

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra biochemických věd**



**VLIV STEATÓZY JATER NA JEJICH REGENERAČNÍ SCHOPNOST**  
**PO PROVEDENÍ ČÁSTEČNÉ HEPATEKTOMIE**  
**EXPERIMENTÁLNÍ STUDIE**

**LIVER REGENERATION AFTER PARTIAL HEPATECTOMY**  
**IN STEATOSIS IN RATS**  
**EXPERIMENTAL STUDY**

**Diplomová práce**

**Vedoucí diplomové práce: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.**  
**Školitel-specialista: doc. MUDr. Helena Živná, CSc.**

**Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/8500-3**

**Hradec Králové, 2007**

**Klára Švejkovská**

### **Poděkování:**

**Toto poděkování patří zejména mé školitelce doc. MUDr. Heleně Živné, CSc. za odbornou pomoc a veškerý čas, který mi věnovala při vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům Radioizotopové laboratoře na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Děkuji také Ing. Lence Pavlíkové za pomoc při zpracovávání vzorků.**

## SOUHRN

Steatóza jater je onemocnění charakterizované hromaděním triacylglycerolů v cytoplazmě jaterních buněk. V naší studii jsme se zabývali vlivem steatózy jater na jejich regenerační schopnosti po provedení částečné hepatektomie u potkanů.

Cílem této práce byla optimalizace podmínek stanovení cholesterolu v tkáních a stanovení specifické aktivity v biologickém materiálu. Obrát exogenně podávaného cholesterolu jsme sledovali pomocí  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu a regeneraci jater jsme hodnotili pomocí inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu. Zaměřili jsme se na optimalizaci podmínek homogenizace tkání, centrifugace, extrakce, hydrolýzy a na rozdíly hodnot měření v závislosti na uplynulém čase od provedení analytické práce.

Při zpracovávání vzorků jsme kladli důraz na důkladnou homogenizaci, prodloužili jsme časy centrifugace a hydrolýzu jsme zdokonalili úpravou teploty termobloku a času hydrolýzy. Opakovaným měřením vzorků jsme zjistili, že nejpřesnější bylo měření po 24-hodinovém stání. Z důvodu přítomnosti  $^3\text{H}$ -thymidinu v jaterní tkáni jsme  $^{14}\text{C}$ -cholesterol měřili programem, který měří zároveň oba kanály.

Uvedené výsledky ukazují, že dodržáním náležitých postupů lze získat asi 38-46% původního obsahu cholesterolu.

## SUMMARY

The hepatic steatosis is characterized by the accumulation of triacylglycerols in the hepatocyte's cytoplasm. In our study we concerned with the influence of the hepatic steatosis to the liver regeneration after the partial hepatectomy in rats.

The aim of this work was to optimize the parameters of the determination of the cholesterol in tissues and the determination of the specific activity in the biological material. We observed the reversion of the externally served cholesterol by the  $^{14}\text{C}$ -cholesterol and the liver regeneration we evaluated by the incorporation of the  $^3\text{H}$ -thymidin. We focused on the optimization of the parameters of the tissues homogenization, centrifugation, extraction, hydrolysis and on the differences of the measurement rates with dependence on the elapsed time since the analytic task finishing.

During the processing of the samples we focused on the substantial homogenization, we enlarged the centrifugation periods and for complete hydrolysis we modified the termoslot temperature and the hydrolysis period. With repeated measures of the samples we found out that the most accurate measure was the one after 24-hour standing. By reason of the presence of  $^3\text{H}$ -thymidin in liver tissue we measured the  $^{14}\text{C}$ -cholesterol with the program, which measures both canals at the same time.

The presented results show that with observance of the appropriate procedure we can gain about 38-46% of the original cholesterol volume.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1	JATERNÍ TKÁŇ.....	8
2.2	CHOLESTEROL .....	10
2.3	BIOSYNTÉZA CHOLESTEROLU .....	11
2.4	TRANSPORT CHOLESTEROLU.....	13
2.5	STEATÓZA JATER.....	16
2.6	DETEKCE BIOLOGICKÝCH LÁTEK ZNAČENÝCH RADIOIZOTOPY .....	19
2.7	STATISTIKA .....	20
<b>3</b>	<b>METODICKÁ ČÁST</b> .....	<b>21</b>
3.1	STANOVENÍ CHOLESTEROLU VE TKÁNÍCH .....	26
3.1.1	<i>Přístroje</i> .....	26
3.1.2	<i>Materiál</i> .....	26
3.1.3	<i>Postup</i> .....	26
3.2	STANOVENÍ SPECIFICKÉ AKTIVITY DNA V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU.....	28
3.2.1	<i>Přístroje</i> .....	28
3.2.2	<i>Materiál</i> .....	28
3.2.3	<i>Příprava roztoků a činidel</i> .....	28
3.2.4	<i>Vlastní stanovení specifické aktivity DNA v biologickém materiálu</i> .....	30
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>40</b>
5.1	METODIKY .....	40
5.1.1	<i>Stanovení cholesterolu v tkáních</i> .....	40
5.1.2	<i>Stanovení specifické aktivity DNA v biologickém materiálu</i> .....	41

5.1.3	<i>Opakované stanovení <sup>14</sup>C-cholesterolu v játrech potkanů po PH</i>	42
5.1.4	<i>Rozdíly hodnot měření v závislosti na uplynulém čase od provedení analytické práce</i>	43
5.1.5	<i>Vyhodnocení výsledků podle měření na různých kanálech přístroje Beckman LS 6000 LL</i>	43
5.1.6	<i>Vyhodnocení chyby metodiky s ohledem na ztráty analytu</i>	44
5.1.7	<i>Opakované zpracování vzorků</i>	45
5.2	<b>VÝSLEDNÉ HODNOTY</b>	46
5.2.1	<i>Aktivity <sup>14</sup>C-cholesterol v játrech</i>	46
5.2.2	<i>Aktivity <sup>14</sup>C-cholesterol v krvi</i>	46
5.2.3	<i>Koncentrace celkového cholesterol v séru</i>	46
5.2.4	<i>Specifická aktivita jaterních DNA</i>	46
5.3	<b>STEATÓZA A REGENERACE</b>	47
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>ZDROJE A LITERATURA</b>	<b>56</b>

# 1 ÚVOD

Steatóza jater je onemocnění postihující velkou část populace. Poškození jater vedoucí k tomuto onemocnění může mít několik příčin. Jednou z nich, a u nás nejčastější, je abúzus alkoholu. Dalšími příčinami jsou *diabetes mellitus*, vysoké koncentrace cholesterolu a triacylglycerolů, obezita, nadměrná výživa, zvýšené hladiny homocysteinu, některé léky, různé otravy, parenterální výživa, podvýživa, chronická zánětlivá onemocnění střeva a vzácně také vrozené vady metabolismu.

Hlavním cílem této práce bylo zdokonalit metodiku stanovení cholesterolu ve tkáních a stanovení specifické aktivity DNA v biologickém materiálu.

Použili jsme dva různé druhy laboratorních potkanů-potkany kmene Wistar a Pražské hereditární hypecholesterolemické potkany. Zvířata byla rozdělena do jednotlivých skupin a po určitou dobu byla krmena dietami s různým obsahem látek, které mají vliv na metabolismus v játrech. Jednalo se o přídavek cholesterolu a kyseliny orotové a naopak nedostatek methioninu a cholinu. Sledovali jsme rychlost obratu exogenně podaného cholesterolu a jeho ukládání do různých orgánů pomocí  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu. Regeneraci jater jsme hodnotili na základě inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu.

Během stanovení jsme upravovali podmínky metodik tak, abychom ze vzorků získali co největší množství materiálu a při zpracování dosáhli co nejmenších ztrát a tím i větší přesnosti metodiky. Vliv těchto změn jsme sledovali během vypracovávání metodiky.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 JATERNÍ TKÁŇ

Játra jsou parenchymatózní orgán, uložený v dutině břišní, u dospělého člověka mívají hmotnost 1500 g.

Jaterní tkáň je tvořena jaterními buňkami-hepatocyty, dále Kupfferovými buňkami, hvězdicovitými Ito buňkami, fenestrovanými endoteliemi, epiteliemi žlučových kanálků a fibroblasty.

Hepatocyty jsou buňky okrouhlého tvaru, s malým množstvím jemného chromatinu. Cytoplasma je hojná, s množstvím organel. Někdy se v cytoplasmě hepatocytů nacházejí různé inkluze, vakuoly a pigmenty. Za normálních okolností to bývá lipofuscin (zejména u starších osob), dále malá množství hemosiderinu a bilirubinu. Za patologických okolností je metabolismus narušen a přítomny jsou různé materiály (tukové vakuoly, bílkovinné kondenzáty, viry, pigmenty, bilirubin, lipofuscin, ceroid, hemosiderin).

Hepatocyty k sobě přiléhají a vytváří řady. Tyto řady tvoří trámce jaterních buněk, mezi kterými jsou cévy. Trámce a cévy jsou uspořádány v lalůček centrální žíly (*lobus venae centralis*). V ose tohoto lalůčku probíhá *vena centralis*, která ze všech stran přijímá jaterní sinusy, vystlané endoteliemi. Tato výstelka je velmi tenká, s póry, kterými hepatocyty komunikují s krevním oběhem, bazální membrána zde chybí. Mezi endotelem a hepatocyty je za normálních podmínek úzký Disseho prostor. Kromě endotelií jsou přítomny též četné Kupfferovy buňky, které fagocytují především bakterie proniklé ze střeva.

Mezi každými třemi lobuly se nachází portobiliární prostor, obsahující malé množství vaziva, intralobulární žlučovod, arteriolu (*arteria interlobularis*) a věnu (*vena interlobularis*).

Krev z portální žíly (*vena portae*), ze žaludku, střeva, sleziny a pankreatu, se větévkami dostává až do portobiliárních prostorů a odtud do jaterních sinusoid. Větévky *arteria hepatica propria* se rovněž dostávají do portobiliárních prostorů a jsou napojeny na jaterní sinusoidy. Sinusoidy jaterní jsou tedy plněny krví

s obsahem metabolitů z *veny portae* (jež je nutné zpracovat) a krví obsahující živiny a kyslík z *arteria hepatica propria*.

Jaterní parenchym má značnou schopnost regenerace. Retikulum jaterní tkáně funguje jako kostra pro regeneraci tkáně. Regenerace počíná směrem z periportální oblasti. Proto procesy, které vedou k destrukci kostry jaterní tkáně, nebo ty, které poškozují periportální oblast, narušují schopnost regenerace tkáně a často mají trvalé následky.

Žluč je produkována hepatocyty a dostává se do intercelulárních jaterních žlučvodů (kanálků). Tyto kanálky nemají vlastní stěnu a jsou tvořeny pouze štěrbinami mezi jaterními buňkami. V optickém mikroskopu pozorujeme jaterní buňky, až když dojde z nějakého důvodu ke stáze žluči. Tyto kanálky ústí do duktulů (Herringových kanálků) na hranici portobiliárních prostorů a potom do interlobulárních žlučvodů v portobiliárních prostorech. Mají vlastní stěnu a jsou vystlány kubickým epitelem. Sbíhají se postupně do žlučvodů většího kalibru.

Kromě tvorby žluči mají játra mnoho dalších významných funkcí. Jednou z nich je detoxikační funkce. Toxické látky v játrech jsou konjugovány např. kyselinou sírovou či kyselinou glukuronovou, dále je to inaktivace hormonů (inzulín, kortikoidy, pohlavní hormony), důležitou roli mají i Kupfferovy buňky schopné fagocytózy. Játra se také podílejí na tvorbě tepla, jsou rezervoárem pro řadu látek. Je zde skladováno železo, glykogen, hromadí se zde vitamíny rozpustné v tucích. Dále se zde tvoří močovina, játra zasahují do sacharidového metabolismu, syntézou proteinů se účastní udržování onkotického tlaku, syntetizují se v nich faktory hemokoagulace, produkují angiotenzinogen, somatomedin a lipoproteiny typu VLDL a HDL.

## 2.2 CHOLESTEROL

Cholesterol je ve tkáních a v plazmatických lipoproteinech přítomen buď jako volný nebo je vázán na mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jako ester cholesterolu. Mnohé tkáně ho syntetizují z acetyl-CoA a z těla je vylučován žlučí jako cholesterol nebo jako žlučové soli. Cholesterol je prekurzorem veškerých ostatních steroidů v těle, kortikoidů, pohlavních hormonů, žlučových kyselin a vitamínu D. Je typickým produktem živočišného metabolismu, a proto se vyskytuje v potravě živočišného původu, jako je vaječný žloutek, maso, játra a mozek.

Cholesterol je amfipatický lipid a jako takový tvoří základní strukturní složku membrán a vnější vrstvy plazmatických lipoproteinů. Lipoproteiny transportují volný cholesterol do krevního oběhu, kde je v rovnováze s cholesterolem jiných lipoproteinů a membrán. Estery cholesterolu tvoří zásobu cholesterolu ve většině tkání. Jsou transportovány jako nálož v hydrofobním jádře lipoproteinů. LDL je prostředníkem, s jehož pomocí jsou cholesterol a estery cholesterolu zachycovány do mnoha tkání. Volný cholesterol je z tkání odstraňován pomocí HDL a je transportován do jater, aby zde byl přeměněn na žlučové kyseliny. Cholesterol je hlavní složkou cholesterolových žlučových kamenů. V patologických procesech se však účastní jako hlavní faktor při vzniku aterosklerózy v životně důležitých artériích, což pak způsobuje poškození cévních stěn v orgánech celého těla s klinickými projevy (kardiální, mozkové, ischemická choroba dolních končetin atd.). Koronární ateroskleróza koreluje s vysokým plazmatickým poměrem cholesterolu ve frakcích LDL:HDL.

Přibližně polovina cholesterolu v těle pochází ze syntézy (asi 500 mg za den) a zbývající podíl má původ v potravě. Játra syntetizují přibližně 10% z celkové produkce cholesterolu u člověka, střevo asi 15% a kůže zbývající významný podíl. Prakticky veškeré tkáně mohou cholesterol syntetizovat. Za syntézu odpovídají mikrozomální frakce (z endoplazmatického retikula) a frakce z plazmy (z cytosolu).

## 2.3 BIOSYNTÉZA CHOLESTEROLU

Biosyntéza cholesterolu může být rozdělena do pěti fází.

1. krok: Nejprve se vytvoří 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Reakce probíhá mimo mitochondrie. Začíná kondenzací dvou molekul acetyl-CoA na acetacetyl-CoA, tuto reakci katalyzuje enzym v cytoplasmě, thioláza. Druhou možností je, že acetacetát, vzniklý v dráze ketogenese v játrech uvnitř mitochondrií, difunduje do cytoplazmy a může být aktivován na acetacetyl-CoA acetacetyl-CoA-syntázou za přítomnosti ATP a CoA. Acetacetyl-CoA kondenzuje s další molekulou acetyl-CoA na HMG-CoA a tuto reakci katalyzuje HMG-CoA-syntáza. HMG-CoA se mění na mevalonát dvěma reakcemi pomocí NADPH za účasti HMG-CoA-reduktázy, mikrozomálního enzymu. Tento krok je považován za krok limitující rychlost v dráze syntézy cholesterolu.

