

**UNIVERZITA KARLOVA  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Farmakologické a metabolické ovlivnění funkce jaterních mitochondrií**

**Ondřej Sobotka**

**Autoreferát dizertační práce**

**Doktorský studijní program  
Fyziologie a patologická fyziologie**

**Hradec Králové**

**2017**

Dizertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Fyziologie a patologická fyziologie na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Ondřej Sobotka  
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova,  
Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel: prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.  
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova,  
Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel konzultant: doc. MUDr. Otto Kučera, Ph.D.  
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova,  
Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Oponenti: Doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D., Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Plzni,  
Univerzita Karlova

RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D., vedoucí skupiny bioenergetiky a svalové  
fyziologie, Katedra fyziologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy,  
Praha

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby dizertačních prací OR Fyziologie a patologická fyziologie dne 11. září 2017 od 11:00 hodin v Zasedací místnosti děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové

Tato práce vznikla za podpory grantu PRVOUK P37/02; Univerzity Karlovy SVV-2015-260179; Univerzity Karlovy SVV-2016-260287; Univerzity Karlovy Progres Q40/02; a Vnitřním grantem Lékařské fakulty v Hradci Králové 84123.

S dizertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.  
Předsedkyně komise pro obhajoby dizertačních prací  
v doktorském studijním programu Fyziologie a patologická fyziologie  
Garant studijního programu

## Obsah

Obsah.....	3
Seznam použitých zkratk .....5	5
1. Souhrn.....6	6
2. Summary.....7	7
3. Úvod .....8	8
3.1. Játra .....8	8
3.1.1. Role jater v metabolismu glukózy .....8	8
3.1.2. Role jater v metabolismu lipidů.....8	8
3.1.3. Regulace metabolismu energetických substrátů.....9	9
3.2. Mitochondrie.....10	10
3.2.1. Struktura mitochondrií .....10	10
3.2.2. Mitochondriální respirační systém a tvorba ATP.....10	10
3.2.3. Regulace mitochondriální biogeneze .....11	11
3.3. Látky s protinádorovým účinkem cílené na mitochondrie .....12	12
3.3.1. 3-Brompyruvát.....12	12
3.3.2. $\alpha$ -Tokoferylsukcinát.....12	12
3.4. Nealkoholová jaterní steatóza.....13	13
3.4.1. Patofyziologie NAFLD .....13	13
4. Cíle práce: .....15	15
5. Metodiky.....16	16
5.1. Materiály a experimentální zvířata .....16	16
5.2. Buněčné kultury .....16	16
5.3. Hodnocení mitochondriálních funkcí v suspenzi.....16	16
5.3.1. Respirační stavy mitochondrií.....16	16
5.4. Statistické zpracování naměřených dat .....17	17
6. Výsledky .....18	18

6.1.	Vliv 3-brompyruvátu na hepatocyty potkana a myši .....	18
6.1.1.	Toxicita 3BP na hepatocyty potkana .....	18
6.1.2.	Přímý účinek 3BP na funkce jaterních mitochondrií potkana.....	19
6.2.	Vliv $\alpha$ -tokoferylsukcinátu na respiraci jaterních mitochondrií.....	21
6.2.1.	Vliv TOS na kapacitu respirace v OXPHOS a ETS stavu .....	21
6.3.	Vliv vysokotukové diety na respiraci jaterních mitochondrií .....	23
6.3.1.	Vliv HFD na maximální kapacitu respirace jaterních mitochondrií.....	23
7.	Diskuze .....	26
7.1.	Vliv nových protinádorových látek na jaterní mitochondrie.....	26
7.1.1.	<i>In vitro</i> účinek 3BP na nádorové a nenádorové buňky .....	26
7.1.2.	<i>In vitro</i> účinek TOS na nádorové a nenádorové buňky .....	26
7.2.	NAFLD u potkana.....	27
7.2.1.	Vliv vysokotukové diety na respiraci jaterních mitochondrií .....	27
8.	Závěry.....	29
9.	Seznam použité literatury .....	30
10.	Přehled publikační činnosti autora .....	36

## Seznam použitých zkratk

3BP	– 3-brompyruvát
ACC	– acetyl-CoA karboxyláza
ADP	– adenosindifosfát
AMP	– adenosinmonofosfát
AMPK	– AMP-dependentní protein kináza
ATP	– adenosintrifosfát
ERR	– z angl. „ <i>estrogen-related receptors</i> “
ETF	– elektron transportující flavoprotein
FAS	– syntáza mastných kyselin (z angl. „ <i>Fatty acid synthase</i> “)
GPDH	– glycerofosfátdehydrogenáza
HFD	– vysokotuková dieta
IMM	– vnitřní mitochondriální membrána (z angl. „ <i>inner mitochondrial membrane</i> “)
IMS	– mezimembránový prostor (z angl. „ <i>intermembrane space</i> “)
K.I	– komplex I
K.II	– komplex II
K.III	– komplex III
K.IV	– komplex IV
K.V	– ATP syntáza
MMP	– mitochondriální membránový potenciál
MTTP	– angl. „ <i>microsomal triglyceride transfer protein</i> “
NADH	– redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	– redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NAFLD	– z angl. „ <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> “
NRF	– z angl. „ <i>nuclear respiratory factor</i> “
OMM	– vnější mitochondriální membrána (z angl. „ <i>outer mitochondrial membrane</i> “)
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> “)
SD	– směrodatná odchylka (z angl. „ <i>standard deviation</i> “)
TOS	– $\alpha$ -tokoferylsukcinát
VLDL	– lipoproteiny s velmi nízkou denzitou (z angl. „ <i>very low density lipoproteins</i> “)
VMK	– volné mastné kyseliny

## 1. Souhrn

Jaterní mitochondrie hrají centrální úlohu v hlavních metabolických cestách lidského organismu. V této práci jsme studovali farmakologické ovlivnění jejich funkce *in vitro* pomocí dvou nových protinádorových léků: 3-brompyruvátu a  $\alpha$ -tokoferylsukcinátu. Metabolické ovlivnění funkce jaterních mitochondrií bylo navozeno *in vivo* na potkanech krmených dietou s vysokým obsahem mastných kyselin a cholesterolu.

Toxicita 3-brompyruvátu *in vitro* byla hodnocena v primárních kulturách hepatocytů potkana a myši. Účinek nových protinádorových léků na jaterní mitochondrie byl studován v suspenzi mitochondrií, homogenátu nebo permeabilizovaných buněk. Ke zhodnocení farmakologického a metabolického vlivu na mitochondriální funkce jater bylo využito respirometrie s vysokým rozlišením.

3-brompyruvát způsoboval morfologické i funkční postižení hepatocytů v kultuře. Toto poškození bylo doprovázeno zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku a poruchou mitochondriálních funkcí. 3-Brompyruvát snižoval konzumpci kyslíku mitochondrií energizovaných substráty pro komplexy I a II.  $\alpha$ -Tokoferylsukcinát inhiboval sukcinát-dependentní respiraci jaterních mitochondrií. Stupeň inhibice byl závislý na použitém experimentálním modelu a na respiračním stavu. Nejvíce citlivé k účinkům  $\alpha$ -tokoferylsukcinátu byly izolované mitochondrie v suspenzi, nejméně citlivým modelem byly permeabilizované hepatocyty.

Dieta s vysokým obsahem tuků způsobovala změnu mitochondriálních funkcí jater, která byla závislá na délce podávání diety. Po třech týdnech jsme pozorovali zvýšení maximální kapacity oxidativní fosforylace a celkové oxidační kapacity mitochondriálního respiračního systému. Po 12. týdnu byla pak signifikantně snížena respirace při použití substrátů Krebsova cyklu. Schopnost  $\beta$ -oxidace mastných kyselin byla signifikantně zvýšena už od 1. týdne, ale na konci studie po 24 týdnech jsme již nezaznamenali signifikantní rozdíl oproti kontrolám.

## 2. Summary

Liver mitochondria play a crucial role in intermediary metabolism and main metabolic pathways. We evaluated the pharmacological effect on liver mitochondria *in vitro* using two novel anticancer drugs: 3-bromopyruvate and  $\alpha$ -tocopheryl succinate. Metabolic influence on liver mitochondria was performed *in vivo* by high fat and high cholesterol diet.

Toxicity of both drugs was evaluated in cell cultures of hepatocytes isolated from rat and mouse liver. The effect of anticancer drugs on liver mitochondrial functions *in vitro* was studied on suspensions of isolated liver mitochondria, tissue homogenate and permeabilized hepatocytes. Mitochondrial respiration was measured using high-resolution respirometry.

3-bromopyruvate caused morphological and functional damage of primary rat and mouse hepatocytes in cell cultures; this toxic effect was accompanied by an increase of reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction. 3-bromopyruvate decreased the oxygen consumption of mitochondria energized by substrates for complex I and complex II.  $\alpha$ -Tocopheryl succinate caused a decrease of succinate-dependent respiration in all experimental models both in coupled and in uncoupled states. The most pronounced effect of  $\alpha$ -tocopheryl succinate was apparent in isolated mitochondria and the least pronounced effect was observed in permeabilized hepatocytes.

High fat and high cholesterol diet caused changes of liver mitochondrial functions which were dependent on duration of the treatment. The maximal capacity of oxidative phosphorylation was increased after three weeks of the experiment, but followed by a decline after 6 weeks and later in comparison to normal diet controls. The oxidation of Krebs cycle substrates was significantly inhibited after 12 and more weeks of high fat diet feeding. On the other hand  $\beta$ -oxidation of fatty acids was increased already after one week of high fat diet feeding. The capacity of fatty acids oxidation returned to control level after 24 weeks of experimental diet.

