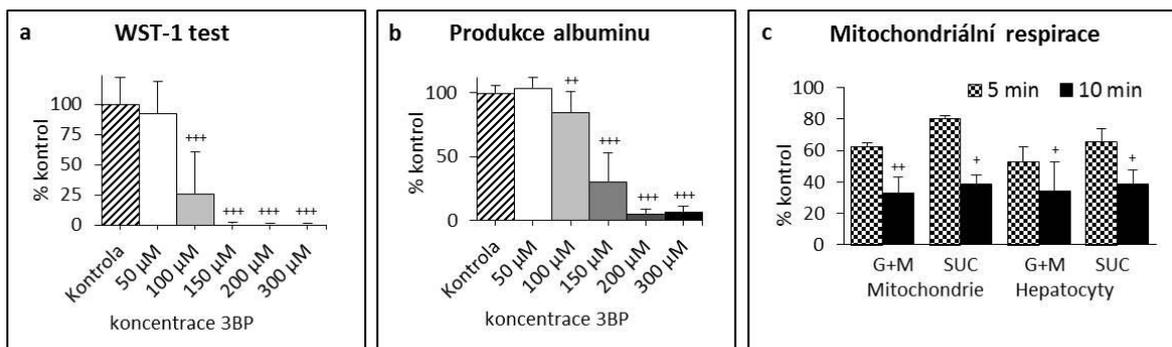


**Graf 9a, b. Zhodnocení účinku 3BP na integritu plazmatické membrány myších hepatocytů v primární kultuře.**

A) Aktivita LDH v kultivačním médiu hepytocyotů myši po působení 3BP ve stanovených časových intervalech. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontrol v daném časovém intervalu. B) LDH leakage po 20 hodinách inkubace. V grafech je zobrazen vždy průměr  $\pm$  SD;  $n = 17 - 18$ ;  $+ p < 0,05$ ;  $+++ p < 0,001$  vs příslušná kontrola.

### 3.1.3.2. Aktivita buněčných dehydrogenáz (WST-1 test)

Změna aktivity buněčných dehydrogenáz hepatocytů izolovaných z myších jater je zobrazena v grafu 10a. V porovnání s potkaními hepatocyty *in vitro*, 3BP způsoboval ještě větší poškození hepatocytů myši, což bylo vyjádřeno 74% poklesem aktivity jejich dehydrogenáz po jedné hodině inkubace se 100 µM 3BP ( $p < 0,001$ ; graf 10a). U vyšších koncentrací aktivita buněčných dehydrogenáz byla pod detekčním limitem.



**Graf 10a-c. Vliv 3BP na viabilitu a funkci myších hepatocytů v primárních kulturách a na funkci jaterních mitochondrií v suspenzi.**

V Grafu 10a jsou znázorněny výsledky měření aktivity buněčných dehydrogenáz pomocí testu WST-1 u hepatocytů vystavených různým koncentracím 3BP po dobu 20 hodin. V grafu 10b jsou znázorněny výsledky měření koncentrace albuminu v kultivačním médiu hepatocytů po působení různých koncentrací 3BP po dobu 20 hodin. V grafu 10c jsou znázorněny výsledky respirometrie izolovaných mitochondrií a permeabilizovaných hepatocytů po 5 a 10 minutách působení 20 $\mu$ M 3BP v OXPHOS stavu. V grafech je zobrazen vždy průměr  $\pm$  SD; a)  $n = 24 - 48$ ; b)  $n = 17 - 18$ ; c)  $n = 3 - 4$ ; +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  ve srovnání s příslušnou kontrolní skupinou bez 3BP.

### 3.1.3.3. Funkční stav buněk

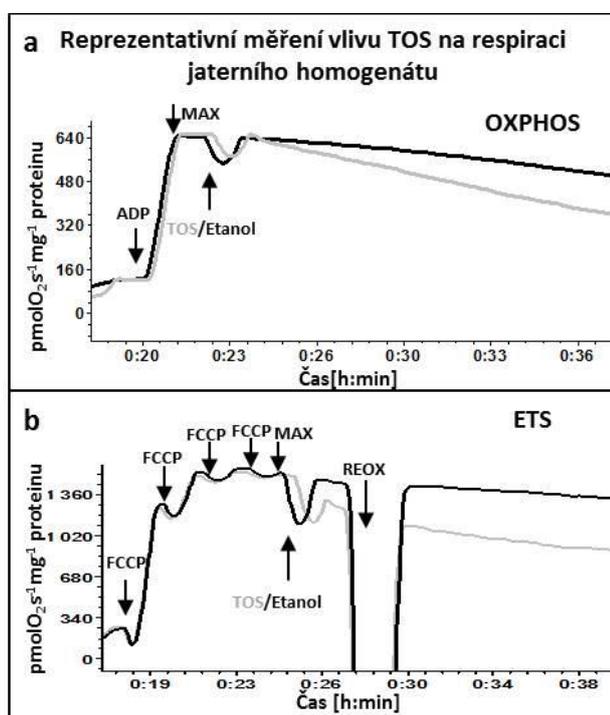
Funkční kapacita myších hepatocytů po 20 hodinové kultivaci s námi sledovanými koncentracemi 3BP je zobrazena v grafu 10b. Zde podobně jako u potkaních hepatocytů došlo k signifikantnímu snížení tvorby albuminu po 20 hodinách u koncentrací 3BP 100  $\mu$ M a vyšších.

### 3.1.3.4. Vliv 3BP na mitochondriální respiraci myších hepatocytů

Výsledky účinku 20  $\mu$ M 3BP na mitochondriální respiraci permeabilizovaných myších hepatocytů a izolovaných jaterních mitochondrií jsou zobrazeny v grafu 10c. I u tohoto zvířecího druhu se potvrdil inhibiční vliv 3BP na NADH- i sukcinát-dependentní respiraci v obou experimentálních modelech.

### 3.2. Vliv $\alpha$ -tokoferylsukcinátu na respiraci jaterních mitochondrií

Vliv  $\alpha$ -tokoferylsukcinátu na sukcinát-dependentní respiraci izolovaných jaterních mitochondrií potkana byl sledován ve třech experimentálních modelech: Izolovaných jaterních mitochondriích, jaterním homogenátu a permeabilizovaných hepatocytech. Reprezentativní měření respiračního protokolu je znázorněno na obrázku 32a a 32b. Po přidání substrátu sukcinátu byl do suspenze přidán cytochrom c a ADP pro zhodnocení vlivu TOS na OXPHOS respiraci (obr. 32a). Pro zhodnocení vlivu TOS na respiraci v ETS stavu byl přidán sukcinát jako substrát a následně cytochrom c a s postupným titrováním FCCP k zajištění maximální respirační kapacity (obr. 32b).

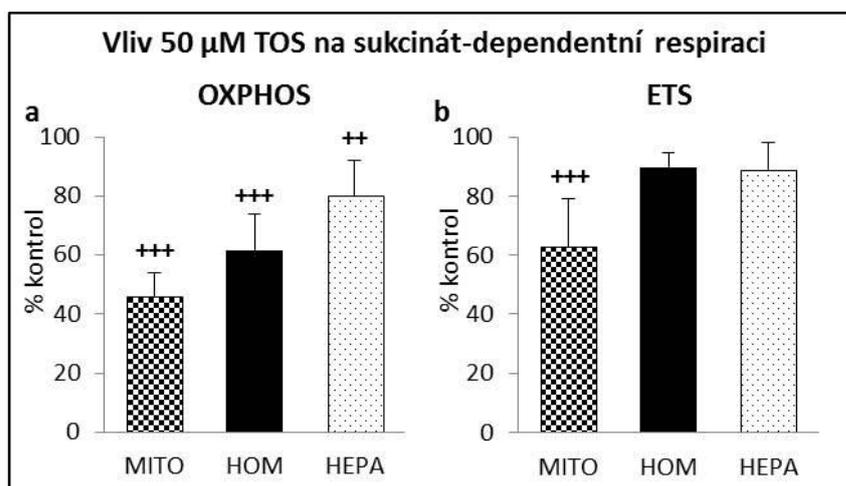


**Obrázek 32a, b. Vliv TOS na mitochondriální respiraci jater potkana v OXPHOS a ETS stavu.**

Na obrázku je znázorněno reprezentativní měření mitochondriální respirace jaterního homogenátu v OXPHOS (a) a ETS (b) stavu. Po dosažení maximální možná respirace, byl do komůrky oxygrafu přidán TOS (šedá křivka) či rozpouštědlo TOS (etanol) v případě kontrolního měření (černá křivka). Šipky označují přidání jednotlivých chemikálií do komůrky. MAX – místo maximální respirace, REOX – artefakt způsobený otevřením a zavřením komůrky za účelem zvýšení koncentrace kyslíku a omezení respirace limitované

### 3.2.1. Vliv $\alpha$ -tokoferylsukcinátu na kapacitu respirace v OXPHOS a ETS stavu

50 $\mu$ M TOS inhiboval konzumpci kyslíku ve všech experimentálních modelech v závislosti na respiračním stavu. Výsledky měření vlivu TOS na sukcinát-dependentní respiraci jaterních mitochondrií v OXPHOS a ETS stavu jsou zobrazeny v grafu 11a respektive 11b. Největší procento inhibice sukcinát-dependentní respirace bylo pozorováno v případě použití izolovaných mitochondrií v OXPHOS stavu. V ETS stavu byla signifikantní inhibice vlivem 50 $\mu$ M TOS pozorována pouze u izolovaných mitochondrií, kde došlo k poklesu na hodnotu 62,8 % kontrolní respirace. Nejmenší vliv měl TOS na respiraci permeabilizovaných hepatocytů potkana signifikantní 20% inhibicí v OXPHOS stavu ( $p < 0,01$ ) a statisticky nesignifikantní 10% inhibicí v ETS stavu. Inhibice mitochondriální respirace v ETS stavu byla oproti OXPHOS stavu méně vyjádřena ve všech experimentálních modelech (graf 11a, b).



**Graf 11a, b. Porovnání účinků TOS na respiraci jaterních mitochondrií potkana v různých experimentálních modelech.**

V grafu jsou zobrazeny výsledky měření sukcinát-dependentní respirace v OXPHOS (a) a ETS (b) stavu po 10 minutové inkubaci s TOS. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontrol, zobrazeny jsou průměry  $\pm$  SD;  $n = 6$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  ve srovnání s odpovídající kontrolou bez přidaného TOS.

### 3.2.2. Srovnání účinku $\alpha$ -tokoferolsukcinátu v různých experimentálních modelech

Pro zhodnocení minimálního inhibičního účinku TOS v jednotlivých experimentálních modelech byly testovány různé koncentrace TOS. V případě izolovaných mitochondrií došlo k výrazné inhibici již u 50 $\mu$ M TOS. Proto byly v tomto případě

koncentrace TOS snižovány. Výsledky respirace, vyjádřené v relativních hodnotách kontrolních procent jsou zobrazeny v tabulkách 5-7. Nejnížší námi testovaná dávka TOS (5  $\mu\text{mol/l}$ ) způsobovala 25% inhibici sukcinát-dependentní respirace v OXPHOS stavu. V ETS stavu byla nejnížší koncentrace TOS 25  $\mu\text{mol/l}$ ; použití této koncentrace vedlo k 33% inhibici ve srovnání s respirací kontrolních mitochondrií bez přidaného TOS (tab. 5).

Výsledky inhibice sukcinát-dependentní respirace jaterního homogenátu vlivem TOS jsou uvedeny v tabulce 6. Při použití tohoto experimentálního modelu bylo potřeba vyšších koncentrací TOS. Nejnížší dávka TOS, která způsobovala statisticky významný pokles sukcinát-dependentní respirace, byla 25  $\mu\text{mol/l}$  v OXPHOS stavu (20% pokles;  $p < 0,05$ ) a 100  $\mu\text{mol/l}$  v případě ETS stavu (17% pokles,  $p < 0,01$ ).

Výsledky inhibice respirace pro permeabilizované buňky jsou uvedeny v tabulce 7. Tento experimentální model vykazoval největší resistenci k účinkům TOS. Nejnížší námi testovaná dávka TOS (50  $\mu\text{mol/l}$ ) snižovala respiraci o 20 % v OXPHOS stavu. Během rozpřažené respirace bylo nutno použít nejméně 150 $\mu\text{M}$  TOS.

Skupina	OXPHOS	ETS
<b>Kontrola</b>	100 $\pm$ 22,6	100 $\pm$ 4,9
<b>TOS 5 <math>\mu\text{M}</math></b>	75,7 $\pm$ 8,9*	95,6 $\pm$ 5,1
<b>TOS 10 <math>\mu\text{M}</math></b>	66,2 $\pm$ 8,5***	89,6 $\pm$ 9,2
<b>TOS 25 <math>\mu\text{M}</math></b>	52,3 $\pm$ 9,2***	66,8 $\pm$ 9,0***
<b>TOS 50 <math>\mu\text{M}</math></b>	45,7 $\pm$ 8,3***	62,8 $\pm$ 16***

**Tabulka 5. Vliv TOS na respiraci izolovaných jaterních mitochondrií potkana.**

Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontrol. V tabulce je zobrazen průměr  $\pm$  SD;  $n = 6$ ;

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  ve srovnání s kontrolou.

Skupina	OXPHOS	ETS
<b>Kontrola</b>	100 ± 9,7	100 ± 4,6
<b>TOS 25 μM</b>	79,6 ± 10,3*	95,4 ± 4,6
<b>TOS 50 μM</b>	61,6 ± 12,4***	89,8 ± 4,8
<b>TOS 100 μM</b>	53,3 ± 13,1***	83,5 ± 9,4**
<b>TOS 200 μM</b>	47,6 ± 11,0***	63,8 ± 9,5***

**Tabulka 6. Vliv TOS na respiraci jaterního homogenátu potkana.**

Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontrol. V tabulce je zobrazen průměr ± SD;  $n = 6$ ;

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  ve srovnání s kontrolou.