2. krok: Z mevalonátu vznikají aktivní isoprenové jednotky. Mevalonát je fosforylován pomocí ATP na několik aktivních fosforylovaných meziproductů. Po dekarboxylaci vzniká aktivní jednotka isoprenu, isopentenylpyrofosfát.

3. krok: Ze šesti jednotek isoprenu vzniká skvalen. Tento krok zahrnuje kondenzaci tří molekul isopentenylpyrofosfátu na farnesylpyrofosfát. Děje se tak pomocí izomerace isopentenylpyrofosfátu, při které dochází k posunu dvojně vazby a vzniká dimethylallylpyrofosfát. Pak následuje kondenzace s další molekulou isopentenylpyrofosfátu na deseti-uhlíkatý meziproduct geranylpyrofosfát. Další kondenzací s isopentenylpyrofosfátem se vytvoří farnesylpyrofosfát. Dvě molekuly farnesylpyrofosfátu kondenzují pyrofosfátovými konci v reakci, kde je nejprve odstraněn pyrofosfát, vznikne preskvalenpyrofosfát, a poté následuje redukce s NADPH a je odstraněn zbývající pyrofosfátový zbytek. Tak vznikne skvalen. Může také proběhnout alternativní dráha, která je známa jako „trans-methylglukonátový zkrat“. Pomocí této dráhy je odstraněna významná část dimethylallylpyrofosfátu (5% v játrech za stavu sytého, 33% za hladovění) a vrací jej přes trans-3-methylglukonát-CoA na HMG-CoA. Tato dráha může mít regulující činnost s ohledem na celkovou syntézu cholesterolu.

4. krok: Skvalen se mění na lanosterol. Struktura skvalenu je velmi podobná steroidnímu jádru. Dříve než dojde k dokončení kruhu, mění se skvalen v endoplazmatickém retikulu účinkem oxidázy se smíšenou funkcí,

skvalenepoxidazou, na skvalen-2,3-oxid. Oxidoskvalenosterolcykláza katalyzuje v rámci cyklizace přenos methylových skupin z C14 na C13 a z C8 na C14.

5. krok: Lanosterol se mění na cholesterol. To probíhá na membránách endoplazmatického retikula a zahrnuje změnu ve steroidním jádře a postranním řetězci. Methylová skupina na C14 se oxiduje na  $\text{CO}_2$  a vzniká 14-desmethylanosterol. Stejně tak jsou odstraněny další dvě methylové skupiny na C4 a vznikne zymosterol. Z něho vzniká delta7,24-cholestadienol přesunem dvojně vazby mezi C8 a C9 do polohy mezi C8 a C7. Demosterol vznikne tehdy, když dojde k dalšímu přesunu dvojně vazby v kruhu B do pozice mezi C5 a C6, jak je tomu u cholesterolu. Cholesterol se nakonec vytvoří po redukcí dvojně vazby v postranním řetězci, ačkoliv by k této reakci mohlo dojít ve kterémkoliv kroku během přeměny na cholesterol. Neví se s jistotou, zda tyto popsané reakce v daném pořadí skutečně takto probíhají (*Harperová, 2002*).

Je pravděpodobné, že meziprodukty reakcí probíhajících od skvalenu k cholesterolu jsou vázány na zvláštní protein zvaný „proteinový nosič skvalenu a sterolu“. Tento nosič váže steroly a jiné nerozpustné lipidy a umožňuje jim reagovat ve vodném buněčném prostředí. Navíc se zdá, že takto vázán na proteinový nosič cholesterolu a sterolů, se cholesterol mění na steroidní hormony a žlučové kyseliny a účastní se tvorby membrán a lipoproteinů.

Regulace syntézy cholesterolu se uplatňuje téměř na samém začátku v místě, kde působí HMG-CoA reductáza. U hladovějících živočichů dochází k výraznému poklesu aktivity tohoto enzymu, čímž lze vysvětlit sníženou syntézu cholesterolu během hladovění. Existuje mechanismus zpětné vazby, kterým je HMG-CoA-reductáza inhibována v játrech cholesterolem, hlavním produktem dráhy. Protože nelze dokázat přímou inhibici enzymu cholesterolem, může cholesterol (nebo jeho metabolit) působit buď tak, že potlačí syntézu nové reductázy, nebo že vyvolá syntézu nového enzymu, který odbourá již existující reductázu. Syntézu cholesterolu také inhibuje LDL-cholesterol, přijatý pomocí LDL receptorů (apo-B-100, E-receptory). Denní změny se projevují jak u syntézy cholesterolu, tak u reductázové aktivity. Existují zde však rychlejší účinky na reductázovou aktivitu, které není možné vysvětlit pouze změnou rychlosti proteosyntézy. Podání insulínu nebo hormonů štítné žlázy zvýší HMG-CoA-reductázovou aktivitu, zatímco glukagon nebo glukokortikoidy ji snižují.

Enzym existuje jak ve formě aktivní, tak neaktivní a může být výrazně modifikován fosforylačně-defosforylačními mechanismy, z nichž některé mohou být cAMP dependentní, a proto bezprostředně citlivé na glukagon.

Účinek kolísání množství cholesterolu v potravě na vnitřní produkci cholesterolu byl studován u potkanů. Bylo-li v potravě pouze 0,05% cholesterolu, pak bylo 70-80% cholesterolu v játrech, tenkém střevě a nadledvinkách syntetizováno v organismu. Když se cholesterol v potravě zvýšil na 2%, jeho vnitřní produkce poklesla. Zdá se, že je inhibována pouze syntéza jaterní. Experimenty s perfundovanými játry prokázaly, že chylomikronové zbytky bohaté na cholesterol a zachycované játry inhibují syntézu sterolů. Pokusy snížit hladinu cholesterolu v plazmě u člověka tím, že se sníží množství cholesterolu v potravě, přinesly různé výsledky. Obecně však snížení cholesterolu v potravě o 100 mg za den má za následek jeho snížení přibližně o 0,13 mmol/l séra (*Harperová*, 2002).

## **2.4 TRANSPORT CHOLESTEROLU**

Horní fyziologická mez celkové koncentrace plazmatického cholesterolu u zdravého člověka je 5,2 mmol/l. Značná část cholesterolu je v esterifikované formě. V lipoproteinech je transportován plazmou a velká část se ho nachází v LDL ( $\beta$ -lipoproteiny). Jestliže VLDL kvantitativně převažují, může podíl plazmatického cholesterolu v této frakci stoupnout. Cholesterol z potravy dosahuje rovnováhy s cholesterolem v plazmě za několik dnů a s cholesterolem ve tkáních za několik týdnů. Metabolický obrat cholesterolu v játrech je v porovnání s poločasem celkového tělesného cholesterolu, který činí několik týdnů, relativně rychlý. Volný cholesterol v plazmě a v játrech dosahuje rovnováhy v průběhu hodin, protože cholesterol se snadno vyměňuje a přenáší navzájem mezi buněčnými membránami, plazmatickými lipoproteiny a membránami erytrocytů.

Estery cholesterolu pocházející z potravy se hydrolyzují na volný cholesterol, který se mísí s volným cholesterolem z potravy a žlučovým cholesterolem před svou resorpcí ve střevě a vstupují do chylomikronů.

Z cholesterolu, který se resorbuje, je ve střevní sliznici esterifikována 80-90 % mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem. Rostlinné steroly se resorbují velice špatně. Chylomikrony jsou transportovány mízními cévami do *ductus thoracicus* a do *vena cava inferior*, poté cévním řečištěm do plic (lipoproteinová lipáza) a pak teprve do jater. Reagují-li chylomikrony s lipoproteinovou lipázou za vzniku chylomikronových zbytků, ztrácí se z nich pouze 5% esterů cholesterolu. Zbývající část je zachycena játry, přičemž reaguje chylomikronový zbytek s apo-E-receptorem a ester cholesterolu je hydrolyzován na volný cholesterol. VLDL vzniklé v játrech transportují cholesterol do plazmy. Většina cholesterolu z VLDL se zachovává ve zbytkovém VLDL, ten je vychytáván játry nebo přeměněn na LDL, který pak zachytí receptor pro LDL přítomný v játrech a v mimojaterních tkáních.

Enzymovou aktivitou plazmatické lecithin-cholesterol-acyltransferázy (LCAT) vznikají prakticky všechny estery cholesterolu u člověka (jinak je tomu u jiných živočišných druhů). LCAT podporuje výdej cholesterolu z buněčné membrány do lipoproteinů s nízkým obsahem cholesterolu, obzvláště do HDL<sub>3</sub> nebo do nově vzniklých HDL. LCAT aktivita je vázána na druh LDL obsahující apo-A-I. Jakmile cholesterol v HDL esterifikuje, vznikne určitý koncentrační spád, který přitahuje cholesterol ze tkání a ostatních lipoproteinů. HDL ztrácí hustotu a vzniká HDL<sub>2</sub>, o kterém se předpokládá, že dopravuje cholesterol do jater. HDL má tedy velký význam ve zpětném transportu cholesterolu, v procesu, jímž je tkáňový cholesterol transportován do jater.

Ester cholesterolu je přenášen proteinem, který se vyskytuje v lidské plazmě (nikoliv u potkanů), připojuje se k HDL a usnadňuje přenos esterů z HDL do VLDL, LDL a v menší míře do chylomikronů po jejich koncentračním spádu a umožňuje přesun triacylglycerolů v opačném směru. Uvolňuje tedy inhibici aktivity LCAT produktem v HDL. U člověka se proto velké množství esterů cholesterolu vzniklých aktivitou LCAT v HDL přemístí do jater pomocí zbytků VLDL nebo LDL. Současně je HDL<sub>2</sub> obohacený triacylglycerolem zbaven svého nákladu v játrech tím, že je vychytáván nebo že se přemění na HDL<sub>3</sub> po hydrolyze triacylglycerolu jaterní lipázou uvolnitelnou heparinem.

Za den je z těla odstraněn asi 1 g cholesterolu. Přibližně polovina tohoto množství se vyloučí stolicí ve formě žlučových kyselin. Zbytek se vylučuje jako

neutrální steroidy. Velké množství cholesterolu vyloučené žlučí je znovu resorbováno a předpokládá se, že alespoň část cholesterolu sloužící jako prekurzor pro vznik steroidů ve stolici pochází ze střevní sliznice. Koprostanol je hlavním steroidem ve stolici. Vytváří se z cholesterolu činností bakterií v tlustém střevě. Velká část žlučových solí ve vyloučené žluči se znovu resorbuje do portálního krevního oběhu, je zachycena játry a opět se vylučuje ve žluči. Tento cyklus nese název enterohepatální oběh. Žlučové soli nebo jejich deriváty, které se znovu neresorbovaly, jsou vyloučeny stolicí. Žlučové soli podléhají změnám, které způsobují střevní bakterie, a vznikají z nich sekundární žlučové kyseliny.

Primární žlučové kyseliny se syntetizují v játrech z cholesterolu. Tato reakce má několik kroků. Cholová kyselina je žlučová kyselina vyskytující se ve velkém množství ve žluči. Jak kyselina cholová, tak chenodeoxycholová kyselina vznikají ze stejného prekurzoru, který je odvozen z cholesterolu. Žlučové kyseliny vstupují do žluče jako konjugáty s glycinem a taurinem. Předpokládá se, že nově syntetizované primární žlučové kyseliny existují v jaterních buňkách jako estery CoA. Ty vznikají za pomoci aktivujícího enzymu, který je přítomen v jaterních mikrozomech. Část primárních žlučových kyselin může podléhat ve střevě určitým dalším změnám v důsledku působení střevních bakterií. Dekonjugací a  $7\alpha$ -dehydroxylací vznikají sekundární žlučové kyseliny-deoxycholová a lithocholová kyselina. Primární a sekundární žlučové kyseliny jsou resorbovány většinou pouze v ileu a do jater se tak vrací cestou enterohepatálního oběhu 99–98% žlučových kyselin vyloučených do střeva. Malý zlomek žlučových solí, ne více než 500 mg/den, unikne resorpci a je vyloučen stolicí. Jedná se o hlavní dráhu vylučování cholesterolu. Během dne se ale ztráta žlučových kyselin stolicí kompenzuje ekvivalentním množstvím syntetizovaným z cholesterolu v játrech, takže hotovost žlučových kyselin zůstává konstantní. Tento děj je řízen systémem zpětnovazebné kontroly.

## 2.5 STEATÓZA JATER

Steatóza jater je hromadění triacylglycerolů v cytoplasmě jaterních buněk a to ve formě tukových vakuol minimálně v polovině jaterních buněk. Steatózu lze diagnostikovat morfoloicky nebo při abdominální ultrasonografii (pozorujeme zvětšená a světlá játra), bývají i změny jaterních testů, včetně alkalické fosfatázy. Příčin vzniku steatózy je mnoho. Hlavní dělení je na alkoholovou a nealkoholovou. Jiné jaterní steatózy než etylické etiologie jsou: obezita a hyperlipidemie, diabetes mellitus, léky, chronická virová hepatitida, těhotenská steatóza, Reyův syndrom atd.

Alkoholová steatóza souvisí s abúzem alkoholu. Rozlišujeme makrovezikulární, mikrovezikulární, smíšenou, fokální steatózu a lipogranulom. Makrovezikulární steatóza je nejčastější formou. V cytoplasmě hepatocytu je přítomna obvykle jedna velká vakuola odtlačující jádro na okraj. Po vysazení alkoholu steatóza mizí po 4-8 týdnech. Mikrovezikulární steatóza je způsobena poruchou beta-oxidací mastných kyselin v mitochondriích. V cytoplasmě se nachází mnoho drobných tukových vakuol, jádro hepatocytu je bez dislokace na periferii. Nejčastější příčinou jsou léky. Pro potvrzení tohoto typu je někdy nutno použít speciální histochemická barvení na zmražených vzorcích tkáně (Sudan III). Smíšená steatóza u alkoholického postižení („alcoholic foamy degeneration“) může být provázena selháním jater. Při vysazení alkoholu však dochází k rychlé normalizaci klinického a morfoloického obrazu. Léze je doprovázena ikterem a hepatomegalií, avšak chybí zánět. Morfoloicky jde o kombinaci makrovezikulární a mikrovezikulární steatózy. Hepatocyty obsahují četné drobné kapénky tuku, dávající cytoplasmě charakteristický pěnitý vzhled. Fokální steatóza se vyskytuje zřídka. Lipogranulom je způsoben rupturou hepatocytů obsahujících lipidy. V okolí ruptury dochází k lokální akumulaci mikrofágů, leukocytů, případně eozinofilů a k tvorbě lipogranulomů. Právě přítomnost tuků v lipogranulomech je nejdůležitějším znakem při jejich odlišení od granulomů jiné etiologie. Lipogranulomy vyvolávají v okolí tvorbu fibrotické tkáně. Tato lokální fibróza nemá signifikantní vliv na eventuální rozvoj chronického alkoholického postižení jater a nesmí být zaměněna s mnohem závažnější pericelulární fibrózou u alkoholické hepatitidy, která se vyznačuje difúznějším

postižením jater a výraznějším zánětem. Asi u 40% alkoholiků přechází steatóza do steatohepatitidy (*Burt, 1999*).

