

**UNIVERZITA KARLOVA  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Příspěvek ke studiu etiologie a klinického významu jaterní steatózy v  
experimentu**

**Lenka Žaloudková**

**Autoreferát disertační práce  
Doktorský studijní program: Klinická biochemie**

**Hradec Králové  
2021**

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního/kombinovaného* studia doktorského studijního programu Klinická biochemie na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: Ing. Lenka Žaloudková  
Ústav klinické biochemie a diagnostiky  
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.  
II. interní gastroenterologická klinika  
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: prof. MUDr. Vladimír Teplan, DrSc.  
Interní klinika FN a Katedra interních oborů LF Univerzity Ostrava  
Subkatedra nefrologie IPVZ Praha

Doc. MUDr. Pavel Dlouhý, Ph.D.  
Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav hygieny

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Klinické biochemie dne 22.9.2021 v Hradci Králové od 14 hod.

Tato práce vznikla za podpory grantu **MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906)**, granty **IGA NR8500-3, SVV-260398**, programem **PRVOUK P37/11** a programem **Progress Q40/01**.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

Prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr.h.c.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Klinická biochemie  
Garant studijního programu

## OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	4
1. SOUHRN.....	5
2. SUMMARY.....	6
3. ÚVOD.....	7
4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY.....	8
4.1. Parciální hepatektomie.....	8
4.2. Nealkoholové ztukovatění jater (NAFLD).....	10
4.3. Experimentální modely NAFLD u potkanů.....	11
4.4. Metody hodnocení intenzity regenerace.....	11
4.5. Funkční testy jaterní regenerace – dechové testy.....	12
4.6. Možnosti ovlivnění jaterní regenerace.....	12
5. CÍLE PRÁCE.....	14
6. METODY.....	15
6.1. Experiment vlivu steatózy jater na jejich regenerační schopnost.....	15
6.2. Experiment s kyselinou ursolovou.....	15
6.3. Experiment s kyselinou ursolovou – dechové testy.....	16
6.4. Kalkulace hmotnosti jater.....	17
6.5. Histologické vyšetření jater.....	17
6.6. Statistická analýza.....	17
7. VÝSLEDKY.....	18
7.1. Experiment vlivu steatózy jater na jejich regenerační schopnost.....	18
7.2. Experiment s kyselinou ursolovou.....	20
7.3. Experiment s kyselinou ursolovou - dechové testy.....	21
8. DISKUZE.....	23
8.1. Experiment s navozením NAFLD.....	23
8.2. Experiment s kyselinou ursolovou.....	24
8.3. Experiment s kyselinou ursolovou – dechové testy.....	26
9. ZÁVĚR.....	28
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	29
10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY AUTORA.....	34

## SEZNAM ZKRATEK

ACAT2	acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-2
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
$\beta$ -CD	beta-cyklodextrin
BrdU	bromdeoxyuridin
CYP7A1	cytochrom P450 7A1
CTRL	kontrolní skupina potkanů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EIA	enzymatická Immuno Assay
$\gamma$ -CD	gama-cyklodextrin
HAP	forma kyselina ursolová připravená homozenizací
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HGF	hepatocytární růstový faktor
HF	vysokotuková dieta, <i>high-fat diet</i>
HMG-CoA	HMG-CoA reductáza
HRR	<i>hepatic regeneration ratio</i>
<i>i.v.</i>	<i>podání látky intravenózně</i>
IL-6	interleukin-6
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
LPL	lipoproteinová lipáza
MAP	forma kyseliny ursolové připravené mikronizací
MCDD	methionin-cholin deficientní dieta
MK	mastné kyseliny
MMP9	metaloproteináza 9
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAFLD	nealkoholové ztukovatění jater, <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	nealkoholová steatohepatitida, <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
ORO	kyselina orotová
<i>p.o.</i>	<i>podání látky per os</i>
PH	parciální hepatektomie
PHHC	Pražský hereditárně hypercholesterolemický potkan
PPAR $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha</math></i>
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku, <i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce, <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
SD	směrodatná odchylka
SREBP	sterol regulatory element – binding protein
SLD	standardní laboratorní dieta
TAG	triacylglycerol
tCH	celkový cholesterol
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
TNFR	receptor pro TNF- $\alpha$
UA	kyselina ursolová
ŽK	žlučové kyseliny

## 1. SOUHRN

Disertační práce se zabývá časnou fází jaterní regenerace u potkanů s navozenou steatózou jater, zjištěním vlivu kyseliny ursolové a jejích hepatoprotektivních účinků na jaterní tkáň po částečné hepatektomii a zjištěním vlivu této kyseliny na metabolismus lipidů.

První část disertační práce byla zaměřena na studium jaterní regenerace po částečné hepatektomii u potkanů s nutričně navozenou steatózou jater s využitím tří experimentálních diet. Pro posouzení jaterní regenerace byly zvoleny dva potkaní modely, zdravý potkan kmene Wistar a potkan s vysokou bazální cholesterolemíí tzv. Pražský hereditárně hypercholesterolemický potkan. Zavedený model nealkoholového ztukovatění jater (NAFLD) podáváním vysokocholesterolové diety a diety s kyselinou orotovou po dobu čtyř týdnů u obou kmenů potkanů potvrdil rozvoj jaterní steatózy bez známek zánětu, nekrózy či fibrotických změn. Dieta methionin-cholin deficitní nepotvrdila histologickým vyšetřením přítomnost steatózy, ačkoli bylo potvrzeno narušení syntézy VLDL částic. Průběh jaterní regenerace prokázal na základě inkorporace <sup>3</sup>[H]-thymidinu do DNA hepatocytů zpoždění jaterní regenerace s vysokocholesterolovou dietou i dietou s kyselinou orotovou. Model s kyselinou orotovou se pro studium jaterní regenerace neosvědčil, u potkanů došlo k těžkému poškození jaterního parenchymu před samotným operačním zákrokem, které bylo po částečné hepatektomii neslučitelné s přežitím. Při porovnání rychlosti regenerace zhodnocení syntézy DNA za 18 a 24 hodin po částečné hepatektomii mezi potkany kmene Wistar a potkany PHHC bylo prokázáno zpoždění nástupu regenerace u hypercholesterolemických potkanů ukazující možné komplikace pro pacienty s prostou steatózou podstupující transplantaci jater či resekci jaterní tkáně.

Druhá část disertační práce byla zaměřena na ovlivnění jaterní regenerace podáním různých forem kyseliny ursolové, které byly připraveny výhradně z přírodních zdrojů bez použití chemických rozpouštědel. Kyselina ursolová je v literatuře zmiňována jako látka s hepatoprotektivními účinky, ale komplikací pro její běžné použití je její nízká biologická dostupnost. Hypolipidemické účinky kyseliny ursolové byly potvrzeny již po 7 dnech experimentu u potkanů s vysokotukovou dietou, kdy bylo docíleno významného snížení koncentrací hladin cholesterolu a triacylglycerolu. Současně bylo prokázáno, že kyselina ursolová stimuluje DNA syntézu s nižší enzymatickou aktivitou ALT a AST po invazivním zákroku. Zároveň byly prokázány pozitivní účinky kyseliny ursolové na jaterní tkáň ještě před parciální hepatektomií a potvrzují tím kyselinu ursolovou jako látku s hepatoprotektivními účinky.

## 2. SUMMARY

### **Contribution to the study of the etiology and clinical significance of hepatic steatosis in the experiment**

The aim of this dissertation thesis is to elucidate and describe the influence of ursolic acid and its hepatoprotective effects on liver tissue after partial hepatectomy and the effects of this acid on lipid metabolism. It includes studies of the early phase of liver regeneration in rats with induced hepatic steatosis.

The first part of the dissertation is focused on the study of liver regeneration after partial hepatectomy in rats with nutritionally induced hepatic steatosis using three experimental diets. To assess the liver regeneration, two rat models were selected, a healthy Wistar-type rat and a rat with high basal cholesterolemia, the so-called Prague hereditary hypercholesterolemic rat (PHHC). The standard model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), achieved by feeding both rat types on a high-cholesterol diet and an orotic acid diet for four weeks, confirmed the development of hepatic steatosis without signs of inflammation, necrosis or fibrotic changes. The methionine-choline deficient diet did not induce steatosis in the histological examination, although disruption of VLDL particle synthesis was found. Based on the incorporation of <sup>3</sup>[H]-thymidine into hepatocyte's DNA, the course of liver regeneration was slowed down in experiments with the high-cholesterol diet and with the orotic acid diet. The orotic acid model did not work well for the study of liver regeneration, due to the severe damage of the rat's liver parenchyma even before the partial hepatectomy and this operation was incompatible with survival of the rats. Comparison of the regeneration rate after partial hepatectomy between Wistar rats and PHHC rats by DNA synthesis assessment at 18 and 24 hours shows a delay in the onset of regeneration in hypercholesterolemic rats. That indicates possible complications for patients with simple steatosis undergoing liver transplantation or liver tissue resection.

The second topic was focused on liver regeneration influenced by the administration of various forms of ursolic acid, which were prepared exclusively from natural sources without the use of chemical solvents. Ursolic acid is known for its hepatoprotective effects but its low bioavailability is a major complication of its wider use. The hypolipidemic effects of ursolic acid were found after only 7 days of application in rats on a high-fat diet as significant reduction of cholesterol and triacylglycerol concentrations. At the same time, a supplementation with ursolic acid has been shown to stimulate DNA synthesis with lower enzymatic activity of ALT and AST after invasive surgery. Finally, the positive effects of ursolic acid on liver tissue before partial hepatectomy were found and suggested ursolic acid as a substance with hepatoprotective effects.

### 3. ÚVOD

Játra představují životně důležitý orgán vykonávající řadu nezastupitelných funkcí v energetickém a intermediárním metabolismu. Důležitou funkcí jater je biotransformace a eliminace xenobiotik, a možná právě z tohoto důvodu mají játra schopnost obnovit původní populaci jaterních buněk po jejich redukci nebo poškození různé etiologie [1]. Změny v metabolismu související s nezdravou výživou, nezdravým životním stylem ale i toxické změny patří k hlavním příčinám aterosklerózy, kardiovaskulárním onemocněním i ke steatóze jater. Stejně tak jako existuje mnoho faktorů vedoucích ke zvýšené zátěži jater a jejich poškození, existuje i více metabolických cest, které proces regenerace ovlivňují.