Skupina	OXPHOS	ETS
<b>Kontrola</b>	100 ± 8,8	100 ± 8,4
<b>TOS 50 μM</b>	79,9 ± 12**	89,0 ± 9,1
<b>TOS 100 μM</b>	70,8 ± 9,7***	82,3 ± 11,4
<b>TOS 150 μM</b>	63,9 ± 9,3***	79,2 ± 11,3*
<b>TOS 200 μM</b>	61,9 ± 7,2***	70,7 ± 17,9***

**Tabulka 7. Vliv TOS na respiraci permeabilizovaných hepatocytů potkana.**

Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontrol. V tabulce je zobrazen průměr ± SD;  $n = 6$ ;

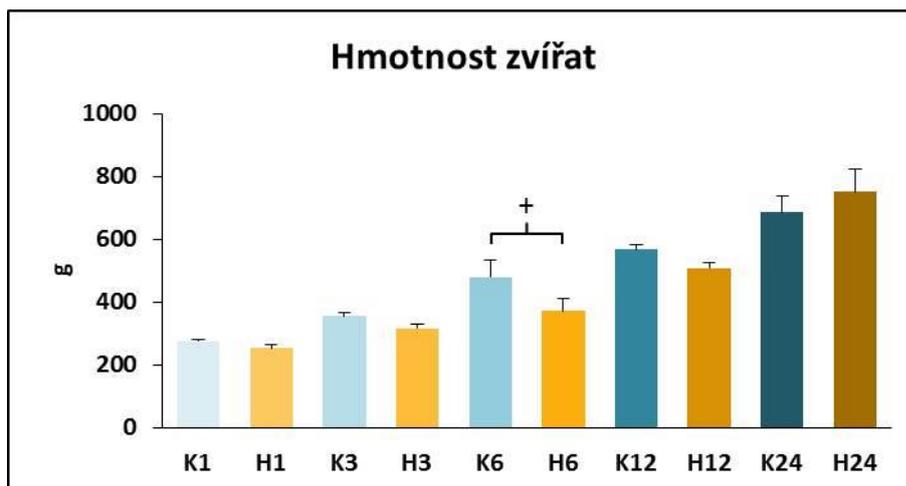
\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  ve srovnání s kontrolou.

### 3.3. Vliv vysokotukové diety na respiraci jaterních mitochondrií

#### 3.3.1. Změny jater po krmení vysokotukovou dietou

Indukce NAFLD pomocí HFD u různých experimentálních zvířat byla potvrzena již v celé řadě předchozích prací (Kakimoto and Kowaltowski, 2016). V této dizertační práci jsme se rozhodli využít experimentální HFD (70 % energetického obsahu hrazeno nasycenými mastnými kyselinami a 1,25 % ve formě cholesterolu).

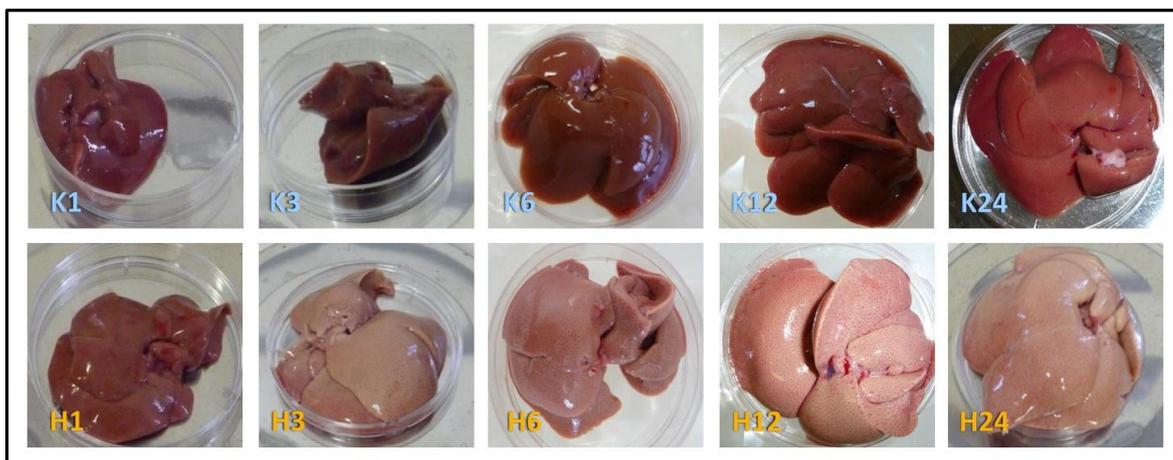
Uvedená dieta nezpůsobovala statisticky významný nárůst hmotnosti experimentálních zvířat po dobu 1 až 24 týdnů (graf 12). V šestém týdnu byla kontrolní zvířata signifikantně těžší oproti potkanům krmeným HFD.



**Graf 12. Hmotnost experimentálních zvířat v den usmrcení**

K – Kontrolní dieta, H – Vysokotuková dieta, # - týdenní interval. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr se směrodatnou odchylkou;  $n = 4$ ;  $+ p < 0,05$  ve srovnání s kontrolou.

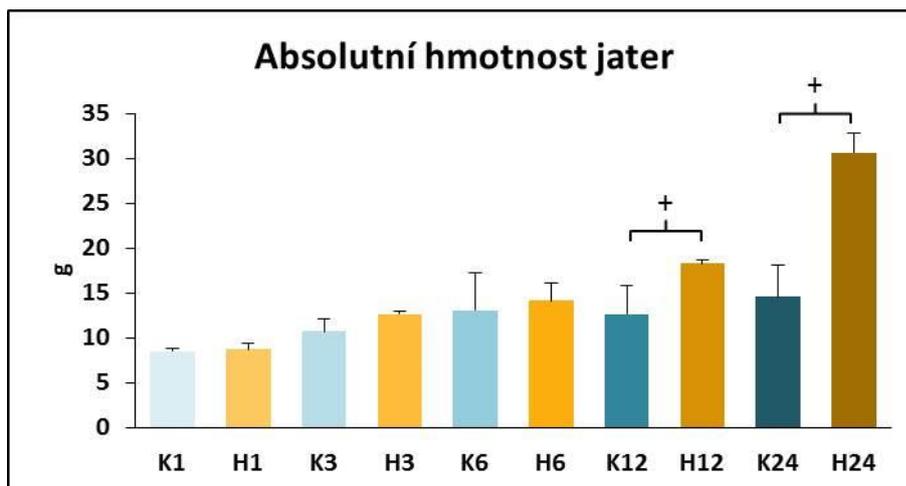
Na obrázku 33 jsou zobrazena játra vyjmutá z potkanů krmených experimentální vysokotukovou dietou po dobu 1 – 24 týdnů. Jak je již na první pohled patrné, došlo k významné jaterní steatóze, což se projevilo jejich světlým zbarvením již v prvním týdnu, poté se barva změnila na růžovo-žlutou.



**Obrázek 33. Vliv HFD na makroskopický vzhled jater potkana po 1 až 24 týdnech.**

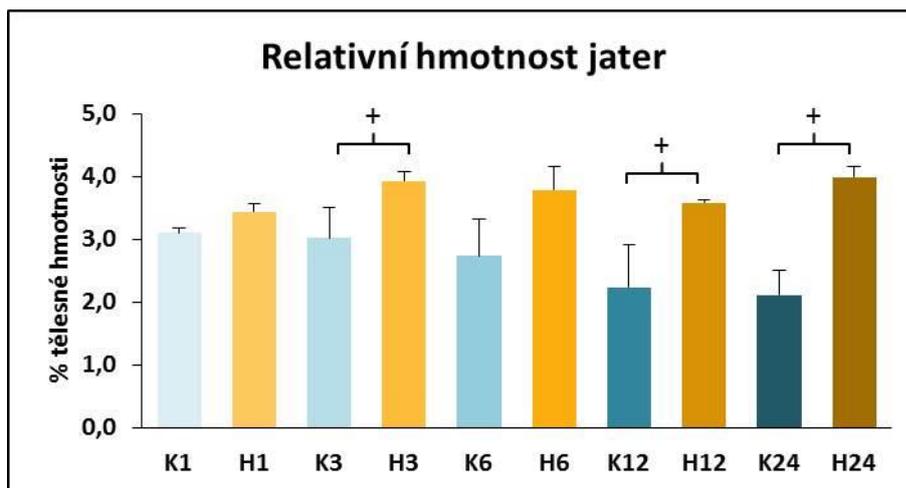
Na obrázku jsou zobrazeny fotografie jater potkana po vytažení z dutiny břišní. Játra byla opláchnuta fyziologickým roztokem, jinak na nich nebyly provedeny žádné úpravy před provedením fotografie.

Absolutní hmotnost (graf 13) jater ale nebyla signifikantně zvýšena oproti kontrolám až do 12 týdne experimentu. Relativní hmotnost jater v poměru k celkové hmotnosti nebyla signifikantně větší po 1. týdnu krmení HFD oproti kontrolní dietě, ale vykazovala statisticky významný nárůst až po 3 týdnech a dále (graf 14). Po šesti týdnech nebyl mezi oběma skupinami statisticky významný rozdíl, ale byl naznačen pouze trend (graf 14). Domníváme se, že tento výsledek je způsoben malým počtem zvířat ve skupinách.



**Graf 13. Vliv HFD na absolutní hmotnost jater potkanů**

H – vysokotuková dieta, K – kontrolní dieta, # - týdenní interval. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr se směrodatnou odchylkou;  $n = 4$ ; +  $p < 0,05$  ve srovnání s odpovídající kontrolou.



**Graf 14. Relativní hmotnost jater potkanů po krmení vysokotukovou dietou**

H – vysokotuková dieta, K – kontrolní dieta, # - týdenní interval. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr se směrodatnou odchylkou;  $n = 4$ ; +  $p < 0,05$  ve srovnání s odpovídající kontrolou.

### 3.3.2. Vliv vysokotukové diety na respiraci jaterních mitochondrií

Kompletní výsledky z obou respiračních protokolů použitých ke zhodnocení mitochondriální respirace (RP1 a RP2) jsou zobrazeny v grafu 15a, b. Detailní popis těchto protokolů naleznete v sekci 2.4.3.4.2 *Referenční protokoly*. Pro větší přehlednost jsme se rozhodli věnovat se v této dizertační práci pouze statisticky významným rozdílům, které jsme při použité referenčních protokolů pozorovali.

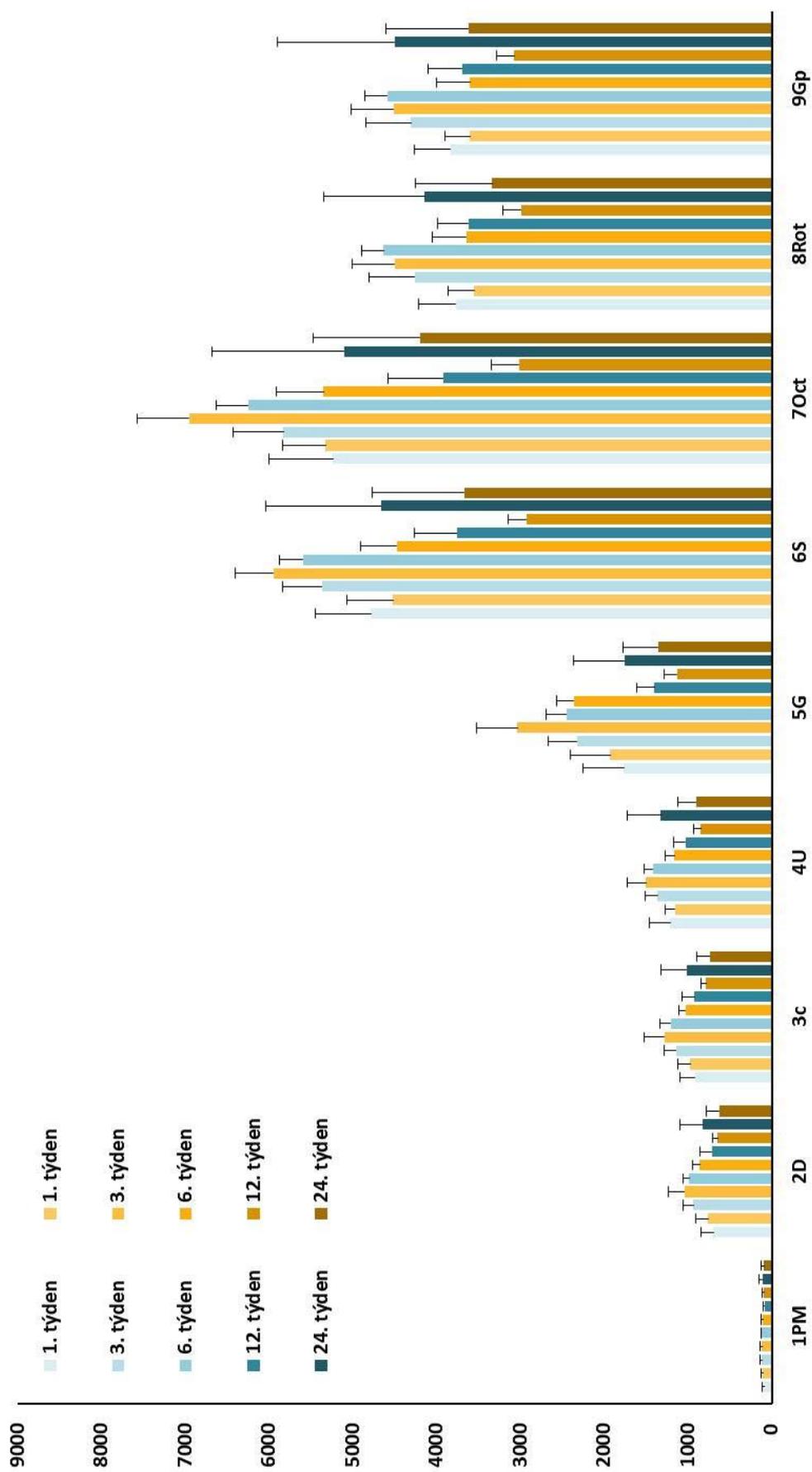
#### **Graf 15a, b. Vliv HFD na respiraci jaterních mitochondrií (na následující straně).**

Kompletní výsledky působení HFD na respiraci jaterních mitochondrií po 1 až 24 týdnech, zhodnocených pomocí referenčního protokolu 1 a 2. Pomocí postupného přidávání substrátů a inhibitorů k mitochondriální suspenzi se nám podařilo dosáhnout několika respiračních stavů (viz. metody sekce 2.4.3.4.2 *Referenční protokoly*). Čísla se zkratkami vyjadřují pořadí titračních kroků, ve kterých byla přidána daná chemikálie a následně odečítán respirační stav.