Jakékoli poškození hepatocytů se projeví vyplavením nitrobuněčného obsahu, zejména enzymů, jejichž aktivita v séru stoupá. Můžeme tedy rozlišit mírné poškození hepatocytu, které se projeví zvýšením permeability buněčné membrány. V krvi nacházíme zvýšenou aktivitu cytoplazmatických hormonů, např. alaninaminotransferázy (ALT), laktátdehydrogenázy (LD) a cytoplazmatické frakce aspartátaminotransferázy (AST). Při těžkém poškození hepatocytů se následkem nekrózy buněk do krve dostávají i enzymy lokalizované intramitochondriálně. V séru stoupá aktivita AST a poměr AST/ALT je větší než 1,0, výrazně stoupá také aktivita glutamátdehydrogenázy (GMD) (*Racek, 1999*).

Biochemické nálezy u samotné nekomplikované steatózy jsou chudé. Pouze vzácně, vyvine-li se cholestáza nebo cholangitida, lze v krvi sledovat markery cholestázy či zánětu. Mezi nespecifické testy provázející chronický příjem alkoholu patří především zvýšení aktivity gamaglutamyltransferázy (GMT). Signifikantní může být pokles aktivity GMT při prokazatelné abstinenci. Zvýšení ALT při chronickém alkoholismu bývá mírnější a méně časté, takže poměr AST/ALT je obvykle větší než 1, zatímco u ostatních jaterních chorob bývá menší než 1. Aspartátaminotransferáza (AST) bývá zvýšená u 45 až 70% alkoholiků, ale většinou nepřesáhne 5-násobek horního referenčního limitu. Mezi aktivitou AST a mírou jaterního poškození neexistuje přímý vztah. Vzestup AST je podmíněn především mitochondriálním izoenzymem. Po týdenní abstinenci klesají hodnoty AST na polovinu. Již s časnými fázemi chronického alkoholismu je spojeno také zvýšení desialovaných forem transferinu stanovovaných jako „carbohydrate deficient transferrin, CDT“. Zvýšení se vyskytuje v širokém rozmezí 40% až 100% případů abúzu alkoholu a má výrazně nižší výskyt u žen a v mladém věku. Falešně pozitivní nálezy jsou při deficitu železa, u vzácného fenotypu transferinu D a glykoproteinového syndromu. Falešně negativní výsledky jsou u transferinu typu B, při hemochromatóze, ale také u 31% mužských a 83% ženských chronických „píjáků“. Při nutnosti potvrdit podezření na konzumaci alkoholu lze stanovit etanol (nebo metanol) v krvi, případně vyšetřit metabolity serotoninu v moči. (*Ehrrman, 2006*).

Nealkoholická steatóza označována termínem NASH („non–alcoholic steatohepatitis“), který byl navržen Ludwigem (1980) a to na základě histologických nálezů (steatóza, nekróza, zánět, Malloryho hyalin a fibróza) v jaterních biopsiích odebraných u převážně obézních pacientů, u nichž byl vyloučen abúzus alkoholu. V současné době se doporučuje používat termín NAFLD („non–alcoholic fatty liver disease“), který přesněji odpovídá šíři změn v jaterní tkáni-od prosté steatózy přes steatohepatitidu až k cirhóze (*Neuschwander 2003; Zafrani 2004*). NAFLD je chronické onemocnění s histologickými známkami etanolového poškození u osob nekonzumujících alkohol. Onemocnění je mnohem častější než se dříve soudilo, zřejmě patří mezi nejčastější jaterní choroby vůbec. Ve všeobecné populaci se vyskytuje jaterní steatóza asi u 20% osob, NAFLD syndrom u 2-3%, u obézních osob je však NAFLD zastoupen až v 17% případů. Tato data byla získána na základě rozsáhlých studií jaterní tkáně získané od klinicky zdravých osob, které zemřely při autonehodách. Závažnost NAFLD spočívá v riziku přechodu onemocnění do jaterní cirhózy. Rizikovými faktory pro vznik a progresi onemocnění jsou metabolické poruchy, a to jak vrozené (abetalipoproteinémie, některé tesaurismózy, Wilsonova choroba aj.), tak získané (*diabetes mellitus*, dlouhodobé hladovění). Zvýšená nabídka neesterifikovaných mastných kyselin v krvi se objevuje při jejich uvolňování z tukových zásob nebo z lipoproteinů. Játra tyto mastné kyseliny přijímají a esterifikují. Ke steatóze dochází, jestliže tvorbě triacylglycerolů neodpovídá dostatečná tvorba apoproteinů; nebo může být příčinou porucha sekrece vzniklých lipoproteinů jaterními buňkami (obezita, metabolický syndrom X, idiopatické střevní záněty aj.). NAFLD může komplikovat také úplnou parenterální výživu nebo chirurgicky založený jejunální bypass pro obezitu. Druhou rizikovou skupinu představují léky a toxiny (léky-amiodaron, diltiazem, tamofixen, tetracyklin, metotrexát, kortikosteroidy, warfarin a řada dalších; toxiny-tetrachlormethan, chloroform, fosfor, olovo, arsen). U některých typů steatózy se připisuje význam nedostatku tzv. lipotropních faktorů. Patří k nim látky, které mohou být zdrojem methylových skupin-cholin, betain, methionin. Cholin nebo zdroje methylové skupiny jsou nezbytné pro syntézu fosfolipidů (typu lecitinu), které patří rovněž k součástem lipoproteinů. Choroba postihuje častěji ženy středního věku. Hypotézy předpokládají dvoufázové poškození (tzv. two–hit

hypothesis). V první fázi dochází k akumulaci neutrálního tuku v hepatocytech, jaterní buňky jsou schopny se na toto poškození dílčím způsobem adaptovat. V druhé fázi oxidační stres a abnormální lipoperoxidace indukují apoptózu jednotlivých hepatocytů nebo vedou k rozsáhlejším nekrotickým jaterním buněk.

Podle histologického vyšetření je možno rozlišit čtyři stádia:

- I. typ: prostá jaterní steatóza (častěji velkokapénková);
- II. typ: jaterní steatóza se zánětlivým infiltrátem v jaterním parenchymu;
- III. typ: jaterní steatóza s balónovou degenerací;
- IV. typ: jaterní steatóza s fibrózou a Malloryho hyalitem.

U typů III. a IV. je riziko progresu onemocnění do jaterní cirhózy s rozvojem portální hypertenze.

## **2.6 DETEKCE BIOLOGICKÝCH LÁTEK ZNAČENÝCH RADIOIZOTOPY**

K detekci jaderného záření se používají scintilační detektory. Jejich funkce je založena na luminiscenčních účincích jaderného záření. Po dopadu jaderného záření na scintilační krystal vznikají fotony viditelného, UV nebo IČ záření (počet fotonů je úměrný absorbované energii záření). Tento děj může mít povahu fotoluminiscence, fluorescence nebo fosforescence. Fotony po dopadu na scintilátor v něm vyvolají scintilační jevy. Dojde k excitaci valenčních elektronů a při deexcitaci jsou emitovány fotony z viditelného, UV nebo IČ spektra. Část fotonů vysílaných molekulami scintilátoru dopadá na fotokatodu fotonásobiče, kde se procesem fotoelektrického jevu uvolňují elektrony. Emise elektronů z fotokatody je velmi slabá a nelze ji přímo registrovat, proto se elektrony znásobují ve fotonásobiči. Ten se skládá z fotokatody a z celé řady dalších elektrod (dynod), které po dopadu urychlených elektronů emitují sekundární elektrony. Každá ze série (zpravidla 8 až 16) dynod má v porovnání s předcházející kladnější potenciál. Počet elektronů se od dynody k dynodě zvyšuje, až silný proud elektronů (po  $10^5$  až  $10^8$ -násobném zesílení) dopadne na anodu fotonásobiče.

Takto vzniklý elektrický impuls je veden do registračního zařízení. Velikost elektrického impulzu je úměrná energii jaderného záření, což umožňuje rozlišení záření o rozdílné energii (M. Lázniček, 1998).

Scintilátory mohou být anorganické tuhé (NaI, KI, NaTI...), organické tuhé (anthracen, naftalen, stilben...), organické roztoky tuhé (terfenyl v polystyrenu,...) nebo kapalné (anthracen v toluenu, v xylenu...).

K měření nízkoenergetických zářičů beta ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ) se používá tzv. kapalných scintilátorů, což jsou roztoky nebo suspenze organických scintilátorů v organických rozpouštědlech (*p*-terfenyl, difenylloxazol nebo anthracen v toluenu, xylenu nebo dioxinu a další). Vzorky radioaktivních látek se rozpouštějí nebo suspendují v roztoku obsahujícím dvě organické fluorescenční látky (primární a sekundární scintilátory). Jsou použity z toho důvodu, že u záření beta dochází k výrazné absorpci záření přímo v samotném vzorku. Elektrony beta z vnitřních částí vzorku většinou vůbec ven neproniknou, toto záření dále nepronikne případným obalem radioaktivního vzorku (např. lahvičkou). U takových vzorků je třeba provést buď poměrně náročnou úpravu vzorku do velmi tenké vrstvičky (odparku) a tu se pak pokusit měřit pomocí G-M trubic nebo plastických scintilátorů, nebo se použije metoda kapalných scintilátorů. Kapalný scintilátor je látka kapalného skupenství, která při interakci s ionizujícím zářením převádí část absorbované energie na světelné záblesky (scintilace) (Ullmann).

## **2.7 STATISTIKA**

Statistickou analýzy jsme provedli s využitím statistického software SigmaStat 3.1, (Jandel Scientific\* Corporation, San Rafael, California, USA). Jeden symbol značí statistickou významnost  $p < 0,05$ , dva symboly značí  $p < 0,01$  a tři symboly značí  $p < 0,001$ .

### 3 METODICKÁ ČÁST

V našem experimentu byly užití standardní laboratorní potkani-samci kmene Wistar (n=64) a potkani PHHP (pražský hereditární hypercholesterolemický potkan) (n=64), celkem 128 zvířat.

Potkani PHHP jsou genetické modely nemocí sloužící ke studiu mechanismu vzniku hypercholesterolémie. Jedná se o inbrední linii potkana odvozeného z kmene Wistar, u kterých lze navodit hypercholesterolémie vysokocholesterolovou dietou a složení lipoproteinů je velmi podobné lidské patologii. Hypercholesterolémie je způsobena poruchou zpětnovazebné regulace syntézy cholesterolu v játrech a je výrazně posunuta k vyšším koncentracím cholesterolu v hepatocytu i intravazálně. Výsledkem je podstatné zvýšení koncentrace LDL a IDL po podání vysokocholesterolové diety.

Protokol pokusu byl schválen odbornou komisí. Všechny operační zákroky na potkanech byly provedeny ve funkční digestoři v eterové anestézii.

Potkani byli chováni v Centrálním viváriu Radioizotopové laboratoře LF UK v Hradci Králové, v klimatizovaných prostorách s teplotou vzduchu 22-24°C a vlhkostí 30-70%, 12 hodin světlo, 12 hodin tma. Zvířata byla umístěna v PVC klecích po pěti zvířatech na dřevěných hoblinách bez prachu a pilin. Počáteční tělesná hmotnost potkanů kmene Wistar byla  $256 \pm 15$  g a u potkanů PHHP  $292 \pm 20$  g. Po týdenní aklimatizaci potkanů bylo zahájeno podávání standardní diety i speciálních diet po celou dobu pokusu *ad libitum* s měřením jejich spotřeby. K pití byla užitá pitná voda *ad libitum*.

## PŘÍPRAVA DIET

Tabulka č. 1: Příprava mixu vitamínů:

Thiamin B1	3,78 g
Riboflavin B2	3,78 g
Ca Panthotenát	6 g
Niacin PP	6,3 g
Biotin H	20 mg
C vitamín	63,03 g
Kyselina listová	110 mg
Inositol	6,3 g
Sucrose	Doplněno do 1000 g

Tabulka č. 2: Příprava mixu minerálů:

Minerál	1 kg
CaCO <sub>3</sub>	548,3 g
MgCO <sub>3</sub>	25,2 g
MgSO <sub>4</sub>	16,0 g
NaCl (jodidovaná, fluoridovaná kuchyňská sůl)	69,68 g = 440 mg KI
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	203,76 g
KCl	113,28 g
FePO <sub>4</sub>	20,8 g
MnSO <sub>4</sub>	0,32 g
Tridin -NaF	15 tbl =120 mg
CuCO <sub>3</sub>	0,40 g
ZnCO <sub>3</sub>	2,14 g
Součet	999,88 g

Diety měly vždy stejný obsah tuků, obsahovaly 5,5% kukuřičného oleje. Dieta MCDD obsahovala 1,68 g methioninu/kg diety, ostatní diety obsahovaly 11,68 g methioninu/kg.

Tabulka č. 3: Diety podle našeho rozpisu:

1 kg diety	SLD	SLD se 4% cholesterolu	SLD s 1% kyseliny orotové	SLD cholin- methionin deficitní
Kasein	260 g	260 g	260 g	260 g
Kukuřičný škrob	491,7 g	453,7 g	491,7 g	491,7 g
Cukr moučka	60 g	60 g	60 g	60 g
Celulóza	50 g	50 g	50 g	50 g
Cholin chlorid	9,05 g	9,05 g	9,05 g	0
DL-methionin	10 g	10 g	10 g	0
L-cystein	5 g	5 g	5 g	5 g
L-arginin	5 g	5 g	5 g	24 g
Cholesterol	0	38 g	0	0
Orotová kyselina	0	0	100 g	0
Mix minerálů	50 g	50 g	50 g	50 g
Mix vitamínů	8,92 g	8,92 g	8,92 g	8,92 g
Olej s vitamíny	55,33 g	55,33 g	55,33 g	55,33 g
Do oleje přidáme pitnou vodu, přidáme vitamíny (viz níže) a rozšleháme roztok metlou.				
A vit (30000 IU/tobolka)	2600 IU	2600 IU	2600 IU	2600 IU
D vit (300000 IU/amp)	9000 IU	9000 IU	9000 IU	9000 IU
K vit (20 mg/ml)	0,8 mg	0,8 mg	0,8 mg	0,8 mg
E vit (30 mg/amp)	5 mg	5 mg	5 mg	5 mg
Vitamín B6 (50 mg/amp)	0,68 ml	0,68 ml	0,68 ml	0,68 ml
Vitamín B12 (300 µg/amp)	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml

Jednotlivé typy diet byly připraveny dle dostupné literatury. Diety byly vytvořeny na mlýnku na ovoce pro výrobu marmelád promícháním jednotlivých součástí s pitnou vodou (tab. č.3). Vytvořené pelety byly následně usušeny v sušičce potravin při teplotě 60°C. Jednotlivé diety byly obarveny potravinářskými barvami, aby byly dobře odlišitelné.

## JEDNOTLIVÉ TYPY DIET

1. skupina: kontrolní skupina zvířat každého kmene byla krmena *ad libitum* definovanou standardní laboratorní dietou (viz návod na přípravu).

Experimentální skupiny potkanů byly krmeny:

2.skupina: standardní laboratorní dietou se zvýšeným obsahem cholesterolu (4%). Tato dieta demonstruje změny jaterní tkáně při nadbytku cholesterolu, podobně jako u lidí.