Ačkoli je snaha léčbu steatózy jater změnou jídelníčku a pohybové aktivity předcházet a zastavit a zregenerovat, pokročilá stádia steatózy - steatohepatitida a cirhóza stále patří k důvodům s vyšší úmrtností v České republice. Nealkoholové poškození jater tzv. NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) patří mezi nejčastější chronická onemocnění jater a je součástí i celého komplexu onemocnění tzv. metabolického syndromu.

Játra mají ve srovnání s ostatními orgány největší regenerační schopnost, a dokážou tak překonat i významné poškození. Další důležitou vlastností jaterních buněk je, že si během regenerace zachovávají kromě obnovovacích procesů také všechny metabolické funkce včetně schopnosti odstraňování toxických látek. Úspěšnost resekce jater, ke které dochází z různých příčin, závisí na regenerační schopnosti zbytku jater. Z tohoto důvodu je jakékoli poškození jater (např. NAFLD) komplikací při transplantacích a regenerace tím může být negativně ovlivněna [2, 3, 4]. Zároveň ale existují v literatuře i názory, že steatóza jater regenerační schopnost jater neovlivňuje [5, 6, 7]. Kromě komplikací při samotném výkonu resekce jater existují i pooperační komplikace přijatého štěpu či opožděná regenerace s delší dobou léčby [8].

Léčebně se pro regeneraci jater využívá celá řada hepatoprotektivních látek, mezi kterými lze nalézt látky přírodních produktů. K této skupině patří i triterpenoidy – látky obsažené v mnoha bylinách, rostlinách i ovoci, jejichž hepatoprotektivní účinky jsou zmiňovány v mnoha publikacích [9,10]. Mechanismus účinku triterpenoidů je komplexní – potlačují některé enzymy způsobující poškození [11], ochraňují před hepatotoxicitou tetrachlormetanu [12] i acetaminofenu [13] a jsou známé protinádorovou aktivitou [14, 15].

Disertační práce se zabývá časnou fází jaterní regenerace u potkanů s navozenou steatózou jater, zjištěním vlivu kyseliny ursolové a jejich hepatoprotektivních účinků na jaterní tkáň po částečné hepatektomii a zároveň zjištěním vlivu této kyseliny na metabolismus lipidů.

## 4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

### 4.1. Parciální hepatektomie

Pro studium orgánové regenerace kontrolovaného růstu buněk se využívá model parciální hepatektomie (PH), který není spojován s masivní nekrózou. Pro tyto experimenty jsou nejvíce používáni laboratorní hlodavci (potkan, myš), popsány jsou experimenty i na větších savcích (např. prasatech), využívané pro modelování nových chirurgických postupů a hledání nových možností hojení ran. Postupně se zvyšující hmotnost jater po resekcii je jedním z ukazatelů obnovy jaterní tkáně. Zvýšení hmotnosti jater o 45 % po parciální hepatektomii je prokázáno již po 24 hodinách po resekcii, za 48 hod je zvýšení hmotnosti již o 70 % a postupně mezi 5. – 7. dnem dosahuje 93 % původní hmotnosti. Ke kompletní obnově by mělo dojít do maximálně dvacátého dne po parciální hepatektomii [16], byť v některých experimentech cílového objemu jater nebylo dosaženo ani po 3 týdnech po parciální hepatektomii [17, 18].

Jaterní regenerace je složitý systém řízený nyní všeobecně přijímanou teorií souhry 3 systémů – cytokinů, růstových faktorů a metabolických změn [19]. Odstraněním převážné části jaterní tkáně dochází ihned ke změnám hemodynamiky, ale zároveň ke změnám v expresi a aktivitě signálních mediátorů, mezi něž patří cytokiny a interleukiny (TNF- $\alpha$ , IL-6), růstové faktory (HGF, EGFR, VEGF a IGF-I, atd.), hormony a neurotransmitery (inzulin, vazopresin), ale i změny hladin žlučových kyselin, kyslíkových radikálů, lipoproteinů a ostatních lipidů. Celý průběh jaterní regenerace je zcela koordinovaným procesem zahrnující desítky různých cest a genů, proto ztráta 1 genu málokdy vede k úplné inhibici regenerace, ale obvykle způsobí změnu načasování replikace nebo mortality DNA hepatocytů [20].

Regenerace jater nezahrnuje pouze hepatocyty (představují 60 – 80 % buněk jater), ale i buňky neparenchymové - žlučové epiteliální buňky, endoteliální sinusoidální buňky, Itovy buňky (jaterní hvězdicové buňky) a Kupfferovy buňky. Hepatocyty a cholangiocyty jsou první buňky, které vstupují do buněčného cyklu, podstupují proliferaci a produkci mitogenních signálů pro další typy jaterních buněk [20]. Proliferace hepatocytů po PH je charakterizována mitotickými vlnami buněk všech populací. U hlodavců začíná 12 – 18 hodin po částečné hepatektomii s maximem u potkanů 24 hodin, u myši 36 hodin a končí přibližně 4 dny po PH. Syntéza DNA začíná v jaterních ascinech v okolí portální vény a postupně následuje v dalších hepatocytech směrem k centrální véně. Mitóza následuje syntézu DNA za 6 – 8 hodin. Proliferace v extracelulární matrix, která zahrnuje cca 3 % objemu jater, není během prvního dne patrná podle Martineze-Hernandez a Amenty [21]. Kupfferovy i hvězdicové buňky a buňky žlučovodů vstupují do S fáze později 48 – 96 hodin po zákroku.

Průběh buněčného cyklu během parciální hepatektomie se dělí na tři fáze – iniciace, proliferace a terminace. Iniciace tj. zahájení (priming) je období prvních 12 – 18 hodin po PH, kdy většina hepatocytů opouští klidový stav buněčného cyklu  $G_0$  (fáze). Iniciace je v současnosti nejvíce prozkoumávanou částí buněčného z pohledu ovlivnění, urychlení či zpomalení intervalu mezi částečnou hepatektomií a iniciací syntézy DNA v hepatocytech. Následující fází je fáze proliferace, kdy hepatocyty syntetizují DNA. V této fázi proběhne buněčné dělení, část hepatocytů se vrací do fáze  $G_0$  a část vstupuje do dalšího mitotického cyklu. Současně v této fázi dochází k remodelaci extracelulární matrix (ECM) a dochází k dělení dalších jaterních buněk (cholangiocytů a endoteliálních buněk jaterních sinusoid). Tato fáze trvající u hlodavců (potkanů) až 4 dny je následována poslední fází terminací, tj. ukončení, které je spojeno s přítomností inhibičních faktorů a podnětů, na jejichž základě dojde k zastavení proliferační odpovědi a návratu do klidového stavu včetně regulace poměru velikosti jater vůči velikosti těla, tzv. „hepatostat“. Délka trvání této poslední fáze je ve většině publikací uváděna 7-10 dní [16].

Časná fáze iniciace je charakterizována produkcí nejen přímých mitogenů, tedy látek schopných samotné indukce jaterní proliferace jako je Hepatocytární růstový faktor (HGF) a



Epidermální růstový faktor (EGF), ale i stoupající koncentrací cytokinů, především Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$ ) a Interleukinu-6 (IL-6). Zdrojem cytokinů jsou neparenchymové jaterní buňky (Kupfferovy, endotelové buňky jaterních sinusoid a hvězdíkové buňky). Cytokinová kaskáda začíná vazbou TNF- $\alpha$  na receptor TNFR1 v Kupfferových buňkách. Tímto dochází k aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B) a následně k tvorbě IL-6, který se uvolní do okolí buňky a váže se na vlastní receptor v hepatocytech. Zde aktivuje *Signal transducer and activation of transcription 3* (STAT-3). Po přesunu STAT-3 do jádra hepatocytu zde působí na řadu genů odpovědných za regeneraci. Zmíněné cytokiny jsou plně aktivní již 30 minut po resekci jater [16, 19].

### **Hepatocytární růstový faktor (HGF)**

HGF je produkován hvězdíčovými jaterními buňkami jako single peptid pro-HGF, který je uskladněn v extracelulární matrix (ECM). Bezprostředně po jaterní hepatektomii dochází ke zvýšení krevního průtoku játry z důvodu nadbytku objemu krve, která by před dvoutřetinovou resekci játry protekla a zároveň se spouští kaskáda navazujících reakcí, které zahajuje zvýšení aktivity hlavního enzymu zodpovědného za aktivaci HGF urokinázového aktivátoru plazminogenu (uPA). Zvýšení uPA aktivity je doprovázeno přeměnou aktivity plasminogenu na plasmin. HGF se po aktivaci váže na transmembránový receptor s tyrosinkinázovou aktivitou c-Met, a zároveň je vyplavován do krevního oběhu. Maxima uPA dosahuje za 60 – 120 minut po operaci. Remodelací matrix buněk se mění mnoho proteinů, první aktivovanou je metaloproteináza 9 (MMP9), která se aktivuje již 30 minut po částečné hepatektomii a je aktivní následujících 24 – 48 hodin. Metaloproteinázy jsou schopny degradovat část matrix, a tím umožnit proliferaci hepatocytů. Zásobní množství HGF uvolněného z ECM je po 3 hodinách vyčerpáno. Nová syntéza HGF v hvězdíkových a endoteliálních buňkách následuje během dalších 36 - 48 hodin. Hladiny HGF se zvyšují 10 - 20 násobně po částečné hepatektomii [22], exprese mRNA HGF se zvyšuje 3 hodiny po PH nejen v játrech, ale i v plicích a ve slezině. Mezi další kandidáty pro zprostředkování zvýšené produkce HGF lze zařadit i norepinefrin a cytokin IL-6 [16].

HGF se zdá být iniciátor jaterní regenerace a bylo potvrzeno, že patří mezi přímé mitogeny aktivující receptory ihned po částečné hepatektomii [16]. Na druhou stranu je evidentní, že neexistuje jen jedna cesta iniciace, ale příspěvek hepatocytárního růstového faktoru se zdá být nenahraditelný. DeFrances a Michalopoulos [23] ověřili, že při vyloučení signální cesty HGF/cMet nedochází k úplnému zastavení jaterní regenerace, ale jen k jejímu dočasnému útlumu. Bowen [24] prokázal při cílené genetické eliminaci signální cesty c-Met snížení jaterní regenerace. Podání infúze HGF je dokonce schopno vyvolat hyperplastickou odpověď jaterních buněk bez předchozího poškození jater [25].