## 3. Úvod

### 3.1. Játra

Játra jsou největším parenchymovým orgánem lidského těla a mají zásadní úlohu při metabolismu jak základních živin, tak i celé řady dalších látek endogenního a exogenního původu. Vzhledem zaměření této dizertační práce bude v úvodu věnována pozornost zejména těm biochemickým procesům, které jsou součástí energetického metabolismu, a které jsou spojeny s fyziologií jaterních mitochondrií.

#### 3.1.1. Role jater v metabolismu glukózy

Játra se zásadní mírou podílejí na metabolismu cukrů, zejména glukózy. Glukostatická funkce jater spočívá v jejich schopnosti udržovat hladinu krevní glukózy v relativně úzkém fyziologickém koncentračním rozmezí (Červinková Z., 2010). Játra ukládají glukózu v podobě glykogenu a v případě potřeby jsou schopna glukózu z glykogenových zásob uvolnit v procesu glykogenolýzy; současně jsou schopna glukózu tvořit z jiných substrátů cestou glukoneogeneze. Jako substrátu pro glukoneogenezi je využit zejména laktát (kyselina mléčná); dále se může glukóza syntetizovat z glukoplastických aminokyseliny a glycerolu (Adeva-Andany *et al.*, 2016). V případě tvorby glukózy z laktátu mluvíme o glukoneogeneze Coriho cyklu (Russell and Young, 1990; Suhara *et al.*, 2015; Young, 2005). Obdobný význam má i syntéza glukózy z alaninu (tj. alaninový cyklus; Adeva-Andany *et al.*, 2016). Rychlost tvorby glukózy v játrech může dosahovat až 10 g na kg tělesné hmotnosti denně. 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).

Další metabolickou cestou glukózy u živočichů je pentózový cyklus; ten je nutný pro tvorbu ribózy a deoxyribózy pro tvorbu nukleových kyselin ale také pro vznik NADPH, který je potřebný pro redukční a tedy anabolické procesy. Příkladem může být syntéza mastných kyselin (lipogeneze), která vyžaduje redukující ekvivalenty ve formě NADPH a v játrech zastává velké procento utilizace tohoto redukčního kofaktoru. NADPH je také využíván k obraně proti oxidačnímu stresu, neboť se jedná o dárce elektronů při redukci oxidovaného glutathionu (Rizvi *et al.*, 2009).

#### 3.1.2. Role jater v metabolismu lipidů

V jaterních mitochondriích probíhá  $\beta$ -oxidace masných kyselin, které jsou za normálních podmínek hlavním energetickým substrátem pro jaterní buňku. Při  $\beta$ -oxidaci vzniká z volných masných kyselin (VMK) acetyl-CoA, který může být následně zpracován



v Krebsově cyklu, použit k syntéze ketolátek a cholesterolu, nebo je základem pro syntézu nových mastných kyselin. 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).

Syntéza mastných kyselin je proces, který probíhá zejména v játrech a 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, ale malonyl-CoA, který vzniká karboxylací acetyl-CoA. Tato reakce, katalyzovaná acetyl-CoA-karboxylázou (ACC), je pro proces lipogeneze limitující a je v hepatocytech úzce regulovaná. Malonyl-CoA se poté pomocí syntázy mastných kyselin (FAS) přemění na VMK s dlouhým řetězcem (např. palmitát).

### 3.1.3. Regulace metabolismu energetických substrátů

Hormonální regulaci metabolismu energetických substrátů jater 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 prostřednictvím inhibice AMP-dependentní protein kinázy (AMPK). Pokud je množství sacharidů v dietě dostatečně vysoké, dojde také ke zvýšení *de novo* lipogeneze (Adeva-Andany *et al.*, 2016; Rui, 2014). Inzulin současně potlačuje  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin v mitochondriích a současnou tvorbu ketolátek.

Při hladovění se zvyšuje hladina glukagonu, katecholaminů a glukokortikoidů, což způsobuje zvýšení aktivity glukoneogenetických enzymů a stimulaci glukoneogeneze. Glukagon na rozdíl od inzulínu inhibuje a inaktivuje ACC prostřednictvím přímé aktivace AMPK. To 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 k tvorbě glukózy v procesu glukoneogeneze tím k dodávce glukózy periferním tkáním. Zvýšený vstup VMK do jaterních mitochondrií má současně za následek zvýšenou tvorbu ketolátek. To je dáno tím, že množství vytvořeného acetyl-CoA je významně vyšší než jsou energetické potřeby hepatocytů; vzniklé ketolátky jsou pak využity také pro hrazení energetických potřeb periferních tkání včetně mozku (Bak, 2017; Rui, 2014).

## 3.2. Mitochondrie

Mitochondrie jsou organelami eukaryotických buněk, které zastávají důležité místo v regulaci homeostázy intracelulárního prostředí. Může se v nich tvořit až 90% veškerého buněčného ATP. Mitochondrie mají současně i řadu dalších 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).

### 3.2.1. Struktura mitochondrií

Mitochondrie jsou jediné buněčné organely, které disponují vlastní deoxyribonukleovou kyselinou – mtDNA (mitochondriální DNA). Vzhledem k přítomnosti mtDNA mají mitochondrie k dispozici 37 genů a 16 569 párů bází (Milane *et al.*, 2015; van der Wijst *et al.*, 2017).

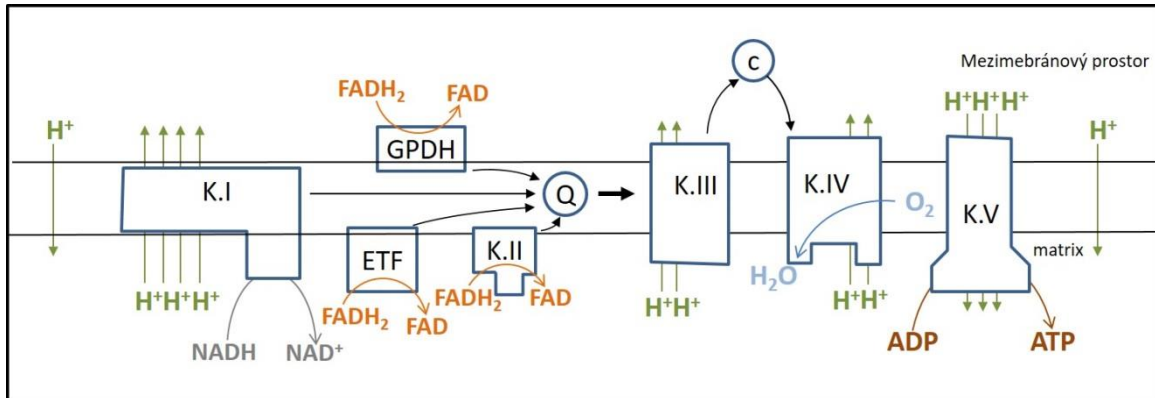
Mitochondrie je také jediná organela eukaryotické buňky obsahující dvě membrány: zevní mitochondriální membrána (OMM), která je svým fosfolipidovým složením velice podobná membráně cytoplazmatické, a vnitřní mitochondriální membrána (IMM), která je specifická nejen odlišným fosfolipidovým složením, ale také obsahuje převážnou část proteinů tvořících mitochondriální proteinové superkomplexy. Každá z těchto dvou membrán má unikátní enzymatické a receptorové složení, díky kterým mitochondrie mohou vytvářet spojení mezi sebou, regulovat koncentraci intracelulárního kalcia a zahajovat programovanou smrt buňky – apoptózu (Manfredi and Kawamata, 2016).

IMM je oproti OMM a dalším fosfolipidovým membránám eukaryotických buněk specifická signifikantně vyšším zastoupením proteinů a také svou minimální propustností pro ionty, proteiny a další látky. Díky tomu vytváří IMM kompartment oddělený od cytoplazmy, který nazýváme mitochondriální matrix. Jednou z nejdůležitějších struktur na IMM, je respirační neboli elektron transportní systém, který je schopen pumpovat protony z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru (IMS) a vytvářet na IMM mitochondriální membránový potenciál (MMP) (Nicholls D.G. and Ferguson S.J., 2013).

### 3.2.2. Mitochondriální respirační systém a tvorba ATP

Elektron transportní neboli respirační systém na vnitřní mitochondriální membráně se skládá z více než 20 samostatných elektronových přenašečů schopných navázat a uvolnit proton dle svého redoxního potenciálu. Tyto přenašeče jsou ukotveny v několika velkých respiračních komplexech, které tento tok elektronů usměrňují. Záměrně nebudu v této práci používat termín respirační řetězec, protože proteinové komplexy respiračního systému nejsou

uspořádány lineárně do řetězce, ale tvoří konvergentní síť, ve které elektrony plynou podle spádu redoxního potenciálu až na místo koncové redukce molekuly kyslíku (obrázek 1). Během transportu elektronů respiračním systémem dochází ke konformačním změnám respiračních komplexů a ty pumpují vodíkové protony do IMS. Protonový gradient na IMM je následně využíván ATP syntázou pro fosforylaci ADP a tvorbě ATP.



**Obrázek 1. Schéma mitochondriálního elektron transportního systému.**

Zkratky: ETF – elektron transportující flavoprotein; GPDH – glycerofosfátdehydrogenáza; K.I – komplex I; K.II – komplex II; K.III – komplex III; K.IV – komplex IV; K.V – ATP syntáza; Q – ubichnon; c – cytochrom c;  $H^+$  – vodíkový proton. Černými šipkami je znázorněn tok elektronů mezi jednotlivými respiračními komplexy.