3. skupina: dieta MCDD (methionin a cholin deficitní dieta). Druhá dieta demonstrovala stav malnutrice, kdy do organismu není doplňován cholin a pouze v omezené míře methionin (1,68 g methioninu/kg diety). Zdrojem bílkovin byl mléčný kasein, který obsahuje málo methioninu, ale více než sojový protein (*Gudbrandsen, 2005*). Cholin je jedním ze stavebních kamenů buněčných a organelových stěn. Je nutný pro tvorbu fosfatidylcholinu, který je esenciální pro produkci VLDL. Absence cholinu ve stravě znamená, že hepatocyty netvoří VLDL, a tím je poškozena exocytóza triacylglycerolů, což vede k jejich hromadění (*Nakano, 1997*). Deficit cholinu je také u potkanů známý hepatokarcinogen (*Nakae, 1999*).

4. skupina: dieta s vyšším obsahem kyseliny orotové (1%). Kyselina orotová v potravě je známou příčinou mikrovezikulární steatózy u potkanů (*Rifai, 1994*), brání tvorbě apoproteinů nutných k transportu VLDL a LDL do krve. Kyselina orotová zabraňuje exportu nově syntetizovaných jaterních lipoproteinů z jater (*Hebbachi, 1997*), což vede k značnému ukládání jaterních triacylglycerolů a volných mastných kyselin (*Su, 2005*).

Zvířata byla krmena různými typy diet po dobu 4 týdnů. V době trvání experimentu byla denním vážením sledována hmotnost potkanů a spotřeba diety. Odběr 1,5 ml krve z ocasní žíly byl proveden 25. den pro získání údajů o biochemických ukazatelích u intaktních potkanů, ještě před plánovanou částečnou hepatektomií. Částečná hepatektomie (2/3 jater) byla provedena 28.den a jednu hodinu poté byl potkanům podán  $^{14}\text{C}$ -cholesterol v dávce 37 kBq/100 g tělesné hmotnosti potkana (pro stanovení aktivit značeného cholesterolu). Za 17 hodin po operaci byl podán  $^3\text{H}$ -thymidin v dávce

740 kBq/100g tělesné hmotnosti potkana do femorální žíly a jednu hodinu poté bylo usmrceno prvních osm zvířat jednotlivých skupin (18 hodin po PH). Druhým osmi zvířatům jednotlivých skupin byl podán  $^3\text{H}$ -thymidin do femorální žíly 29. den za 23 hodin po operaci a 1 hodinu poté byli zvířata usmrcena (24 hodin po PH). Potkani byli usmrceni vykrvácením z bifurkace břišní aorty s odběrem systémové krve a následně všech orgánů. Všechny vyňaté orgány a získané krevní sérum byly zamraženy.

### **ROZDĚLENÍ ZVÍŘAT DO 8 SKUPIN PO 16 ZVÍŘATECH:**

1.skupina: samci kmene Wistar, živení standardní laboratorní dietou (SLD) (W-SLD)

2.skupina: samci kmene Wistar, živení SLD obohacenou o 4% cholesterolu (W-CHOL)

3. skupina: samci kmene Wistar, živení methionin-cholin deficitní dietou (W-MCDD)

4.skupina: samci kmene Wistar, živení dietou s obsahem 1% kyseliny orotové (W-ORO)

5. skupina: samci kmene PHHP živení SLD (PHHP-SLD)

6. skupina: samci kmene PHHP živení SLD obohacenou o 4% cholesterolu (PHHP-CHOL)

7. skupina: samci kmene PHHP živení methionin-cholin deficitní dietou (PHHP-MCDD)

8. skupina: samci kmene PHHP živení dietou s obsahem 1% kyseliny orotové (PHHP-ORO)

### **3.1 STANOVENÍ CHOLESTEROLU VE TKÁNÍCH**

Pro stanovení cholesterolu v tkáních jsme použili zamražené tkáně jater, thymu, ledvin, nadledvin, sleziny, srdce, plic a krve.

#### **3.1.1 Přístroje**

Beckman instruments, inc. LS analyzer, 6000 LL

Centrifuga MPW-360 (Mechanika Precyzyjna Warszawa)

Rotační třepačka Multi Bio RS-24 (Biosan)

Homogenizátor Ultra-Turrax T8 (Ika-Werke)

Termoblok ISOTEMP 125D (Fischer Scientific)

Vortex Lab dancer (Ika)

#### **3.1.2 Materiál**

Etanol Spiritus 96% (zdroj-lékárna)

Aceton čistý (Lachema n.p. Brno)

Hydroxid draselný p.a. (Lachema n.p. Brno)

Destilovaná voda

Toluen 99% (Acrōs organics)

Scintilační roztok SLT-41 (Chemopetrol)

#### **3.1.3 Postup**

Biologický materiál jsme nechali nejprve při teplotě laboratoře rozmraznout. Odvážili jsme 1 g tkáně, který jsme homogenizovali ve dvojnásobném množství fyziologického roztoku v plastové zkumavce. Na důkladnou homogenizaci tkáně byl kladen zvýšený důraz. Pokud bylo tkáně méně, pak jsme zjistili její hmotnost a následně přidali dvojnásobné množství fyziologického roztoku. Krev jsme odebírali do čistých plastových zkumavek bez antikoagulačních přísad a zamrazili ji. Před zpracováním jsme krev museli také důkladně rozmrazit. Z homogenátů a z krve jsme odebrali 500 µl do směsi ethanol-aceton (1:1) do lahvičky se závitěm

o velikosti 3 ml. Poté jsme vzorky stočili na rotační třepačce po dobu 15 minut a zcentrifugovali při 1500 otáčkách/minutu po dobu 10 minut.

Poté jsme do lahvičky se závitem o velikosti 4 ml napipetovali 150  $\mu$ l nasyceného vodného roztoku KOH, který jsme si před tím připravili. Při rozpouštění se vyvíjí značné teplo a vzniklý vodný roztok je silně zásaditý. Do lahvičky se 150  $\mu$ l nasyceného roztoku KOH jsme opatrně stáhli 1,5 ml aceton-etanolového supernatantu z horní vrstvy. Vzorky jsme důkladně protřepali na Vortexu a vložili do termobloku. Termoblok jsme nastavili na 52°C a vzorky jsme zde nechali 60 minut. Zhruba každých deset minut jsme vzorky protřepali, aby alkalická hydrolyza proběhla úplně.

Po vyjmutí vzorků z termobloku, jsme je vložili na 5-10 minut do vodní lázně s ledem. Po důkladném zchlazení jsme do zkumavek přidali 1,5 ml destilované vody a 1 ml toluenu. Následovalo stočení vzorků na rotační třepačce po dobu 15 minut a centrifugování při 1500 otáček/minutu po dobu 10 minut. Poté jsme odebrali 1 ml horní organické vrstvy, tedy toluenu a částečně acetonu, do scintilační lahvičky s 10 ml scintilačního roztoku SLT-41. Následně jsme vzorky změřili na Beckman instruments, inc. LS analyzer.

Při každé sadě stanovení jsme prováděli i zkoušku pozadí. Použili jsme intaktní játra bez podaného izotopu, zpracovali je jako ostatní vzorky a změřili počty impulsů.

Výsledná hodnota aktivit  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu v počtech scintilací (dpm) se přepočítá na Bq: Tkáň=dpmx31,92/60 (Bq chol/g tkáň). Krev=dpmx10,64/60 (Bq chol/ml krve).

## **3.2 STANOVENÍ SPECIFICKÉ AKTIVITY DNA V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU**

### **3.2.1 Přístroje**

Homogenizátor Ultra-Turrax T8 (Ika-Werke)  
Termoblok ISOTEMP 125D (Fischer Scientific)  
Centrifuga MPW-360 (Mechanika Precyzyjna Warszawa)  
Vortex Lab dancer (Ika)  
Destilační aparatura

### **3.2.2 Materiál**

Kyselina citronová 0,1 M  
Kyselina chloristá 0,5%, 5%, 10%, 70% (Penta)  
Roztok TRITON (SLT-31, SLT-41+TRITON x-100 nebo x-500 v poměru 2:1)  
SLD-41 (Chemopetrol)  
Difenylamin (Penta)  
Kyselina octová 99,8% p.a. (Rieder-de Haën)  
Kyselina sírová p.a. (MERCK)  
Manganistan draselný (Lachema)  
Acetaldehyd  
Destilovaná voda  
Aqua pro injectione (Braun, lékárna)

### **3.2.3 Příprava roztoků a činidel**

Standardní roztok DNA: Rozpuštěním DNA-SIGMA (sodná sůl, z thymu) o hmotnosti 2 mg (v jedné dávce) v 10 ml *aqua pro injectione*. Roztok jsme uchovávali zmražený.

Difenylaminové činidlo: Roztok musel být připraven vždy čerstvý! Rozpustili jsme 8 g difenylaminu v 500 ml předestilované kyselině octové p.a. (viz. níže) a přidali jsme 7,5 ml kyseliny sírové p.a. MERCK.

Destilace kyseliny octové: K 1 litru kyseliny octové p.a. přidáme 20 g manganistanu draselného. Roztok jsme nechali 24 hodin stát, občas promíchali a poté destilovali. Teplota varu byla 118°C (116°C).

10% kyselina chloristá: 100 ml 70% kyseliny chloristé jsme zředili 600 ml destilované vody

5% kyselina chloristá: 50 ml 70% kyseliny chloristé jsme zředili 650 ml destilované vody

0,5% kyselina chloristá: 70 ml 5% kyseliny chloristé jsme zředili 630 ml destilované vody

0,07M roztok acetaldehydu: 4,2 ml acetaldehydu jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody a roztok jsme uchovávali v lednici.

### **Kalibrační křivka DNA**

Před vlastním stanovením specifické aktivity DNA v biologickém materiálu jsme si vytvořili kalibrační křivku DNA.

Pro kalibrační křivku jsme použili standardní roztok DNA, který jsme uchovávali zmražený. Před použitím jsme nechali roztok rozmrazit při pokojové teplotě. Poté jsme jej smíchali v poměru 1:1 s 10% kyselinou chloristou. Roztok jsme nechali hydrolyzovat při 72°C po dobu 45 minut (viz. dále). Tím jsme získali v 1 ml hydrolyzátu 100 µg DNA. Tuto hydrolyzovanou standardu DNA v prostředí cca 5% kyseliny chloristé jsme použili pro kalibrační křivku.

Tabulka č. 4: Kalibrační křivka:

	st. DNA (ml)	5%kyselina chloristá (ml)	DNA (µg)
1.	0,2	0,8	20
2.	0,3	0,7	30
3.	0,4	0,6	40
4.	0,5	0,5	50
5.	0,6	0,4	60
6.	0,7	0,3	70
7.	0,8	0,2	80
8.	0,9	0,1	90
9.	1,0	0,0	100

Jako slepý vzorek jsme použili 1 ml 5% kyseliny chloristé

Ke každému roztoku DNA v 5% kyselině chloristé přidáme 1,5 ml difenylaminového činidla a 0,1 ml 0,07M acetaldehydu. Oba roztoky jsme si předem připravili.

Po protřepání jsme nechali zkumavky stát cca 20 minut v temnu při pokojové teplotě. Extinkce byla měřena na spektrometru na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### **3.2.4 Vlastní stanovení specifické aktivity DNA v biologickém materiálu**

Ke stanovení jsme použili stejné tkáně a orgány jako při stanovení cholesterolu v tkáních.

Homogenizaci 0,5 g jater jsme prováděli v 4 ml 0,1M kyseliny citronové. Po homogenizaci jsme k homogenátu přidaly další 4 ml 0,1M kyseliny citronové, celkem tedy 8 ml.

Homogenát jsme dali centrifugovat při 3300 otáčkách po dobu 15 minut. Po centrifugaci jsme roztok nad sedimentem slili rychlým otočením zkumavek dnem vzhůru nad výlevkou. K sedimentu, který nám ve zkumavkách zůstal, jsme přidali 8 ml 0,5% kyseliny chloristé. Roztok jsme důkladně promíchali na Vortexu a opět centrifugovali 15 minut při 3300 otáčkách za minutu. Po centrifugaci jsme roztok nad sedimentem vylili do odpadní lahve a opět přidali asi 8 ml 0,5% kyseliny chloristé. Celý proces promývání jsme opakovali 3x.

K promytému sedimentu jsme přidali 3 ml 5% kyseliny chloristé a promíchali na Vortexu. Roztok jsme poté dali hydrolyzovat do termobloku při 72°C na 45 minut. Zkumavky jsme během hydrolyzy občas promíchali.

Po hydrolyze jsme opět provedli centrifugaci (3300 otáček za minutu po dobu 15 minut). Hydrolyzát nad sedimentem jsme slili do jiné zkumavky, ze které jsme odpipetovali 1 ml do měřicí scintilační lahvičky a přidali jsme 6 ml scintilačního roztoku TRITONU. Sediment ve zkumavce jsme již dále nepoužili.

Vzorky jsme změřili za 24 hodin na spektrometru BECKMAN, poté jsme provedli výpočty dpm  $^3\text{H}$ -thymidin (krát 3 se rovná dpm v navážce) a výpočet specifické aktivity (dpm v navážce/ $\mu\text{g}$  DNA v navážce).