### **Žlučové kyseliny (ŽK)**

Koncentrace žlučových kyselin podléhá jasným kritériím s důrazem na fyziologickou a signální dynamiku po částečné hepatektomii, neboť koncentrace žlučových kyselin je během pěti minut významně změněna. Neschopnost zbytku jater po částečné hepatektomii vyloučit vracející se žlučové kyseliny do střeva vede ke zvýšení hladin žlučových kyselin v krevním řečišti, což je spouštěcím signálem pro jaterní regeneraci. V případě, že by nedošlo k preventivní redistribuci žlučových kyselin do střeva, dochází u hepatocytů ke snížené proliferaci i růstu jater. Potvrzení vlivu žlučových kyselin na jaterní regeneraci bylo prokázáno Naglerem [36], který sekvenací RNA jaterní tkáně prokázal snížení replikace DNA u potkanů s operativním přerušением a zastavením toku žlučových kyselin, zároveň bylo zjištěno snížení hladin HGF v krvi. Obnovením toku žlučových kyselin došlo ke zvýšení koncentrace HGF v krvi. Hladiny IL-6 v krvi se při absenci žlučových kyselin po částečné hepatektomii nemění. Tato zjištění ukazují, že nález HGF je nepostradatelný pro jaterní regeneraci. Sekrece žlučových kyselin a jejich pool je rozhodujícím faktorem pro budoucí velikost jater [26].

Delgado-Coello *et al.* [27] potvrdila, že HGF přímo moduluje expresi CYP7A1, který patří mezi rate-limiting enzym kontrolující syntézu ŽK z cholesterolu, ale kromě přímého ovlivnění přes HGF, syntéza CYP7A1 je ovlivněna inhibicí c-Jun N-terminální kinázi C. Tyto závěry potvrdil i Naugler [26], který kromě snížené aktivity c-Jun bezprostředně po PH (4 hodiny) našel i snížený střevní Fibroblastový růstový faktor 15 (FGF15).

Redistribuce a reflux žlučových kyselin je pro probíhající jaterní regeneraci nezbytností a všechny mechanismy zapojené do oběhu žlučových kyselin chrání regenerující játra před apoptózou a nekrózou vyvolanou jejich zvýšenou elevací.

## 4.2. Nealkoholové ztukovatění jater (NAFLD)

Nealkoholická steatóza a nealkoholická steatohepatitida jater (NAFLD/NASH) jsou jaterní onemocnění charakterizované histologickým obrazem pozorovaným u alkoholické jaterní steatózy a steatohepatitidy u osob bez významné konzumace alkoholu (< 20 g ethanolu/den). Definice NAFLD vychází z průkazu přítomnosti steatózy jater zobrazovacími metodami nebo histologicky u více než 5 % hepatocytů. NASH je pokročilou a progresivní fází NAFLD se vztahem k jaterní cirhóze a je potenciálně smrtelným onemocněním, u které jsou kromě steatózy přítomny i zánětlivé změny, známky poškození hepatocytů a může (a nemusí) být přítomna jaterní fibróza. Na základě výskytu nemocných s nevysvětlitelnou elevací ALT je dlouhodobě odhadován až na 25,24 % [2,3,28]. V současné době je řešena otázka, zda mimojaterní projevy jsou hlavní příčinou NAFLD, tj. metabolického syndromu, nebo zda je NAFLD nezávislým rizikovým faktorem. Z mimojaterních projevů NAFLD jsou v současné době hlavně studována onemocnění kardiovaskulárního systému, diabetes mellitus 2. typu, onemocnění ledvin, kolorektální karcinom, některé endokrinopatie. U diabetiků 2. typu nebo u osob jen s inzulínovou rezistencí se zvyšuje lipolýza v tukové tkáni s nárůstem volných mastných kyselin. U pacientů s metabolickým syndromem je častější sonografický nálezn steatózy než ve zdravé populaci - přibližně 40 % mužů a 26 % žen s metabolickým syndromem má sonograficky zjevnou steatózu [29]. Pokud by jaterní steatóza měla být považovaná za nezávislý faktor vzniku hypertenze, event. arteriosklerózy, pak je třeba to podepřít vznikem a progresí již časných stadií, tedy prearteriosklerotických lézí a toto prozatím není v literatuře potvrzeno.

Patogeneze NAFLD (NASH) není zcela objasněná, nicméně pro vznik a vývoj NASH byla dříve navrhována teorie dvojího kroku poškození, kterou lze obecně definovat (1) Pokud se překročí kapacita jater pro metabolizování nadměrného množství dodaných mastných kyselin, dojde k metabolické dysregulaci a k ukládání tuků v hepatocytech a (2) abnormální peroxidace v důsledku nadměrně uložených mastných kyselin v hepatocytech vede k jejich toxickému poškození, zánětu jater, fibróze jater a dalším konsekvencím.

Tato teorie je v současnosti nahrazena hypotézami širšího spektra vzniku, které ve svém důsledku vedou ke vzniku NAFLD a NASH [30]. Klíčovou roli v patogenezi NAFLD představuje zvýšená nabídka volných mastných kyselin při zvýšené lipolýze a/nebo zvýšený dietní příjem tuků, snížená oxidace mastných kyselin, zvýšená de novo lipogeneze v játrech, nebo snížená sekrece VLDL z jater [30].

Normální funkce adipocytů je závislá na mnoha faktorech zahrnujících jejich počet, velikost, hormonální vlivy a jejich interakce. Při nadměrném příjmu energie je tuková tkáň schopna do jisté míry reagovat hypertrofií a hyperplazií adipocytů ochránit ostatní tkáň před nežádoucími účinky mastných kyselin. Další akumulace tuku vede ke zvětšení adipocytů, jejich dysfunkci a zánětu tukové tkáň. Subklinický zánět potencuje lipolýzu, inzulínorezistenci a vede následně k uvolnění nadbytečných volných mastných kyselin do cirkulace. Kupfferovy buňky jsou jaterní obdobou makrofágů v tukové tkáni a jsou hlavním zdrojem zánětlivých cytokinů.

Mastné kyseliny indukují na povrchu hepatocytů expresi genů kodujících proteiny účastníci se syntézy lipidů tzv. FAS molekul, jejichž interakce s jinými ligandami vedou k buněčné smrti [31],

nebo volné mastné kyseliny destabilizací lysozomů uvolní katepsin B a následně jeho aktivací NF- $\kappa$ B se zvýší produkce TNF- $\alpha$  a vzniká nekróza hepatocytů. Zvýšený energetický příjem ve formě zvýšené nabídky volných mastných kyselin inhibují aktivitu mitochondriálního dýchacího řetězce vedoucí k nadměrnému množství ROS (*reaktivní formy kyslíku*). Na tuto situaci reaguje zvýšenou expresí uncoupling protein-2 – mitochondriální protein vnitřní membrány mitochondrií – rozpřežením fosforylace snížením tvorby mitochondriálního ATP a snížením ROS v poškozených ztukovatěných hepatocytech [32]. Peroxisomy přejímají  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin, protože mitochondriální oxidační kapacita je u onemocnění NAFLD je překonána. Peroxisomální enzymy jsou regulovány aktivačním receptorem proliferace nukleárního hormonálního receptoru (PPAR $\alpha$ ). Zvýšená transkripční exprese (up-regulace) PPAR $\alpha$  s následovným indukovaným oxidačním stresem je pozorována u obézních a diabetických hlodavců [78].

NAFLD je spojována i s posttransplantačními komplikacemi jaterního štěpu, které se vyskytuje téměř u 50 % pacientů po transplantaci a u kterých v kombinaci s kardiovaskulárním onemocněním může vést k časnější mortalitě pacientů po transplantaci [2,3,8]. Více jak 20 % pacientů s histologickým nálezem jaterní steatózy podstupuje transplantaci jater, středně velká steatóza souvisí s nižším přežitím pacientů anebo sníženou regenerační schopností. Játra s vyšší než 30% steatózou nejsou pro transplantace vhodná k použití z důvodu zvýšeného rizika primárních funkcí [28]. Celkově se provedlo v roce 2019 v České republice 197 transplantací jater a dalších 90 pacientů na transplantaci čeká (Koordinační středisko transplantací, ČR).

### 4.3. Experimentální modely NAFLD u potkanů

Experimentální pokusy na zvířatech se staly nedílnou součástí základního výzkumu nejen kvůli zjištění a pochopení mechanismů stojících za patogenezi a progresí jaterního poškození, ale i pro zjištění a sledování nových poznatků ve farmakologii, při vývoji nových terapeutických možností a sledování vlivu nových léků. Do současné doby bylo zavedeno množství zvířecích modelů napodobujících jaterní onemocnění u lidí. Nejčastěji používaná pokusná zvířata jsou myši a potkani, velké zvířecí modely např. s využitím prasat, jsou významné zejména v oblasti modelování akutního jaterního selhání, nebo jsou dnes stále častěji využívány v modelování akutních i chronických jaterních operací. Ideální zvířecí model by měl odrážet všechny aspekty lidského NAFLD včetně etiopatogeneze, histologického nálezu v jednotlivých fázích choroby a také metabolické změny, které jsou s NAFLD spjaty [34]. Toto v současnosti nesplňuje žádný z dostupných modelů. Většina modelů vyvolaných dietou i modely genetické sice úspěšně simulují histologický obraz NAFLD/NASH, ale nezdědka jim schází metabolický nebo genetický kontext vývoje NASH u lidí (obezita, inzulínová rezistence, hyperglykémie, hyperinzulinémie, dyslipidémie, nerovnováha cytokinů a adipokinů) [35]. Mezi nejpoužívanější modely NAFLD patří diety methionin – cholin deficientní, vysokotuková dieta, dieta s fruktózou navozující steatohepatitidu, nebo kombinace vyššího příjmu tuku a fruktózy dnes často zmiňovanou jako dietu „fast-food“.

### 4.4. Metody hodnocení intenzity regenerace

Existují možnosti ryze fyzikální, kdy podle hmotnosti jater lze posuzovat míru regenerace podle nárůstu objemu jaterní tkáně [35,36]. Cílem tohoto porovnání je informace o tzv. hepatostatu, tedy zda a jak dochází k dosažení cílového objemu jater vůči velikosti těla a zda dochází k rekonstrukci tkáňové mikroarchitektury [16].