### 3.2.3. Regulace mitochondriální biogeneze

Tvorba nových mitochondrií v buňce závisí z velké části na energetických potřebách buňky. Jedny z nejdůležitějších aktivátorů mitochondriální biogeneze jsou transkripční faktory třídy PGC-1 (z anglického „*Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator*“). PGC-1 jsou regulovány glukagonem a inzulínem skrz aktivaci AMPK a patří mezi skupinu faktorů, jejichž aktivita závisí na energetickém stavu buňky. PGC-1 hrají hlavní úlohu v regulaci oxidativního a energetického metabolismu, regulují tvorbu a zánik mitochondrií a ovlivňují řadu 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 (Villena, 2015). Dlouhodobá vysokotuková dieta (HFD) snižuje hladiny jaterní PGC-1 $\alpha$  (Hirschey *et al.*, 2011). Další jaderné receptory transkripční faktory ovlivňované třídou PGC-1 jsou PPAR, ERR („*estrogen-related receptors*“), NRF1 a NRF2 („*nuclear respiratory factors 1 a 2*“) které se také podílejí na regulaci  $\beta$ -oxidace a oxidativní fosforylace.

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

#### 3.3.1. 3-Brompyruvát

3-Brompyruvát (3BP) je malá alkylojící molekula, původně připravena pro studium funkce proteinů, která se těší pozornosti řady vědeckých týmů na světě kvůli svému protinádorovému působení (Pedersen, 2012; Sanborn *et al.*, 1971). Bylo prokázáno, že 3BP *in vivo* zastavoval růst implantovaných nádorů na zvířecích modelech bez téměř žádných negativních účinků a *in vitro* způsoboval nekrózu a apoptózu řady nádorových linií (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). Protinádorový účinek 3BP se vysvětluje inhibicí glykolytických enzymů (Shoshan, 2012). 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 3BP je tedy nejvíce vyjádřen u těch typů nádorů, které jsou na glykolýze maximálně závislé (Pedersen, 2012).

Nejvíce informací o mechanismu působení 3BP se podařilo získat díky *in vitro* studiím s lidskými nádorovými liniemi, ve kterých byl popsán také inhibiční účinek 3BP na mitochondriální funkce. 3BP snižoval aktivitu komplexu I, komplexu II a ATP syntázy. Toxický účinek 3BP byl spojován se zvýšenou tvorbou ROS a oxidačním stresem. Toho bylo dosaženo dvojitým mechanismem: snižováním redukční obrany v cytoplazmě (Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2013), a také zvyšováním produkce mitochondriálních volných radikálů přes inhibici komplexů I a II (Pedersen, 2012). Funkční studie zabývající se účinky 3BP na nenádorovou tkáň chybí. Dodnes také nebyla popsána *in vitro* toxicita 3BP na primární nenádorové hepatocyty.

#### 3.3.2. $\alpha$ -Tokoferylsukcinát

$\alpha$ -Tokoferylsukcinát (TOS) je succinyl ester  $\alpha$ -tokoferolu, který spadá do skupiny antioxidantně působících látek, které souhrnně nazýváme vitamin E (Zingg, 2007). Pokud se na jeho funkční skupinu naváže esterovou vazbou nějaká další látka (jako je sukcinát v případě TOS), nemůže již plnit antioxidantní funkci (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).

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 mitochondriální 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 (Kluckova *et al.*, 2013; Ralph *et al.*, 2011).

### **3.4. Nealkoholová jaterní steatóza**

Nealkoholová jaterní steatóza, neboli NAFLD (z angl. „*non-alcoholic fatty liver disease*“), je charakterizována zvýšenou akumulací lipidů v hepatocytech v množství větším než 5% (Nassir and Ibdah, 2014). Pojem NAFLD pokrývá širokou škálu poruch od nezápálivé prosté steatózy, steatózy spojené se zánětem (steatohepatitida) a dále zánět přecházející ve fibrózu a cirhózu až k možnému terminálnímu jaternímu selhání, příp. hepatocelulárnímu karcinomu (Bellentani, 2017; Gusdon *et al.*, 2014). NAFLD postihuje cca 20 – 30 % veškeré populace západního světa (Younossi *et al.*, 2004). Metabolické příčiny NAFLD jsou podobné jako příčiny dalších metabolických onemocnění jako je obezita, cukrovka druhého typu a metabolický syndrom, které jaterní steatózu velmi často doprovází (Calzadilla Bertot and Adams, 2016; Kucera and Cervinkova, 2014; Masarone *et al.*, 2014).

#### **3.4.1. Patofyziologie NAFLD**

Porucha, která vede k rozvoji NAFLD, se projevuje na několika úrovních lipidového metabolismu. Na orgánové úrovni jde o patologický obrat VMK a VLDL lipoproteinů mezi játry a periferními tkáněmi. Inzulinová rezistence může ovlivňovat proces uvolnění VMK z tukové tkáně a jejich následné vychytávání játry a zároveň snížit tvorbu a sekreci VLDL v jítrech. Porucha jaterní reesterifikace mastných kyselin a de novo lipogeneze hraje důležitou roli v patofyziologii NAFLD (Ferre and Fofelle, 2010). Tvorba VLDL probíhá v hladkém ER a vyžaduje interakci receptoru ApoB100 a MTTP (z angl. „*microsomal triglyceride transfer protein*“), což je proces regulovaný inzulinem. Ten mimo jiné inhibuje postranlační degradaci ApoB100. Inzulinová rezistence tedy ve výsledku vede ke zvýšené sekreci mastných kyselin z tukové tkáně a snížené sekreci VLDL játry s následným a zahlcení jater TAG (Choi and Ginsberg, 2011). Již dříve bylo prokázáno, že mutace v jedné z těchto dvou složek (MTTP/ApoB100) způsobuje zvýšenou akumulaci tuků v jítrech (Schonfeld, 2003).

Pouhá inzulinová rezistence je pro vznik NAFLD důležitá, ale sama o sobě jej nemusí vždy způsobovat. V současné literatuře se setkáváme se dvěma teoriemi vzniku NAFLD: První z nich je tzv. *Two-hit theory*“ (Day and James, 1998); novější je teorie několika poruch

současně „*Multi-hit theory*“ (Tilg and Moschen, 2010). Obě uvedené teorie předpokládají potřebu inzulinové rezistence, následně je však nutný ještě další patologický impulz. Takovými impulzy mohou být zejména: oxidační stres (Lewis and Mohanty, 2010; Rolo *et al.*, 2012), mitochondriální dysfunkce (Wei *et al.*, 2008), zvýšená tvorba prozánětlivých cytokinů a zánětlivá reakce (Kucera and Cervinkova, 2014; Rolo *et al.*, 2012). Vzhledem k faktu, že NAFLD následně přispívá inzulinové resistenci a diabetu a ty opět zvyšují riziko NAFLD často dochází ke vzniku bludného kruhu (Loria *et al.*, 2013).

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

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). Současně byla prokázána i 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 inzulinové rezistence dodnes nebyla uspokojivě zodpovězena.

Z pohledu morfologie postižených mitochondrií při inzulinové resistenci 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 (Cheung and Sanyal, 2008; Sanyal *et al.*, 2001). HFD má vliv na strukturu a kompozici fosfolipidů membrán jaterních mitochondrií (Aoun *et al.*, 2012; Vial *et al.*, 2011). 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).

#### **4. 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 u potkana s nutričně navozenou steatózou

## **5. Metodiky**

### **5.1. Materiály a experimentální zvířata**

K pokusům uvedeným v této dizertační práci byli použiti samci potkanů kmene Wistar a samci myši kmene C57Bl/6. Všechny použité chemikálie byly alespoň kvality analytického stupně. 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.

### **5.2. Buněčné kultury**

Hepatocyty byly izolovány modifikovanou metodou dvoustupňové kolagenázové perfúze a poté byly nasazeny na titrační destičky potažené kolagenem. Po uplynutí stanovené doby kultivace byly provedeny tyto biochemické testy: měření aktivity laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu, test aktivity buněčných dehydrogenáz, stanovení aktivity kaspázy 3, měření produkce albuminu a hodnocení produkce ROS. Morfologie buněčné kultury byla zhodnocena pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem a fluorescenční mikroskopie byla využita k vizualizaci MMP kultivovaných hepatocytů.

### **5.3. Hodnocení mitochondriálních funkcí v suspenzi**

Funkce jaterních mitochondrií byly hodnoceny v suspenzi na třech experimentálních modelech: tkáňovém homogenátu, izolovaných mitochondriích a hepatocytech permeabilizovaných digitoninem.

Změny MMP byly hodnoceny pomocí fluorescenční sondy Safranin O a k měření mitochondriální respirace byla využita respirometrie s vysokým rozlišením. K měření MMP byl využit přístroj AMINCO-Bowman Series 2 a pro zhodnocení mitochondriální respirace byl využit Oxygraf-2k od společnosti OROBOROS.

#### **5.3.1. Respirační stavy mitochondrií**

Při popisu mitochondriální respirace v této práci budeme užívat nejnovější mezinárodní terminologii, která byla vyvinuta za účelem standardizace v oblasti komparativní mitochondriální fyziologie (Gnaiger, 2014).