## 4 VÝSLEDKY

VYSVĚTLIVKY:

W - Wistar

PHHP-pražský hereditární hypercholesterolemický potkan

SLD-standardní laboratorní dieta

CHOL-dieta obohacená o cholesterol (4%)

ORO-dieta s obsahem kyseliny orotové (1%)

MET-methionin a cholin deficitní dieta

PH-částičná (parciální) hepatektomie

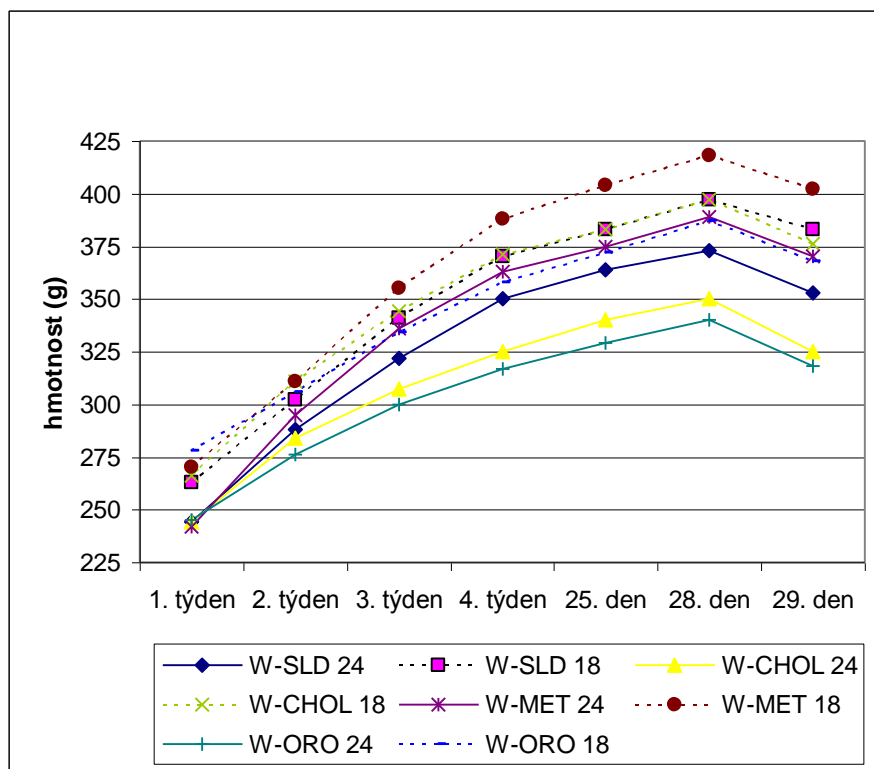
18-usmrcení potkana 18 hodin po PH

24-usmrcení potkana 24 hodin po PH

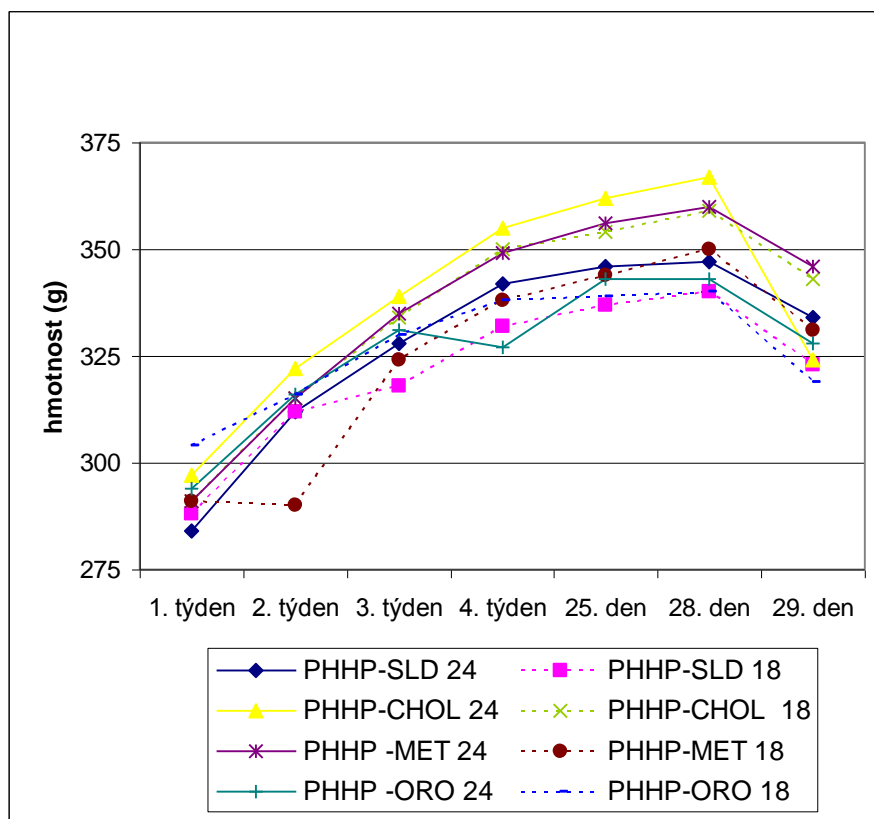
Tabulka č. 5: Tělesná hmotnost potkanů (g)

	1.týden	2.týden	3.týden	4.týden	25.den	28.den	29.den
W-SLD 24	244±15	288±13	322±9	350±17	364±6	373±6	353±13
W-SLD 18	263±5	302±6	341±5	370±6	383±5	397±6	383±5
W-CHOL 24	244±15	284±15	307±13	325±10	340±8	350±9	325±11
W-CHOL 18	266±6	311±5	344 ±6	371±6	383±7	397±8	376±9
W-MET 24	242±13	295±14	336±16	363±15	375±16	389±17	370±17
W-MET 18	270±3	311±3	355±5	388±6	404±5	418±6	402±7
W-ORO 24	245±17	276±16	300±17	317±17	329±16	340±15	318±17
W-ORO 18	278±3	306±5	334±8	358±9	372±10	387±9	368±11
PHHP-SLD 24	284±21	312±19	328±17	342±15	346±14	347±12	334±11
PHHP-SLD 18	288±15	312±12	318±18	332±17	337±17	340±18	323±17
PHHP-CHOL 24	297±26	322±23	339±21	355±18	362±17	367±16	324±20
PHHP-CHOL 18	291±16	315±11	334±17	350±15	354±15	359±15	343±15
PHHP-MET 24	291±15	315±12	335±19	349±18	356±17	360±15	346±17
PHHP-MET 18	291±12	290±18	324±14	338±12	344±10	350±9	331±10
PHHP-ORO 24	294±13	316±13	331±14	327±12	343±18	343±18	328±21
PHHP-ORO 18	304±15	316±14	330±18	338±20	339±19	340±18	319±19

obrázek č.1 : Tělesná hmotnost potkanů kmene Wistar:



obrázek č. 2: Tělesná hmotnost potkanů kmene PHHP



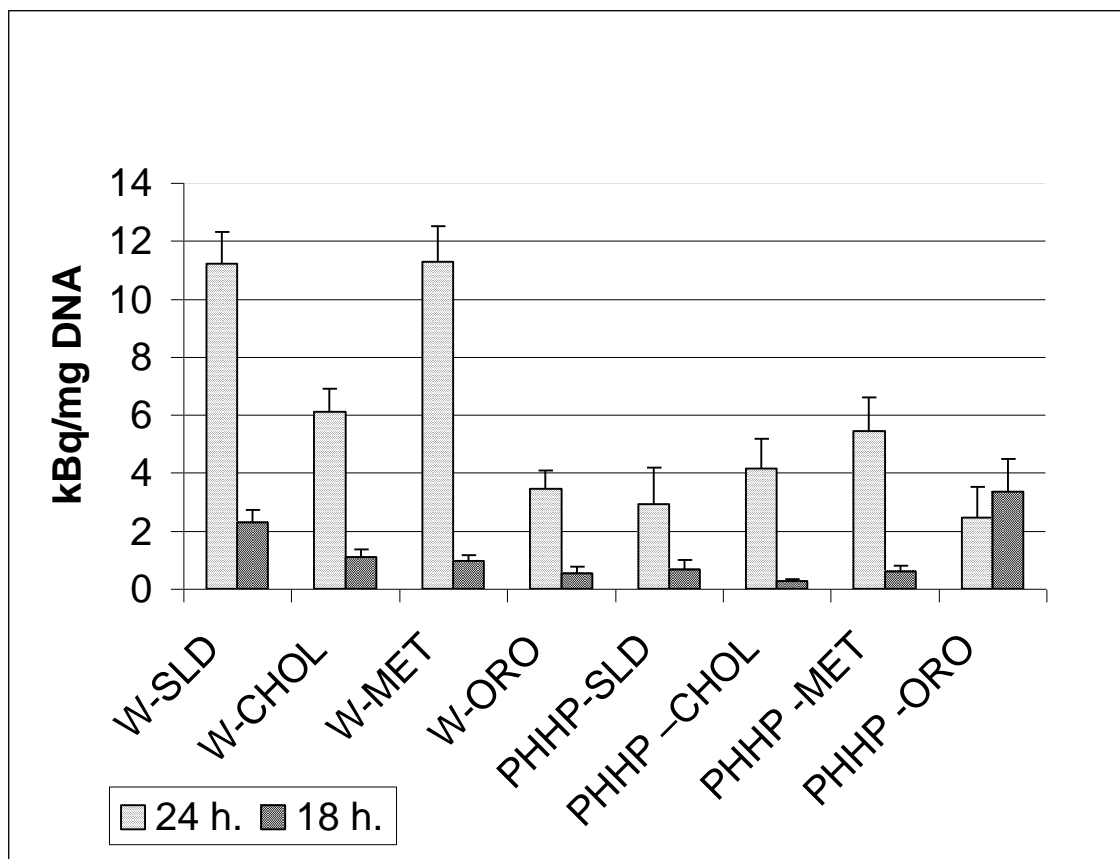
Tabulka č. 6: Spotřeba diety (g)

	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	Po PH
W-SLD 24	19,0 ± 0,9	21,0 ± 0,5	22,7 ± 1,0	23,1 ± 1,0	7,6 ± 1,0
W-SLD 18	19,4 ± 0,8	21,0 ± 0,3	21,1 ± 0,5	22,6 ± 0,8	5,4 ± 0,6
W-CHOL 24	19,3 ± 0,2	21,9 ± 0,1	23,0 ± 0,3	24,0 ± 0,3	6,2 ± 0,7
W-CHOL 18	19,3 ± 0,2	21,9 ± 0,6	21,5 ± 0,2	24,4 ± 0,6	5,1 ± 0,1
W-MET 24	24,3 ± 0,3	24,6 ± 0,8	23,7 ± 0,2	25,0 ± 0,5	9,6 ± 0,9
W-MET 18	25,0 ± 0,2	23,2 ± 1,2	24,2 ± 0,1	25,5 ± 0,7	9,0 ± 0,1
W-ORO 24	17,0 ± 0,2	19,3 ± 0,4	19,4 ± 0,4	19,5 ± 0,4	5,5 ± 0,2
WORO 18	17,4 ± 0,2	19,0 ± 1,0	21,0 ± 0,1	24,5 ± 1,1	1,9 ± 0,4
PHHP -SLD 24	20,4 ± 0,2	23,9 ± 3,1	21,5 ± 2,0	18,2 ± 0,8	4,2 ± 0,8
PHHP-SLD 18	20,3 ± 0,2	14,2 ± 0,7	16,4 ± 0,1	17,0 ± 0,1	2,9 ± 0,2
PHHP -CHOL 24	21,4 ± 0,3	19,3 ± 0,3	19,8 ± 0,6	20,1 ± 0,4	9,8 ± 0,3
PHHP-CHOL 18	21,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	17,4 ± 0,3	18,2 ± 0,3	1,7 ± 0,1
PHHP -MET 24	21,9 ± 0,5	20,5 ± 0,1	21,0 ± 0,2	19,7 ± 0,9	5,2 ± 0,4
PHHP-MET 18	20,5 ± 0,1	17,5 ± 0,7	18,1 ± 0,6	18,8 ± 0,4	4,0 ± 0,9
PHHP -ORO 24	21,1 ± 0,4	19,9 ± 0,3	19,6 ± 0,1	17,1 ± 0,1	3,7 ± 0,3
PHHP-ORO 18	16,7 ± 0,4	17,1 ± 0,5	17,1 ± 0,7	16,6 ± 0,1	3,4 ± 1,1

Tabulka č. 7: Hmotnost jaterního zbytku, s.a.DNA a c.o. DNA, <sup>14</sup>C-cholesterol v játrech po PH

	Játra (g)	s.a. DNA (kBq/mg DNA) <sup>3</sup> H thymidin	c.o. DNA (mg/g jater)	<sup>14</sup> C-cholesterol v játrech (Bq/g tkáně)
W-SLD 24	5,40 ± 0,11	11,21 ± 1,10 *	2,01 ± 0,06	1894,93 ± 402,80
W-SLD 18	5,38 ± 0,23	2,29 ± 0,44	1,87 ± 0,03	1467,43 ± 235,39
W-CHOL 24	5,97 ± 0,27	6,09 ± 0,82	1,75 ± 0,05	845,16 ± 162,72
W-CHOL 18	6,72 ± 0,41	1,11 ± 0,26	1,80 ± 0,06	1081,73 ± 159,43
W-MET 24	6,20 ± 0,47	11,27 ± 1,24*	2,07 ± 0,07•	2180,98 ± 249,67
W-MET 18	5,68 ± 0,18	0,97 ± 0,19	2,22 ± 0,08♣	2176,55 ± 340,94
W-ORO 24	7,09 ± 0,44	3,44 ± 0,64	1,42 ± 0,08•	1727,14 ± 343,23
W-ORO 18	6,74 ± 0,45	0,54 ± 0,22	1,45 ± 0,04♣	1379,26 ± 299,82
PHHP-SLD 24	4,39 ± 0,24	2,92 ± 1,27	2,01 ± 0,13♦	2219,31 ± 603,28
PHHP-SLD 18	3,93 ± 0,19	0,65 ± 0,36	1,99 ± 0,05	796,01 ± 366,32
PHHP-CHOL 24	5,70 ± 0,34	4,16 ± 1,00	1,56 ± 0,02	666,66 ± 188,36
PHHP-CHOL 18	4,85 ± 0,22	0,28 ± 0,04	1,72 ± 0,04	712,33 ± 201,43
PHHP-MET 24	4,68 ± 0,16	5,44 ± 1,17	1,85 ± 0,18	1374,70 ± 599,72
PHHP-MET 18	4,34 ± 0,16	0,59 ± 0,20	1,99 ± 0,08♥	1453,28 ± 233,67
PHHP-ORO 24	7,37 ± 0,41	2,44 ± 1,07	1,15 ± 0,09♦	1213,68 ± 401,63
PHHP-ORO 18	7,07 ± 0,41	3,35 ± 1,13	1,17 ± 0,04♥	753,54 ± 133,71

Obrázek č. 3: Syntéza jaterních DNA po PH:



Statistická významnost s.a.DNA (syntéza jaterních DNA):  $p < 0,05$ :

W-SLD 24 versus W-MET 24, W-ORO 18, PHHP-SLD 18

W-MET 24 versus W-ORO 18, PHHP-MET 18

W-CHOL 24 versus W-ORO 18, PHHP-CHOL 18

Statistická významnost c.o.DNA (celkový obsah jaterních DNA):  $p < 0,05$ :

W-SLD 24 versus PHHP-ORO 24, W-ORO 18

W-MET 24 versus PHHP-ORO 24, W-ORO 18, W-ORO 24

W-MET 18 versus PHHP-ORO 18, W-ORO 18, W-ORO 24,

PHHP-MET 18 versus PHHP-ORO 24, PHHP-ORO 18

PHHP-SLD 24 versus PHHP-ORO 24, PHHP-ORO 18

Tabulka č. 8: Stanovení <sup>14</sup>C-cholesterolu ve tkáních potkanů po PH (Bq/g tkáně):

	Krev	Játra	Slezina	Thymus
W-SLD 24	719,8±66,9	1894,9±402,8	2275,0±180,1	124,1±19,7
W-SLD 18	321,6 ±70,9	1467,4±235,4	1636,3±274,0	129,9±35,2
W-CHOL 24	426,6±73,2	845,2±162,7	1345,6±184,2	131,3±21,4
W-CHOL 18	311,5±41,9	1081,7±159,4	943,0±185,3	74,1±12,5
W-MET 24	999,8±95,1	2181,0±249,7	1791,4±269,1	199,6±25,5
W-MET 18	485,9±105,7	2176,6±340,9	1409,2 ±345,5	85,4±13,7
W-ORO 24	1033,9±167,6	1727,1±343,2	1914,0±428,0	116,8±23,3
W-ORO 18	670,1±122,0	1379,3±299,8	1470,8±329,1	85,7±15,0
PHHP -SLD 24	943,6±124,2	2219,3±603,3	2097,7±437,6	137,4±19,3
PHHP-SLD 18	414,2±129,4•	796,0±366,3	1601,5±643,7	88,3±23,6
PHHP -CHOL 24	324,4±63,9♣	666,7±188,4	1729,8±599,3	114,8±20,2
PHHP-CHOL 18	554,8±132,4	712,3±201,4	2132,9±804,2	85,4±19,4
PHHP -MET 24	1266,9±162,2	1374,7±599,7	2664,5±715,2	406,4±259,9
PHHP-MET 18	696,4±109,3	1453,3±233,6	2930,4±393,9	93,2±17,9
PHHP -ORO 24	1266,9±162,2♣	1213,7±401,6	4873,4±1254,2	161,1±36,5
PHHP-ORO 18	1096,8±105,9•	753,5±133,7	4482,9±1017,8	142,3±23,5

