

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd. **Školitel:** doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D., **Kandidát:** Mgr. Ester Dohnálková

Název rigorózní práce: Hepatocyte ROCK1 kinase activity incites liver inflammation in murine non-alcoholic fatty liver disease

Úvod: Již dříve bylo zjištěno, že Rho-asociovaná proteinová kináza 1 (ROCK1) se podílí na uvolňování extracelulárních vezikulů (EV) z hepatocytů vyvolaného lipotoxicitou. Lipotoxické EV uvolněné z hepatocytů vyvolávají zánětlivou odpověď v monocytech a makrofázích. Kromě toho jsme dříve zjistili, že aktivovaná ROCK1 kináza je histologickým znakem zánětlivého stadia myšího a lidského nealkoholového ztučnění jater (NAFLD). V současné době však není známo, zda aktivovaná ROCK1 kináza může přímo přispívat k patogenezi NAFLD. V naší studii jsme se zaměřili na zkoumání účinků hepatocytové ROCK1 kinázové aktivity při vývoji zánětu v myším modelu NAFLD.

Metody: Pro posouzení role ROCK1 kinázy v NAFLD jsme použili *in vivo* model. Myším (C57BL/6J kmen) bylo injekčně podáno buď: a) vehikulum; b) AAV8-zabalený, TBG-řízený konstitutivně aktivní ROCK1 (CA-ROCK1) konstrukt; nebo c) AAV8-zabalený, TBG-řízený kinázově neaktivní ROCK1 (KD-ROCK1) konstrukt jako negativní kontrola. O dva týdny později byly myši umístěny na standardní laboratorní dietu (chow) nebo dietu s vysokým obsahem tuku, fruktózy a cholesterolu (FFC) po dobu 8 týdnů; toto krátkodobé krmení představuje model izolované steatózy s minimálním zánětem tkáně. Na konci studie byly odebrány játra, tuková tkáň a krev pro následné analýzy a hmotnostní cytometrii “time-of-flight“ (CyTOF).

Výsledky: Myši krmené standardní laboratorní dietou exprimující ROCK1 kinázové mutanty vykazovaly normální histologii a funkci jater. U všech tří skupin myší krmených FFC dietou byla pozorována podobná tělesná hmotnost, hmotnost jater a hmotnost epididymální bílé tukové tkáně (nebyly pozorovány signifikantní rozdíly). Metabolický fenotyp (glukóza nalačno, inzulin nalačno) neukazoval žádné statisticky významné rozdíly mezi KD-ROCK1 a CA-ROCK1 u myší krmených FFC dietou. K posouzení inzulinové rezistence byl vypočten index HOMA-IR (homeostatický model inzulinové rezistence). Myši krmené FFC dietou exprimující CA-ROCK1 vykazovaly zvýšené HOMA-IR ve srovnání s myši KD-ROCK1. Poškození jater, které bylo stanoveno hladinou alanin aminotransferázy v séru, se nelišilo mezi skupinami myší krmených FFC dietou. Naopak myši CA-ROCK1, které byly krmeny FFC dietou, vykazovaly významné zvýšení markerů aktivace makrofágů (CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10), povrchových markerů makrofágů (CD68, F4/80) a makrofágů (Mac-2 imunohistochemicky) v játrech. Tyto zánětlivé markery spojené s makrofágy byly významně nižší u myší KD-ROCK1 krmených FFC dietou a kontrolních zvířat krmených FFC dietou. Analýza CyTOF byla provedena na izolovaných intrahepatických leukocytech a prokázala významné změny v subpopulacích imunitních buněk u myší krmených FFC dietou s expresí CA-ROCK1. Charakteristické znaky fibrogenese (α SMA, kolagen 1 α 1, fibronektin) byly zvýšeny u myší CA-ROCK1 krmených FFC dietou ve srovnání s myši KD-ROCK1.

Závěr: Zvýšená aktivita ROCK1 kinázy na pozadí izolované steatózy vyvolává steatohepatitidu charakterizovanou zánětem spojeným s makrofágy. Kromě toho exprese CA-ROCK1 v hepatocytech také přispívala k jaterní fibrogenezi. Vzhledem k důkazu, že ROCK1 kináza podporuje progresi onemocnění, předpokládáme, že inhibice aktivity ROCK1 kinázy může být potenciálně použita pro léčbu lidského NAFLD.