Velmi často používaným vyjádřením obnovy tkáně jater je odečet mitotického indexu na hematoxylin-eosinem barvených histologických řezech jaterní tkáně určující buněčnou proliferaci buněk procházejících mitózou. Též se využívá určení syntézy DNA pomocí inkorporace značeného radioaktivního thymidinu ( $^3$ H-thymidinu) nebo bromdeoxyuridinu (BrdU) do buněčné DNA.

Laboratorní diagnostika umožňuje stanovení hladin látek na základě reakce mezi daným analytem a protilátkou, kdy se využívá specifické reakce. Výhodou stanovení je i možnost využití konkrétní protilátky pro daný zvířecí experiment. V případě stanovení růstových, transkripčních faktorů i zánětlivých markerů jsou imunochemické metody dostatečně senzitivní a specifické.

Další nyní velmi často používanou možností je využití metod molekulární biologie, kdy lze analýzou molekuly DNA studovat buněčné procesy na molekulární úrovni s cílem analyzovat molekulu DNA. Vlastní exprese genů je po izolaci DNA či RNA hodnocena na úrovni mRNA metodou reverzní transkripce následovanou polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase (RT-PCR). Výsledkem je přesné hodnocení exprese studovaných genů z pohledu regulace up/down nebo vyjádřením změny  $\Delta$  exprese [37].

#### 4.5. Funkční testy jaterní regenerace – dechové testy

Mezi metody zajišťující přesné kvantifikování jaterních funkcí patří neinvazivní dechové testy, které by mohly být více využívány, protože u nich není kontraindikace s jinými léky a poskytují informaci o funkčním poškození v celé škále jaterních onemocnění. Dechové testy s  $^{13}\text{C}$  uhlíkem mají výhodu v jednoduchosti provedení, nevyžadují odběr krve, jsou bezpečné a mají nízkou variabilitu. Orálně podaný  $^{13}\text{C}$  fenylalanin je absorbován aktivním transportem v proximální části tenkého střeva a je ireverzibilně konvertován na tyrosin za katalýzy fenylalaninhydroxylázy (PAH) v játrech a ledvinách. Tato reakce je rate-limiting [38], poté je tyrosin přeměňován až na kyselinu homogentisovou za přístupu  $\text{O}_2$  v reakci katalyzované homogentisátoxygenázou. Vznikající kyselina homogentisová je následně degradována v několika krocích na fumarát a acetoacetát v citrátovém cyklu. Bylo zjištěno, že konverze v ledvinách neovlivňuje jaterní regeneraci po PH [39]. Konverze fenylalaninu koreluje s Child Pughovým skórem i testy s indocyaninovou zelení [40].

Dechové testy s  $^{13}\text{C}$  fenylalaninem byl navržen jako dynamicky marker jaterní regenerace [39]. Heberer et al. [41] prokázal, že centrální clearance plazmy poměru aminokyselin u jater může být považován jako prediktor jaterní funkce i rezerv a koreluje s operačním zásahem. Výsledky dechových testů jsou nejčastěji vydávány jako hodnota kumulativního výdeje vypočtená za definovaný čas testu vztažené na molární množství podaného substrátu. Dalším hodnocením může být poměr  $\delta^{13}\text{C}$  v definovaném čase vztažené na výchozí hodnotu – DOB (Delta Over Baseline).

#### 4.6. Možnosti ovlivnění jaterní regenerace

Nevhodné stravovací návyky a požívání alkoholu negativně ovlivňují jaterní regeneraci, ale jaterní regeneraci je možné ovlivnit i z pohledu ochrany tzv. hepatoprotektiv, látek nebo preparátů, které pozitivně ovlivňují funkci jaterních buněk při různých jaterních chorobách [42]. Většinou se nejedná o léky působící na prvotní příčinu jaterní choroby, ale o preparáty vedoucí ke zpomalení procesu fibrotizace a tím vedoucí ke zpomalení vzniku jaterní cirhózy snížením oxidačního stresu. Tyto účinky byly potvrzeny u preparátů s kombinací silymarinu, vitamínu A, E, dalším hepatoprotektivem je preparát obsahující esenciální fosfolipidy, který ovlivňuje funkce poškozených membrán hepatocytů i buněčných organel [43]. Mechanismus využívající nahrazení toxických substancí látkami netoxickými je uplatňovaný pomocí kyseliny ursodeoxycholové při cholestatických jaterních chorobách [44]. V poslední době se využívají i další rostlinné přípravky a výtažky, u nichž je většinou největším problémem nízká biodostupnost [45]. Podpůrná léčba chronických jaterních chorob by měla směřovat ke zpomalení či zastavení procesu fibrotizace, stabilizovat poškozenou metabolickou funkci hepatocytu, snižovat rozsah nekrózy.

#### Kyselina ursolová

Kyselina ursolová (3-beta-3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic-acid) je přírodní chemická sloučenina patřící mezi terpeny, látky obsahující 6 isoprenových jednotek tzv. triterpénů (30 atomů C), jejichž biosyntéza je založena na skvalenu. Jde o látku vyskytující se v celé řadě rostlin, bobulí,

květin, ale i léčivých rostlin. Dosud bylo přírodních zdrojů izolováno více jak tisíc triterpenoidů s neuvěřitelnou škálou biologických aktivit, mezi něž patří vlastnosti protizánětlivé, protirakovinné, antiangiogenní a byly popsány i vlastnosti hepatoprotektivní [46]. Nejvyšší koncentrace kyseliny ursolové [47] se nachází u zástupců bylin v rozmarýnu, šalvěji a thymiánu, v oleandru a levanduli jako zástupci květin a v případě ovoce jde o nejvyšší koncentraci v jablkách, kde je třeba rozlišit nejen jednotlivé druhy, ale i výskyt - slupky jablek obsahují několikanásobně více kyseliny ursolové než dužnina. Z tohoto u nás celoročně dostupného ovoce měly největší koncentrace kyseliny ursolové odrůdy Jonagold nebo Golden delicious [46].

Biologická dostupnost kyseliny ursolové je problematičtější z důvodu jejich hydrofóbních vlastností, a proto první publikace posuzovaly vlastnosti kyseliny ursolové na organismus většinou rozpuštěné v látkách lidskému tělu nepřístupných (aceton, dichlormethan, etanol, metanol). Experiment zjišťující vliv kyseliny ursolové rozpuštěné v etanolu po předchozí izolaci této látky z Eucalyptu tereticornis na alkoholové poškození jater potvrdil snížení ztrát až 76 % životaschopných hepatocytů [48]. Podobný experiment potvrdil snížené hladiny markerů peroxidace lipidů i celkového bilirubinu [49]. Efekt kyseliny ursolové na metabolické poruchy u diet s vysokým obsahem tuků u myši a potkanů, i když rozpuštěné v 0,5% roztoku dimetylsufoxidem v kombinaci s rosiglitazonem se potvrdilo snížení akumulace lipidů v játrech [50], k těmto závěrům došel i experiment s UA zamíchaný ve vysokotukové dietě [51]. Některé experimenty rozpouští kyselinu ursolovou ve fyziologickém roztoku, jako i jediná publikace zkoumající vliv UA na jaterní regeneraci [52], kdy i přes nízkou biologickou dostupnost bylo potvrzen vliv na UA na buněčný cyklus stimulací exprese cyklinů v G1 fázi buněčného cyklu a C/EBP proteinů.

Kvůli hydrofóbním vlastnostem kyseliny ursolové se začaly v posledních letech objevovat publikace využívající kyselinu ursolovou navázanou ve formě stearylglukosidu ursolové kyseliny [53] různých fosfolipidových komplexů [54] nebo nanočástic [55]. Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, které v závislosti na počtu propojených glukózových jednotek glykosidickými  $\alpha$  1-4 vazbami, rozdělujeme na alfa, beta a gama (alfa - 6, beta - 7, gama - 8 oligosacharidových podjednotek). Molekuly běžných cyklodextrinů mají tvar dutého komolého kuželu, přičemž volné hydroxylové skupiny se nacházejí na jeho okrajích – soustředěním hydroxylových skupin se okraje dutiny cyklodextrinů stávají relativně hydrofóbní, čímž je možné vytvořit inkluzní komplexy. Další možností zvýšení dostupnosti hydrofóbní kyseliny ursolové je mikronizace či homogenizace, tedy postup často využívaný ve farmacii. Tento postup byl v rámci vytvoření fosfolipidového komplexu též proveden [54]. Zapouzdření kyseliny ursolové do cyklodextrinu a tím zvýšení dostupnosti téměř o 1 řád, anebo zvýšení biologické dostupnosti mikronizací (ovlivnění velikostí) nebylo dodnes publikováno.

Kyselina ursolová je v poslední době podrobována mnoha experimentům dokazující vliv na organismus při některých civilizačních onemocněních i na metabolismus sacharidů, lipidů a zánětlivých onemocněních i karcinomů. Celkově lze zhodnotit, že kyselina ursolová příznivě ovlivňuje farmakologické procesy, moduluje některé signální cesty jako prevence před vznikem chronických onemocnění.

Pro použití v potravinářském průmyslu byly schváleny všechny tři základní cyklodextriny (CD), přičemž  $\alpha$ - a  $\gamma$ -CD patří mezi látky s certifikací nejvyšší bezpečnosti. Cyklodextriny  $\alpha$  při orálním podání mají dovolené dávky až 6000 mg/den,  $\gamma$ -cyklodextriny 10 000 mg/den.  $\beta$ -cyklodextriny mají přidělený tzv. „kód E“ používaný pro přídatné látky, tj. E 459. Maximální povolená koncentrace pro  $\beta$ -cyklodextriny v potravinářském výrobku činí 500 mg/den [56].  $\beta$ -cyklodextriny byly zařazeny do dvou funkčních skupin potravinářských přídatných látek, a sice jako *nosič a rozpouštědlo*, a rovněž jako *stabilizátor*. *Nosiče a rozpouštědla* se užívají se k rozpouštění, ředění, disperzi a jiné fyzikální úpravě přídatné látky a potravinového doplňku, aniž přitom mění jejich technologickou funkci nebo mají vlastní technologický efekt. Jejich užití usnadňuje manipulaci, aplikaci nebo použití přídatné látky. *Stabilizátory* umožňují udržovat fyzikálně-chemické vlastnosti potraviny.