Statistická významnost v krvi: p<0,05

PHHP-ORO 18 v.s. WSLD 18, W-CHOL 18, PHHP-CHOL 24, PHHP-SLD 18

PHHP-ORO 24 v.s. W-SLD 18, W-CHOL 18

W-MET 24 v.s. WSLD 18

W-ORO 24 v.s. W-SLD 18

W-CHOL 18 v.s. W-MET 24

W-ORO 24 v.s. W-CHOL 18

PHHP-ORO 24 v.s. PHHP-CHOL 24

Statistická významnost v thymu (Holm-Sidak method): p<0,05:

W-MET 24 v.s. W-CHOL 18, W-MET 18, W-ORO 18

Tabulka č. 9: Stanovení <sup>14</sup>C-cholesterolu ve tkáních potkanů po PH (Bq/g tkáně):

	Střevo	Plíce	Ledviny	Srdce
W-SLD 24	2941,0±770,0	1393,2±464,3	232,9±123,7♥ ♦	442,1±56,0
W-SLD 18	1948,3±473,7	1173,0±266,4♣	150,7±21,3●	334,5±50,9
W-CHOL 24	845,4±219,0●	699,7±97,2	93,1±9,5♥	260,0±30,8
W-CHOL 18	1073,7±277,5	339,2±17,2♣	46,3±6,0	188,4±29,6
W-MET 24	4033,4±551,6●	811,1±87,6	125,5±10,7♦	479,0±36,5
W-MET 18	2762,9±498,9	660,4±115,0	110,7±16,4●	326,0±45,6
W-ORO 24	4568,4±1281,6	593,6±142,9	171,3±27,6	331,2±55,9
W-ORO 18	1895,8±448,4	513,7±97,8	136,7±25,8	312,1±58,5
PHHP -SLD 24	4827,2±1976,2	836,31±152,3	181,6±36,6	389,0±93,1
PHHP-SLD 18	8065,3±3254,9	489,2±248,0	181,7±70,9	489,2±248,0
PHHP -CHOL 24	1824,2±586,0	557,4±136,2	207,8±36,9	248,3±60,5
PHHP-CHOL 18	4157,6±1018,5	454,4±143,3	172,9±56,1	185,9±46,9
PHHP -MET 24	4333,6±1497,3	735,1±240,8	347,9±80,8	495,7±181,5
PHHP-MET 18	5288,1±657,8	633,6±134,7	604,1±395,8	307,7±75,2
PHHP -ORO 24	4048,0±1874,1	704,4±180,6	451,7±121,8	424,3±95,4
PHHP-ORO 18	5901,8±819,6	564,0±93,0	246,0±36,8	939,4±605,9

Statistická významnost ve střevě (Dunn's Method) P<0,05:

W-MET 24 v.s. W-CHOL 24, W-CHOL 18

Statistická významnost v plicích (Dunn's Method) P<0,05:

W-SLD 24 v.s. W-CHOL 18

W-SLD 18 v.s. W-CHOL 18

Statistická významnost v ledvinách (P = <0,001). (Holm-Sidak method):

W-SLD 24 v.s. W-CHOL 18, W-CHOL 24, W-MET 18, W-MET 24

W-SLD 18 v.s. W-CHOL 18

W-ORO 24 v.s. W-CHOL 18

PHHP-SLD 24 v.s. W-CHOL 18

Statistická významnost v srdci (Holm-Sidak method): (P=0,008):

W-CHOL 18 v.s. W-SLD 24

W-CHOL 18 v.s. W-MET 24

Od měření  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu v tukové tkáni bylo upuštěno, neboť hodnoty se pohybovaly velmi blízko hodnot pozadí (tj. radioaktivita prostředí: záření z radonu v podloží, kosmické záření atd.).

## 5 DISKUSE

### 5.1 METODIKY

V naší práci jsme se zaměřili na úpravu podmínek stanovení cholesterolu v tkáních a stanovení specifické aktivity DNA v biologickém materiálu.

Hlavní rozdílem obou metodik je rozpustnost stanovovaných látek v tucích a ve vodě. Scintilační roztok SLT-41 se používá ke stanovení organických látek rozpustných v tucích (stanovení cholesterolu). Naopak při stanovení specifické aktivity DNA stanovujeme organické látky (nukleové kyseliny) rozpustné ve vodě, používáme tedy scintilační roztok SLD-41.

#### 5.1.1 Stanovení cholesterolu v tkáních

Při stanovení cholesterolu v tkáních jsme kladli zvýšený důraz na důkladnou homogenizaci tkání. A to hlavně z důvodu plné výtěžnosti stanovení. Homogenizaci jsme museli provádět dostatečně dlouhou dobu, aby došlo k důkladnému rozmělnění tkání. Kdybychom v homogenátu zanechali části tkáně, snížila by se tím účinnost stanovení (z nehomogenizované tkáně bychom nezískali všechny cholesterol) a docházelo by např. k ucpávání špiček pipet těmito zbytky. U ledvin a nadledvin jsme museli ještě před homogenizací tkáně očistit odstraněním vazivových pouzder, aby nedošlo k poškození homogenizátoru tuhým vazivovým pouzdem.

Pro kvantitativní extrakci celkových lipidů, tedy jak neutrálních nitrobuněčných triacylglycerolů, tak i polárních fosfolipidů buněčných membrán, jsme použili polární etanol, který se dobře rozpouští ve vodě a velice špatně v polárních rozpouštědlech a aceton, který se bez omezení mísí s vodou a většinou organických rozpouštědel, v poměru 1:1. Směs jsme si připravili před vlastním stanovením v digestoři z důvodu toxicity unikajících par acetonu a dále ji uchovávali v lednici.

Dalšími parametry, které jsme během stanovení měnili, byla doba točení na kolotoči a doba centrifugace vzorků. Počet otáček za minutu jsme neměnili.

Pro větší účinnost extrakce celkových lipidů jsme dobu točení na kolotoči prodloužili z původních 10 minut na uvedených 15 minut a dobu centrifugace z 5 minut na 10 minut.

Při pipetování 150  $\mu$ l nasyceného vodného roztoku KOH jsme museli dbát na důkladné pipetování a to z důvodu nasycenosti roztoku. Nasycený roztok byl těžký, obtížně se pipetoval. Nasávání do špičky jsme prováděli velice pomalu s rychlým přenesením roztoku ve špičce do zkumavky. Neopatrným pipetováním bychom do vzorků přidali menší objem roztoku než by byla potřeba k úplné hydrolýze.

Při stahování horní aceton-etanolové vrstvy nesmělo dojít k promíchání obou vrstev. Došlo-li k promíchání aceton-etanolové vrstvy s homogenátem, museli jsme vzorky znovu centrifugovat po dobu 10 minut při 1500 otáčkách/minutu.

Teplotu termobloku jsme změnil z původních 50°C na 52°C, aby uvnitř termobloku byla optimální teplota k proběhnutí alkalické hydrolýzy, při které dochází k rozkladu esterů cholesterolu na cholesterol volný. Důležité bylo také pravidelné protřepávání vzorků.

Z důvodu nízkých teplot varu obou složek supernatantu (etanol=78,3°C, aceton=56°C), jsme se rozhodli vzorky před dalším zpracováním zchladit, abychom zabránili vypařování supernatantu a zkreslování výsledků. A tím jsme také snížili riziko působení toxických par acetonu při zpracovávání vzorků.

Následné točení vzorků na kolotoči jsme také prodloužili z původních 10 minut na 15 minut a dobu centrifugace z 5 minut na 10 minut a to z důvodu účinnější extrakce cholesterolu.

Při odebírání horní organické vrstvy toluenu a částečně acetonu opět nesmělo dojít k promísení vrstev, jinak jsme museli vzorky znovu stočit při 1500 otáčkách/minutu po dobu 10 minut.

### **5.1.2 Stanovení specifické aktivity DNA v biologickém materiálu**

Zvýšenou pozornost jsme opět věnovali důkladné homogenizaci. Tedy, aby probíhala dostatečně dlouhou dobu, aby byla dokonalá a nezbyli nám ve vzorku části tkáni, které by snížili výtěžnost stanovení.

Během vypracovávání této metody jsme při centrifugaci změnili čas centrifugace i rychlost otáček. Čas jsme prodloužili z původních 10 minut na 15 minut a rychlost otáček z původních 3000 na 3300 otáček za minutu a tím jsme docílili bezezbytkového sedimentování homogenátu. V dalších krocích metodiky jsme již změny neprováděli (čas a rychlost centrifugace zůstal konstantní během celého stanovení).

Teplotu, na kterou byl vyhřátý termoblok, jsme zvýšili z původních 70°C na 72°C. Opět z důvodu nastavení optimální teploty uvnitř zkumavek v termobloku. Dobu hydrolýzy jsme prodloužili z 30 minut na 45 minut, aby hydrolýza probíhala dostatečně dlouhou dobu a byla úplná. Pro důkladnou hydrolýzu jsme vzorky také pravidelně promíchávali.

### **5.1.3 Opakované stanovení <sup>14</sup>C-cholesterolu v játrech potkanů po PH**

Tabulka č. 10: Stanovení <sup>14</sup>C-cholesterolu v játrech za různých podmínek:

Číslo potkana	1. sloupec (dpm)	2. sloupec (dpm)	3. sloupec (dpm)
52	133,95	169,06	193,47
65	7297,94	8672,69	8937,21
66	34,46	266,55	277,58
83	900,84	584,40	556,98
97	222,08	183,3	153,7
99	7872,63	8452,78	8503,00
113	23,82	135,89	118,03
pozadí	22,30	18,60	27,45

V 1.sloupci jsou hodnoty bez chlazení vzorků. Ve 2.sloupci jsou aktivity vzorků s chlazením a okamžitým měření po ukončení práce (vzorky mohou být zakalené příměsí látek hydrofilních, které způsobují opalescenci). Ve 3.sloupci jsou aktivity vzorků po 24 hodinách stání a následné změření (tytéž vzorky ze sloupce 2.).

Falešně nízké hodnoty vzorků č. 66 a 113 byly lépe analyzovány po zpřesnění metodiky (dobrá homogenizace vzorku, chlazení roztoků). Ostatní měření byla vždy prováděna až za 24 hodin po zpracování.

#### **5.1.4 Rozdíly hodnot měření v závislosti na uplynulém čase od provedení analytické práce**

Pro porovnání aktivit  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu a  $^3\text{H}$ -thymidinu v závislosti na čase používáme LumEx. LumEx je indikátor chemiluminiscence, tedy naměřené impulsy nejsou původem z radioizotopu, ale pocházejí z prostředí. Za jeden a více dní klesá LumEx. Jeho pokles svědčí o „vyčerení roztoku“, tím nastává lepší situace pro čítání scintilačních záblesků. Nesmí se pohybovat na 5 až 10%.

Tabulka č. 11: Aktivity  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu a  $^3\text{H}$ -thymidinu v závislosti na čase:

Den zpracování materiálu				Následující den			
Číslo vzorku	3H dpm	14C dpm	LumEx (%)	Číslo vzorku	3H dpm	14C dpm	LumEx (%)
1	2010,43	1139,17	54,88	1	2035,85	1141,30	9,69
2	6610,38	1576,67	20,63	2	6482,78	1597,44	0,48
3	2553,46	492,55	36,53	3	2504,63	528,74	1,14
4	5832,96	745,34	14,71	4	5787,10	724,12	0,31
5	5758,57	2418,15	4,64	5	5597,00	2405,16	0,09
6	7071,74	2027,57	2,43	6	7102,49	2022,58	0,02
7	5170,84	1006,86	5,68	7	5368,91	1092,32	0,10
8	6627,38	954,61	0,64	8	6814,83	906,62	0,10
Pozadí 1	20,75	32,71	6,51	Pozadí 1	18,87	28,81	0,37
Pozadí 2	29,61	27,33	21,76	Pozadí 2	21,99	24,00	1,09

#### **5.1.5 Vyhodnocení výsledků podle měření na různých kanálech přístroje Beckman LS 6000 LL.**

Měření na přístroji s využitím kanálu pro jeden izotop nebo kanálu pro oba izotopy.

První sloupec-měření stejných vzorků bez přidání interního standardu, tedy na kanále, který měří pouze  $^{14}\text{C}$  izotopy.

Druhý sloupec-měření stejných vzorků s přidáním interního standardu na dvou kanálech, které měří oba izotopy najednou.

Tabulka č. 12: Hodnoty naměřené před přidáním interní standardy ( $^3\text{H}$ -cholesterol) a po ní:

	Měření bez IS Využití jednoho kanálu pro $^{14}\text{C}$ izotopy	Měření s IS Využití dvou kanálů pro $^3\text{H}$ a $^{14}\text{C}$ izotopy
Číslo vzorku	$^{14}\text{C}$ -cholesterol	$^{14}\text{C}$ - cholesterol
	$^{14}\text{C}$ -dpm	$^{14}\text{C}$ -dpm
1	1396,92	1597,44
2	720,02	724,12
3	2017,74	2405,16
4	1092,95	1092,32
5	1305,71	906,62

Z výsledků je patrné, že rozdíly měření jsou nevýznamné. Vzorky jsme museli měřit s využitím programu pro oba kanály najednou, neboť bychom do výsledků zanesli chybu (přístroj by neodečetl scintilace vzniklé po  $^3\text{H}$ -thymidinu).

V pokusu jsme nemohli použít  $^3\text{H}$ -cholesterol jako vnitřní standard, neboť jsme potkanům podávali  $^3\text{H}$ -thymidin na prokázání syntézy jaterních DNA.

Museli jsme měřit na obou kanálech (tedy jak pro  $^3\text{H}$  izotopy, tak i pro  $^{14}\text{C}$  izotopy), ale dále jsme pracovali s impulsy (číslky) získanými z kanálu  $^{14}\text{C}$ .

### **5.1.6 Vyhodnocení chyby metodiky s ohledem na ztráty analytu.**

Vzorky tkáně s přidáním interním standardem ( $^3\text{H}$ -cholesterol) nám pomohou vyjádřit chybu metodiky.

Do homogenátů vzorků byl na začátku zpracování přidán  $^3\text{H}$ -cholesterol (IS-interní standard) ve výchozí aktivitě 14 933 dpm a změřeny impulzy (viz. Tabulka č. 13). Zpracováním materiálu dochází ke ztrátám cholesterolu (jak neznačeného, tak značeného  $^{14}\text{C}$  i  $^3\text{H}$  izotopem).

Po přepočtu se dá zjistit procento ztrát cholesterolu metodikou a dopočítat výchozí hodnotu  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu.

Výpočet procenta účinnosti metodiky s využitím vnitřního standardu: naměřená aktivita/výchozí aktivita x 100 (%).

Dopočet k <sup>14</sup>C-cholesterolu: naměřená hodnota x spočítaná procenta se dopočítají do 100 procent.