### **5.3.1.1. LEAK respirace**

Respirační stav LEAK (z angl. „*leak*“ – propouštět) je spřaženým respiračním stavem, ve kterém je spotřeba kyslíku na IMM nejmenší z důvodu největšího MMP. V LEAK stavu část protonů uniká skrz IMM do matrix nezávisle na ATP syntáze a část je využita pro nefosforylační reakce na IMM (transport látek, apod.). Respirace tedy kompenzuje pouze tento relativně malý přesun vodíkových protonů.

### **5.3.1.2. OXPHOS respirace**

Respirační stav OXPHOS (z angl. „*oxidative phosphorylation*“ – oxidativní fosforylace) reprezentuje situaci na IMM, ve které již dochází k fosforylaci ADP na ATP. Přesun vodíkových protonů z IMS do matrix skrz ATP syntázu je rapidní a díky tomu dochází ke snížení MMP a zvýšení konzumpce kyslíku.

### **5.3.1.3. ETS respirace**

Stav ETS, či ETS respirace nebo ETS kapacita (z angl. „*electron transfer system*“ – elektron transportující systém) představuje situaci, kdy MMP na IMM je téměř nulový a komplexy respiračního systému pracují maximální možnou rychlostí. Pro navození ETS stavu musíme do suspenze přidat tzv. rozpřahovače, které vyruší MMP. Rozpřahovače jsou obvykle protonofory, které transportují vodíkové protony dle jejich koncentračního gradientu.

## **5.4. Statistické zpracování naměřených dat**

Ke zhodnocení normality naměřených dat byly využity tyto testy: Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov a D'Agostino-Pearson. Data spadající do Gaussova rozložení byly vyhodnoceny parametrickým testem ANOVA a rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly porovnány pomocí Tukey-Krammerova testu. Kruskalův-Wallisův test pro neparametrické rozložení a dále Dunnův post-test byly využity pro data nespádající do normálního rozložení. Statistické zpracování výsledků bylo provedeno za pomoci softwaru GraphPad Prism 6 a grafy a tabulky uvedené v textu byly zhotoveny pomocí programu MS Office Excel.

## 6. Výsledky

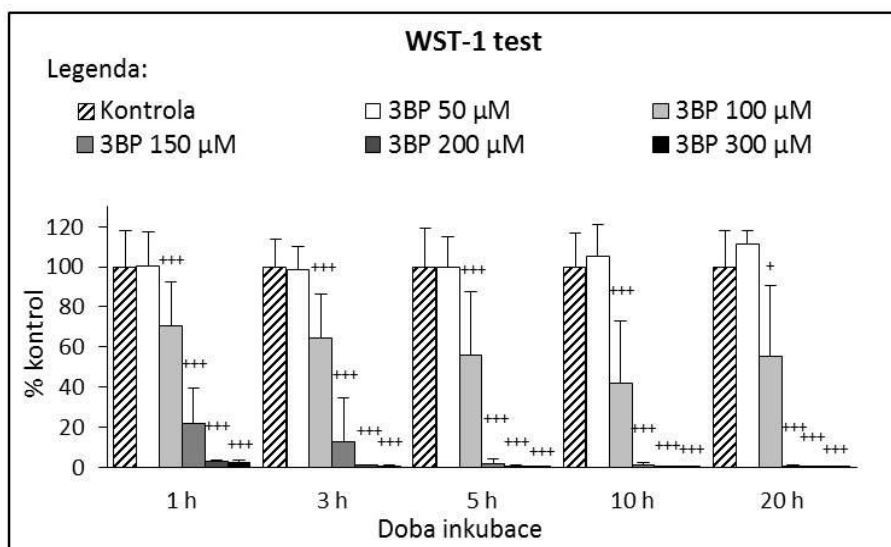
### 6.1. Vliv 3-brompyruvátu na hepatocyty potkana a myši

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 po dobu maximálně 10 minut za současného přidání substrátů pro mitochondriální respiraci.

#### 6.1.1. Toxicita 3BP na hepatocyty potkana

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

Již od koncentrace 3BP 100  $\mu\text{mol/l}$  došlo po jedné hodině k signifikantnímu poklesu aktivity buněčných dehydrogenáz a viability hepatocytů ( $p < 0,001$ ). 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 1).



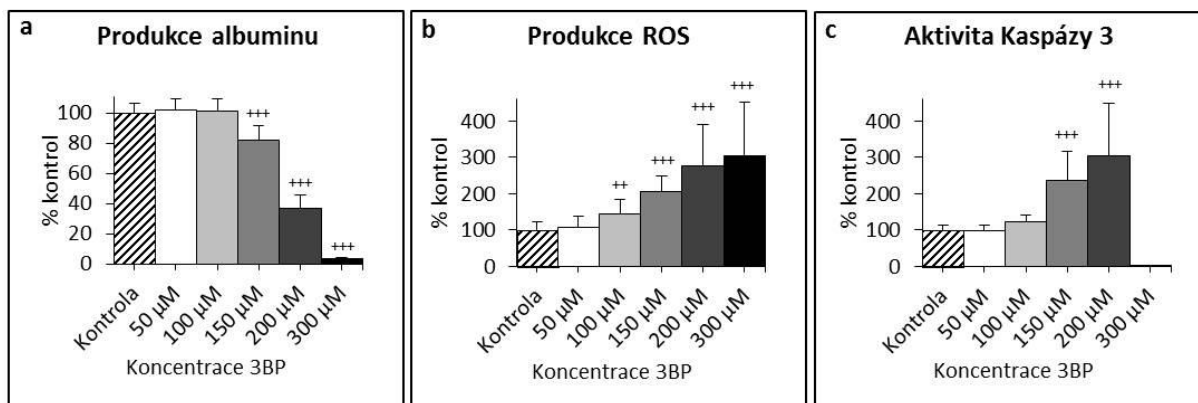
**Graf 1. Test aktivity buněčných dehydrogenáz u potkana.**

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

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

##### 6.1.1.2. Funkční stav hepatocytů

Podání 3BP o koncentrací  $\geq 150 \mu\text{mol/l}$  vedlo ke statisticky signifikantnímu snížení tvorby albuminu v primární kultuře potkaních hepatocytů po 20 hodinové inkubaci ( $p < 0,001$ ; graf 2a).



### Graf 2a-c. Funkční parametry hepatocytů 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.

#### 6.1.1.3. Vliv 3BP na produkci ROS v primární kultuře

Po jedné hodině kultivace jsme zaznamenali zvýšenou produkci ROS u koncentrace 3BP 100  $\mu\text{mol/l}$  a vyšší ( $p < 0,01$ ; graf 2b).

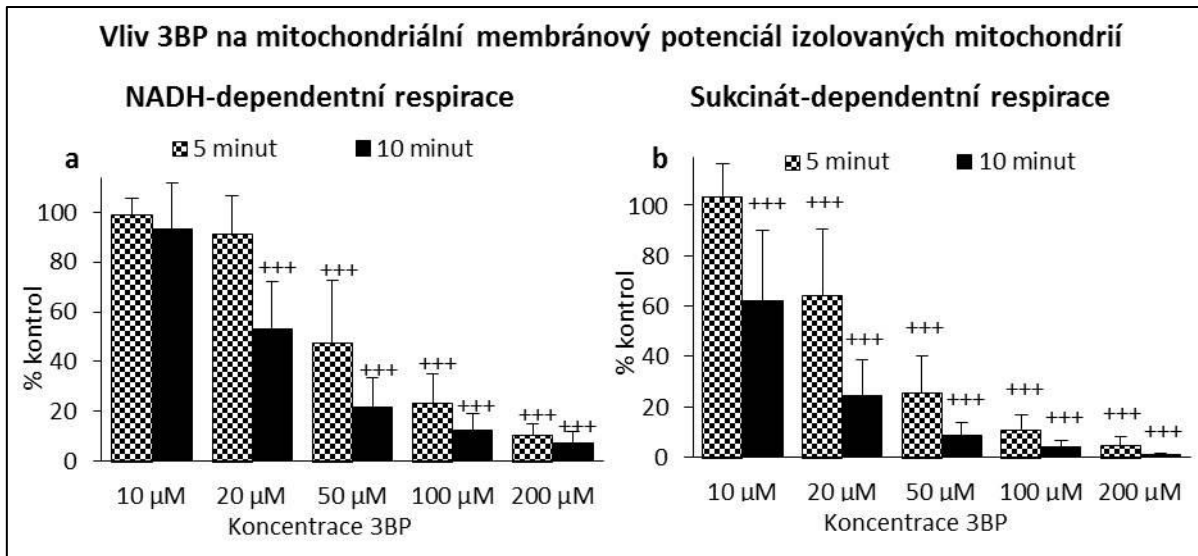
#### 6.1.1.4. Zhodnocení vlivu 3BP na apoptózu

V grafu 2c jsou zobrazeny výsledky měření aktivity kaspázy 3 v lyzovaných hepatocytech po 20 hodinové inkubaci s 3BP. Ke statisticky významnému zvýšení apoptózy došlo u hepatocytů vystavených 150  $\mu\text{M}$  a 200  $\mu\text{M}$  3BP. Aktivita kaspázy 3 u hepatocytů kultivovaných s 300  $\mu\text{M}$  3BP byla pod detekčním limitem, což může značit nekrotickou formu buněčné smrti (graf 2c).

### 6.1.2. Přímý účinek 3BP na funkce jaterních mitochondrií potkana

#### 6.1.2.1. Vliv 3BP na mitochondriální membránový potenciál

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 3a). Pro mitochondrie energizované sukcinátem byly tyto změny významné již při nižších koncentracích 3BP a to od 10 a 20  $\mu\text{mol/l}$  po 5 respektive 10 minutách inkubace ( $p < 0,001$ ; graf 3b).