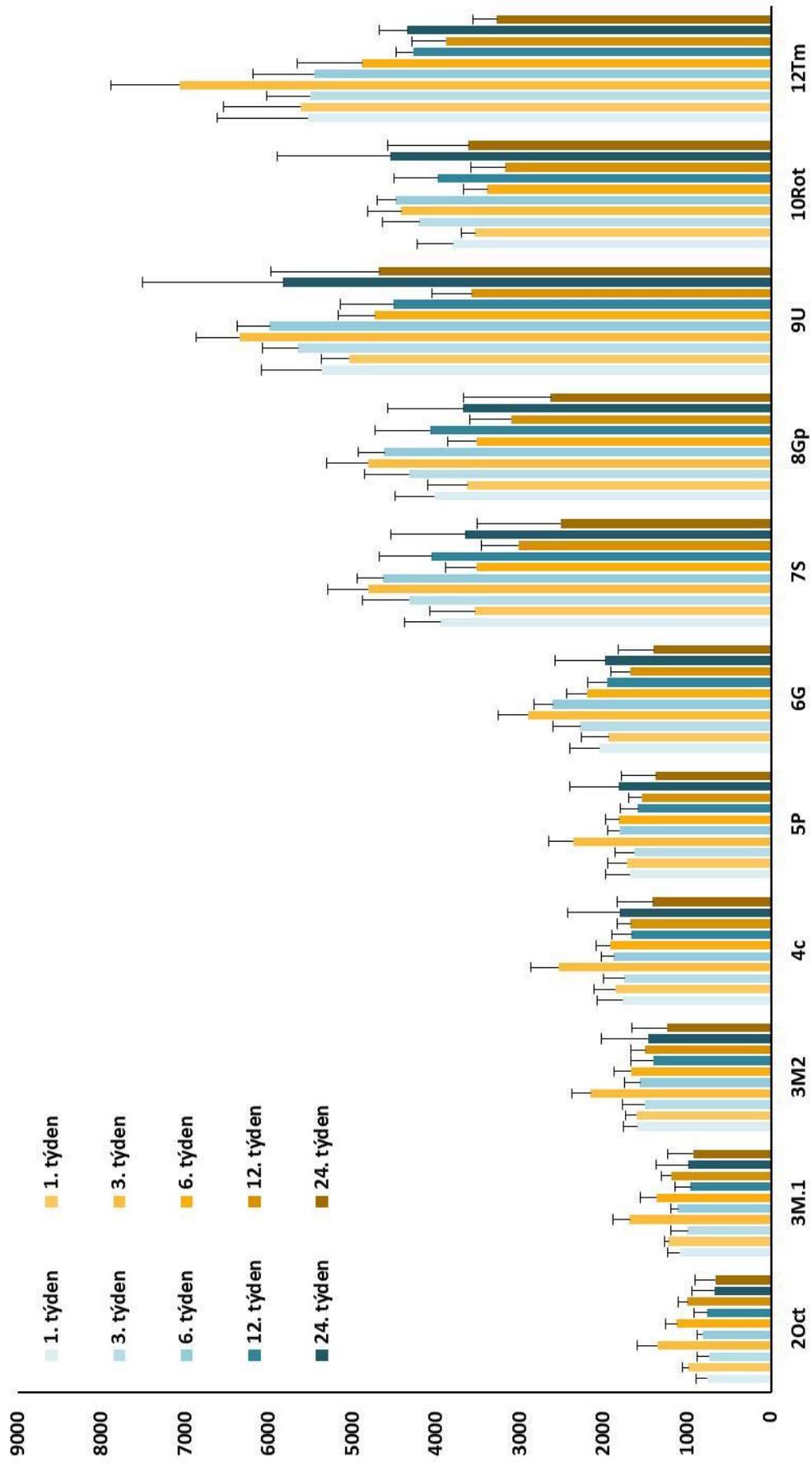
c – cytochrom c, D – ADP, G – glutamát, Gp – glycerofosfát, M – malát (M.1 – malát o koncentraci 0,1mM, M2 – malát o koncentraci 2mM), Oct – oktanoylkarnitin, P – Pyruvát, S – sukcinát, Rot – rotenon, Tm – TMPD (se současným přidáním askorbátu), U – rozpřahovač (*uncoupler*, FCCP).

**Výsledky respirace jaterních mitochondrií u kontrolních/HFD potkanů:  
Referenční protokol 1**

**a**

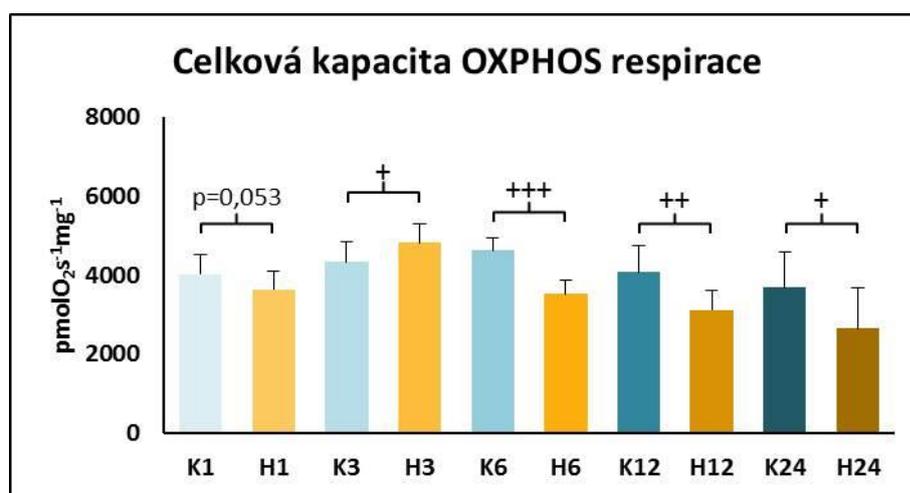


**b** Výsledky respirace jaterních mitochondrií u kontrolních/HFD potkanů:  
Referenční protokol 2



### 3.3.2.1. Vliv HFD na maximální kapacitu respirace jaterních mitochondrií potkana

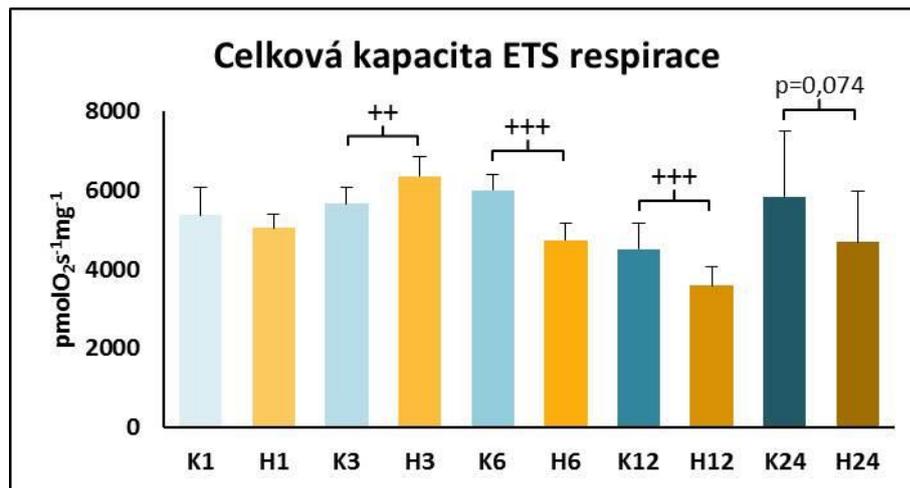
Maximální kapacita respirace jaterních mitochondrií v OXPHOS stavu byla hodnocena po přidání ADP a všech respiračních substrátů, které přispívají svými elektrony do elektron transportního systému mitochondrií (viz RP2, graf 15b). Výsledky našich měření jsou statisticky vyhodnoceny v grafu 16. Po prvním týdnu experimentu jsme zaznamenali nesignifikantní pokles respirace. Ve třetím týdnu krmení HFD jsme pozorovali statisticky významné zvýšení maximální kapacity a k signifikantnímu poklesu maximální kapacity mitochondriální respirace v OXPHOS došlo od 6. týdne dále (graf 16).



**Graf 16. Vliv HFD na celkovou kapacitu respirace jaterních mitochondrií v OXPHOS stavu.**

H – vysokotuková dieta, K – kontrolní dieta, # - týdenní interval. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr se směrodatnou odchylkou;  $n = 10 - 12$ ; +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  ve srovnání s odpovídající kontrolou.

Maximální kapacita mitochondriální respirace v ETS stavu byla hodnocena po rozpřažení elektron transportního systému jaterních mitochondrií v následujícím kroku RP2 (graf 15b). Zde došlo k signifikantně zvýšené respiraci u mitochondrií izolovaných z potkanů krmených vysokotukovou dietou po třetím týdnu pokusu. V následujících týdnech byla respirace jaterních mitochondrií oproti kontrole signifikantně snížena (graf 17).

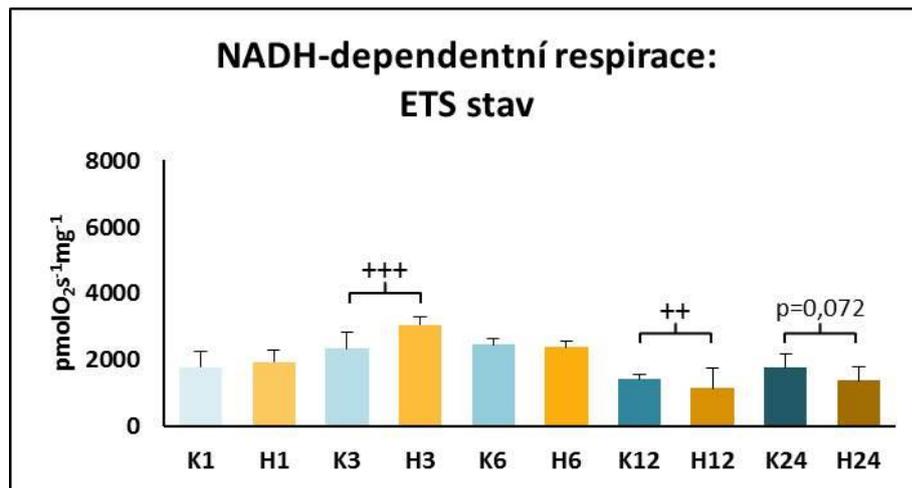


**Graf 17. Vliv HFD na maximální kapacitu respirace jaterních mitochondrií v ETS stavu.**

H – vysokotuková dieta, K – kontrolní dieta, # - týdenní interval. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr se směrodatnou odchylkou;  $n = 10 - 12$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  ve srovnání s odpovídající kontrolou.

### 3.3.2.2. Vliv HFD na NADH-dependentní respiraci jaterních mitochondrií

Maximální kapacita respirace jaterních mitochondrií za použití NADH-generujících substrátů glutamátu, malátu a pyruvátu byla hodnocena po rozpřažení v RP1 (graf 15a). Statisticky vyhodnocené výsledky našich měření jsou zobrazeny v grafu 18. Po prvním týdnu měření nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi oběma skupinami. Po třetím týdnu byla NADH-dependentní respirace mitochondrií izolovaných ze steatotických jater signifikantně zvýšena. Šestý týden se obě skupiny opět vyrovnaly a 12. týden bylo pozorováno statisticky významné snížení kapacity mitochondrií oxidovat NADH-dependentní substráty. 24. Snížení ve 24. týdnu nebylo sice statisticky významné, ale byl naznačen výrazný trend ( $p = 0,072$ ).

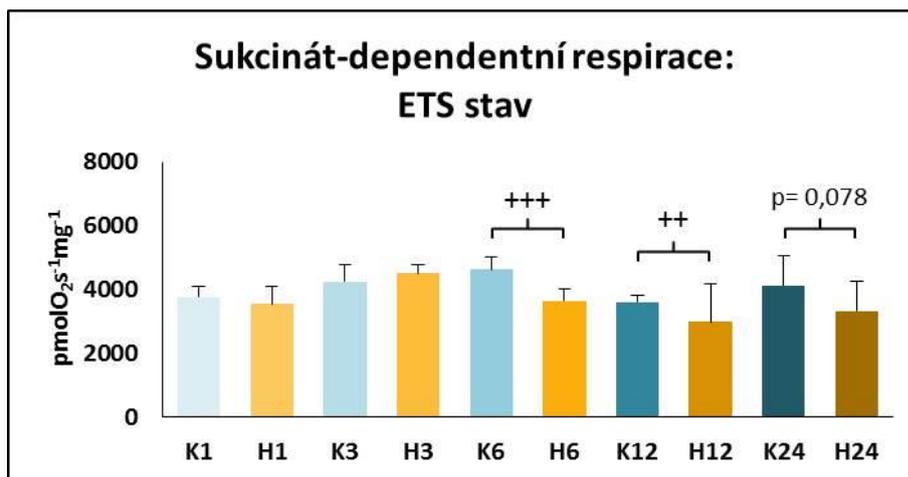


**Graf 18. Vliv HFD na kapacitu NADH-dependentní respirace jaterních mitochondrií v ETS stavu.**

H – vysokotuková dieta, K – kontrolní dieta, # - týdenní interval. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr se směrodatnou odchylkou;  $n = 10 - 12$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  ve srovnání s odpovídající kontrolou.

### 3.3.2.3. Vliv HFD na sukcinát-dependentní respiraci jaterních mitochondrií

Vliv HFD na respiraci jaterních mitochondrií energizovaných sukcinátem byl hodnocený po rozpřažení mitochondrií v RP1 a inhibici komplexu I rotenonem (graf 15a). Inhibicí komplexu I v RP1 se konvergentní tok elektronů z komplexu I a ETF zastaví přímou inhibicí a inhibicí na úrovni produktů. Výsledná konzumpce kyslíku je tedy způsobena oxidací sukcinátu komplexem II. Statisticky vyhodnocené výsledky našich měření jsou zobrazeny v grafu 19. Po šesti a více týdnech krmení HFD jsme pozorovali statisticky významný pokles sukcinát-dependentní respirace oproti skupině krmené kontrolní dietou. Tento rozdíl nebyl tak výrazný 24. týden našeho měření, kde jsme pozorovali pouze nesignifikantní snížení.

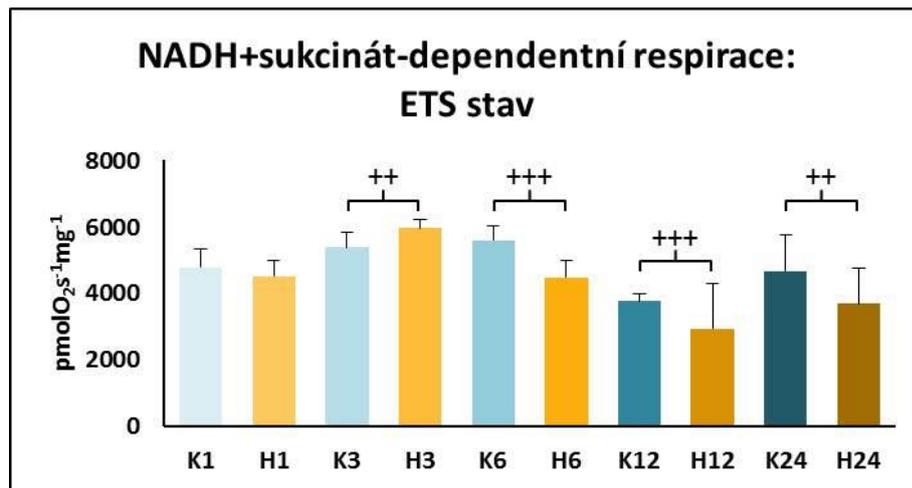


**Graf 19. Vliv HFD na kapacitu sukcinát-dependentní respirace jaterních mitochondrií v ETS stavu.**

H – vysokotuková dieta, K – kontrolní dieta, # - týdenní interval. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr se směrodatnou odchylkou;  $n = 10 - 12$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  ve srovnání s odpovídající kontrolou.