Tabulka č. 13: Měření specifické aktivity s IS a bez IS:

	Měření s IS	IS	výpočet	Dopočet	Dopočet
Číslo vzorku	<sup>14</sup> C- cholesterol (dpm)	<sup>3</sup> H-cholesterol (dpm)	%	<sup>14</sup> C-cholesterol bez IS (dpm)	<sup>14</sup> C-cholesterol s IS (dpm)
1	1597,44	6482,78	43	3248,651	3714,97
2	724,12	5787,10	39	1846,205	1856,71
3	2405,16	5597,00	38	5309,842	6329,36
4	1092,32	5368,91	36	3035,972	3034,22
5	906,62	6814,83	46	2838,5	1970,91

Víme, že z biologického materiálu získáme asi 38% až 46% původního obsahu cholesterolu, což je v souladu s literaturou.

### 5.1.7 Opakované zpracování vzorků

Tabulka č. 14: Hodnoty získané zpracováním jednoho vzorku potkana:

Číslo potkana	14C-dpm	
1	<b>játra</b>	<b>krev</b>
	3744,26	5348,13
	4276,91	5232,56
	4219,22	5332,27
	4260,89	4917,52
	3681,00	5153,40
2	3492,33	4022,88
	3242,76	3691,70
	3765,30	4003,68
	3246,52	4129,74
	3419,43	4053,71

Metodikou získáváme sice relativní hodnoty, ale dostatečně homogenní.

## **5.2 VÝSLEDNÉ HODNOTY**

### **5.2.1 Aktivity <sup>14</sup>C-cholesterol v játrech**

U potkanů obou kmenů krmených dietou CHOL došlo k rychlejšímu obratu exogenního cholesterolu a jeho odbourávání do žlučových kyselin s maximem 24 hodin po PH.

Naopak u potkanů živených dietou MCDD byl exogenně podaný cholesterol využíván a zabudován do jaterní tkáně s maximem kolem 18. hodiny po PH. Nejspíše byl využit jako stavební komponenta nově tvořených organel a buněčných stěn.

### **5.2.2 Aktivity <sup>14</sup>C-cholesterol v krvi**

U potkanů obou kmenů krmených CHOL dietou byla aktivita exogenně podaného cholesterolu nižší než u ostatních skupin, což opět svědčí o jeho rychlém odsunu z plazmy do orgánů, nejvíce do jater.

### **5.2.3 Koncentrace celkového cholesterol v séru**

Cholesterol v séru byl nejvíce zvýšen u potkanů PHHP živených dietou CHOL což je v souladu s literaturou. Ale též u kmene Wistar po krmení dietou CHOL byly sérové koncentrace cholesterolu vyšší než u ostatních skupin.

Po provedení PH došlo u všech potkanů k poklesu cholesterolu, kromě potkanů živených ORO, u kterých byl nevýznamný nárůst.

### **5.2.4 Specifická aktivita jaterních DNA**

Ve srovnání s kontrolní skupinou Wistar byla regenerace jater zpožděna u skupiny W-MCDD, u potkanů W-CHOL snížena a u skupiny W-ORO byla snížena ještě výrazněji.

Potkani kmene PHHP všech skupin měli nižší regenerační schopnosti ve srovnání s potkany kmene Wistar. U potkanů PHHP se neprojevil negativně vliv vysokocholesterolové ani MCDD diety na regenerační schopnost jater. Vyšší

syntéza jaterních DNA byla zjištěna u skupiny PPHP-ORO již 18 hodin po PH, což svědčí o trvalém poškození jaterní tkáně vedoucí k reparačním procesům už v intaktních játrech (vzhledem k sérovým hodnotám jaterních enzymů před PH). U této skupiny byly regenerační děje již spuštěny. Po provedení PH bychom mohli mylně hodnotit vliv této diety na regenerační děje jako pozitivní.

Podávání diety CHOL i ORO vedlo k jaterní steatóze, což se kromě jiného projevilo v nárůstu hmotnosti jater, tedy i zbytku po PH.

### **5.3 STEATÓZA A REGENERACE**

Vliv steatózy jater na jejich regeneraci byl zkoumán mnoha autory. Navzdory faktům, že jaterní steatóza je spjata s častějším výskytem dysfunkce štěpu po jaterní transplantaci (*Todo*, 1982; *Adam*, 1991; *D'Allessandro*, 1991), mortalitou a morbiditou po jaterní resekcí, jsou data vztahující se k vlastnostem steatických jater regenerovat po PH stále vzácná a protichůdná. Regenerace je základní odpověď jater na poranění. Po resekcí 70% jaterní tkáně u potkanů zbývající hepatocyty proliferují, aby zrekonstruovaly jaterní tkáň během 10 dní (*Lieber*, 1994). Klidové hepatocyty vstupují do G<sub>1</sub> fáze, a pak postupují buněčným cyklem. Vzrůstající hepatocytární DNA syntéza je detekovatelná po 18 hodinách a vrcholu dosahuje okolo 24 hodin po PH (*Zhang a spol.*, 1999).

Regenerace jater potkanů po PH byla pozorována ve dvou krocích. První krok se týkal mitózy hepatocytů a druhý krok dělení hypertrofovaných hepatocytů se dvěma jádry. Oba tyto kroky regenerace byly doprovázeny hypocholesterolémií a poklesem aktivity esterifikace cholesterolu v krevním séru. Pomocí aktivace mitózy a časného dělení buněk se dvěma jádry, dochází ke stimulaci proliferace hepatocytů a zrychlení regenerace jaterní tkáně. Ve stejném čase byla v cirkulaci detekována nejvyšší regenerace systému esterifikujícího cholesterol (*Konevalova*, 1989).

### Skupina 2 živená vysokocholesterolovou dietou

Potkani živení dietou obohacenou o cholesterol měli větší spotřebu diety a zároveň nejvyšší hmotnostní přírůstky. Byla u nich zjištěna vyšší syntéza jaterních DNA, přičemž celkový obsah jaterních DNA byl nižší ve srovnání s kontrolami. Lze se domnívat, že jaterní tkáň byla vysokocholesterolovou dietou poškozována a nucena trvale k reparaci, stav byl dále provázen hepatosplenomegalií a jaterní steatózou.

Potkani, jejichž hypercholesterolémie vznikla nadměrným příjmem cholesterolu v dietě, odpověděli na tento stav okamžitou změnou metabolismu. Došlo k poklesu syntézy v hepatocytu a nárůstu fekální exkrece žlučových kyselin (*Sakoko M, 1996*), hlavně Kupfferovými buňkami (*Hoekstra M, 2005*). Touto dietou také vzrostlo množství enzymů biosyntézy žlučových kyselin (*Chen W, 2005*).

Některé experimenty se týkaly vlivu transplantace jater na hypercholesterolémii. Familiární hypercholesterolémie v homozygotní podobě vede s frekvencí 1:1 000 000 obyvatel k prvním projevům klinických komplikací již v první dekádě života. Nositelé obou defektních alel pro apoproteinové B100 a E-receptory se nedožívají 20. roku života. Ke studiu autoři použili PPHP (viz. Kap. 2) u nichž provedli transplantaci jater. V pooperační době hladina celkového cholesterolu signifikantně klesla z 4,46 mmol/l $\pm$ 1,24 na 2,24 mmol/l $\pm$ 0,98. Autoři prokázali, že transplantace jater je z této indikace účinnou terapeutickou metodou (*M.Ryska a spol.,2002*)

### Skupina 3 živená MCDD dietou

Potkani živení dietou s nedostatkem methioninu a cholinu měli sice nejvyšší spotřebu diety, což však nebylo provázeno adekvátním nárůstem tělesné hmotnosti.

Cholin deficitní dieta má na následek steatózu jater způsobující změny fosfolipidové membrány endoplazmatického retikula a jiných organel jaterní buňky (*Degertekin, 1986*). Pod vlivem diety došlo též ke zvýšení jaterní syntézy DNA, což svědčí o faktu, že intaktní játra byla mírně poškozována dietou, neboť cholin deficiencie způsobuje nejenom ztukovatění jater, ale také vzestup množství 1,2-diacylglycerolu v játrech a jaterní poškození (*da Costa et al. 1993*). 1,2-diacylglycerol, ne 1,3-diacylglycerol, je druhý lipidový posel v buňce a silný

aktivátor proteinkinázy C, který zahrnuje buněčný růst, akceleraci růstu tumorů a diferenciaci buněčné smrti (*Nakamura 1995*).

Methion ukázal, že zvyšuje koncentraci cholesterolu v plazmě, v lipoproteinech a v játrech u potkanů, a má sklon ke zvýšení plazmové koncentrace homocysteinu u potkanů ( $P=0,058$ ). Mírný nadbytek, ale i významný nedostatek homocysteinu, jehož prekurzorem je právě methionin, má negativní efekt na kardiovaskulární systém. (*Hirche F, 2006*).

Z předchozího vyplývá, že v séru potkanů živených dietou MCDD byly zvýšené hodnoty triacylglycerolů, ale došlo spíše ke snížení koncentrací cholesterolu celkového i HDL a LDL cholesterolu.

Nástup regenerace byl odsunut, ale játra přesto regenerovala (*Rao MS, 2001*).

#### Skupina 4 živená dietou s vyšším obsahem kyseliny orotové

U potkanů živených touto dietou byla nejnižší spotřeba diety provázená též nejmenším nárůstem tělesné hmotnosti. Při hromadění lipidů v játrech vlivem diety s kyselinou orotovou, došlo k poklesu transportu triacylglycerolů s VLDL lipoproteiny z jater do séra (*Hebbachi AM, 1997*). V našem experimentu se tento stav projevil nálezem nižšího celkového obsahu DNA v játrech. Kyselina orotová přidaná do diety způsobuje hromadění celkových lipidů, triacylglycerolů, 1,2-diacylglycerolů a fosfolipidů v játrech (*Aoyama, 2001*). Tato dieta významně zvyšuje množství enzymů limitujících rychlost syntézy triacylglycerolů (*Buang, 2005*), způsobuje lipidovou infiltraci stimulací intrahepatické lipidové syntézy a zabráněním lipoproteinového transportu přes Golgiho aparát. Dieta vede k značnému ukládání jaterních triacylglycerolů a volných mastných kyselin (*Su, 2005*). U potkanů krmených kaseinovou dietou s kys. orotovou byly zvýšeny hlavně 1,2-diacylglyceroly a fosfolipidy (*Aoyama et al. 2001*). Další efekt kyseliny orotové je ve zvyšování úrovně superoxidového anionu v játrech, v poklesu jaterní superoxid dismutasy, následované jaterním poškozením (*Aoyama et al., 2001*). In vitro hepatocyty z potkanů krmených kyselinou orotovou mají významně nižší poměr intracelulární TAG lipolýzy, reesterifikace a sekreci VLDL (*Hebbachi, 1997*). Z výše zmíněných výsledků ostatních autorů vyplývá, že kyselina orotová poškozuje jaterní tkáň, která reaguje zvýšenou mitotickou aktivitou, tedy vyšší

syntézou jaterních DNA. Potkani živení dietou obohacenou o kyselinu orotovou měli výrazně nižší hmotnost nadledvin než potkani ostatních skupin. Toto zjištění potvrzuje, že byla v játrech zablokována tvorba steroidů (Su, 2005). S efektem kyseliny orotové úzce souvisí nálezy koncentrací cholesterolu i ostatních tuků v séru, tedy nízké koncentrace triglyceridů, HDL-cholesterolu i LDL-cholesterolu. U potkanů živených dietou s kyselinou orotovou v séru ve srovnání s kontrolami nejvíce vzrostla koncentrace inzulínu i glykémie, naopak poklesla koncentrace leptinu. Lze předpokládat, že se organismus snažil podpořit reparační a regenerační procesy v játrech právě vlivem inzulínu. Současně nebyly nižší koncentrací leptinu podpořeny regenerační procesy jater. Leptin má stimulační efekt na proliferaci a proteinovou syntézu jaterních buněk (Lamošová a Zeman, 2001), selektivně snižuje tělesný tuk, podporuje vliv inzulínu na periferní absorpci glukózy, na jaterní produkci glukózy a moduluje genovou expresi klíčových jaterních enzymů (Barzilai, 1997). Dlouhodobé zvýšení leptinu má za následek změny ve snadnějším uskladnění energie do glykogenu a omezení zásob tuků (Barzilai, 1997). Zablokováním výdeje tuků z jater se nemohl uplatnit synergický efekt leptinu a inzulínu.

Některé studie se zabývaly rozdílem mezi nealkoholickou steatohepatitidou (NASH) a alkoholickou steatohepatitidou. NASH je jaterní onemocnění podobné alkoholovému jaternímu onemocnění v morfologii, tudíž mohou sdílet i podobné patologické mechanismy. Protože přímé účinky alkoholu na jaterní regeneraci již byly vysvětleny, zabývala se studie spíše tím, zda steatohepatitida samotná souvisí se zhoršením proliferace buněk (Zhang a spol., 1999). Přestože molekulární mechanismus, kterým alkohol inhibuje regeneraci není definován, několik důkazů ukazuje, že změny ve složení lipidové membrány po dlouhodobém přijímání alkoholu, jsou spjaty se zhoršením jaterní regenerace (Liber, 1994) způsobené pravděpodobně toxickým efektem alkoholu spíše než následek steatohepatitidy. Tento názor je podpořen experimentálními studiemi, ve kterým alkohol přímo působí na proliferaci jaterních buněk (Zhang a spol., 1996, 1997; Carter, 1988; Saso, 1996). Bylo zkoumáno, zda PH stimuluje jaterní regeneraci u potkanů se steatohepatitidou vytvořenou podáváním methion a cholin deficitní diety (MCDD) *ad libitum*. Zvířata byla krmena touto dietou po dobu 4 týdnů, poté

následovala PH (68%). Rozsah regenerace byl určen 24 hodin po PH použitím <sup>3</sup>H-thymidinu, který se inkorporoval do DNA při obnově jaterní buňky. Ve studii bylo ukázáno, že NASH nemění regeneraci u nutričních modelů potkanů se steatohepatitidou vytvořenou MCDD. U potkanů v této studii jsou hlavními znaky poškození jater makrovezikulární steatóza a ložisková zánětlivá infiltrace přednostně v acinární zóně 3 (Weltman, 1996).