## 5. CÍLE PRÁCE

- 1) Zhodnotit schopnost jater regenerovat po částečné hepatektomií u dvou různých kmenů potkanů – potkanů kmene Wistar (kontrolní skupina) a Pražských hereditárně hypercholesterolemických potkanů (u kterých se nepředpokládá porucha receptorů pro leptin a jejich metabolismus lipidů je bližší metabolismu lidí) po dietním navození prosté steatózy.
- 2) Zjistit vliv kyseliny ursolové podávané ve formě enkapsulátu s  $\beta$  a  $\gamma$  cyklodextriny a ve formě mikronizované z přírodních zdrojů na metabolismus lipidů a na jaterní regeneraci.
- 3) Najít a ověřit dostupný marker pro hodnocení jaterní regenerace.

## 6. METODY

### Pokusná zvířata

Všechny experimenty na zvířatech byly schváleny Odbornou komisí pro dobré životní podmínky zvířat při Lékařské fakultě v Hradci Králové (nově „Odborná komise pro dobré životní podmínky zvířat“) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT-42093-2015-5).

Parciální hepatektomie (PH) byla u všech 3 experimentu provedena v celkové anestezii podle modelu 2/3 hepatektomie podle modelu Higgins a Anderson [57] ve Viváriu a radioizotopových laboratořích Lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Všechny invazivní zákroky byly prováděny v éterové inhalační anestezii ve funkční digestoři.

### 6.1. Experiment vlivu steatózy jater na jejich regenerační schopnost

V experimentu byli použiti zdraví samci potkanů kmene Wistar (BioTest Konárovice, Česká republika) a Pražský hereditárně hypercholesterolemický potkan (PHHC) z IKEM (Praha, Česká republika). Během pokusů byl sledován průměrný přírůstek váhy, spotřeba vody a diet a pravidelně byla 1x týdně potkanům odebírána krev z retroorbitálního sinu v anestezii (odběrové zkumavky Sarstedt, Německo). Krev byla centrifugována při 2000 rcf., 10 minut v chlazené centrifuze, plazma byla rozdělena do alikvotačních zkumavek a zamražena na  $-20^{\circ}\text{C}$ , odebrané tkáně jater byly ihned zamraženy na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Skupiny potkanů

Potkani byli po aklimatizaci (1 týden) rozděleni do 8 skupin, v každé skupině bylo 8 potkanů.

- Potkani kmene Wistar - standardní laboratorní dieta (SLD) - kontrolní skupina (W-SLD)
- Potkani kmene Wistar - SLD dieta s přídavkem 4 % cholesterolu (W-CHOL)
- Potkani kmene Wistar – SLD dieta methionin-cholin deficitní (W-MCDD)
- Potkani kmene Wistar - SLD dieta s přídavkem kyseliny orotové (W-ORO)
- Potkani kmene PHHC - standardní laboratorní dieta (SLD) - kontrolní skupina (P-SLD)
- Potkani kmene PHHC - SLD dieta s přídavkem 4 % cholesterolu (P-CHOL)
- Potkani kmene PHHC – SLD dieta methionin-cholin deficitní (P-MCDD)
- Potkani kmene PHHC - SLD dieta s přídavkem kyseliny orotové (P-ORO)

V experimentu byly stanoveny koncentrace lipidů (tCH, HDL a LDL CHOL, TAG), žlučové kyseliny a katalytické aktivity enzymů (ALT, AST). Technikou Western blot byly v homogenátech jaterní tkáně (cca 200 mg vzorku) exprese proteinů ACAT-2, HMG-CoA reductázy, CYP7A1 i LDL receptoru byl zpracován podle Mičudy [129]. Syntéza DNA byla stanovena podle Short [59] a obsah jaterních DNA byl stanoven pomocí difenylaminové metody popsané Burtonem [60] na přístroji Beckman Coulter LS 6000LL (Fullerton, CA, USA)

### 6.2. Experiment s kyselinou ursolovou

Celkově jsme otestovali 4 formy substancí ursolátu. Dvě formy kyseliny ursolové byly podány ve formě cyklodextrinů beta a gama (připravila firma Betulines, Stříbrná Skalice, ČR). Další dvě formy kyseliny ursolové byly připraveny homogenizací (skupina HAP, velikost částic  $\text{Ø} > 5 \mu\text{m}$ ) a mikronizací (skupina MAP, velikost částic  $\text{Ø} = 5 \mu\text{m}$ ). Na přípravu těchto forem kyseliny ursolové byly využity jablečné slupky odrůdy Jonagold a během přípravy nebyla použita žádná organická rozpouštědla (firma K2pharm, Opava, ČR). Všechny diety byly podány ve stejný čas ve formě vodné suspenze gastrickou sondou přímo do žaludku. Kyselina ursolová obsažená v jednotlivých substancích byla podána v koncentraci 20 mg v aplikované dávce. Množství kyseliny ursolové v jablečných slupkách bylo ověřeno stanovením obsahu kyseliny ursolové v jablečných slupkách po

extrakci v ethylacetatu metodou GC-MS [58]. Množství kyseliny ursolové byla 5,6 g/100 g jablečných slupek odrůdy Jonagold. Testované suspence byly podávány potkanům po dobu 7 dní.

### Skupiny potkanů

Potkani byli po aklimatizaci (1 týden) rozděleni do 7 skupin, v každé skupině bylo 6 potkanů.

- standardní laboratorní dieta - kontrolní skupina (CTRL)
- standardní laboratorní dieta - beta-cyklodextrin kyselina ursolová (bCD) 7 dní
- standardní laboratorní dieta - gama-cyklodextrin kyselina ursolová (gCD) 7 dní
- standardní laboratorní dieta - homogenizované jablečné slupky (HAP) 7 dní
- standardní laboratorní dieta - mikronizované jablečné slupky (MAP) 7 dní
- vysokotuková dieta - gama-cyklodextrin kyselina ursolová (HF gCD) 7 dní
- vysokotuková dieta - mikronizované jablečné slupky (HF MAP) 7 dní

V experimentu s kyselinou ursolovou byly stanoveny koncentrace lipidů (tCH, HDL a LDL CHOL, TAG), žlučové kyseliny a katalytické aktivity enzymů (ALT, AST). Dále byly stanoveny koncentrace hepatocytárního růstového faktoru (HGF) v plazmě enzymatickou EIA. Molekulárně biologickými technikami byly stanoveny exprese mRNA HGF, PPAR $\alpha$ , SREBP a CYP7A1 (Tab.1). Relativní exprese (RE) jednotlivých genů byla spočítána pomocí metody ddCT ( $\Delta\Delta C_t$  method) v porovnání s vybraným referenčním genem (Hprt) [37].

**Tab. 1 Seznam použitých genů**

ID genu	Gen
Rn00566673_m1	<b>Hgf</b> hepatocyte growth factor
Rn01527840_m1	<b>Hprt1</b> hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
Rn00566193_m1	<b>Ppara<math>\alpha</math></b> peroxisome proliferator activated receptor alpha
Rn01495769_m1	<b>Srebf1</b> sterol regulatory element binding transcription factor 1
Rn00564065_m1	<b>Cyp7a1</b> cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1

### 6.3. Experiment s kyselinou ursolovou – dechové testy

Celkově jsme otestovali 2 formy substancí ursolátu. Jedna forma kyseliny ursolové byla podána ve formě gama-cyklodextrinů (připravila firma Betulines, Stříbrná Skalice, ČR) a byla podávána dvěma způsoby – intravenózně (i.v.) a intragastricky (p.o.). Další testovaná forma byla připravena mikronizací (skupina MAP, velikost částic  $\varnothing = 5 \mu\text{m}$ ). Testované suspence podávané p.o. byly podávány potkanům po dobu 7 dní, intravenózně (*vena saphena*) byla forma gCD podávaná 4 dny.

### Skupiny potkanů

Potkani byli po aklimatizaci (1 týden) rozděleni do 4 skupin, v každé skupině bylo 6 potkanů.

- standardní laboratorní dieta - kontrolní skupina (CTRL)
- standardní laboratorní dieta - gama-cyclodextrin kyselina ursolová (gCD i.v.) 4 dny
- standardní laboratorní dieta - gama-cyclodextrin kyselina ursolová (gCD p.o.) 7 dní
- standardní laboratorní dieta - mikronizované jablečné slupky (MAP) 7 dní

Během experimentu byl vzorkován vydechovaný vzduch potkanů vzhledem k produkci značeného  $^{13}\text{CO}_2$  ze substrátu do vydechovaného vzduchu. Pro vzorkování vydechovaného vzduchu byli potkani umístěni do fixační klíčky se zajištěným průtokem vzduchu (100 ml/min.) bez látek kontaminujících stanovení značeného oxidu uhličitého. Pro odběr vydechovaného vzduchu byly použity zkumavky VACUETTE 9 ml bez aditiv (Grainer-Bio-One, Frickenhausen, Německo).



Dechové testy probíhaly podle daného schéma (časové intervaly): 0 min - podání intragastricky 0,5 ml značeného traceru  $^{13}\text{C}$ -fenylalaninu o koncentraci 10 mg/1 ml vody - 15 min - 30 min - 45 min - 60 min – ukončení. Poměr  $^{13}\text{CO}_2$  :  $^{12}\text{CO}_2$  byl měřen na přístroji IR-MS (Isotope Ratio Mass Spectrometer, Europa Hydra 2020, Anglie). Výsledky přeměny  $^{13}\text{C}$ -fenylalaninu jsou vyjádřené jako kumulativní množství  $^{13}\text{CO}_2$ /hod.

#### 6.4. Kalkulace hmotnosti jater

Hmotnost jater byla kalkulována podle rovnice Hepatic regeneration rate (HRR) autorů Selznera a Claviena [36]:

Hepatic regeneration rate (HRR) (%):  $[C - (A - B)] / A \times 100$

A - celková vypočtená hmotnost jater při parciální hepatektomii (70%)

B - hmotnost jaterního zbytku při parciální hepatektomii (70%)

C - hmotnost jater 24 hodin po parciální hepatektomii (v době usmrcení).

#### 6.5. Histologické vyšetření jater

Jaterní tkáň pro histopatologický preparát byl získán z jednoho standardního místa (*processus anterior dexter et processus caudatus lobi caudati*) a fixován do 10% roztoku formalínu. Histologické preparáty jaterní tkáň byly obarveny hematoxylin-eosinem a hodnoceny nezávisle dvěma odborníky (Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové). Hodnocení steatózy bylo následující: mírná = 5 - 29 %, střední = 30 – 59 % a vážná = u více jak 60% hepatocytů.