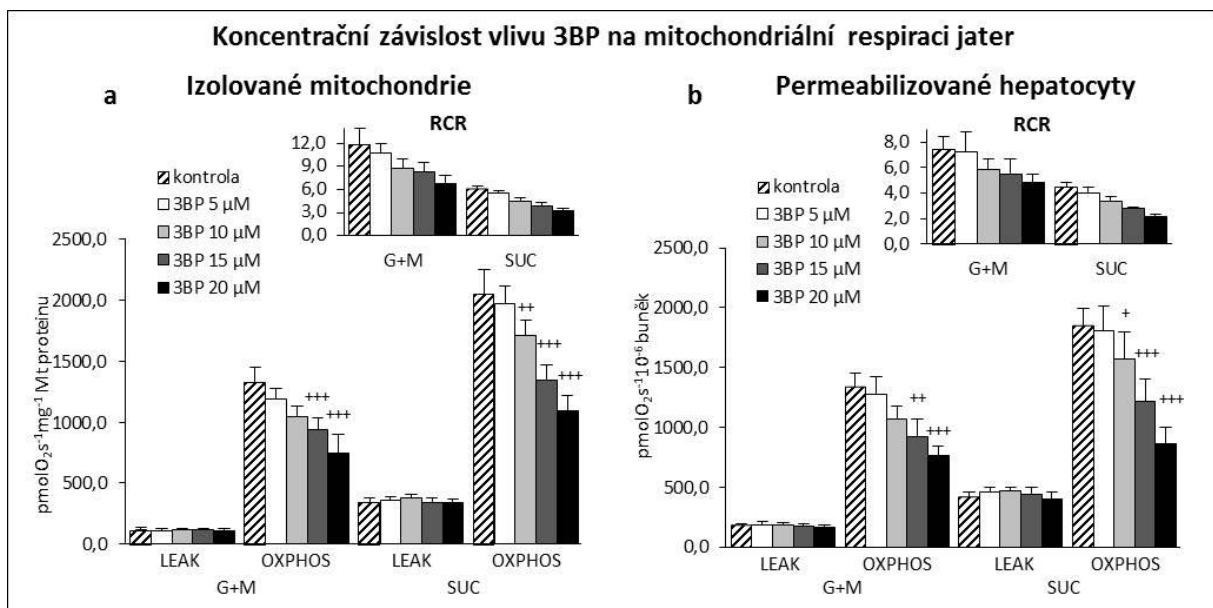


**Graf 3a, b. Výsledky vlivu 3BP na MMP jaterních mitochondrií potkana.**

V grafech je zobrazen průměr  $\pm$  SD;  $n = 5$ ; +++  $p < 0,001$  vs kontrola bez 3BP.

#### 6.1.2.2. Vliv 3B na mitochondriální respiraci hepatocytů potkana

3BP do koncentrace 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 negativní koncentračně závislý účinek této látky (graf 4). 3BP způsobil signifikantní pokles NADH-dependentní respirace od koncentrace 15  $\mu\text{mol/l}$  a sukcinát-dependentní respirace již od koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  (graf 4). Index *RCR* (z angl. „Respiratory control ratio“) vyjadřující efektivitu oxidativní fosforylace se úměrně snižoval se vzrůstající koncentrací 3BP.



#### Graf 4a, b. Výsledky účinku 3BP na respiraci jaterních mitochondrií.

V grafu jsou zobrazeny výsledky při použití NADH-dependentních substrátů glutamátu (G) a malátu (M) pro zhodnocení působení 3BP na komplex I, nebo sukcinátu a rotenonu (SUC) pro zhodnocení účinku na komplex II. Z naměřených výsledků byl vždy vyjádřen index *Respirator Control Ratio* (RCR) pro posouzení efektivity oxidativní fosforylace.

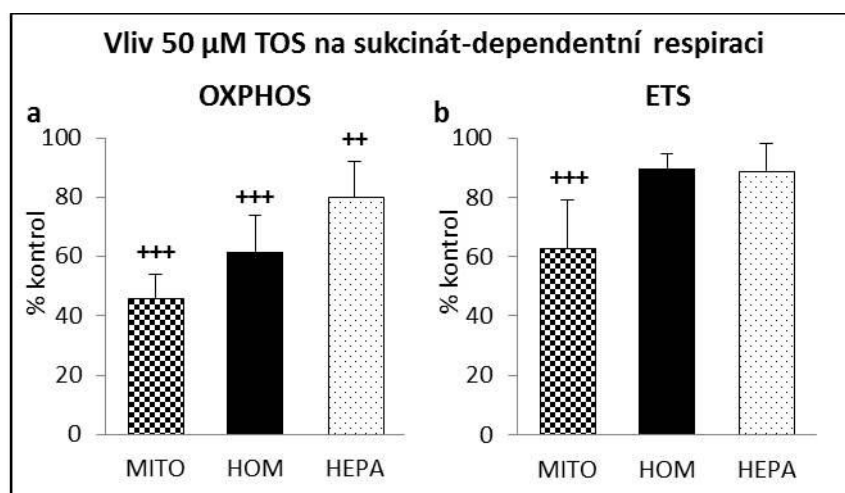
V grafech je zobrazen průměr  $\pm$  SD;  $n = 5$ ;  $+ p < 0,05$ ;  $++ p < 0,01$ ;  $+++ p < 0,001$ .

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

Vliv  $\alpha$ -tokoferylsukcinátu na sukcinát-dependentní respiraci jaterních mitochondrií potkana byl sledován ve třech experimentálních modelech: Izolovaných mitochondriích, jaterním homogenátu a permeabilizovaných hepatocytech.

#### 6.2.1. Vliv TOS na kapacitu respirace v OXPHOS a ETS stavu

TOS způsoboval inhibici sukcinát-dependentní respirace ve všech experimentálních modelech (graf 5a, b). Největší účinek měl v případě izolovaných mitochondrií, nejmenší vliv měl na respiraci permeabilizovaných hepatocytů potkana. Inhibice sukcinát-dependentní respirace jaterních mitochondrií v ETS stavu byla menší oproti OXPHOS stavu ve všech experimentálních modelech (graf 5a, b).



#### Graf 5a, b. Porovnání účinků TOS na respiraci jaterních mitochondrií potkana.

V grafu jsou zobrazeny výsledky měření sukcinát-dependentní respirace v (a) OXPHOS a (b) ETS stavu. 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.

Výsledky respirace, vyjádřené v relativních hodnotách kontrolních procent jsou zobrazeny v tabulkách 1-3.

Skupina	OXPHOS	ETS
<b>Kontrola</b>	100 ± 22,6	100 ± 4,9
<b>TOS 5 µM</b>	75,7 ± 8,9*	95,6 ± 5,1
<b>TOS 10 µM</b>	66,2 ± 8,5***	89,6 ± 9,2
<b>TOS 25 µM</b>	52,3 ± 9,2***	66,8 ± 9,0***
<b>TOS 50 µM</b>	45,7 ± 8,3***	62,8 ± 16***

**Tabulka 1. Vliv TOS na respiraci izolovaných jaterních mitochondrií potkana.**

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

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

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 2. 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 bez TOS.

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 3. Vliv TOS na respiraci permeabilizovaných hepatocytů potkana.**

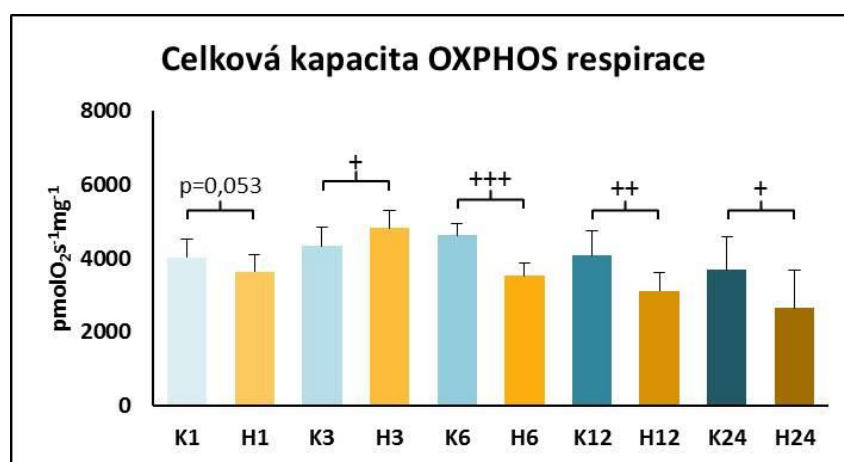
Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontrol. V tabulce je zobrazen průměr ± SD;  $n = 6$ ;

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

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

#### 6.3.1. Vliv HFD na maximální kapacitu respirace jaterních mitochondrií

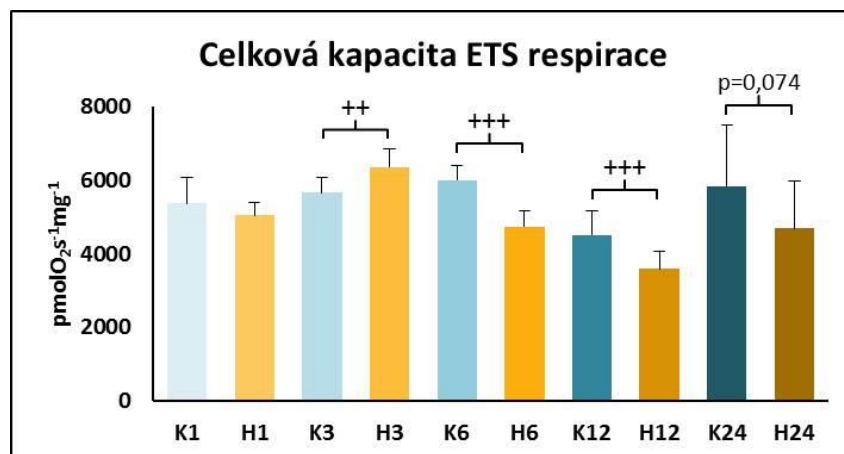
Ve třetím týdnu krmení HFD způsobovala zvýšení celkové kapacity respirace v OXPHOS stavu ( $p < 0,05$ ; graf 6), zatímco po 6 a více týdnech studie došlo k signifikantnímu poklesu respirace ve srovnání s kontrolní dietou ( $p < 0,05$  graf 6).