#### **3.3.2.4. Vliv HFD na NADH- a sukcinát-dependentní respiraci jaterních mitochondrií**

Výsledky konvergentního toku elektronů během NADH- a sukcinát-dependentní respirace v ETS stavu jsou zobrazeny v grafu 20 (hodnoceno z RP1). Po prvním týdnu jsme nepozorovali žádný rozdíl mezi testovanými skupinami. Po třetím týdnu došlo ke statisticky významnému zvýšení mitochondriální respirace mitochondrií izolovaných z jater potkanů krmených vysokotukovou dietou, ale od šestého týdne dále došlo k obrácení situace a k signifikantnímu snížení oproti kontrolním mitochondriím (graf 20).

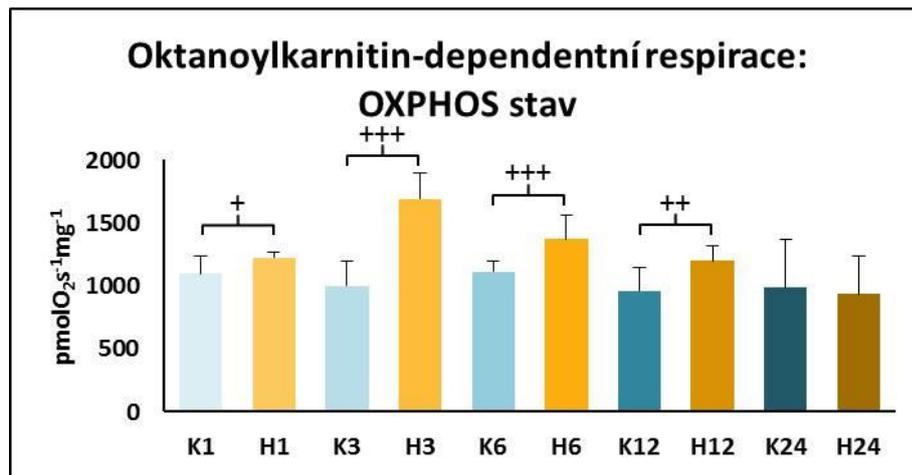


**Graf 20. Vliv HFD na kapacitu NADH- a sukcinát-dependentní respirace jaterních mitochondrií v ETS stavu.**

H – vysokotuková dieta, K – kontrolní dieta, # - týdenní interval. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr se směrodatnou odchylkou;  $n = 10 - 12$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  ve srovnání s odpovídající kontrolou.

### 3.3.2.5. Vliv HFD na oktanoylkarnitin-dependentní respiraci jaterních mitochondrií

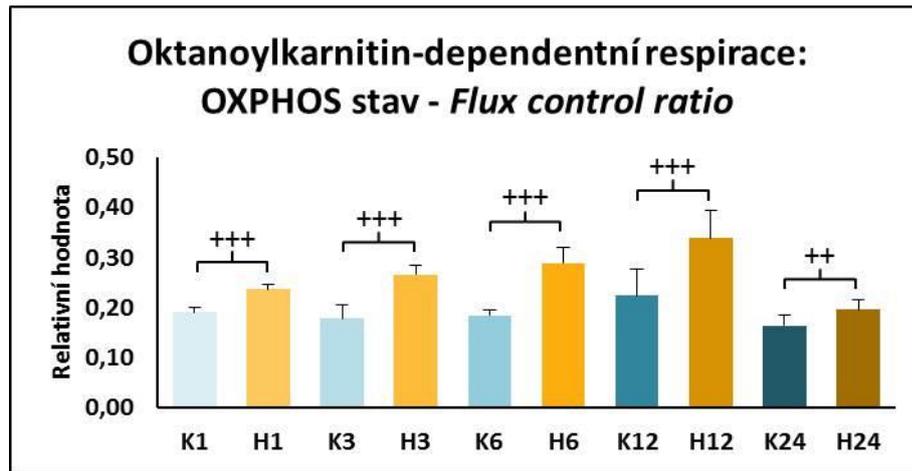
Výsledky respirace izolovaných jaterních mitochondrií po přidání oktanoylkarnitinu a 0,1mM malátu jsou zobrazeny v grafu 21. Po prvním týdnu bylo pozorováno pouze mírné, ale již statisticky významné zvýšení mitochondriální respirace v OXPHOS stavu. Toto zvýšení bylo nejvíce vyjádřeno ve třetím týdnu a pokračovalo až do 24. týdne, kdy se respirace obou skupin opět vyrovnaly (graf 21).



**Graf 21. Vliv HFD na kapacitu oktanoylkarnitin-dependentní respirace jaterních mitochondrií v ETS stavu.**

H – vysokotuková dieta, K – kontrolní dieta, # - týdenní interval. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr se směrodatnou odchylkou;  $n = 10 - 12$ ; +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  ve srovnání s odpovídající kontrolou.

Pro potvrzení tohoto výsledku, byla ještě vyjádřena oktanoylkarnitin-dependentní respirace v relativní hodnotě v přepočtu na maximální respiraci daného měření (graf 22). Vyjádření respirace směrem ke stanovenému referenčnímu stavu se nazývá *Flux control ratio* (FCR). Referenčním stavem v tomto případě byla maximální respirace v ETS stavu a FCR poté vyjadřuje kvalitativní změnu jednotlivých složek elektron transportního systému. Jinými slovy, FCR vyjadřuje procento respirace iniciované z jedné či více elektronových cest k respiraci, která tuto cestu obsahuje. V tomto případě jde o procento oktanoylkarnitin-dependentní respirace z respirace celkové (oboje z RP2, graf 15b). FCR pro oktanoylkarnitin-dependentní respiraci bylo signifikantně zvýšené již po prvním týdnu a značí tak velmi rychlý účinek HFD na kvalitativní složení proteinů elektron transportního systému jaterních mitochondrií. FCR se postupně s přibývajícím dobou zvyšovalo až do 12. Týdne experimentu (graf 22). Po 24 týdnech ovšem došlo ke zmenšení tohoto rozdílu u obou skupin.



**Graf 22. Vliv HFD na kapacitu oktanoylkarnitin-dependentní respirace jaterních mitochondrií v ETS stavu vyjádřené jako relativní hodnota z maximální respirační kapacity elektron transportního systému.**

H – vysokotuková dieta, K – kontrolní dieta, # - týdenní interval. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr se směrodatnou odchylkou;  $n = 10 - 12$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  ve srovnání s odpovídající kontrolou.

## 4. Diskuze

### 4.1. Vliv nových protinádorových látek na jaterní mitochondrie

3BP patří společně s TOS do skupiny chemických látek se slibnými protinádorovými účinky (Klučková *et al.*, 2013; Ko *et al.*, 2012; Neuzil *et al.*, 2007). Působení obou látek je spojováno s vyvoláním energetického stresu nádorových buněk, negativním vlivem na mitochondrie a na ATP generující metabolické cesty (Warmoes and Locasale, 2014). Hlavním problémem nádorové terapie dodnes zůstává otázka toxicity použitého léku a případné akutní nebo chronické poškození nenádorových tkání. Pro definování podmínek farmakoterapie jedním či více léky cílenými na rakovinové buňky je tedy nutný podrobný výzkum mechanismu účinku těchto látek a zároveň studie toxicity na nenádorových buňkách různých tkání.

#### 4.1.1. *In vitro* účinek 3-brompyruvátu na nádorové a nenádorové buňky

Je obecně přijímaným faktem, že selektivita účinků 3BP na nádorovou tkáň spočívá ve vysoké oxidační utilizaci glukózy (Pedersen, 2007; Xu *et al.*, 2005). Inhibice enzymů zahrnutých nejen v glykolytické cestě, ale i v dalších ATP produkujících reakcích a metabolických cestách by tak mohla vysvětlovat velmi selektivní účinek na celou řadu nádorově změněných buněk *in vitro* (Warmoes and Locasale, 2014). Naopak nenádorové buňky mají schopnost produkovat ATP i dalšími metabolickými cestami, a proto by mohly být k účinkům 3BP více rezistentní. Toxický účinek 3BP na nenádorovou tkáň se tedy vysvětluje převážně poškozením jejich mitochondrií (Rodrigues-Ferreira *et al.*, 2012). Data, která by popisovala účinky 3BP na mitochondriální funkce, v dnešní literatuře stále chybí. Rozhodli jsme se proto testovat, jaké dávky 3BP působí v primárních kulturách potkaních a myších hepatocytů toxicky a zda je tento toxický účinek spjat s poruchou mitochondriálních funkcí.

V našich experimentech jsme se zaměřili na základní testy viability a funkční kapacity hepatocytů, na přítomnost oxidačního stresu a na apoptózu kultivovaných hepatocytů. Ve většině námi sledovaných parametrů jsme nepozorovali rozdíl oproti kontrolním hepatocytům do koncentrace 3BP 50  $\mu\text{mol/l}$  po dobu 20 hodin inkubace. Vyšší koncentrace 3BP vedly k poškození hepatocytů, které bylo závislé na koncentraci 3BP i době inkubace. Viabilita potkaních hepatocytů v kultuře poklesla o 40% po 3 hodinách

inkubace s 3BP o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$  (graf 2). Srovnatelnou metodologii na buňkách lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2 použili v *in vitro* práci (Pereira da Silva *et al.*, 2009), kde pozorovali 60% snížení viability v porovnání s kontrolami bez 3BP. Senzitivita k účinkům 3BP se ovšem lišila s použitou nádorovou linií a také závisela na typu tkáně. Jedna ze studií, která porovnává účinky nových protinádorových látek na buněčných liniích nemalobuněčného plicního karcinomu, udává, že 3BP snižoval viabilitu buněk po 24 hodinách v širokém rozmezí koncentrací 50 – 400  $\mu\text{mol/l}$  (Zhang *et al.*, 2012). Toto pozorování bylo potvrzeno za použití nádorových linií epiteliálního karcinomu střeva SW480 a HT29 (Sun *et al.*, 2015). V kontrastu s těmito výsledky jsou práce popisující účinky 3BP na maligně transformovaných buňkách vaječníků a prsu, kde se koncentrace 3BP způsobující 50% snížení viability pohybovaly mezi 10 – 84  $\mu\text{mol/l}$  (Xintaropoulou *et al.*, 2015). Na tomto místě je ovšem potřeba zdůraznit, že nádorové buňky této studie byly vystaveny působení 3BP po dobu 72 hodin oproti 20 a 24 hodinám v naší studii, respektive výše zmíněné studii na HepG2 linii. Pro budoucí využití 3BP v terapii je tedy především nutné zhodnotit typ nádoru, koncentraci a dobu působení (Chen *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2015; Xintaropoulou *et al.*, 2015).

V naší práci 3BP poškozoval primární hepatocyty potkana se stejnými projevy jako v případě studií s nádorovými buňkami. Výsledkem jeho působení byla vyšší tvorba ROS, snížení aktivity buněčných enzymů, indukce apoptózy, či nekrózy a poškození buněčné membrány. Pro potvrzení, že tento efekt není specifický pouze pro hepatocyty potkana, jsme využili i modelu primárních hepatocytů myši. U myších hepatocytů došlo k obdobnému účinku, proto se domníváme, že naše výsledky budou reprodukovatelné i na dalších hepatocytech savců. Podobně jako u jiných látek, způsobujících toxické poškození jater (např. acetaminofen), myší hepatocyty byly více citlivé k účinkům 3BP oproti hepatocytům potkana (Kučera *et al.*, 2016). Nicméně ani hepatocyty myši nebyly poškozeny po 20 hodinách inkubace s koncentracemi 3BP 50  $\mu\text{mol/l}$  a nižšími ve srovnání s kontrolami (grafy 9 a 10).

V rámci této práce jsme také testovali účinek 3BP na schopnost primárních hepatocytů potkana a myši tvořit albumin po 20 hodinách inkubace. Dle našich výsledků 3BP snižoval funkční kapacitu kultivovaných buněk *in vitro* od koncentrací 150  $\mu\text{mol/l}$  a vyšších (graf 3a). Tento výsledek je významný hlavně s přihlédnutím na doposud první využití 3BP v klinické léčbě pacienta s fibrolamelárním karcinomem jater (Ko *et al.*,

2012). V této studii, proběhlé v roce 2009, pacient po léčbě 3BP vykazoval dlouhodobou hypoalbuminémii. Autoři zmiňované práce přisuzují sníženou produkci albuminu rozsáhlému poškození jaterní tkáně právě proběhlým nádorovým procesem. Nicméně dle jimi popisovaných výsledků nelze přímo vyloučit toxické poškození nemaligní jaterní tkáně, ke kterému by mohlo dojít, jak se ukázalo v naší práci. Jednoznačné vyloučení toxicity 3BP na jaterní funkce *in vivo* tedy stále chybí.

3BP způsoboval výrazné snížení MMP kultivovaných hepatocytů při vizualizaci fluorescenční sondou JC-1 (obr 26). Pro objasnění efektu 3BP na funkce jaterních mitochondrií jsme se rozhodli testovat přímé působení této látky na izolované jaterní mitochondrie a hepatocyty permeabilizované digitoninem po dobu maximálně 10 minut. Pozorovali jsme signifikantní pokles MMP při inkubaci s 3BP o koncentracích 10 a 20  $\mu\text{mol/l}$  u mitochondrií energizovaných glutamátem a malátem, respektive sukcinátem (grafy 4 – 6). Velký pokles byl také pozorován v OXPHOS stavu po 5 minutovém vystavení izolovaných mitochondrií 10 $\mu\text{M}$  a 15 $\mu\text{M}$  3BP u NADH-, respektive sukcinát-dependentní respirace (graf 8a). Tento efekt byl obdobný u permeabilizovaných hepatocytů (grafy 7 a 8b). Nepozorovali jsme žádný účinek na komplex IV (graf 9) a účinek 3BP na komplex III byl již dříve vyvrácen (Shoshan, 2012). Dle našich výsledků se tedy domníváme, že místem inhibice respiračního systému jaterních mitochondrií bude komplex I a komplex II. I v případě měření přímého působení 3BP na jaterní mitochondrie jsme pozorovali koncentračně a časově závislý efekt.

Na závěr tedy můžeme shrnout, že 3BP měl toxické účinky na nenádorové, primární hepatocyty izolované z jater potkanů a myši, které vykazovaly časovou a koncentrační závislost. Dávky 3BP použité v této studii se pohybovaly ve srovnatelných mezích s *in vitro* pracemi na nádorových buněčných liniích. Sledovali jsme poškození mitochondriálních funkcí, které mělo nejmenší účinek na intaktních buňkách v kultuře a největší účinek na izolovaných mitochondriích. Snížený účinek na permeabilizovaných a intaktních buňkách může být vysvětlen jednak protektivními faktory v cytoplazmě buněk a jednak nižší efektivní intracelulární koncentrací 3BP způsobenou limitovaným přestupem 3BP přes buněčnou membránu. V budoucích studiích bude důležité objasnit mechanismy, kterými se nenádorové buňky mohou bránit vůči působení 3BP a také popsat transportní mechanismy, kterými 3BP přechází přes cytoplazmatickou membránu.