V další studii byly použity tři různé modely potkanů stejného věku se steatózou, kteří byly zkoumáni za stejných experimentálních podmínek: obézní „Zucker“ potkani, Wistar potkani krmeni dietou obohacenou 5% kyselinou orotovou a Wistar potkani krmeni MCDD (Picard a spol., 2002). Homozygotní „Zucker“ potkani jsou rezistentní na hlavní účinky leptinu. Proto se u nich vyvinula těžká obezita, hyperlipidemie, *diabetes mellitus* a steatóza jater jako následek zvýšeného příjmu potravy a redukované spotřeby energie. Cholin je nezbytný k vytváření fosfatidylcholinu, esenciálního pro produkci VLDL v buněčné membráně. Absence cholinu v dietě znemožňuje tvorbu VLDL hepatocyty, tím poškozuje exocytózu triacylglycerolů a tak indukuje akumulaci triacylglycerolů (Nakano a spol., 1997). U MCDD potkanů kmene Wistar se vyvinula makrovezikulární steatóza, zánětlivá infiltrace a fibróza, napodobující NASH (Zhang a spol., 1984). Cholinová deficience je u potkanů známa jako hepatokarcinogen, proto byl vyšetřován také třetí model potkanů kmene Wistar krměných dietou s přídávkem kyseliny orotové. Kyselina orotová u potkanů způsobuje difúzní mikrovezikulární steatózu (Harden, 1984; Creasey, 1961; Novikoff, 1966; Durschlag, 1980), pravděpodobně s mitochondriálním poškozením a s tím souvisejícím zhoršením mitochondriální oxidace mastných kyselin. Autoři proliferaci hepatocytů hodnotili za 24 hodin po PH. Tento časový bod odpovídá u potkanů vrcholu syntézy DNA a vrcholu CDK-2 aktivity v jádře (Jaumot, 1999; Pujol, 2000; Stärkel, 2001). CDK-2 tvoří komplex s regulační podjednotkou, cyklinem E. Aktivace tohoto komplexu v pozdní G<sub>1</sub> fázi je nezbytná k přechodu z G<sub>1</sub> do S fáze a pro syntézu DNA (Novikoff, 1966; Pujol, 2000; Ehrenfried, 1997; Loyer, 1997; Nelsen, 2001). DNA aktivace začíná uprostřed G<sub>1</sub> fáze a probíhá skrz pozdní G<sub>1</sub> a S-fázi. Posledním vyšetřovaným faktorem je BrdU (bromodeoxyuridin), analog thymidinu, který se inkorporuje do nově syntetizované DNA v replikujících se buňkách (S fáze). Časnější faktory jako je IL-6, nebyly

měřeny, protože se ukázalo, že jsou nespecifickou časnou odpovědí na proliferační stimul a nepředvídají budoucí proliferaci hepatocytů (Stärkel, 1999). Experimenty ukázaly u homozygotních „Zucker“ potkanů významný pokles v restituci jaterní tkáně, mitotického indexu, ale ne BrdU ve srovnání s štíhlými heterozygotními „Zucker“ potkany. Byl zde sklon směrem k nižší CDK-2 kinázové aktivitě u steatických „Zucker“ potkanů, což způsobuje blokaci přechodu G<sub>1</sub> a S-fáze. Nižší CDK-2 kinázová aktivita mohla být buď důsledek chyb v utváření komplexů mezi dvěma proteiny, nebo přenosu těchto komplexů do jádra. Všechna tato data a data dalších autorů (Selzner a spol., 2000), kterými bylo prokázáno, že obézní homozygotní „Zucker“ potkani měli známky zhoršení jaterní regenerace, předpokládají zhoršení jaterní regenerace po PH u obézních „Zucker“ potkanů, ve srovnání s štíhlými, heterozygotními kontrolami. Pozorování u dalších dvou sledovaných modelů se steatózou byli víceméně rozdílné (Picard a spol., 2002). Restituce jaterní tkáně, mitotický index, DNA syntéza měřená pomocí BrdU značícího indexu a PCNA Western blotting, nebyly významně rozdílné u potkanů krmených dietou obohacenou kyselinou orotovou, MCDD a kontrolou (Picard a spol., 2002).

Někteří autoři měřili BrdU index a mitotický index po PH u myší se steatózou (Rao a spol., 2000), vyšetřovali inkorporaci <sup>3</sup>H-thymidinu a restituci jaterní tkáně (Zhang a spol., 1999) nebo měřili DNA syntézu a mitózu po PH u MCDD krmených potkanů (Rhao a spol., 2001). Všechna tato data předpokládají, že steatóza není nezbytně spojená s nižším regeneračním potenciálem. Proto tedy některé specifické faktory odpovědné nebo spojené se steatózou u obézních „Zucker“ potkanů mohou být zahrnuty do jaterní regenerace.

Jako důsledek nedostatku leptinových receptorů, mohou mít obézní „Zucker“ potkani mnoho metabolických abnormalit včetně hyperglykémie, hyperinzulinémie, inzulínové rezistence a hyperlipidémie. Všechny tyto abnormality mohou mít nepřímý negativní efekt na hepatocytární proliferaci (Kaplan, 1998; Cohen, 1996; Muller, 1997; Sivitz, 1997; Kamohara, 1997). Zhoršený glukózový transport do hepatocytů může připravit játra o energii nezbytnou pro anabolické procesy v buněčné proliferaci. Navíc může zvýšená

glukoneogeneze redukovat dostupnost aminokyselin pro masivní syntézu proteinů požadovanou po PH.

Dalším nálezem této studie je, že heterozygotní „Zucker“ potkani mají zvýšenou jaterní regeneraci (vysoký mitotický index) ve srovnání s kontrolními potkany kmene Wistar. Rozdíl u BrdU indexu nebyl významný stejně tak jako cyklin E a CDK-2 proteinová exprese. Vyšší byla CDK-2 kinázová aktivita u heterozygotních „Zucker“ potkanů než u kontroly, pravděpodobně z důvodu rychlejšího přechodu do S-fáze a průběhu mitotického cyklu (*Picard a spol, 2002*).

Ze studie vyplývá, že steatóza sama o sobě nezhoršuje jaterní regenerační kapacitu potkanů po PH. Deficit jaterní regenerace pozorovaný u obézních „Zucker“ potkanů by mohl být důsledkem ostatních faktorů než jen tukové infiltrace tkáně. Pravděpodobně se změny týkají absence leptinového receptoru (*Picard a spol, 2002*).

## 6 ZÁVĚR

V naší práci jsme se zaměřili na úpravu podmínek a optimalizaci stanovení cholesterolu v tkáních a stanovení specifické aktivity DNA v biologickém materiálu.

K experimentu jsme použili dva druhy laboratorních potkanů-potkany kmene Wistar a Pražské hereditární hypecholesterolemické potkany. Zvířata byla rozdělena do skupin a krmena různými typy diet. 28. den trvání experimentu byla provedena částečná hepatektomie. Poté jsme zvířatům podali  $^{14}\text{C}$ -cholesterol pro stanovení cholesterolu ve tkáních a  $^3\text{H}$ -thymidin pro stanovení specifické aktivity DNA v biologickém materiálu. Po usmrcení zvířat vykrvácením z bifurkace břišní aorty byly veškeré jejich orgány a krevní sérum zamrazeny a použity při následujících stanoveních.

Při stanovení cholesterolu v tkáních jsme kladli důraz na zkvalitnění homogenizace tkání. Prodloužením doby centrifugace a točením na rotační třepačce jsme zvýšili výtěžnost analytu. Upravili jsme teplotu termobloku, aby hydrolyza proběhla úplně. Lepších výsledků jsme dosáhli chlazením vzorků po vyjmutí z termobloku před jejich dalším zpracováním.

Při stanovení specifické aktivity v biologickém materiálu jsme také kladli důraz na homogenizaci, u centrifugace jsme upravili nejen dobu, ale i rychlost otáček. Hydrolyzu jsme zkvalitnili správným temperováním termobloku a prodloužením času hydrolyzy.

Pro měření  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu jsme museli použít SLT-41, protože stanovujeme radionuklid rozpustný v tucích. Opakovaným měřením vzorků s izolovaným  $^{14}\text{C}$ -cholesterolem jsme zjistili, že nejpřesnější bylo měření vzorků po 24-hodinovém stání. To jsme potvrdili měřením LumEx, který byl minimální za 24 hodin po provedení analytické práce. Vyhodnocením výsledků po měření na různých kanálech přístroje Beckman LS 6000 LL jsme zjistili, že při měření na jednom kanále je účinnost vyšší než při měření na dvou kanálech, ale rozdíl není významný. Z důvodu přítomnosti  $^3\text{H}$ -thymidinu v jaterní tkáni jsme  $^{14}\text{C}$ -cholesterol měřili programem, který měří zároveň oba kanály.

Závěrem lze říci, že zdokonalením postupu stanovení cholesterolu v tkáních a jeho dodržováním získáme asi 38-46% původního obsahu cholesterolu.

V dalších pracích souvisejících s touto studií byly vyhodnoceny výsledky jednotlivých stanovení. Zabývali se vlivem jednotlivých typů diet na rychlost obratu exogenně podávaného cholesterolu a regenerační schopnosti steatických jater, jejichž poškození bylo vyvoláno právě těmito dietami. Získané výsledky byly porovnány s výsledky obdobných studií různých autorů a prodiskutovány.

## 7 ZDROJE A LITERATURA

1. Adam R., M. Reynes, M. Johann, M. Morino, I. Astarcioglu, I. Kafetzis et al., The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc* 23, **1991**, 1538–1540
2. Barzilai N, Wang J, Massillon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest.*, **1997** Dec 15;100(12):3105-10.
3. Befekadu G., Kovar J., Poledne R., High sensitivity of PHHC rat to dietary cholesterol. *Physiol Res.* **1992**;41:263
4. Carter EA & Wands JR. Ethanol-induced inhibition of liver cell function. I. Effect of ethanol on hormone-stimulated hepatocyte DNA synthesis and the role of ethanol metabolism. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **1988**; 14: 555–62.
5. Cohen B., D. Novick and M. Rubinstein , Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274 (**1996**), 1185–1188
6. Creasey W.A., L. Hankin and R.E. Handschumacher , Fatty livers induced by orotic acid. I. Accumulation and metabolism of lipids. *J Biol Chem* 236 (**1961**), 2064–2069.
7. da Costa KA, Cochary EF, Blusztajn JK, Garner SC, Zeisel SH. Accumulation of 1,2-sn-diradylglycerol with increased membrane-associated protein kinase C may be the mechanism for spontaneous hepatocarcinogenesis in Chopine deficient rats. *J Biol Chem.* **1993** Jan 25;268(3):2100-5.
8. D'Allessandro AM., Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, et al. The predictive value of donor liver biopsies on the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* **1991**; 23, 1536–1537
9. Duchoň, *Lékařská chemie a biochemie*, **1982**
10. Durschlag R.P. and J.L. Robinson , Orotic acid induced metabolic changes in rat. *J Nutr* 110 (**1980**), 816–821
11. Ehrenfried J.A., T.C. Ko, E.A. Thompson and B.M. Evers , Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery* 122 (**1997**), 927–935.
12. Ehrmann J., Schneiderka P., *Játra a alkohol*, Grada, **2006**

13. Harden K.K. and J.L. Robinson , Hypocholesteremia induced by orotic acid: dietary effects and species specificity. *J Nutr* 114 (**1984**), 411–421.
14. Harperová-Biochemie, H&H, **2002**
15. Jaumot M., J.M. Estanyol, J. Serratosa, N. Agell and O. Bachs , Activation of cdk4 and cdk2 during rat liver regeneration is associated with intranuclear rearrangements of cyclin-cdk complexes. *Hepatology* 29 (**1999**), 385–395
16. Kamohara S., R. Burcelin, J.L. Halaas, J.M. Friedman and M.J. Charron , Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* **1997**;389, 374–377
17. Kaplan LM. Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterol* **1998**; 115, 997–1001
18. Lázniček Milan, Komárek Pavel : *Základy radiofarmacie*, Karolinum, **1998**
19. Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterol* **1994**;14:1085–105.
20. Loyer P, D. Glaise, S. Cariou, G. Baffet, L. Meijer and C. Guguen-Guillouzo, Expression and activation of cdks (1 and 2) and cyclins in the cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* 269 (**1994**), 2491–2500
21. Miller G., J. Ertl, M. Gerl and G. Preibisch , Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 272 (**1997**), 10585–10593.
22. Nakae D. Endogenous liver carcinogenesis in the rat. *Pathol Int* **1999**;49:1028-1042
23. Nakamura S, Nishizuka Y. Lipid mediators and protein kinase C activation for the intracellular signaling network. *J Biochem (Tokyo)*. **1994** Jun;115(6):1029-34.
24. Nakano H, H. Nagasaki, A. Barama, K. Boudjema, D. Jaeck, K. Kumada et al., The effects of N-acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine-deficient diet. *Hepatology* 26 (**1997**), 670–678.
25. Nelsen C.J., L.K. Hansen, D.G. Rickheim, C. Chen, M.W. Stanley, W. Krek et al., Induction of hepatocyte proliferation and liver hyperplasia by the targeted expression of cyclin E and skp2. *Oncogene* 20 (**2001**), 1825–1831

26. Novikoff A.B., P.S. Roheim and N. Quintana , Changes in rat liver cells induced by orotic acid feeding. *Lab Invest* 15 (**1966**), 27–49.
27. Picard C, Lambotte L, Starkel P, Sempoux C, Saliez A, Van den Berge V, Horsmans Y: Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats, *J. Hepatol*, **2002**; 36(5): 645
28. Pujol M. J., M. Jaime, J. Serratos, M. Jaumot, N. Agell and O. Bachs , Differential association of p21Cip1 and p27Kip1 with cyclin E-CDK2 during rat liver regeneration. *J Hepatol* 33 (**2000**), 266–274
29. Racek J.: *Klinická biochemie*, Galén, **1999**
30. Rao MS. and JK Reddy. The effect of microvesicular fatty change on liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 47 (**2000**), 912–915
31. Rao MS, Papreddy K, Abecassis KM, Hashimoto T. Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* 46 (**2001**), 1821–1826
32. Rifai N., G.R. Warnick (Eds.): *Laboratory measurements of lipids, lipoproteins and apolipoproteins*. AACC Press Washington, **1994**
33. Ryska M, Pantoflíček T, Lipár K, Poledne R. Transplantace jater pro hypercholesterolemii v experimentu, *Čes. a Slov. Gastroent a hepatol.*, 56, **2002**, 100-103
34. Saso K, Higashi K, Nomura Tet al. Inhibitory effect of ethanol on hepatocyte growth factor-induced DNA synthesis and Ca<sup>2+</sup> mobilization in rat hepatocytes. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **1996**; 14: A330–4.
35. Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* 31 (**2000**), 35–42
36. Sivitz W.I., S.A. Walsh, D.A. Morgan, M.J. Thomas and W.G. Haynes , Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology* 138 (**1997**), 3395–3401
37. Stärkel P., Y. Horsmans, C. Sempoux, C. De Saeger, J. Wary, P. Lause et al., After portal branch ligation in rat, nuclear factor kappa B, interleukin-6, signal transducers and activators of transcription 3, c-fos, c-myc, and c-jun are

- similarly induced in the ligated and nonligated lobes. *Hepatology* 29 (1999), pp. 1463–1470.
38. Stärkel P., L. Lambotte, C. Sempoux, C. De Saeger, A. Saliez, D. Maiter et al., After portal branch ligation in the rat, cellular proliferation is associated with selective induction of c-Ha-ras, p53, cyclin E and cdk2. *Gut* 49 (2001), 119–130
  39. Todo S., A.J. Demetris, L. Makowka, L. Teperman, L. Podesta, T. Shaver et al., Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation* 47 (1989), 903–905.
  40. Ullmann Vojtěch, RNDr. ,<http://astronuklfyzika.cz/DetekceSpektrometrie.htm>
  41. Voet : Biochemie
  42. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996; 14: 1645–53
  43. Zhang BH, M. Weltman M, Farrell GC. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 14 (1999), 133–137
  44. Zhang BH, Farrell GC. Ethanol perturbs receptor-operated cytosolic free calcium concentration signals in cultured rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1997;14: 641–8
  45. Zhang BH, Horsfield BP, Farrell GC. Chronic ethanol administration to rats decreases receptor-operated mobilization of intracellular ionic calcium in cultured hepatocytes and inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate production: Relevance to impaired liver regeneration. *J. Clin. Invest.* 1996; 14: 1237–44.