**Graf 6. Vliv HFD na celkovou respiraci jaterních mitochondrií v OXPHOS 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.

Celková oxidační kapacita jaterních mitochondrií byla opět signifikantně zvýšena po třech týdnech krmení HFD ( $p < 0,01$ ; graf 7), ale v následujících týdnech došlo podobně jako v předchozím případě k významnému poklesu ve srovnání s kontrolní dietou (graf 7).

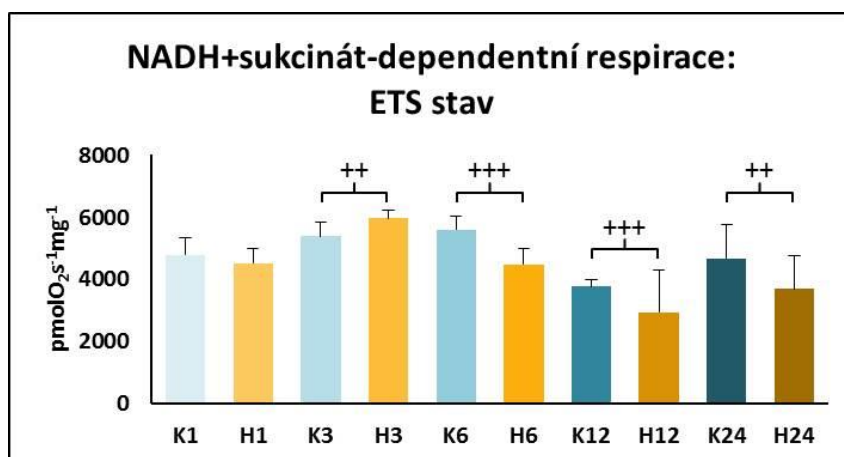


**Graf 7. Vliv HFD na celkovou respiraci jaterních mitochondrií v ETS stavu.**

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.

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

Výsledky mitochondriální respirace při využití substrátů Krebsova cyklu jsou zobrazeny v grafu 8. Po třech týdnech zvýšila HFD kapacitu NADH- a sukcinát-dependentní respirace ( $p < 0,01$ ), zatímco po šesti a více týdnech došlo k signifikantnímu poklesu (graf 8).



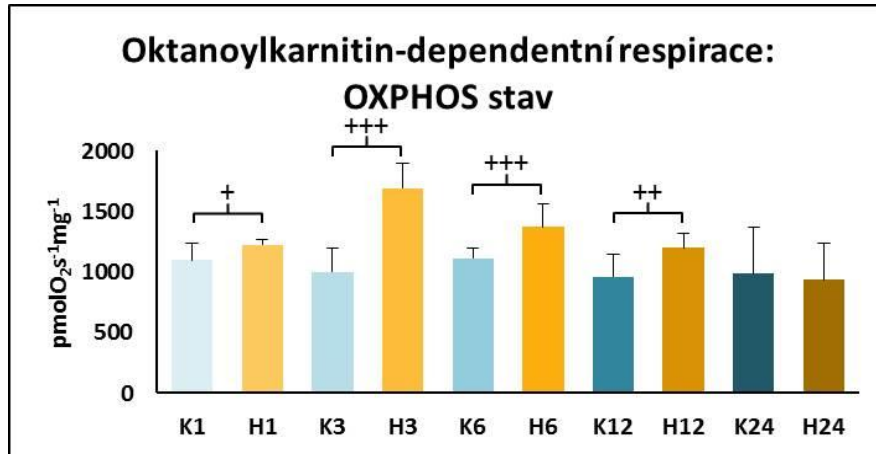
**Graf 8. Vliv HFD na NADH- a sukcinát-dependentní respiraci jaterních mitochondrií.**

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.



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

Po prvním týdnu krmení HFD bylo pozorováno mírné, ale již statisticky významné zvýšení oxidace mastných kyselin v jaterních mitochondriích. Toto zvýšení bylo nejvíce vyjádřeno ve třetím týdnu a pokračovalo až do 24. týdne, kdy došlo k vyrovnání hodnot u obou sledovaných skupin (graf 9).



**Graf 9. Vliv HFD na oktanoylkarnitin-dependentní respiraci jaterních mitochondrií.**

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.

## 7. Diskuze

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

#### 7.1.1. *In vitro* účinek 3BP na nádorové a nenádorové buňky

V našich experimentech jsme provedli základní biochemické testy viability a funkčnosti buněk s důrazem na přítomnost oxidačního stresu a na apoptózu. Ve většině námi sledovaných parametrů jsme nepozorovali rozdíl u hepatocytů kultivovaných s 3BP o koncentraci  $\leq 50 \mu\text{mol/l}$  po dobu 20 hodin. Při vyšších koncentracích 3BP docházelo k poškození buněk. Viabilita nenádorových hepatocytů v naší práci poklesla o 40 % po 3 hodinách inkubace s  $100\mu\text{M}$  3BP (graf 1). Při srovnatelné metodologii bylo pozorováno snížení viability jaterních nádorových buněk HepG2 o 60 % (Pereira da Silva *et al.*, 2009).

Dle našich výsledků 3BP poškozoval primární hepatocyty potkana s projevy stejnými jako v případě studií provedených nádorových buňkách. Sami jsme pozorovali vyšší tvorbu ROS, snížení aktivity buněčných enzymů, indukci apoptózy a poškození buněčné membrány. Pro potvrzení, že tento efekt není specifický pouze pro potkana, jsme izolovali hepatocyty i z jater myši s podobným výsledkem. Myší hepatocyty byly dokonce více citlivé k toxickým účinkům této látky.

Kultivace hepatocytů s 3BP měla za následek snížení jejich funkční kapacity od dávky  $\geq 150 \mu\text{mol/l}$  (graf 2a). Ve studii z roku 2009 pacient po léčbě 3BP vykazoval dlouhodobou hypoalbuminémii (Ko *et al.*, 2012). Autoři zmiňované práce přisuzují sníženou produkci albuminu rozsáhlému poškození jaterní tkáně proběhlým nádorovým procesem. Nicméně dle jimi popisovaných výsledků nelze vyloučit toxické poškození nemaligní jaterní tkáně.

3BP způsoboval snížení MMP po 10 minutách již od koncentrací 10 a 20  $\mu\text{mol/l}$  u mitochondrií energizovaných glutamátem a malátem, respektive sukcinátem (graf 3a, b). Signifikantní pokles mitochondriální respirace byl pozorován v OXPHOS stavu po 5 minutovém vystavení izolovaných mitochondrií u  $15\mu\text{M}$  a  $10\mu\text{M}$  3BP při využití NADH- respektive sukcinát-dependentních substrátů (graf 4a). Tento efekt byl potvrzen u permeabilizovaných hepatocytů (graf 4b).

#### 7.1.2. *In vitro* účinek TOS na nádorové a nenádorové buňky

V experimentech s TOS jsme se zaměřili na již dříve popsany účinek inhibovat funkci komplexu II nádorových mitochondriích (Dong *et al.*, 2008). Rozhodli jsme se vystavit účinku TOS tři experimentální modely ve dvou různých respiračních stavech.

TOS způsoboval ve všech experimentálních modelech inhibici sukcinát-dependentní respirace. Tato inhibice byla vyjádřena více v OXPHOS stavu v porovnání s ETS stavem (graf 5a, b). Domníváme se, že inkubace jaterních mitochondrií s TOS vede nejen k inhibici komplexu II, ale zároveň i k možné inhibici ATP syntázy. Negativní účinek TOS na oxidativní fosforylaci byl již dříve navržen (Gogvadze *et al.*, 2010), ale dosud nebyl jednoznačně prokázán.

Dle našich výsledků byly k účinkům TOS nejvíce citlivé izolované mitochondrie a nejméně permeabilizované hepatocyty. Vzhledem k lipofilnímu charakteru TOS se domníváme, že obsah lipidů v testovaném vzorku může snižovat efektivní koncentraci TOS. Dalším možným vysvětlením, které bylo dříve navrženo, je přítomnost nespecifických esteráz v cytoplazmě hepatocytů (Neuzil and Massa, 2005). Esterázy štěpí TOS na sukcinát a vitamin E a snižují inhibiční účinek na komplex II. Tyto dva mechanismy mohou vysvětlovat diskrepance v účincích TOS v různých experimentálních modelech.