#### 4.1.2. *In vitro* účinek $\alpha$ -tokoferylsukcinátu na nádorové a nenádorové buňky

V našich experimentech s TOS jsme se zaměřili na již dříve popsany účinek spočívající v inhibici funkce komplexu II v nádorových mitochondriích (Dong *et al.*, 2008). Tento efekt TOS v nádorových buňkách se odlišoval při použití různých nádorových linií a nebyl testován na mitochondriích izolovaných z nenádorových hepatocytů. Pro detailnější popis inhibice komplexu II na jaterních mitochondriích potkana jsme se rozhodli vystavit účinku TOS tři experimentální modely ve dvou různých respiračních stavech. Účinek TOS na respiraci nenádorových mitochondrií byl již dříve popsán na submitochondriálních partikulích (SMP) izolovaných ze srdečních mitochondrií skotu (Gruber *et al.*, 2014). Dle výsledků této studie způsoboval 42  $\mu$ M TOS poloviční inhibici aktivity komplexu II. Model SMP je úspěšně využíván pro měření aktivity komplexu II díky vazbě komplexu II na vnitřní IMM, a proto po přidání sukcinátu a cytochromu c dosáhneme maximální kapacity sukcinát-dependentní respirace. Tento stav je tedy analogický naším měřením v rozpřaženém ETS stavu, protože není limitovaný aktivitou ATP syntázy a protonovým gradientem. Studie, ve které autoři porovnávají účinek TOS na komplex II bakterie *Paracoccus denitrificans* a jaterních mitochondrií potkana v modelu SMP (Dong *et al.*, 2008), byla ve shodě s našimi pozorováními.

Z námi naměřených výsledků uvedených v této práci je zřejmé, že ve všech experimentálních modelech TOS způsoboval inhibici sukcinát-dependentní respirace jaterních mitochondrií potkana. Tato inhibice byla více vyjádřena v OXPHOS stavu v porovnání s ETS stavem. Z důvodu využití stejných respiračních protokolů v obou experimentálních situacích (s jediným rozdílem využití ADP a rozpřahovače při měření OXPHOS, respektive ETS respirační kapacity) se domníváme, že inkubace jaterních mitochondrií s TOS vede nejen k inhibici komplexu II, ale zároveň i k možné inhibici ATP syntázy. Účinek TOS na inhibici oxidativní fosforylace byl již dříve navržen (Gogvadze *et al.*, 2010), ale doposud nebyl dostatečně experimentálně potvrzen.

Naše výsledky dokumentují, že k účinkům TOS jsou nejcitlivější izolované mitochondrie. Vzhledem k chemické struktuře této lipofilní látky je logické, že větší obsah lipidů v testovaném vzorku bude snižovat efektivní koncentraci TOS, která bude mít možnost specificky inhibovat enzymy na vnitřní straně IMM. V případě jaterního homogenátu a permeabilizovaných hepatocytů dochází k situaci, kdy se TOS rovnoměrně distribuuje ve všech lipidových membránách a tím pádem menší množství zůstane pro

mitochondrie samotné. Nedávno byla vyvinuta molekula specificky upraveného TOS cíleného na mitochondrie, která se nazývá MitoVES (Dong *et al.*, 2011). MitoVES byl vyvinut skupinou profesora Neužila a několikanásobně zlepšuje protinádorové účinky TOS (Kovarova *et al.*, 2014; Truksa *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015b). Struktura MitoVES vychází z molekuly TOS, na jehož alifatický řetězec je navázaný trifenyl-fosfoniový kationt, který selektivně cílí do mitochondriální matrix (Rohlena *et al.*, 2011). Nespecifická distribuce TOS je tedy v souladu s našimi pozorováními a vysvětluje rozdílný účinek TOS v různých experimentálních modelech. Dalším možným vysvětlením, které bylo navrženo již dříve (Neuzil and Massa, 2005), je přítomnost nespecifických esteráz v cytoplazmě hepatocytů. Tyto esterázy štěpí TOS na sukcinát a vitamin E a snižují inhibiční účinek na komplex II. Domníváme se tedy, že tyto dva mechanismy mohou vysvětlovat diskrepance v jednotlivých experimentálních modelech.

Závěrem bych chtěl shrnout, že naše výsledky prokazují větší inhibiční účinek TOS na sukcinát-dependentní respiraci v izolovaných mitochondriích ve srovnání s jaterním homogenátem a permeabilizovanými hepatocyty. Ve všech experimentálních modelech došlo k větší míře inhibice při respiraci v OXPHOS stavu, než v ETS stavu, což nás vede k závěru, že nejen komplex II, ale také ATP syntáza může být cílem působení této látky v jaterních mitochondriích.

#### **4.1.3. Porovnání účinků obou antineoplastických látek**

Z našich výsledků vyplývá, že obě látky mají inhibiční účinek na respiraci jaterních mitochondrií v OXPHOS stavu. Negativní účinek obou látek vykazoval koncentrační a časovou závislost. Nejnižší koncentrace 3BP, která způsobovala statisticky významný pokles sukcinát-dependentní respirace izolovaných mitochondrií, byla 10  $\mu\text{M}$  (16% pokles,  $p < 0,01$ ) ve srovnání s 5  $\mu\text{M}$  (25% pokles,  $p < 0,05$ ) u TOS. Obrácená situace nastala v případě permeabilizovaných hepatocytů, kde nejnižší koncentrace TOS způsobující signifikantní snížení sukcinát-dependentní respirace byla 50  $\mu\text{M}$  (20% pokles,  $p < 0,01$ ) a u 3BP to bylo opět 10  $\mu\text{mol/l}$  (15% pokles,  $p < 0,05$ ).

Z námi naměřených dat se lze domnívat, že inhibiční účinek na sukcinát-dependentní respiraci je vyšší u TOS ve srovnání s 3BP, ale na druhou stranu je použití TOS méně selektivní, protože dochází k distribuci této lipofilní molekuly i v jiných lipidových membránách, což neplatí o hydrofilním 3BP. Také může být tento rozdíl vysvětlen štěpením molekuly TOS nespecifickými esterázami v cytoplazmě hepatocytů.

## **4.2. Nealkoholová jaterní steatóza u potkana**

Vliv vysokotukové diety na funkce jaterních mitochondrií v průběhu NAFLD je v posledních letech intenzivně studován (Kakimoto and Kowaltowski, 2016; Lionetti *et al.*, 2014; Nassir and Ibdah, 2014; Rolo *et al.*, 2012). Závěry jednotlivých prací se rozcházejí v zásadních zjištěních, což je způsobeno velkou variabilitou druhů experimentálních zvířat, metodologie hodnocení mitochondriální respirace a hlavně délce krmení a druhu vysokotukové či jiné specifické diety (Aharoni-Simon *et al.*, 2011; Kakimoto and Kowaltowski, 2016).

Indukce jaterní steatózy byla pozorována ve většině studií bez rozdílu složení HFD či doby krmení (Aoun *et al.*, 2012; Ciapaite *et al.*, 2007; Flamment *et al.*, 2012; Lionetti *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011) a nebyla nutně asociována s nárůstem hmotnosti (Ciapaite *et al.*, 2011; Kakimoto and Kowaltowski, 2016; Raffaella *et al.*, 2008). Zvýšená akumulace lipidů v játrech potkanů byla doprovázena inzulínovou rezistencí (Lionetti *et al.*, 2014; Raffaella *et al.*, 2008). Zda steatóza hepatocytů je příčinou či důsledkem inzulínové rezistence, ale stále není jednoznačně objasněno (Aoun *et al.*, 2012; Postic and Girard, 2008). Dle našich výsledků absolutní hmotnost jater nebyla signifikantně zvýšena do 12. týdne studie. Podobné pozorování bylo již dříve zaznamenáno u potkanů krmených HFD s 54% obsahem tuků po dobu 8 týdnů (Vial *et al.*, 2011).

### **4.2.1. Vliv vysokotukové diety na respiraci jaterních mitochondrií**

#### **4.2.1.1. Výhody komplexního zhodnocení mitochondriální respirace v naší práci**

V této práci jsme ke studiu vlivu HFD na mitochondriální elektron transportující systém využili referenčních protokolů RP1 a RP2 (viz výše). Referenční protokoly jsou vyvíjeny v rámci mezinárodního projektu zaměřeného na studium mitochondriální fyziologie MITOEAGLE, na kterém se podílí i naše skupina experimentální hepatologie. RP1 a RP2 byly navrženy ke komplexnímu zhodnocení mitochondriální respirace a k získání co největšího množství informací během jednoho respirometrického měření se současným zachováním co nejlepší kvality studovaného vzorku. Jsou proto využívány pro porovnání mitochondriální respirace v rozdílných orgánech, živočišných druzích a tak dále.

V této práci se nám podařilo úspěšně použít referenční protokoly ke komplexnímu zhodnocení elektron transportního systému mitochondrií, které byly izolovány z jater

potkana postiženého NAFLD. Díky tomuto postupu máme dostatek reprodukovatelných dat v řadě respiračních stavů.

Podle našich výsledků má dlouhodobé podávání HFD odlišné účinky na respiraci izolovaných jaterních mitochondrií jak v závislosti na respirační cestě, tak i na době krmení. Když porovnáme maximální OXPHOS respiraci při použití všech respiračních substrátů (graf 16) je patrné, že od 6. týdne dále dochází ke statisticky významnému snížení maximální oxidativní fosforylace u HFD skupiny. Na druhou stranu po třech týdnech krmení 70% HFD je maximální respirační OXPHOS kapacita zvýšena. Obdobný trend můžeme pozorovat u rozpřažených mitochondrií, kdy dochází po třech týdnech ke zvýšení maximální oxidační kapacity a od šesti týdnů dále k jejímu snížení v porovnání s kontrolní skupinou (graf 17). Vial *et al.* (2011) ve své práci popisuje podobné snížení mitochondriální OXPHOS kapacity po osmi týdnech krmení HFD (54 % energie z tuků), které nebylo závislé na typu použitého respiračního substrátu. Ve své práci dále uvádí že LEAK respirace byla změněna při použití substrátů glutamátu a malátu (Vial *et al.*, 2011). V rozporu s těmito výsledky jsou práce, ve kterých autoři nezaznamenali žádné signifikantní rozdíly v efektivitě oxidativní fosforylace, LEAK respiraci a v oxidativní kapacitě jaterních mitochondrií u HFD skupiny krmené 7 týdnů (Ciapaite *et al.*, 2007), respektive 26 týdnů (Nadal-Casellas *et al.*, 2010). V naší studii také nedošlo ke zvýšení LEAK respirace a nepozorovali jsme rozdíly mezi kontrolní a HFD skupinou (graf 15a, stav 1PM). Porucha produkce ATP u jaterních mitochondrií byla také prokázána u potkanů krmených cholin deficientní dietou již od dvou týdnů (Aharoni-Simon *et al.*, 2011).

#### ***4.2.1.2. Vliv vysokotukové diety na NADH-dependentní a sukcinát-dependentní respiraci***

Výsledky vlivu HFD na mitochondriální respiraci při použití substrátů pro komplex I či II s literatuře rozchází. Shodně s našimi výsledky Lionetti *et al.* (2014) nezaznamenal žádný rozdíl NADH-dependentní respirace v LEAK a OXPHOS stavu po 6 týdnech krmení HFD (40% tuků). Raffaella *et al.* (2008) prokázal snížení sukcinát-dependentní respirace a NADH-dependentní respirace v LEAK a OXPHOS stavu po 7 týdnech krmení. V rozporu s našimi výsledky jsou data publikovaná v další práci (Ciapaite *et al.*, 2011), kde autoři studie popisují snížení NADH-dependentní respirace po 2,5 týdnech krmení HFD.

Dle našich výsledků došlo po 6 týdnech a delší době krmení HFD k inhibici sukcinát-dependentní respirace (graf 19). Zvýšenou efektivitu sukcinát-dependentní

oxidativní fosforylace izolovaných jaterních mitochondrií po 8 týdnech krmení HFD naměřil ve své práci Flamment *et al.* (2012). Zvýšená aktivita komplexu II, III a IV také byla prokázána spektrofotometricky (Aoun *et al.*, 2012). Výsledky obou prací se zdají být v rozporu s námi naměřenými daty. Tuto diskrepanci lze vysvětlit použitím jiného množství a typů mastných kyselin ve vysokotukové dietě, provedením pokusů na jiném kmeni potkanů (Sprague Dawley v případě práce Flamment *et al.* 2012) a použitím jiné kontroly (vztahováno ke skupině před zahájením krmení). Dalším vysvětlením může být použití odlišné metodologie. Aoun *et al.* (2012) měřil ve své práci aktivitu komplexů respiračního systému spektrofotometricky a nepočítal tedy s rychlostí celkové respirační cesty ale pouze aktivitou izolovaných respiračních komplexů. I za předpokladu, že se komplexy II, III a IV podílí na transportu elektronů v sekvenci, stále se mezi nimi nachází Q a cytochrom c. Také je opodstatněné se domnívat, že izolovaná aktivita daného proteinu bude do jisté míry odlišná od aktivity proteinu v součinnosti s dalšími komponentami IMM.

#### **4.2.1.3. Vliv vysokotukové diety na mitochondriální oxidaci mastných kyselin**

Dle našich výsledků došlo již po prvním týdnu krmení HFD ke statisticky významnému zvýšení oktanoylkarnitin-dependentní OXPHOS respirace izolovaných jaterních mitochondrií ve srovnání s kontrolní dietou ( $p < 0,05$ ; graf 21). Tento rozdíl byl nejvíce vyjádřen po třech týdnech a od šesti a více týdnů se rozdíl postupně vyrovnával. Po 24 týdnech trvání experimentu nebyl mezi skupinami žádný významný rozdíl.

Změna oxidace mastných kyselin v mitochondriích při rozvoji NAFLD byla prokázána již dříve s využitím palmitoylkarnitinu jako respiračního substrátu. Jaterní mitochondrie potkanů krmených HFD od 2,5 do 25 týdnů vykazovaly zvýšenou palmitoylkarnitin-dependentní respiraci v LEAK i OXPHOS stavu (Ciapaite *et al.*, 2011; Lionetti *et al.*, 2014). Ani v případě oxidace mastných kyselin nejsou výsledky publikovaných prací jednoznačné. Po 7 týdnech trvání HFD zaznamenal pokles palmitoylkarnitin-dependentní respirace v LEAK a OXPHOS Raffaella *et al.* (2008) a po 8 týdnech Vial *et al.* (2011). Autoři posledně jmenované studie zaznamenali také pokles ketogeneze a z naměřených dat se domnívají, že při rozvoji NAFLD dochází ke snížení  $\beta$ -oxidace mastných kyselin v jaterních mitochondriích. Jejich poznatek je v rozporu s nálezem vyšší exprese mRNA pro CD36, FABP, CPT-1 a Acyl-CoA dehydrogenázy (Vial *et al.*, 2011). Tyto proteiny mají důležitou úlohu v transportu VMK do hepatocytů a

do mitochondrií a jsou nezbytné k zajištění  $\beta$ -oxidace mastných kyselin v játrech. Zvýšení aktivity mitochondriálního transportního proteinu CPT-1 bylo prokázáno i v dalších studiích (Lionetti *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011).