#### 6.6. Statistická analýza

Před výběr statistických analýz jsme testovali normalitu rozložení dat, v případě Gaussovského rozložení jsme použili parametrickou One-Way Anovaa data jsou vyjádřena jako průměr s uvedením smerodatné odchylky. V případě nenormální distribuce jsme použili neparametrický Kruskal-Wallis posléze Dunnovým post hoc testem. Všechna data jsou vyjádřena jako medián s uvedením interkvartilových rozmezí. Hladina významnosti byla  $p < 0,05$ .

## 7. VÝSLEDKY

### 7.1. Experiment vlivu steatózy jater na jejich regenerační schopnost

Hmotnosti potkanů ukázaly nejmenší přírůstky u diety s kyselinou orotovou u obou skupin potkanů kmene Wistar a Pražských hereditárně hypercholesterolemických potkanů (PHHC). Při prozkoumání růstových křivek dodavatelů potkanů (Wistar i PHHC) u žádné skupiny nebyla potvrzena stagnace přírůstků, průměrný přírůstek potkanů Wistar i PHHC zcela koreluje se stářím potkanů.

Podávání jednotlivých diet potkanům kmene Wistar způsobilo během 28 dní očekávané změny v krvi – u potkanů W-CHOL byly v porovnání W-SLD byly potvrzeny signifikantně zvýšené hladiny celkového cholesterolu a LDL cholesterolu i hladiny bilirubinu. Výsledky u diety s kyselinou orotovou naopak vykazaly významné snížení celkového cholesterolu, LDL cholesterolu již před PH s vysokými koncentracemi bilirubinu a dieta methionin-cholin deficitní nevykazuje žádné změny proti skupině s SLD dietou. Výsledky PHHC potkanů potvrdily signifikantně zvýšené hladiny celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu u potkanů PHHC krmených SLD i v porovnání s potkany potkanům Wistar. Diety MCDD a ORO u PHHC potkanů prokázaly signifikantní snížení celkového cholesterolu na hladiny jako u stejných diet potkanů Wistar. Po parciální hepatektomii PHHC výsledky potkanů vykazují ve všech parametrech stejný trend jako u dané skupiny potkanů kmene Wistar. Signifikantně zvýšené katalytické aktivity enzymu ALT charakterizující poškození jaterního parenchymu byly prokázány a skupiny CHOL kmene Wistar a i u všech skupin PHHC po částečné hepatektomii. Dieta obohacená o kyselinu orotovou vedla k jaternímu hepatocelulárnímu poškození, hladiny ALT a AST byly signifikantně zvýšené již před PH jak u kmene Wistar i u kmene PHHC v porovnání s ostatními skupinami. Po PH výsledky ALT i AST vykazují u této diety dvojnásobné hladiny.

Pomocí metodiky Western blot [61] byla vyšetřena jaterní exprese LDL receptoru - zásadního receptoru pro vychytávání cholesterolu z plazmy a jaterní exprese enzymů zasahujících do metabolismu cholesterolu: 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A reduktázy (HMG-CoA), klíčového enzymu regulace cholesterolové syntézy a acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2) – enzymu odpovědného za intracelulární esterifikaci cholesterolu. Výsledky jsou vždy vyjádřeny jako protein ve vztahu k intaktním játrům W-SLD (před PH, který je 100 %). Stanovené proteiny byly vztaženy k beta-aktinu. U potkanů kmene Wistar byl nalezen významný vzestup exprese HMG-CoA reduktázy u MCDD před i během parciální hepatektomie na 146 reps. 148 % ( $p < 0,05$ ). Dieta CHOL vykazovala snížené hodnoty exprese enzymu ACAT-2 a naopak vyšší expresi u LDL receptoru po PH v porovnání s kontrolní skupinou SLD, exprese HMG-CoA reduktázy je u této diety i přes zvýšený příjem cholesterolu stejná. Výsledky exprese u diety ORO ukazují odlišný trend výsledků exprese 24 hod po PH proti dietě SLD – postupný pokles exprese HMG-CoA reduktázy, významně sníženou esterifikaci cholesterolu (pokles exprese ACAT-2) a sníženou expresi LDL receptoru. Výsledky exprese u potkanů PHHC (skupiny SLD, CHOL a MCDD) vykazují stejný trend jako u potkanů kmene Wistar, exprese LDL receptoru vykazovala též stejný trend, ale zvýšení exprese nybalo tak významné jako u potkanů Wistar. Expresse ACAT-2 je u všech skupin PHHC potkanů 24 hod po PH významně snížená a podporuje využití cholesterolu pro výstavbu nových membrán. Dieta ORO u PHHC potkanů vykazuje významně snížené exprese po PH u HMG-CoA reduktázy, ACAT-2 i LDL receptoru za 24 hod.

#### Syntéza jaterních DNA

Částečná hepatektomie odstraněním 2/3 jater navodila pokles celkového obsahu DNA (Tab. 2 a 3). Syntéza jaterních DNA byla u PHHC potkanů při porovnání hodnot za 18 a 24 hodin zpožděna, ale nikoli blokována. MCDD dieta vykazovala aktivitou DNA stejných hodnot jako SLD dieta. Nejnižší syntézu DNA vykazuje skupina s kyselinou orotovou, dokonce u potkanů PHHC se

hodnota syntézy DNA 24 hod po PH snižuje. V souladu se všemi dalšími výsledky i histologickému nálezu kyselina orotová způsobila trvalé poškození jaterní tkáně ještě před parciální hepatektomií a vedla k zahájení reparačním procesům ještě před samotným chirurgickým zákrokem.

**Tab. 2. Potkani kmene Wistar – vliv PH na obsah DNA**

ANALYT	ČAS	SKUPINY			
		W-SLD	W-CHOL	W-MCDD	W-ORO
Hmotnost jaterního zbytku (g)	T1	5,38 ± 0,23	6,72 ± 0,41*	5,68 ± 0,18	6,74 ± 0,45*
	T2	5,40 ± 0,11	6,97 ± 0,27	6,20 ± 0,47	7,09 ± 0,44**
Syntéza jaterních DNA (Bq/mg DNA)	T1	2,29 ± 0,44	1,11 ± 0,26*	0,97 ± 0,19*	0,54 ± 0,22**
	T2	11,21 ± 1,10	6,09 ± 0,82**	11,27 ± 1,24	3,44 ± 0,64***
Celkový obsah DNA (mg DNA/g jater)	T1	1,87 ± 0,03	1,80 ± 0,06	2,22 ± 0,08**	1,45 ± 0,04***
	T2	2,01 ± 0,06	1,75 ± 0,05*	2,07 ± 0,07	1,42 ± 0,08***

Tab. 2 Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr ± SD, n = 8); W – potkani kmene Wistar, SLD – standardní laboratorní dieta, CHOL – dieta s vyšším obsahem cholesterolu, MCDD – dieta methionin-cholin deficitní, ORO - dieta s kyselinou orotovou

Signifikantní rozdíly proti kontrolní skupině W-SLD v daném čase PH (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001)

T1 – syntéza DNA, hmotnosti jater a syntéza cholesterolu 18 hod po PH

T2 – syntéza DNA, hmotnosti jater a syntéza cholesterolu 24 hod po PH

**Tab. 3. Potkani PHHC – vliv PH na obsah DNA**

ANALYT	ČAS	SKUPINY			
		P-SLD	P-CHOL	P-MCDD	P-ORO
Hmotnost jaterního zbytku (g)	T1	3,93 ± 0,19	4,85 ± 0,22*+	4,34 ± 0,16	7,07 ± 0,41+++
	T2	4,39 ± 0,24	5,70 ± 0,34+	4,68 ± 0,16	7,37 ± 0,41+++
Syntéza jaterních DNA (Bq/mg DNA)	T1	0,65 ± 0,36*	0,28 ± 0,04	0,59 ± 0,20	3,35 ± 1,13++
	T2	5,92 ± 1,27	4,16 ± 1,00	5,44 ± 1,17	2,44 ± 1,07
Celkový obsah DNA (mg DNA/g jater)	T1	1,99 ± 0,05	1,72 ± 0,04+	1,99 ± 0,08	1,17 ± 0,04+++
	T2	2,01 ± 0,13	1,56 ± 0,02+	1,85 ± 0,18	1,15 ± 0,09+++

Tab. 3 Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr ± SD, n = 8); P = PHHC – Pražský hereditární hypercholesterolemický potkan, SLD – standardní laboratorní dieta, CHOL – dieta s vyšším obsahem cholesterolu, MCDD – dieta methionin-cholin deficitní, ORO - dieta s kyselinou orotovou

Signifikantní rozdíly proti kontrolní skupině W-SLD v daném čase PH (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001)

Signifikantní rozdíly proti kontrolní skupině PHHC-SLD v daném čase PH (+ p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001)

T1 – syntéza DNA, hmotnosti jater a syntéza cholesterolu 18 hod po PH

T2 – syntéza DNA, hmotnosti jater a syntéza cholesterolu 24 hod po PH

## 7.2. Experiment s kyselinou ursolovou

Počáteční hmotnosti potkanů se v jednotlivých skupinách nelišily. Vybrané skupiny potkanů s vysokotukovou dietou vstoupily do samotného experimentu s kyselinou ursolovou o 6 týdnů později, kdy celých 6 týdnů byli potkani krmeni vysokotukovou dietou, průměrná spotřeba diety byla od začátku experimentu v těchto skupinách vyšší s postupným nárůstem hmotnosti. V ostatních skupinách se průměrná spotřeba diety významně nelišila a ani váhové přírůstky neprokázaly signifikantní změny mezi jednotlivými dietami, experiment ale trval pouze 7 dní.

Hladina cholesterolu a triacylglyceridů v plazmě potkanů u skupin krmených vysokotukovou dietou prokázaly signifikantní zvýšení proti kontrolní skupině, ale podáním 20 mg kyseliny ursolové ve formě mikronizované i ve formě cyklodextrinů došlo k signifikantnímu poklesu těchto analytů na hladinu odpovídající ostatním experimentálním skupinám. Hladina triacylglyceridů po podání kyseliny ursolové byla ve všech skupinách nižší proti kontrolní skupině (CTRL). Katalytické aktivity enzymů během podávání kyseliny ursolové nebyly zvýšeny ani v jedné skupině. Toto potvrzuje cyklodextriny jako látky nepoškozující jaterní parenchym a podání připravených substancí s kyselinou ursolovou se jeví jako bezpečné.