## **7.2. NAFLD u potkana**

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

Podle našich výsledků HFD způsobovala zprvu zvýšení a následně snížení celkové OXPHOS respirace jaterních mitochondrií (graf 6). Stejný trend byl pozorován u respirace jaterních mitochondrií v ETS stavu, vyjadřujícím jejich celkovou oxidační kapacitu (graf 7). Vial *et al.* (2011) ve své práci popisuje podobné snížení kapacity oxidativní fosforylace jater po osmi týdnech krmení HFD (54% tuků). Porucha produkce ATP u jaterních mitochondrií byla také prokázána u potkanů krmených cholin deficientní dietou již po dvou týdnech (Aharoni-Simon *et al.*, 2011). V rozporu s těmito výsledky jsou práce, ve kterých autoři nezaznamenali žádné rozdíly v efektivitě oxidativní fosforylace a oxidativní kapacitě jaterních mitochondrií po 7 až 26 týdnech krmení potkanů HFD (Ciapaite *et al.*, 2007; Nadal-Casellas *et al.*, 2010).

Dle našich výsledků došlo po třech týdnech ke stimulaci a následované inhibici mitochondriální respirace závislé na substrátech Krebsova cyklu (graf 8). Dovolujeme si zde hovořit o substrátech Krebsova cyklu, protože během našich měření byl do mitochondriální suspenze přidáván glutamát, malát, pyruvát a sukcinát. Tyto látky jsou v mitochondriích využity jako substráty pro tvorbu pro NADH a nebo jsou přímo substrátem pro respirační komplex II. Výsledky vlivu HFD na mitochondriální respiraci při použití substrátů pro komplex I či II se v literatuře rozcházejí. 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 prezentované v práci (Ciapaite *et al.*, 2011), kde autoři studie popisují snížení NADH-dependentní respirace po 2,5 týdnech krmení HFD.

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

HFD způsobovala statisticky významné zvýšení oktanoylkarnitin-dependentní respirace izolovaných jaterních mitochondrií ve srovnání s kontrolní dietou ( $p < 0,05$ ; graf 9). Zvýšení  $\beta$ -oxidace bylo nejvíce vyjádřeno po třech týdnech a od šesti a více týdnů, následně postupně klesalo. Po 24 týdnech trvání studie nebyl mezi skupinami patrný žádný významný rozdíl.

Změna mitochondriální oxidace mastných kyselin byla již dříve prokázána s využitím respiračního substrátu palmitoylkarnitinu. 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 tomto případě však 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 se domnívají, že při rozvoji NAFLD dochází ke snížení  $\beta$ -oxidace mastných kyselin v jaterních mitochondriích. Jejich hypotéza ale kontrastuje s nálezem vyšší exprese mRNA pro CD36, FABP, CPT-1 a Acyl-CoA dehydrogenázy (Vial *et al.*, 2011).

## 8. 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 významně snižoval MMP a respirační kapacitu jaterních mitochondrií již po 5 minutách působení. Inhibiční účinek této látky jsme pozorovali v OXPHOS stavu mitochondrií energizovaných sukcinátem a NADH-dependentními substráty. 3BP neměl vliv na respirační aktivitu komplexu IV.
3. V této práci se nám podařilo prokázat rozdíly inhibičního účinku TOS na sukcinát-dependentní respiraci nenádorových jaterních mitochondrií v odlišných experimentálních modelech. TOS měl největší negativní efekt 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.

## 9. Seznam použité literatury

- 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.
- 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.
- 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.
- CALZADILLA BERTOT L, ADAMS LA: The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *International journal of molecular sciences* **17**, 2016.
- 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.
- 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.
- 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.
- GNAIGER E (2014). Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis., 4 edn (Innsbruck: Mitochondr Physiol Network 19.12. OROBOROS MiPNet Publications).
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- KLUCKOVA 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.
- KUCERA O, CERVINKOVA Z: Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World journal of gastroenterology : WJG* **20**: 8364-8376, 2014.
- LE A, COOPER CR, GOUW AM, DINAVAHI 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, 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.).
- 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.
- 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.
- 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.
- RIZVI SI, PANDEY KB, JHA R, MAURYA PK: Ascorbate recycling by erythrocytes during aging in humans. *Rejuvenation research* **12**: 3-6, 2009.
- 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.
- SHOSHAN MC: 3-Bromopyruvate: targets and outcomes. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **44**: 7-15, 2012.
- SCHONFELD G: Familial hypobetalipoproteinemia: a review. *Journal of lipid research* **44**: 878-883, 2003.
- 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.
- TILG H, MOSCHEN AR: Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology (Baltimore, Md)* **52**: 1836-1846, 2010.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 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.
- ZINGG JM: Vitamin E: an overview of major research directions. *Molecular aspects of medicine* **28**: 400-422, 2007.

## 10. Přehled publikační činnosti autora

### Původní články

1. **SOBOTKA O**, DRAHOTA Z, KUCERA O, ENDLICHER R, RAUCHOVA H, CERVINKOVA Z: The effect of alpha-tocopheryl succinate on succinate respiration in rat liver mitochondria. *Physiol Res* **64 Suppl 5**: S609-615, 2015. **IF: 1,643**
2. KUCERA O, LOTKOVA H, **SOBOTKA O**, CERVINKOVA Z: The effect of D-galactosamine on lean and steatotic rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res* **64 Suppl 5**: S637-646, 2015. **IF: 1,643**
3. MEZERA V, KUCERA O, MORAVCOVA A, PETEROVA E, ROUSAR T, RYCHTRMOC D, **SOBOTKA O**, CERVINKOVA Z: Comparison of acetaminophen toxicity in primary hepatocytes isolated from transgenic mice with different apolipoprotein E alleles. *J Physiol Pharmacol* **66**: 863-873, 2015. **IF: 2,804**
4. **SOBOTKA O**, ENDLICHER R, DRAHOTA Z, KUCERA O, RYCHTRMOC D, RAAD M, HAKEEM K, CERVINKOVA Z; Impaired mitochondrial functions contribute to 3-bromopyruvate toxicity in primary rat and mouse hepatocytes. *J Bioenerg Biomembr* **48**: 363-373;2016. **IF: 2,576**
5. MEZERA V, ENDLICHER R, KUCERA O, **SOBOTKA O**, DRAHOTA Z, CERVINKOVA Z: Effects of Epigallocatechin Gallate on Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Mitochondrial Dysfunction in Rat Liver Mitochondria and Hepatocytes. *Oxid Med Cell Longev* **2016**: 7573131; 2016. **IF: 4,593**
6. KUČERA O, ENDLICHER R, RYCHTRMOC D, LOTKOVÁ H, **SOBOTKA O**, ČERVINKOVÁ Z: Acetaminophen toxicity in rat and mouse hepatocytes in vitro. *Drug Chem Toxicol* 2016. **IF: 1,732**

## Statě ve sbornících

1. **SOBOTKA O.**, KUČERA O., ENDLICHER R., ČERVINKOVÁ Z.; Studium toxického účinku dimethylsulfoxidu na primární kulturu hepatocytů potkana; *XLII. májové hepatologické dny 2014*, 28. - 30. 5. 2014, Karlovy Vary, Česká republika.
2. **SOBOTKA O.**, DRAHOTA Z., ČERVINKOVÁ Z.; Effect of  $\alpha$ -Tocopheryl Succinate on complex II; *95th OROBOROS O2k-Workshop on O2k-Fluorometry*, 12. - 16. 9. 2014, Oberurgl, Rakousko.
3. **SOBOTKA O.**, DRAHOTA Z., RAUCHOVÁ H., ČERVINKOVÁ Z.; Inhibitory effect of  $\alpha$ -Tocopherolsuccinate on liver mitochondria; *5th World Congress on Targeting Mitochondria 2014*, 29 - 31. 10. 2014, Berlín, Německo.
4. **SOBOTKA O.**, DRAHOTA Z., ENDLICHER R., RAUCHOVÁ H., ČERVINKOVÁ Z.; Vliv  $\alpha$ -Tokoferylsukcinátu na respiraci jaterních mitochondrií; *91. Fyziologické dny 2015*, 3. - 5. 2. 2015, Brno, Česká republika.
5. KUCERA O, LOTKOVA H, **SOBOTKA O.**, CERVINKOVA Z: The effect of D-galactosamine on lean and steatotic rat hepatocytes in primary culture. *91. Fyziologické dny 2015*, 3. - 5. 2. 2015, Brno, Česká republika.
6. **SOBOTKA O.**, ENDLICHER R., KUČERA O., ČERVINKOVÁ Z.; Hodnocení toxického působení 3-brompyruvátu v primární kultuře hepatocytů potkana; *XLIII. Májové Hepatologické dny 2015*, 27. - 29. 5. 2015, Karlovy Vary, Česká republika
7. ČERVINKOVÁ Z., **SOBOTKA O.**, ENDLICHER R., KUČERA O., ČERVINKA M., DRAHOTA Z.; Inhibitory effect of  $\alpha$ -tocopheryl succinate on complex II activity in rat liver mitochondria; *FASEB Science Research Conference: Mitochondrial Biogenesis and Dynamics in Health, Disease and Aging*, 17. – 22. 5. 2015, West Palm Beach, FL, USA.
8. ENDLICHER R., **SOBOTKA O.**, DRAHOTA Z., ČERVINKOVÁ Z.; Hodnocení energetického metabolismu izolovaných hepatocytů a mitochondrií potkana po krátkodobém působení 3-brompyruvátu v podmínkách in vitro; *XLIII. Májové Hepatologické dny 2015*, 27. - 29. 5. 2015, Karlovy Vary, Česká republika.