Vliv HFD na  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin v jaterních mitochondriích dokladují i námi naměřené výsledky oktanoylkarnitin-dependentní respirace. Díky dlouhodobému sledování je ovšem zřejmé, že tento účinek není konstantní, ale mění se v čase. Mírný vzestup  $\beta$ -oxidace u potkanů krmených HFD nastal již po prvním týdnu experimentu. Domníváme se, že se jedná o začínající adaptaci jaterních mitochondrií na radikální změnu ve složení stravy. Tato adaptace, která se dá vyjádřit kvalitativně pomocí *FCR* v přepočtu na maximální kapacitu respiračního systému, progreduje až do 12 týdne naší studie (graf 22). Radikální pokles, který následuje 24. týden, nelze z dostupných dat hodnotit a vysvětlení bude vyžadovat další měření. V absolutních hodnotách respirace přepočítané na mg proteinu je vzestup oktanoyl-dependentní respirace také statisticky významný po prvním a třetím týdnu. V intervalech delších než šest týdnů dochází k signifikantnímu poklesu. Zde lze spekulovat. Mohlo by dojít ke třem poměrně reálným scénářům: 1) snížení absolutního počtu jaterních mitochondrií; 2) snížení absolutního počtu všech respiračních komplexů na IMM vlivem mitochondriálního spojování či rozpojování; 3) zpomalení mitochondriální respirace nespecifickým mechanismem (např. vlivem většího zastoupení fosfolipidů IMM a prodloužením vzdálenosti mezi komplexy se snížením jejich efektivní koncentrace). Na všechny tři teorie lze nalézt podpůrné podklady ve vědecké literatuře (viz úvod). Naše data neumožňují ani jednu teorii definitivně potvrdit či vyvrátit; pro bližší vysvětlení bude nutné rozšířit metodologický přístup o molekulárně genetické a biologické metody.

Zvýšení NADH-dependentní respirace v ETS stavu po třech týdnech naznačuje zvýšenou kapacitu komplexu I oxidovat NADH a generovat  $\text{NAD}^+$ , který je nezbytným redukčním kofaktorem při  $\beta$ -oxidaci. Dala by se tedy potvrdit hypotéza, že během rozvoje NAFLD dochází nejprve k adaptaci jaterních mitochondrií na změnu složení diety. Tato adaptace je vyjádřena zvýšenou stimulací  $\beta$ -oxidace mastných kyselin za současného poklesu aktivity enzymů KC. V pozdějších fázích tohoto onemocnění může dojít k poškození mitochondrií se sníženou celkovou kapacitou elektron transportního systému a mitochondriální dysfunkci.

## 5. Závěry

1. V první části práce se nám podařilo prokázat toxické poškození nenádorových hepatocytů potkana a myši *in vitro* od koncentrace 3BP 100  $\mu\text{mol/l}$  a vyšší již po 1 hodině inkubace. Toto poškození bylo vyjádřeno jako snížení viability a funkční kapacity kultivovaných hepatocytů. 3BP způsoboval zvýšenou tvorbu ROS, což vedlo k apoptóze a nekróze buněk. Poškození bylo závislé na dávce a době působení této látky.
2. 3BP snižoval MMP a respirační kapacitu izolovaných jaterních mitochondrií a permeabilizovaných hepatocytů v suspenzi již po 5 minutách působení. Inhibiční účinek této látky jsme pozorovali v OXPHOS stavu mitochondrií energizovaných NADH-dependentními substráty a sukcinátem. 3BP neměl vliv na respirační aktivitu komplexu IV.
3. V další části práce se nám podařilo prokázat rozdíly inhibičního účinku TOS na sukcinát-dependentní respiraci nenádorových jaterních mitochondrií v odlišných experimentálních modelech. TOS měl největší negativní účinek na respiraci izolovaných jaterních mitochondrií a nejnižší efekt na permeabilizované hepatocyty potkana v OXPHOS i v ETS stavu.
4. V poslední části práce se nám pomocí HFD podařilo navodit jaterní steatózu u potkana. Mitochondrie izolované ze steatotických jater měly zvýšenou kapacitu  $\beta$ -oxidace mastných kyselin již po prvním týdnu. Postupně ale došlo k poklesu  $\beta$ -oxidace a 24 týden jsme již nepozorovali žádný významný rozdíl. NADH- a sukcinát-dependentní respirace, které bylo dosaženo přidáním substrátů Krebsova cyklu, byla vyšší po 3 týdnech a následně významně snižena po 6, 12 a 24 týdnech studie. Tento trend vykazovala i celková respirační kapacita jaterních mitochondrií.

Tato práce vznikla za podpory grantů PRVOUK P37/02; UK SVV-2015-260179; UK SVV-2016-260287; UK Progres Q40/02; a Vnitřního grantu Lékařské fakulty v Hradci Králové 84123.

## 6. Použitá literatura

- ADEVA-ANDANY MM, PEREZ-FELPETE N, FERNANDEZ-FERNANDEZ C, DONAPETRY-GARCIA C, PAZOS-GARCIA C: Liver glucose metabolism in humans. *Bioscience reports* **36**, 2016.
- AHARONI-SIMON M, HANN-OBERCYGER M, PEN S, MADAR Z, TIROSH O: Fatty liver is associated with impaired activity of PPARgamma-coactivator 1alpha (PGC1alpha) and mitochondrial biogenesis in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **91**: 1018-1028, 2011.
- AKERMAN KE, WIKSTROM MK: Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* **68**: 191-197, 1976.
- ALBERTS BJ, ALEXANDER; LEWIS, JULIAN; MORGAN, DAVID; RAFF, MARTIN; ROBERTS, KEITH; WALTER, PETER (2015). *Molecular Biology of the Cell*, 6th edn (Garland Science).
- ALMEIDA AS, FIGUEIREDO-PEREIRA C, VIEIRA HL: Carbon monoxide and mitochondria-modulation of cell metabolism, redox response and cell death. *Frontiers in physiology* **6**: 33, 2015.
- ALVES TC, BEFROY DE, KIBBEY RG, KAHN M, CODELLA R, CARVALHO RA, FALK PETERSEN K, SHULMAN GI: Regulation of hepatic fat and glucose oxidation in rats with lipid-induced hepatic insulin resistance. *Hepatology (Baltimore, Md)* **53**: 1175-1181, 2011.
- ANDREYEV AY, KUSHNAREVA YE, STARKOV AA: Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry Biokhimiia* **70**: 200-214, 2005.
- ANGULO-MOLINA A, REYES-LEYVA J, LOPEZ-MALO A, HERNANDEZ J: The Role of Alpha Tocopheryl Succinate (alpha-TOS) as a Potential Anticancer Agent. *Nutrition and cancer*, 2013.
- AOUN M, FOURET G, MICHEL F, BONAFOS B, RAMOS J, CRISTOL JP, CARBONNEAU MA, COUDRAY C, FEILLET-COUDRAY C: Dietary fatty acids modulate liver mitochondrial cardiolipin content and its fatty acid composition in rats with non alcoholic fatty liver disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **44**: 439-452, 2012.
- AZEVEDO-SILVA J, QUEIROS O, BALTAZAR F, ULASZEWSKI S, GOFFEAU A, KO YH, PEDERSEN PL, PRETO A, CASAL M: The anticancer agent 3-bromopyruvate: a simple but powerful molecule taken from the lab to the bedside. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2016.
- BAK LK: Astrocytes take the stage in a tale of signaling-metabolism coupling. *The Journal of biological chemistry* **292**: 9439-9440, 2017.

- BARADARAN R, BERRISFORD JM, MINHAS GS, SAZANOV LA: Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* **494**: 443-448, 2013.
- BEJARANO I, ESPINO J, GONZALEZ-FLORES D, CASADO JG, REDONDO PC, ROSADO JA, BARRIGA C, PARIENTE JA, RODRIGUEZ AB: Role of Calcium Signals on Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells. *International journal of biomedical science : IJBS* **5**: 246-256, 2009.
- BELLAFANTE E, MURZILLI S, SALVATORE L, LATORRE D, VILLANI G, MOSCHETTA A: Hepatic-specific activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1beta protects against steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* **57**: 1343-1356, 2013.
- BELLENTANI S: The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **37 Suppl 1**: 81-84, 2017.
- BELLEZZA I, TUCCI A, GALLI F, GROTTELLI S, MIERLA AL, PILOLLI F, MINELLI A: Inhibition of NF-kappaB nuclear translocation via HO-1 activation underlies alpha-tocopheryl succinate toxicity. *The Journal of nutritional biochemistry* **23**: 1583-1591, 2012.
- BERRY MN, EDWARDS AM, BARRIT GJ (1991). High-yield preparation of isolated hepatocytes from rat liver. In *Isolated Hepatocytes Preparation, Properties and Application*, B. M.N., ed. (New York: Elsevier), pp. 15-81.
- BORKOWSKI AA, KARDANI A, MASTORIDES SM, THOMAS LB: Warfarin pharmacogenomics: recommendations with available patented clinical technologies. *Recent patents on biotechnology* **8**: 110-115, 2014.
- BRADFORD MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254, 1976.
- BRAND MD: Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free radical biology & medicine* **100**: 14-31, 2016.
- BREITENBACH M, RINNERTHALER M, HARTL J, STINCONE A, VOWINCKEL J, BREITENBACH-KOLLER H, RALSER M: Mitochondria in ageing: there is metabolism beyond the ROS. *FEMS yeast research* **14**: 198-212, 2014.
- BUSIELLO RA, SAVARESE S, LOMBARDI A: Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in physiology* **6**: 36, 2015.
- BUSTAMANTE E, SOPER JW, PEDERSEN PL: A high-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria. *Analytical biochemistry* **80**: 401-408, 1977.
- CALZADILLA BERTOT L, ADAMS LA: The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *International journal of molecular sciences* **17**, 2016.

- CARDOL P: Mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in eukaryotes: a highly conserved subunit composition highlighted by mining of protein databases. *Biochimica et biophysica acta* **1807**: 1390-1397, 2011.
- CECCHINI G: Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual review of biochemistry* **72**: 77-109, 2003.
- CIAPAITE J, BAKKER SJ, VAN EIKENHORST G, WAGNER MJ, TEERLINK T, SCHALKWIJK CG, FODOR M, OUWENS DM, DIAMANT M, HEINE RJ, WESTERHOFF HV, KRAB K: Functioning of oxidative phosphorylation in liver mitochondria of high-fat diet fed rats. *Biochimica et biophysica acta* **1772**: 307-316, 2007.
- CIAPAITE J, VAN DEN BROEK NM, TE BRINKE H, NICOLAY K, JENESON JA, HOUTEN SM, PROMPERS JJ: Differential effects of short- and long-term high-fat diet feeding on hepatic fatty acid metabolism in rats. *Biochimica et biophysica acta* **1811**: 441-451, 2011.
- COELHO M, NUNES P, MENDES VM, MANADAS B, HEERSCHAP A, JONES JG: Effect of Global ATGL Knockout on Murine Fasting Glucose Kinetics. *Journal of diabetes research* **2015**: 542029, 2015.
- ČERVINKOVÁ Z. (2010). Funkce jater. In Hepatologie, Ehrmann J., and Hůlek P., eds. (Praha: Grada publishing a.s.), pp. 25 - 35.
- DAY CP, JAMES OF: Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* **114**: 842-845, 1998.
- DELL'ANTONE P: Targets of 3-bromopyruvate, a new, energy depleting, anticancer agent. *Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))* **5**: 491-496, 2009.
- DONG LF, JAMESON VJ, TILLY D, CERNY J, MAHDAVIAN E, MARIN-HERNANDEZ A, HERNANDEZ-ESQUIVEL L, RODRIGUEZ-ENRIQUEZ S, STURSA J, WITTING PK, STANTIC B, ROHLENA J, TRUKSA J, KLUCKOVA K, DYASON JC, LEDVINA M, SALVATORE BA, MORENO-SANCHEZ R, COSTER MJ, RALPH SJ, SMITH RA, NEUZIL J: Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *The Journal of biological chemistry* **286**: 3717-3728, 2011.
- DONG LF, LOW P, DYASON JC, WANG XF, PROCHAZKA L, WITTING PK, FREEMAN R, SWETTENHAM E, VALIS K, LIU J, ZOBALOVA R, TURANEK J, SPITZ DR, DOMANN FE, SCHEFFLER IE, RALPH SJ, NEUZIL J: Alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II. *Oncogene* **27**: 4324-4335, 2008.
- DONNELLY KL, SMITH CI, SCHWARZENBERG SJ, JESSURUN J, BOLDT MD, PARKS EJ: Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation* **115**: 1343-1351, 2005.
- DOS SANTOS GA, ABREU E LIMA RS, PESTANA CR, LIMA AS, SCHEUCHER PS, THOME CH, GIMENES-TEIXEIRA HL, SANTANA-LEMOES BA, LUCENA-

- ARAÚJO AR, RODRIGUES FP, NASR R, UYEMURA SA, FALCAO RP, DE THE H, PANDOLFI PP, CURTI C, REGO EM: (+)alpha-Tocopheryl succinate inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I and is as effective as arsenic trioxide or ATRA against acute promyelocytic leukemia in vivo. *Leukemia* **26**: 451-460, 2012.
- DRAHOTA Z, ENDLICHER R, STANKOVA P, RYCHTRMOC D, MILEROVA M, CERVINKOVA Z: Characterization of calcium, phosphate and peroxide interactions in activation of mitochondrial swelling using derivative of the swelling curves. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **44**: 309-315, 2012.
- EGUCHI A, WREE A, FELDSTEIN AE: Biomarkers of liver cell death. *Journal of hepatology* **60**: 1063-1074, 2014.
- ELUSTONDO PA, NICHOLS M, ROBERTSON GS, PAVLOV EV: Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake pathways. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2016.
- ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50, 1998.
- ENDLICHER R, KRIVAKOVA P, RAUCHOVA H, NUSKOVA H, CERVINKOVA Z, DRAHOTA Z: Peroxidative Damage of Mitochondrial Respiration is Substrate-Dependent. *Physiol Res* **58**: 685-692, 2009.
- ERNSTER L, SCHATZ G: Mitochondria: a historical review. *The Journal of cell biology* **91**: 227s-255s, 1981.
- FARISS MW, NICHOLLS-GRZEMSKI FA, TIRMENSTEIN MA, ZHANG JG: Enhanced antioxidant and cytoprotective abilities of vitamin E succinate is associated with a rapid uptake advantage in rat hepatocytes and mitochondria. *Free radical biology & medicine* **31**: 530-541, 2001.
- FERRE P, FOUFELLE F: Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, obesity & metabolism* **12 Suppl 2**: 83-92, 2010.
- FLAMMENT M, RIEUSSET J, VIDAL H, SIMARD G, MALTHIERY Y, FROMENTY B, DUCLUZEAU PH: Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a high fat diet: a longitudinal study in rats. *Journal of physiology and biochemistry* **68**: 335-344, 2012.
- FUKUZAWA K, KOGURE K, MORITA M, HAMA S, MANABE S, TOKUMURA A: Enhancement of nitric oxide and superoxide generations by alpha-tocopheryl succinate and its apoptotic and anticancer effects. *Biochemistry Biokhimiia* **69**: 50-57, 2004.
- GLATER EE, MEGEATH LJ, STOWERS RS, SCHWARZ TL: Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *The Journal of cell biology* **173**: 545-557, 2006.
- GNAIGER E (2014). Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis., 4 edn (Innsbruck: Mitochondr Physiol Network 19.12. OROBOROS MiPNet Publications).