U všech skupin potkanů včetně skupiny HFMAP byl 24 hodin po parciální hepatektomii potvrzen pokles koncentrace celkového cholesterolu, jenom u skupiny HFgCD zůstaly koncentrace celkového cholesterolu na stejné hladině jako před parciální hepatektomií.

### Expres mRNA HGF a koncentrace HGF v plazmě

Ovlivnění jaterní regenerace kyselinou ursolovou podávané v různých formách na jaterní regeneraci po částečné hepatektomii je prezentován v Tab. 4. Expres mRNA HGF byla signifikantně zvýšená u skupiny HAP a HFgCD v játrech 24 hod po PH. Dále byly stanoveny koncentrace HGF v plazmě, jejichž statistická významnost je v souladu s výsledky exprese mRNA HGF a byla potvrzena korelace mezi expresí HGF a koncentrací HGF v plazmě (Graf č.1). Expres HGF a plazmatické hladiny HGF byly zároveň porovnány s vypočítaným parametrem „Hepatic regenerative rate“ (HRR) získaným z hmotností jater při PH, po PH a odhadnutou hodnotou celkové hmotnosti jater [36]. Byly nalezeny významně zvýšené výsledky u skupin HAP a HFgCD proti kontrolní skupině. Zvýšené ale nikoli již signifikantně jsou i výsledky skupiny gCD ( $p < 0,05$ ).

**Tab. 4. Vliv jednotlivých diet na expresi mRNA HGF, koncentrace HGF v plazmě a výpočet HRR**

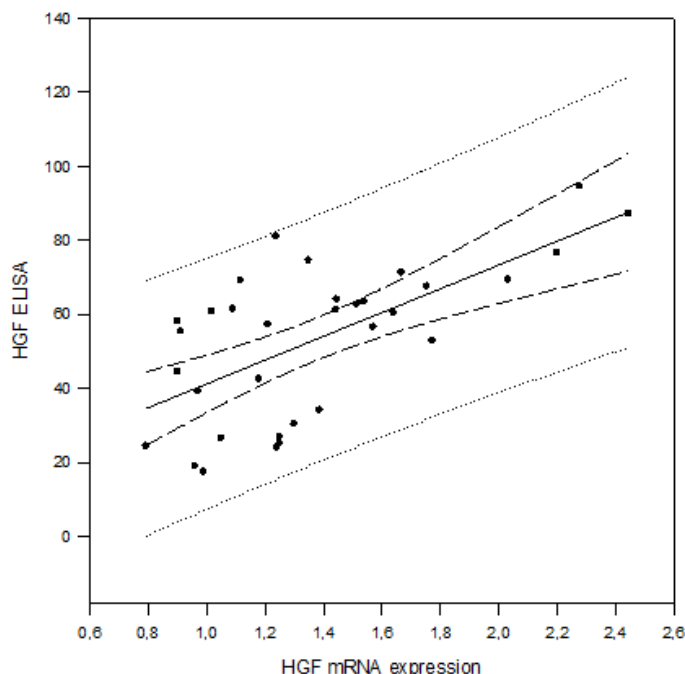
Skupina	CTRL	bCD	gCD	HAP	MAP	HFgCD <sup>♠</sup>	HFMAP <sup>♠</sup>
HGF (ng/l) v krvi	31,46 (25,05-42,82)	43,58 (36,22-48,06)	55,76 (41,91-59,83)	62,67 (57,11-68,52)*	43,56 (34,36-49,62)	63,58 (56,88-78,83)*	41,96 (34,04-52,87)
Expres mRNA HGF	1,108 (1,09-1,203)	1,097 (1,02-1,193)	1,260 (1,16-1,315)	1,975 (1,815-2,109)*	1,037 (0,987-1,126)	1,341 (1,256-1,497)*	2,178 (1,893-2,226)*
HRR (%)	11,4 (8,5 – 14,1)	15,4 (12,5 – 17,6)	14,5 (12,8 – 17,1)	17,4 (15,8 – 19,9)*	15,5 (12,7 – 17,1)	17,7 (16,1 – 19,7)*	17,3 (15,9 – 18,9)*

Tab. 4 Hodnoty vyjádřené jako medián a interkvantilové rozpětí, \* $p < 0,05$  vs. CTRL skupině; CTRL – kontrolní skupina (SLD dieta), bCD – SLD dieta +  $\beta$ -cyklodextrin, gCD – SLD dieta +  $\gamma$ -cyklodextrin, HAF – SLD dieta + homogenizované jablečné slupky, MAP – SLD dieta + mikronizované jablečné slupky, HFgCD - vysokotuková dieta +  $\gamma$ -cyklodextrin, HFMAP – vysokotuková dieta + mikronizované jablečné slupky SLD – standardní laboratorní dieta, <sup>♠</sup>hodnoty – 7. týden experimentu (den 48 a 49)

**Graf 1. Spermán korelace exprese mRNA HGF a koncentrace HGF v plazmě**

GROUP	R	$p < 0.05$
HGF EIA vs. HGF expression	0,379	0,04

**Regression, Conf. & Pred.**



Snížené koncentrace žlučových kyselin byly nalezeny u skupin MAP a HFMAP, nicméně podle hladin žlučových kyselin ani exprese mRNA CYP7A1 nedošlo k blokování toku žlučových kyselin, i když korelace mezi expresí CYP7A1 a hladinou žlučových kyselin po parciální hepatektomii nalezena nebyla ( $R = -0,0484$ ).

Klíčovou úlohu v udržení homeostázy cholesterolu mají receptory sterol regulatory element binding protein (SREBP) a nukleární receptor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\alpha$ ), který zintenzivňuje reverzní transport cholesterolu zvýšením syntézy apoA-I. SREBP zahajuje expresi genů – HMG-CoA reduktázy, LDL receptoru a skvalen syntázy. Významné zvýšení exprese SREBP bylo potvrzeno u skupiny HAP, a naopak u ostatních skupin je 24 hod po PH syntéza cholesterolu přes SREBP potlačena v porovnání s kontrolní skupinou. Exprese PPAR $\alpha$  byla významně zvýšena u všech skupin kromě bCD.

**7.3. Experiment s kyselinou ursolovou - dechové testy**

Do naší pilotní studie zjišťující funkční kapacitu jater pro metabolické funkce během jaterní regenerace prostřednictvím podání  $^{13}\text{C}$  fenylalaninu byly vybrány dvě substance kyseliny ursolové – ve formě mikronizátu (MAP) a  $\gamma$ -cyklodextrinu (gCD podávaného dvěma způsoby *p.o.* a *i.v.*). Výsledky přeměny  $^{13}\text{C}$  fenylalaninu vyjádřené jako kumulativní množství  $^{13}\text{CO}_2$ /hod. jsou uvedeny v tabulce 5 (Tab. 5 a Graf 2.). Dechové testy byly provedeny u potkanů před částečnou hepatektomií, kdy výsledky prokázaly množství vydechaného  $^{13}\text{CO}_2$  ve všech skupinách stejné (v tabulce čas T<sub>1</sub>). Po podání ursolátu s gCD (skupiny gCD *p.o.* i gCD *i.v.*) i MAP došlo k signifikantnímu zvýšení v porovnání s kontrolní skupinou (v tabulce čas T<sub>2</sub>). Skupina potkanů s intravenózním podáním ursolátu ve formě  $\gamma$ -cyklodextrinu prokázala nejrychlejší přeměnu  $^{13}\text{C}$  fenylalaninu, což je nejspíše

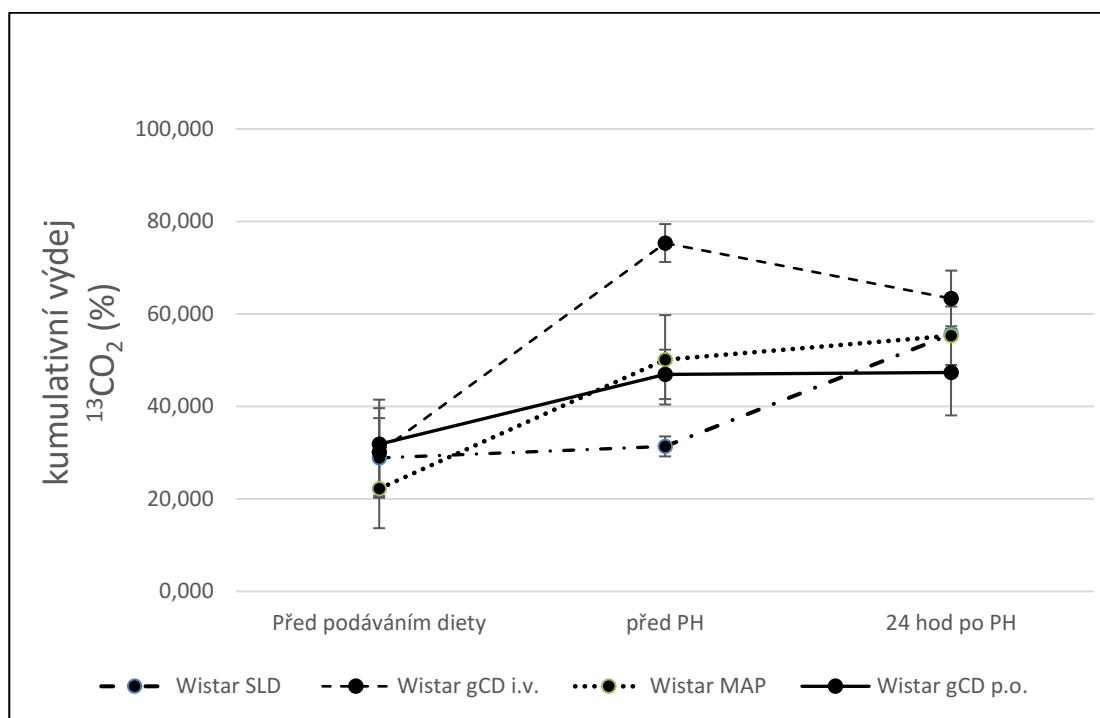
způsobeno formou podání. Skupiny s kyselinou ursolovou podanou *p.o.* (skupiny gCD a MAP) též prokázaly významné zvýšení proti kontrolní skupině, u níž zůstaly hodnoty kumulativního množství vydechaného  $^{13}\text{CO}_2$ /hod. stejné jako před parciální hepatektomií. Po částečné hepatektomii zůstaly hodnoty kumulativního množství  $^{13}\text{CO}_2$ /hod. u všech experimentálních skupin s kyselinou ursolovou obdobně vysoké jako před parciální hepatektomií a došlo k nárůstu vydechaného  $^{13}\text{CO}_2$  došlo i u kontrolní skupiny (v tabulce čas T<sub>3</sub>). Naše výsledky prokázaly stimulaci jaterních hepatocytů přeměnou fenylalaninu ještě před částečnou hepatektomií.