9. KUČERA O., LOTKOVÁ H., **SOBOTKA O.**, ČERVINKOVÁ Z.; Citlivost nesteatotických a ztukovatělých hepatocytů v primární kultuře vůči toxickému účinku D-galaktosaminu.; *XLIII. Májové Hepatologické dny 2015*, 27. - 29. 5. 2015, Karlovy Vary, Česká republika.
10. **SOBOTKA O.**, ENDLICHER R., DRAHOTA Z., KUČERA O., RYCHTRMOC D., RAAD M., HAKEEM K., ČERVINKOVÁ Z.; Toxic effect of 3-Bromopyruvate on Rat Hepatocytes in vitro; *11th Postgraduate Medical Students Conference*, 26. 10. 2015, Hradec Králové, ČR.
11. **SOBOTKA O.**, ENDLICHER R., DRAHOTA Z., KUČERA O., RYCHTRMOC D., RAAD M., HAKEEM K., ČERVINKOVÁ Z.; The effect of 3-bromopyruvate on rat hepatocytes in vitro; *6th World Congress on Targeting Mitochondria 2015*, 28. - 30. 10. 2015, Berlín, Německo.
12. **SOBOTKA O.**, ENDLICHER R., DRAHOTA Z., KUČERA O., RYCHTRMOC D., RAAD M., HAKEEM K., ČERVINKOVÁ Z.; Toxic effect of 3-Bromopyruvate on Rat Hepatocytes in vitro; *12th International Medical Postgraduate Conference*, 26. - 27. 11. 2015, Hradec Králové, ČR.
13. ENDLICHER R., DRAHOTA Z., MEZERA V., KUČERA O., **SOBOTKA O.**, LOTKOVÁ H., ČERVINKOVÁ Z.; Zhodnocení možného antioxidačního účinku epigalokatechingalátu na mitochondrie potkana po působení t-butyhydroperoxidu; *Májové hepatologické dny*, 25.-27. 5. 2016, Karlovy Vary, ČR.
14. **SOBOTKA O.**, STANKOVA P., ENDLICHER R., KUCERA O., BANNI A., NOZICKOVA K., CERVINKOVA Z.: Mitochondrial functions in steatotic rat liver. *12th Postgraduate Medical Students Conference*; 24. 10. 2016, Hradec Králové, Czech Republic.
15. **SOBOTKA O.**, STANKOVA P., ENDLICHER R., KUCERA O., BANNI A., NOZICKOVA K., CERVINKOVA Z.: Mitochondrial respiration in fatty liver. *OROBOROS O2k-Workshop on O2k-Fluorometry - advanced*; 21. - 25. 11. 2016, Innsbruck, Austria.

16. **SOBOTKA O.**, STANKOVA P., ENDLICHER R., KUCERA O., BANNI A., NOZICKOVA K., CERVINKOVA Z.: Mitochondrial functions in steatotic rat liver. *13th International Medical Postgraduate Conference*; 24. - 25. 11. 2016, Hradec Králové, Czech Republic.
17. **SOBOTKA O.**, DOERRIER C., GNAIGER E.: Facts and artefacts in measurements of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production under hypoxia. *Annual Meeting of the Society for Free Radical Research Australasia 2016*; 5. - 7. 12. 2016, Gold Coast, Australia.
18. **SOBOTKA O.**, KUČERA O., STAŇKOVÁ P., ENDLICHER R., NOŽIČKOVÁ K., BANNI A., ČERVINKOVÁ Z.: Funkce jaterních mitochondrií u potkanů s nealkoholovou jaterní steatózou. *93. Fyziologické dni*; 31. 1. – 2. 2. 2017; Košice, Slovenská republika.
19. **SOBOTKA O.**, STANKOVA P., ENDLICHER R., KUCERA O., BANNI A., NOZICKOVA K., CERVINKOVA Z.: The effect of 24 weeks of high-fat and high-cholesterol diet on rat liver mitochondria. *MITOEAGLE Barcelona 2017*; 21. - 23. 3. 2017, Barcelona, Španělsko.
20. STAŇKOVÁ P, **SOBOTKA O.**, KUČERA O, ENDLICHER R, LOTKOVÁ H, ČERVINKOVÁ Z. Vliv vysokotukové diety na energetický metabolismus jater potkana. *45. Májové hepatologické dny*; 10. - 12. 5. 2017, Olomouc, Česká republika.
21. KUČERA O., **SOBOTKA O.**, STAŇKOVÁ P., ENDLICHER R., LOTKOVÁ H., PODHOLA M., ČERVINKOVÁ Z.: Nutričně navozený model NAFDL u potkanů. *45. Májové hepatologické dny*; 10. - 12. 5. 2017, Olomouc, Česká republika.

### **Sdělení na odborných setkáních (pouze první autor)**

1. SOBOTKA O., KUČERA O., ENDLICHER R., ČERVINKOVÁ Z.; Studium toxického účinku dimethylsulfoxidu na primární kulturu hepatocytů potkana (poster); *XLII. májové hepatologické dny 2014*, 28. - 30. 5. 2014, Karlovy Vary, Česká republika.
2. SOBOTKA O., DRAHOTA Z., ČERVINKOVÁ Z. 95th; Effect of  $\alpha$ -Tocopherylsuccinate on complex II (přednáška); *OROBOROS O2k-Workshop on O2k-Fluorometry*, 12. - 16. 9. 2014, Oberurgl, Rakousko.
3. SOBOTKA O., DRAHOTA Z., RAUCHOVÁ H., ČERVINKOVÁ Z.; Inhibitory effect of  $\alpha$ -Tocopherolsuccinate on liver mitochondria (poster); *5th World Congress on Targeting Mitochondria 2014*, 29. - 31. 10. 2014, Berlín, Německo.
4. SOBOTKA O., DRAHOTA Z., ENDLICHER R., RAUCHOVÁ H., ČERVINKOVÁ Z.; Vliv  $\alpha$ -Tokoferylsukcinátu na respiraci jaterních mitochondrií (přednáška); *91. Fyziologické dny 2015*, 3. - 5. 2. 2015, Brno, Česká republika.
5. SOBOTKA O., ENDLICHER R., KUČERA O., ČERVINKOVÁ Z.; Hodnocení toxického působení 3-bromopyruvátu v primární kultuře hepatocytů potkana (přednáška); *XLIII. Májové Hepatologické dny 2015*, 27. - 29. 5. 2015, Karlovy Vary, Česká republika.
6. SOBOTKA O., ENDLICHER R., DRAHOTA Z., KUČERA O., RYCHTRMOC D., RAAD M., HAKEEM K., ČERVINKOVÁ Z.; Toxic effect of 3-bromopyruvate on rat hepatocytes in vitro (přednáška); *11th Postgraduate Medical Students Conference*, 26. 10. 2015, Hradec Králové, ČR.
7. SOBOTKA O., ENDLICHER R., DRAHOTA Z., KUČERA O., RYCHTRMOC D., RAAD M., HAKEEM K., ČERVINKOVÁ Z.; The effect of 3-bromopyruvate on rat hepatocytes in vitro (poster); *6th World Congress on Targeting Mitochondria 2015*, 28. - 30. 10. 2015, Berlín, Německo.
8. SOBOTKA O., ENDLICHER R., DRAHOTA Z., KUČERA O., RYCHTRMOC D., RAAD M., HAKEEM K., ČERVINKOVÁ Z.; Toxic effect of 3-Bromopyruvate on Rat Hepatocytes in vitro (přednáška); *12th International Medical Postgraduate Conference*, 26. - 27. 11. 2015, Hradec Králové, ČR.



9. SOBOTKA O., DOERRIER C., GNAIGER E.: Facts and Artefacts in measurement of ROS production under hypoxia (poster + přednáška); *Annual Meeting of the Society for Free Radical Research Europe*; 8. - 11. 6. 2016; Budapešť, Maďarsko.
10. SOBOTKA O., STANKOVA P., ENDLICHER R., KUCERA O., BANNI A., NOZICKOVA K., CERVINKOVA Z.: Mitochondrial functions in steatotic rat liver (přednáška); *12th Postgraduate Medical Students Conference*; 24. 10. 2016, Hradec Králové, Czech Republic.
11. SOBOTKA O., STANKOVA P., ENDLICHER R., KUCERA O., BANNI A., NOZICKOVA K., CERVINKOVA Z.: Mitochondrial respiration in fatty liver (přednáška); *OROBOROS O2k-Workshop on O2k-Fluorometry - advanced*; 21. - 25. 11. 2016, Innsbruck, Austria.
12. SOBOTKA O., STANKOVA P., ENDLICHER R., KUCERA O., BANNI A., NOZICKOVA K., CERVINKOVA Z.: Mitochondrial functions in steatotic rat liver (přednáška); *13th International Medical Postgraduate Conference*; 24. - 25. 11. 2016, Hradec Králové, Czech Republic.
13. SOBOTKA O., DOERRIER C., GNAIGER E.: Facts and artefacts in measurements of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production under hypoxia (přednáška); *Annual Meeting of the Society for Free Radical Research Australasia 2016*; 5. - 7. 12. 2016, Gold Coast, Australia.
14. SOBOTKA O., KUČERA O., STAŇKOVÁ P., ENDLICHER R., NOŽIČKOVÁ K., BANNI A., ČERVINKOVÁ Z.: Funkce jaterních mitochondrií u potkanů s nealkoholovou jaterní steatózou (přednáška); *93. Fyziologické dni*; 31.1. – 2. 2. 2017; Košice, Slovenská republika.
15. SOBOTKA O., STANKOVA P., ENDLICHER R., KUCERA O., BANNI A., NOZICKOVA K., CERVINKOVA Z.: The effect of 24 weeks of high-fat and high-cholesterol diet on rat liver mitochondria (přednáška); *MITOEAGLE Barcelona 2017*; 21. - 23. 3. 2017, Barcelona, Španělsko.