- GNAIGER E, KUZNETSOV A, SCHNEEBERGER S, SEILER R, BRANDACHER G, STEURER W, MARGREITER R (2000). Mitochondria in the cold. In *Life in the Cold*, G. Heldmaier, and M. Klingenspor, eds. (Heidelberg, Berlin, New York: Springer), pp. 431-442.
- GOGVADZE V, NORBERG E, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B: Involvement of Ca<sup>2+</sup> and ROS in alpha-tocopheryl succinate-induced mitochondrial permeabilization. *International journal of cancer Journal international du cancer* **127**: 1823-1832, 2010.
- GRATTAGLIANO I, DE BARI O, BERNARDO TC, OLIVEIRA PJ, WANG DQ, PORTINCASA P: Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease--from origin to propagation. *Clinical biochemistry* **45**: 610-618, 2012.
- GREEN DR, GALLUZZI L, KROEMER G: Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science (New York, NY)* **345**: 1250256, 2014.
- GROSS A: BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 2016.
- GRUBER J, STANIEK K, KREWENKA C, MOLDZIO R, PATEL A, BOHMDORFER S, ROSENAU T, GILLE L: Tocopheramine succinate and tocopheryl succinate: mechanism of mitochondrial inhibition and superoxide radical production. *Bioorganic & medicinal chemistry* **22**: 684-691, 2014.
- GUICCIARDI ME, MALHI H, MOTT JL, GORES GJ: Apoptosis and necrosis in the liver. *Comprehensive Physiology* **3**: 977-1010, 2013.
- GUSDON AM, SONG KX, QU S: Nonalcoholic Fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2014**: 637027, 2014.
- HANGEN E, BLOMGREN K, BENIT P, KROEMER G, MODJTAHEDI N: Life with or without AIF. *Trends in biochemical sciences* **35**: 278-287, 2010.
- HEDDERICH R: Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **36**: 65-75, 2004.
- HENGSTLER JG, BRULPORT M, SCHORMANN W, BAUER A, HERMES M, NUSSLER AK, FANDRICH F, RUHNKE M, UNGEFROREN H, GRIFFIN L, BOCKAMP E, OESCH F, VON MACH MA: Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **1**: 61-74, 2005.
- HIRSCHEY MD, SHIMAZU T, JING E, GRUETER CA, COLLINS AM, AOUIZERAT B, STANCAKOVA A, GOETZMAN E, LAM MM, SCHWER B, STEVENS RD, MUEHLBAUER MJ, KAKAR S, BASS NM, KUUSISTO J, LAAKSO M, ALT FW, NEWGARD CB, FARESE RV, JR., KAHN CR, VERDIN E: SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Molecular cell* **44**: 177-190, 2011.
- HURST S, HOEK J, SHEU SS: Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and regulation of the permeability transition pore. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2016.

- CHANCE B, WILLIAMS GR: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *The Journal of biological chemistry* **217**: 409-427, 1955.
- CHEN Z, ZHANG H, LU W, HUANG P: Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochimica et biophysica acta* **1787**: 553-560, 2009.
- CHEUNG Z, TSENG Y, WHITE MF: Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **21**: 589-598, 2010.
- CHEUNG O, SANYAL AJ: Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in liver disease* **28**: 351-359, 2008.
- CHOI SH, GINSBERG HN: Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **22**: 353-363, 2011.
- CHOW L, FROM A, SEAQUIST E: Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction. *Metabolism: clinical and experimental* **59**: 70-85, 2010.
- IBDAH JA, PERLEGAS P, ZHAO Y, ANGDISEN J, BORGERINK H, SHADOAN MK, WAGNER JD, MATERN D, RINALDO P, CLINE JM: Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology* **128**: 1381-1390, 2005.
- IRAHARA T, SATO N, INOUE K, OTAKE K, OHTSURU S, KOIKE K, FUSHIKI T, YOKOTA H: Low-intensity exercise in the acute phase of lipopolysaccharide-induced sepsis improves lipid metabolism and survival in mice by stimulating PGC-1alpha expression. *The journal of trauma and acute care surgery* **80**: 933-940, 2016.
- JACOBS RA, BOUSHEL R, WRIGHT-PARADIS C, CALBET JA, ROBACH P, GNAIGER E, LUNDBY C: Mitochondrial function in human skeletal muscle following high-altitude exposure. *Experimental physiology* **98**: 245-255, 2013.
- JANEWAY CAJT, P., WALPORT M., ET AL. (2001). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. In (New York: Garland Science).
- JEZEK P, OLEJAR T, SMOLKOVA K, JEZEK J, DLASKOVA A, PLECITA-HLAVATA L, ZELENKA J, SPACEK T, ENGSTOVA H, PAJUELO REGUERA D, JABUREK M: Antioxidant and regulatory role of mitochondrial uncoupling protein UCP2 in pancreatic beta-cells. *Physiol Res* **63 Suppl 1**: S73-91, 2014.
- JHA MN, BEDFORD JS, COLE WC, EDWARD-PRASAD J, PRASAD KN: Vitamin E (d-alpha-tocopheryl succinate) decreases mitotic accumulation in gamma-irradiated human tumor, but not in normal, cells. *Nutrition and cancer* **35**: 189-194, 1999.
- JOHNSON ML, LANZA IR, SHORT DK, ASMANN YW, NAIR KS: Chronically endurance-trained individuals preserve skeletal muscle mitochondrial gene expression with age but differences within age groups remain. *Physiological reports* **2**, 2014.

- JOHNSON RF, PERKINS ND: Nuclear factor-kappaB, p53, and mitochondria: regulation of cellular metabolism and the Warburg effect. *Trends in biochemical sciences* **37**: 317-324, 2012.
- JUNG UJ, CHOI MS: Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular sciences* **15**: 6184-6223, 2014.
- KAKIMOTO PA, KOWALTOWSKI AJ: Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox biology* **8**: 216-225, 2016.
- KERSTEN S, STIENSTRA R: The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie*, 2017.
- KIM JS, AHN KJ, KIM JA, KIM HM, LEE JD, LEE JM, KIM SJ, PARK JH: Role of reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysregulation in 3-bromopyruvate induced cell death in hepatoma cells : ROS-mediated cell death by 3-BrPA. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **40**: 607-618, 2008.
- KING N, TRAN MH: Long-Acting Anticoagulant Rodenticide (Superwarfarin) Poisoning: A Review of Its Historical Development, Epidemiology, and Clinical Management. *Transfusion medicine reviews* **29**: 250-258, 2015.
- KLUČKOVÁ K, BEZAWORK-GELETA A, ROHLENA J, DONG L, NEUZIL J: Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochimica et biophysica acta* **1827**: 552-564, 2013.
- KO YH, SMITH BL, WANG Y, POMPER MG, RINI DA, TORBENSON MS, HULLIHEN J, PEDERSEN PL: Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochemical and biophysical research communications* **324**: 269-275, 2004.
- KO YH, VERHOEVEN HA, LEE MJ, CORBIN DJ, VOGL TJ, PEDERSEN PL: A translational study "case report" on the small molecule "energy blocker" 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **44**: 163-170, 2012.
- KOGURE K, HAMA S, KISAKI M, TAKEMASA H, TOKUMURA A, SUZUKI I, FUKUZAWA K: Structural characteristic of terminal dicarboxylic moiety required for apoptogenic activity of alpha-tocopheryl esters. *Biochimica et biophysica acta* **1672**: 93-99, 2004.
- KOVAROVA J, BAJZIKOVA M, VONDRUSOVA M, STURSA J, GOODWIN J, NGUYEN M, ZOBALOVA R, PESDAR EA, TRUKSA J, TOMASETTI M, DONG LF, NEUZIL J: Mitochondrial targeting of alpha-tocopheryl succinate enhances its anti-mesothelioma efficacy. *Redox report : communications in free radical research* **19**: 16-25, 2014.
- KROEMER G, GALLUZZI L, BRENNER C: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* **87**: 99-163, 2007.

- KUCERA O, AL-DURY S, LOTKOVA H, ROUSAR T, RYCHTRMOC D, CERVINKOVA Z: Steatotic rat hepatocytes in primary culture are more susceptible to the acute toxic effect of acetaminophen. *Physiol Res* **61 Suppl 2**: S93-101, 2012.
- KUCERA O, CERVINKOVA Z: Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World journal of gastroenterology : WJG* **20**: 8364-8376, 2014.
- KUCERA O, ENDLICHER R, ROUSAR T, LOTKOVA H, GARNOL T, DRAHOTA Z, CERVINKOVA Z: The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2014**: 752506, 2014.
- KUCERA O, ENDLICHER R, RYCHTRMOC D, LOTKOVA H, SOBOTKA O, CERVINKOVA Z: Acetaminophen toxicity in rat and mouse hepatocytes in vitro. *Drug and chemical toxicology*: 1-9, 2016.
- KUMAR V, ABBAS A, FAUSTO N, ROBBINS S, COTRAN RS (2005). Robbins and Cotran pathologic basis of disease., 7 edn (Philadelphia, Pa., USA: Elsevier Saunders).
- LAI L, LEONE TC, ZECHNER C, SCHAEFFER PJ, KELLY SM, FLANAGAN DP, MEDEIROS DM, KOVACS A, KELLY DP: Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes & development* **22**: 1948-1961, 2008.
- LE A, COOPER CR, GOUW AM, DINAVAH R, MAITRA A, DECK LM, ROYER RE, VANDER JAGT DL, SEMENZA GL, DANG CV: Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2037-2042, 2010.
- LEE S, KUK JL: Visceral fat is associated with the racial differences in liver fat between black and white adolescent boys with obesity. *Pediatric diabetes*, 2017.
- LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM (2005). Lehninger principles of biochemistry, 4 edn (New York W.H. Freeman).
- LEWIS JR, MOHANTY SR: Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Digestive diseases and sciences* **55**: 560-578, 2010.
- LINDQUIST C, BJORNDAL B, ROSSMANN CR, TUSUBIRA D, SVARDAL A, ROSLAND GV, TRONSTAD KJ, HALLSTROM S, BERGE RK: Increased Hepatic Mitochondrial FA Oxidation leads to lower TG levels in Rat Liver and Plasma, and is associated with Upregulation of Uncoupling Proteins and Downregulation of Apolipoprotein C-III. *Journal of lipid research*, 2017.
- LIONETTI L, MOLLICA MP, DONIZZETTI I, GIFUNI G, SICA R, PIGNALOSA A, CAVALIERE G, GAITA M, DE FILIPPO C, ZORZANO A, PUTTI R: High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. *PLoS one* **9**: e92753, 2014.
- LORIA P, LONARDO A, ANANIA F: Liver and diabetes. A vicious circle. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **43**: 51-64, 2013.

- LOSON OC, SONG Z, CHEN H, CHAN DC: Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell* **24**: 659-667, 2013.
- LOTKOVÁ H: Vliv MCT na regeneraci jater. *Disertační práce, UK, LFHK Fyziologie a Patologická fyziologie*, 2000.
- MALDONADO EN: VDAC-Tubulin, an Anti-Warburg Pro-Oxidant Switch. *Frontiers in oncology* **7**: 4, 2017.
- MANFREDI G, KAWAMATA H: Mitochondria and endoplasmic reticulum crosstalk in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease* **90**: 35-42, 2016.
- MASARONE M, FEDERICO A, ABENAVOLI L, LOGUERCIO C, PERSICO M: Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Reviews on recent clinical trials* **9**: 126-133, 2014.
- MAURYA SR, MAHALAKSHMI R: VDAC-2: Mitochondrial outer membrane regulator masquerading as a channel? *The FEBS journal* **283**: 1831-1836, 2016.
- MCILWAIN DR, BERGER T, MAK TW: Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**: a008656, 2013.
- MEEUSEN S, DEVAY R, BLOCK J, CASSIDY-STONE A, WAYSON S, MCCAFFERY JM, NUNNARI J: Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* **127**: 383-395, 2006.
- MILANE L, TRIVEDI M, SINGH A, TALEKAR M, AMIJI M: Mitochondrial biology, targets, and drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2015.
- MIQUILENA-COLINA ME, LIMA-CABELLO E, SANCHEZ-CAMPOS S, GARCIA-MEDIAVILLA MV, FERNANDEZ-BERMEJO M, LOZANO-RODRIGUEZ T, VARGAS-CASTRILLON J, BUQUE X, OCHOA B, ASPICHUETA P, GONZALEZ-GALLEGO J, GARCIA-MONZON C: Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut* **60**: 1394-1402, 2011.
- MISHRA P, CHAN DC: Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* **15**: 634-646, 2014.
- MORINO K, PETERSEN KF, SONO S, CHOI CS, SAMUEL VT, LIN A, GALLO A, ZHAO H, KASHIWAGI A, GOLDBERG IJ, WANG H, ECKEL RH, MAEGAWA H, SHULMAN GI: Regulation of mitochondrial biogenesis by lipoprotein lipase in muscle of insulin-resistant offspring of parents with type 2 diabetes. *Diabetes* **61**: 877-887, 2012.
- MORRIS EM, MEERS GM, BOOTH FW, FRITSCHKE KL, HARDIN CD, THYFAULT JP, IBDAH JA: PGC-1alpha overexpression results in increased hepatic fatty acid oxidation with reduced triacylglycerol accumulation and secretion. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **303**: G979-992, 2012.

- MRACEK T, HOLZEROVA E, DRAHOTA Z, KOVAROVA N, VRBACKY M, JESINA P, HOUSTEK J: ROS generation and multiple forms of mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et biophysica acta* **1837**: 98-111, 2014.
- NADAL-CASELLAS A, AMENGUAL-CLADERA E, PROENZA AM, LLADO I, GIANOTTI M: Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **26**: 291-302, 2010.
- NASSIR F, IBDAH JA: Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular sciences* **15**: 8713-8742, 2014.
- NASSIR F, IBDAH JA: Sirtuins and nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology* **22**: 10084-10092, 2016.
- NEUZIL J, DONG LF, RAMANATHAPURAM L, HAHN T, CHLADOVA M, WANG XF, ZOBALOVA R, PROCHAZKA L, GOLD M, FREEMAN R, TURANEK J, AKPORIAYE ET, DYASON JC, RALPH SJ: Vitamin E analogues as a novel group of mitocans: anti-cancer agents that act by targeting mitochondria. *Molecular aspects of medicine* **28**: 607-645, 2007.
- NEUZIL J, MASSA H: Hepatic processing determines dual activity of alpha-tocopheryl succinate: a novel paradigm for a shift in biological activity due to pro-vitamin-to-vitamin conversion. *Biochemical and biophysical research communications* **327**: 1024-1027, 2005.
- NEUZIL J, WANG XF, DONG LF, LOW P, RALPH SJ: Molecular mechanism of 'mitocan'-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins. *FEBS letters* **580**: 5125-5129, 2006.
- NICHOLLS D.G., FERGUSON S.J. (2013). Respiratory chains. In *Bioenergetics* (Elsevier Ltd.).
- NOVOSAD J, KODYDKOVA K, KREJSEK J: [Apoptosis, its mechanisms and medical significance. I. Definition of apoptosis and its progression at the cellular level]. *Vnitřní lékařství* **47**: 381-386, 2001.
- PECINOVA A, DRAHOTA Z, NUSKOVA H, PECINA P, HOUSTEK J: Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion* **11**: 722-728, 2011.
- PEDERSEN PL: The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: an overview. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **39**: 1-12, 2007.
- PEDERSEN PL: 3-Bromopyruvate (3BP) a fast acting, promising, powerful, specific, and effective "small molecule" anti-cancer agent taken from labside to bedside: introduction to a special issue. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **44**: 1-6, 2012.
- PEI H, YANG Y, ZHAO H, LI X, YANG D, LI D, YANG Y: The Role of Mitochondrial Functional Proteins in ROS Production in Ischemic Heart Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2016**: 5470457, 2016.

- PELLICORO A, RAMACHANDRAN P, IREDALE JP, FALLOWFIELD JA: Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature reviews Immunology* **14**: 181-194, 2014.
- PENG YB, ZHAO ZL, LIU T, XIE GJ, JIN C, DENG TG, SUN Y, LI X, HU XX, ZHANG XB, YE M, TAN WH: A Multi-Mitochondrial Anticancer Agent that Selectively Kills Cancer Cells and Overcomes Drug Resistance. *ChemMedChem* **12**: 250-256, 2017.
- PEREIRA DA SILVA AP, EL-BACHA T, KYAW N, DOS SANTOS RS, DA-SILVA WS, ALMEIDA FC, DA POIAN AT, GALINA A: Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. *The Biochemical journal* **417**: 717-726, 2009.
- PESTA D, GNAIGER E: High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **810**: 25-58, 2012.
- PONNALAGU D, SINGH H: Anion Channels of Mitochondria. *Handbook of experimental pharmacology*, 2016.
- POSTIC C, GIRARD J: The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes & metabolism* **34**: 643-648, 2008.
- PROCHAZKA L, DONG LF, VALIS K, FREEMAN R, RALPH SJ, TURANEK J, NEUZIL J: alpha-Tocopheryl succinate causes mitochondrial permeabilization by preferential formation of Bak channels. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **15**: 782-794, 2010.
- RAFFAELLA C, FRANCESCA B, ITALIA F, MARINA P, GIOVANNA L, SUSANNA I: Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring, Md)* **16**: 958-964, 2008.
- RALPH SJ, MORENO-SANCHEZ R, NEUZIL J, RODRIGUEZ-ENRIQUEZ S: Inhibitors of succinate: quinone reductase/Complex II regulate production of mitochondrial reactive oxygen species and protect normal cells from ischemic damage but induce specific cancer cell death. *Pharmaceutical research* **28**: 2695-2730, 2011.
- RAUCHOVA H, VOKURKOVA M, DRAHOTA Z: Inhibition of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by alpha-tocopheryl succinate. *The international journal of biochemistry & cell biology* **53**: 409-413, 2014.
- RIZVI SI, PANDEY KB, JHA R, MAURYA PK: Ascorbate recycling by erythrocytes during aging in humans. *Rejuvenation research* **12**: 3-6, 2009.
- RODRIGUES-FERREIRA C, DA SILVA AP, GALINA A: Effect of the antitumoral alkylating agent 3-bromopyruvate on mitochondrial respiration: role of mitochondrially bound hexokinase. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **44**: 39-49, 2012.
- ROHLENA J, DONG LF, KLUCKOVA K, ZOBALOVA R, GOODWIN J, TILLY D, STURSA J, PECINOVA A, PHILIMONENKO A, HOZAK P, BANERJEE J, LEDVINA M, SEN CK, HOUSTEK J, COSTER MJ, NEUZIL J: Mitochondrially

- targeted alpha-tocopheryl succinate is antiangiogenic: potential benefit against tumor angiogenesis but caution against wound healing. *Antioxidants & redox signaling* **15**: 2923-2935, 2011.
- ROLO AP, TEODORO JS, PALMEIRA CM: Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free radical biology & medicine* **52**: 59-69, 2012.
- RUI L: Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology* **4**: 177-197, 2014.
- RUSSELL RW, YOUNG JW: A review of metabolism of labeled glucoses for use in measuring glucose recycling. *Journal of dairy science* **73**: 1005-1016, 1990.
- SADOWSKA-BARTOSZ I, BARTOSZ G: Effect of 3-bromopyruvic acid on human erythrocyte antioxidant defense system. *Cell biology international* **37**: 1285-1290, 2013.
- SANBORN BM, FELBERG NT, HOLLOCHER TC: The inactivation of succinate dehydrogenase by bromopyruvate. *Biochimica et biophysica acta* **227**: 219-231, 1971.
- SANYAL AJ, CAMPBELL-SARGENT C, MIRSHAHI F, RIZZO WB, CONTOS MJ, STERLING RK, LUKETIC VA, SHIFFMAN ML, CLORE JN: Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* **120**: 1183-1192, 2001.
- SAZANOV LA: A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature reviews Molecular cell biology* **16**: 375-388, 2015.
- SEO AY, JOSEPH AM, DUTTA D, HWANG JC, ARIS JP, LEEUWENBURGH C: New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Journal of cell science* **123**: 2533-2542, 2010.
- SHOSHAN MC: 3-Bromopyruvate: targets and outcomes. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **44**: 7-15, 2012.
- SCHON EA, DIMAURO S, HIRANO M: Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature reviews Genetics* **13**: 878-890, 2012.
- SCHONFELD G: Familial hypobetalipoproteinemia: a review. *Journal of lipid research* **44**: 878-883, 2003.
- SIEKEVITZ P: Powerhouse of the Cell. *Scientific American* **197**: 131-144, 1957.
- SONG Z, GHOCHANI M, MCCAFFERY JM, FREY TG, CHAN DC: Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Molecular biology of the cell* **20**: 3525-3532, 2009.
- STRAATMAN J, HARMSSEN AM, CUESTA MA, BERKHOF J, JANSMA EP, VAN DER PEET DL: Predictive Value of C-Reactive Protein for Major Complications after Major Abdominal Surgery: A Systematic Review and Pooled-Analysis. *PloS one* **10**: e0132995, 2015.
- SUHARA T, HISHIKI T, KASAHARA M, HAYAKAWA N, OYAIZU T, NAKANISHI T, KUBO A, MORISAKI H, KAELIN WG, JR., SUEMATSU M, MINAMISHIMA

- YA: Inhibition of the oxygen sensor PHD2 in the liver improves survival in lactic acidosis by activating the Cori cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 11642-11647, 2015.
- SUN T, WU Y, WU X, MA H: Metabolomic profiles investigation on athletes' urine 35 minutes after an 800-meter race. *The Journal of sports medicine and physical fitness* **57**: 839-849, 2017.
- SUN Y, LIU Z, ZOU X, LAN Y, SUN X, WANG X, ZHAO S, JIANG C, LIU H: Mechanisms underlying 3-bromopyruvate-induced cell death in colon cancer. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **47**: 319-329, 2015.
- ŠAFKA V. (2010). Makroanatomie Jater. In Hepatologie, Ehrmann J., and Hůlek P., eds. (Praha: Grada publishing a.s.), pp. 17 - 25.
- TILG H, MOSCHEN AR: Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology (Baltimore, Md)* **52**: 1836-1846, 2010.
- TRUKSA J, DONG LF, ROHLENA J, STURSA J, VONDRUSOVA M, GOODWIN J, NGUYEN M, KLUCKOVA K, RYCHTARCIKOVA Z, LETTLOVA S, SPACILOVA J, STAPELBERG M, ZORATTI M, NEUZIL J: Mitochondrially targeted vitamin E succinate modulates expression of mitochondrial DNA transcripts and mitochondrial biogenesis. *Antioxidants & redox signaling* **22**: 883-900, 2015.
- TUMMERS B, GREEN DR: Caspase-8: regulating life and death. *Immunological reviews* **277**: 76-89, 2017.
- VAN AKEN O, VAN BREUSEGEM F: Licensed to Kill: Mitochondria, Chloroplasts, and Cell Death. *Trends in plant science* **20**: 754-766, 2015.
- VAN DER WIJST MG, VAN TILBURG AY, RUITERS MH, ROTS MG: Experimental mitochondria-targeted DNA methylation identifies GpC methylation, not CpG methylation, as potential regulator of mitochondrial gene expression. *Scientific reports* **7**: 177, 2017.
- VAN VRANKEN JG, NA U, WINGE DR, RUTTER J: Protein-mediated assembly of succinate dehydrogenase and its cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **50**: 168-180, 2015.
- VERKHOVSKAYA ML, BELEVICH N, EURO L, WIKSTROM M, VERKHOVSKY MI: Real-time electron transfer in respiratory complex I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 3763-3767, 2008.
- VIAL G, DUBOCHAUD H, COUTURIER K, COTTET-ROUSSELLE C, TALEUX N, ATHIAS A, GALINIER A, CASTEILLA L, LEVERVE XM: Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *Journal of hepatology* **54**: 348-356, 2011.
- VILLENA JA: New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *The FEBS journal* **282**: 647-672, 2015.

- WADA J, NAKATSUKA A: Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial Dysfunction in Diabetes. *Acta medica Okayama* **70**: 151-158, 2016.
- WAJANT H: The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science (New York, NY)* **296**: 1635-1636, 2002.
- WALLACE DC: Mitochondria and cancer. *Nature reviews Cancer* **12**: 685-698, 2012.
- WANG S, KAMAT A, PERGOLA P, SWAMY A, TIO F, CUSI K: Metabolic factors in the development of hepatic steatosis and altered mitochondrial gene expression in vivo. *Metabolism: clinical and experimental* **60**: 1090-1099, 2011.
- WARBURG O: On respiratory impairment in cancer cells. *Science (New York, NY)* **124**: 269-270, 1956.
- WARMOES MO, LOCASALE JW: Heterogeneity of glycolysis in cancers and therapeutic opportunities. *Biochemical pharmacology* **92**: 12-21, 2014.
- WARNER A, MITTAG J: Breaking BAT: can browning create a better white? *The Journal of endocrinology* **228**: R19-29, 2016.
- WEBER T, LU M, ANDERA L, LAHM H, GELLERT N, FARISS MW, KORINEK V, SATTLER W, UCKER DS, TERMAN A, SCHRODER A, ERL W, BRUNK UT, COFFEY RJ, WEBER C, NEUZIL J: Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**: 863-869, 2002.
- WEI Y, RECTOR RS, THYFAULT JP, IBDAH JA: Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**: 193-199, 2008.
- WESTON SR, LEYDEN W, MURPHY R, BASS NM, BELL BP, MANOS MM, TERRAULT NA: Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)* **41**: 372-379, 2005.
- WILKINS HM, CARL SM, SWERDLOW RH: Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox biology* **2**: 619-631, 2014.
- WOHLRAB H: Transport proteins (carriers) of mitochondria. *IUBMB life* **61**: 40-46, 2009.
- XINTAROPOULOU C, WARD C, WISE A, MARSTON H, TURNBULL A, LANGDON SP: A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarget* **6**: 25677-25695, 2015.
- XU DQ, TAN XY, ZHANG BW, WU T, LIU P, SUN SJ, CAO YG: 3-Bromopyruvate inhibits cell proliferation and induces apoptosis in CD133+ population in human glioma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2015.
- XU RH, PELICANO H, ZHOU Y, CAREW JS, FENG L, BHALLA KN, KEATING MJ, HUANG P: Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug

- resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer research* **65**: 613-621, 2005.
- YAN B, DONG L, NEUZIL J: Mitochondria: An intriguing target for killing tumour-initiating cells. *Mitochondrion*, 2015a.
- YAN B, STANTIC M, ZOBALOVA R, BEZAWORK-GELETA A, STAPELBERG M, STURSA J, PROKOPOVA K, DONG L, NEUZIL J: Mitochondrially targeted vitamin E succinate efficiently kills breast tumour-initiating cells in a complex II-dependent manner. *BMC cancer* **15**: 401, 2015b.
- YOUNG A: Effects on plasma glucose and lactate. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)* **52**: 193-208, 2005.
- YOUNOSSI ZM, GRAMLICH T, MATTEONI CA, BOPARAI N, MCCULLOUGH AJ: Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **2**: 262-265, 2004.
- ZHANG JG, NICHOLLS-GRZEMSKI FA, TIRMENSTEIN MA, FARISS MW: Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chemico-biological interactions* **138**: 267-284, 2001.
- ZHANG Q, PAN J, LUBET RA, KOMAS SM, KALYANARAMAN B, WANG Y, YOU M: Enhanced antitumor activity of 3-bromopyruvate in combination with rapamycin in vivo and in vitro. *Cancer prevention research* **8**: 318-326, 2015.
- ZHANG Q, PAN J, NORTH PE, YANG S, LUBET RA, WANG Y, YOU M: Aerosolized 3-bromopyruvate inhibits lung tumorigenesis without causing liver toxicity. *Cancer prevention research* **5**: 717-725, 2012.
- ZHANG X, LI L, PRABHAKARAN K, ZHANG L, LEAVESLEY HB, BOROWITZ JL, ISOM GE: Uncoupling protein-2 up-regulation and enhanced cyanide toxicity are mediated by PPARalpha activation and oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology* **223**: 10-19, 2007.
- ZHAO Y, NEUZIL J, WU K: Vitamin E analogues as mitochondria-targeting compounds: from the bench to the bedside? *Molecular nutrition & food research* **53**: 129-139, 2009.
- ZHOU M, XU A, TAM PK, LAM KS, CHAN L, HOO RL, LIU J, CHOW KH, WANG Y: Mitochondrial dysfunction contributes to the increased vulnerabilities of adiponectin knockout mice to liver injury. *Hepatology (Baltimore, Md)* **48**: 1087-1096, 2008.
- ZINGG JM: Vitamin E: an overview of major research directions. *Molecular aspects of medicine* **28**: 400-422, 2007.