**Tab. 5. Kumulativní množství vydechaného  $^{13}\text{CO}_2$  odpovídající celkové kapacitě metabolických funkcí během jaterní regenerace**

SKUPINA	CTRL	gCD <i>i.v.</i>	gCD <i>p.o.</i>	MAP
před podání ursolátů (před začátkem experimentu) – T1	28,85 ± 5,6	29,6 ± 5,8	31,81 ± 4,65	22,18 ± 4,0
po podání ursolátů – T2	31,35 ± 2,65	75,32 ± 2,24 *** +++	46,92 ± 2,58 *,+	50,07 ± 4,67 *** +++
24 hod po PH – T3	55,6 ± 1,40 *	63,34 ± 3,297 ***	47,33 ± 4,48 +	55,28 ± 3,05 ***

Tab. 5 Hodnoty vyjádřené jako medián a interkvantilové rozpětí, \* $p < 0,05$  vs. CTRL skupině; CTRL – kontrolní skupina (SLD dieta), gCD *i.v.* – SLD dieta +  $\gamma$ -cyklodextrin podaný *i.v.*, gCD *p.o.* – SLD dieta +  $\gamma$ -cyklodextrin podaný *p.o.*, MAP – SLD dieta + mikronizované jablečné slupky  
Signifikantní rozdíly proti kontrolní skupině CTRL (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )  
Signifikantní rozdíly v rámci skupiny (+  $p < 0,05$ , +++  $p < 0,001$ )

**Graf 2. Kumulativní množství vydechaného  $^{13}\text{CO}_2$**



## 8. DISKUZE

### 8.1. Experiment s navozením NAFLD

V předkládané disertační práci byl studován vliv steatózy jater na průběh jaterní regenerace. Pro zhodnocení jaterní regenerace u jater poškozených NAFLD jsme zvolili tři různé experimentální diety podle literatury navozující NAFLD a zároveň jsme zvolili 2 kmeny potkanů – zdravé potkany kmene Wistar a Pražské hereditárně hypercholesterolemické potkany (PHHC) – jde o inbrední linii potkanů s vysokou bazální cholesterolemií, indukovanou pouze dietním cholesterolem. Hypercholesterolemie je u těchto potkanů způsobena poruchou zpětnovazebné regulace syntézy cholesterolu v játrech a složení lipoproteinů a metabolismus lipidů je z tohoto důvodu velmi podobné lidské patologii.

První zvolenou dietou pro navození modelu NAFLD byla dieta obohacená o 4 % cholesterolu rozpuštěného v kukuřičném oleji, který svým složením nasycených a omega-6 polynenasycených mastných kyselin přispívá ke zvýšení peroxidace lipoproteinů zvýšenou aktivitou NF- $\kappa$ B i TNF $\alpha$  s důsledkem zvýšené fibrotizace jaterní tkáně. Vysokocholesterolová dieta u potkanů kmene Wistar krmených 28 dní způsobila v souladu s literaturou [5, 62] zvýšení plazmatických hladin lipidů – celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triacylglyceridů. Na základě výsledků jsme prokázali, že nadměrný příjem cholesterolu potravou v našem experimentu nevedl k ovlivnění syntézy a vstřebání cholesterolu. Po 4 týdnech podávání této diety byla potvrzena indukovaná prostá steatóza bez známek zánětu či fibrotických změn a bez signifikantních změn aktivit ALT a AST. Stanovené hladiny inzulinu a signifikantně zvýšené hladiny glukózy v porovnání s kontrolní skupinou v našem experimentu prokazují, že sekrece inzulinu není dostatečná k udržení normoglykemie a při delším podávání této diety by pravděpodobně mohlo dojít k rozvoji inzulinové rezistence.

Dalším vhodným modelem pro navození NAFLD se zdála být dieta methionin-cholin deficitní, u níž by měl být navozen malnutriční stav s váhovým úbytkem bez inzulinové rezistence [34]. Dieta MCDD nicméně v našem experimentu prokázala u potkanů kmene Wistar nejvyšší spotřebu diety během 28 dní, která byla doprovázena adekvátním nárůstem hmotnosti. Histologické nálezy i hladiny celkového cholesterolu a triacylglyceridů v krvi nevykazovaly signifikantní změny proti kontrolní skupině potkanů. Stejně tak katalytické aktivity enzymů ALT a AST neprokázaly signifikantní změny proti kontrolní skupině. U této skupiny potkanů byly změřeny významně zvýšené exprese HMG-CoA reductázy i zvýšená esterifikace cholesterolu v jaterní tkáni. Tyto výsledky potvrzují narušení sekrece VLDL z jater a jsou v souladu se závěry publikace Veteläinen [8].

Poslední experimentální dietou byla dieta s kyselinou orotovou, která ukázala u potkanů kmene Wistar nejnižší hmotnostní přírůstky i spotřebu diety. Dále byla potvrzena snížená bazální hladina cholesterolu a TAG, a zároveň byla u těchto potkanů potvrzena zvýšená hladina bilirubinu a jaterních enzymů. Všechny tyto výsledky potvrdily zvýšenou oxidaci mastných kyselin, a to ještě před samotnou parciální hepatektomií a souhrnně prokazují, že reparační a regenerační procesy vedoucí k návratu k bazálnímu metabolismu byly podpořeny již před samotným chirurgickým zákrokem.

Při sledování změn hladin lipidových markerů během experimentu u jednotlivých diet byl nakonec potvrzen stejný trend výsledků při porovnání výsledků mezi kmeny Wistar a Pražských hereditárně hypercholesterolemických potkanů. U PHHC potkanů bylo potvrzeno, že syntéza cholesterolu i přes vyšší bazální hladinu cholesterolu byla signifikantně zvýšená ve všech dietních skupinách proti potkanům kmene Wistar, což lze vysvětlit snahou o udržení rovnováhy mezi cholesterolem a mastnými kyselinami v játrech. Hladina inzulinu u všech PHHC potkanů byla významně snížena současně se zvýšenou hladinou glukózy u všech skupin PHHC v porovnání s kontrolní skupinou, což též prokazuje nedostatečné udržení normoglykemie.

Jaterní regenerace byla hodnocena na základě inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu do DNA a byla zhodnocena syntéza DNA po provedené parciální hepatektomii. Při porovnání syntézy DNA u

kontrolní skupiny byla prokázána snížená hladina syntézy DNA 24 hodin po PH u potkanů kmene Wistar i PHHC s vysokocholesterolovou dietou. Prokazatelné zpoždění syntézy DNA při porovnání syntézy DNA za 18 a 24 hodin potvrdilo zpoždění proti kontrolní skupině. Akumulace lipidů v játrech je výsledkem porušené rovnováhy mezi syntézou triacylglyceridů a mastných kyselin a jejich exkrecí ovlivněnou signifikantním zvýšením exprese LDL receptoru, HMGCoA reduktázy spolu se sníženou esterifikací ACAT-2. Nadměrné množství lipidů vedlo ke zvýšení peroxidace v hepatocytárních membránách a k rozvoji oxidačního stresu z důvodu mitochondriální dysfunkce. U PHHC potkanů je toto zpoždění významnější než u potkanů Wistar, z důvodu nadměrného množství lipidů v játrech. Hepatocyty preferující lipidy jako zdroj energie potřebují nemalé množství lipidů pro novotvorbu membrán, a i když je přechodná akumulace tuků v časně fázi regenerace nepostradatelná, předpokládáme, že nadbytečné množství lipidů má za následek rozpražení fosforylace [63] a snížení ATP [32], v jehož důsledku dochází ke zpoždění jaterní regenerace v porovnání s kontrolní skupinou.

Výsledky syntézy DNA, histologické nálezy a hmotnosti dorůstajících jater u potkanů kmene Wistar s dietou methionin-cholin deficitní jsou v souladu se závěry publikace Picarda [5], který potvrdil na základě nezměněné exprese cyklinu E a tím přechodu G1 a S fáze buněčného cyklu stejné výsledky proliferace hepatocytů při porovnání kontrolní a MCDD diety u potkanů. Nedostatek cholinu a methioninu v dietě by měl též potvrdit změny ve fosfolipidové membráně endoplazmatického retikula jaterních buněk, ale toto v našem experimentu prokázáno nebylo. Důvodem by mohlo být nahrazení nedostatku těchto dvou aminokyselin vyšším množstvím argininu [64].

Enzymatické aktivity ALT a AST prokázaly u diety s kyselinou orotovou signifikantní zvýšení u obou kmenů potkanů, a to již před parciální hepatektomií. Histologická vyšetření prokázala zánik jader hepatocytů 24 hodin po parciální hepatektomii. Výsledky hladin lipidů, jaterních enzymů a syntéza DNA ukázaly těžké poškození jater touto dietou, téměř neslučitelné s přežitím. Poškození jater u potkanů kmene Wistar bylo natolik velké, že syntéza DNA téměř neprobíhala. U PHHC potkanů bylo poškození jater menší a syntéza DNA probíhala na úrovni srovnatelné s kontrolní skupinou. To sice ukazuje lepší adaptaci PHHC potkanů k oxidačnímu stresu způsobenému vyšším obratem lipidů, oxidaci mastných kyselin a mitochondriální dysfunkci. Nicméně dieta s kyselinou orotovou se v našem experimentu prokázala jako nevhodná pro dietní model navozující NAFLD.

## 8.2. Experiment s kyselinou ursolovou

Druhá část disertační práce spočívala v objasnění působení kyseliny ursolové získané z přírodních zdrojů na jaterní regeneraci a na expresi vybraných nukleárních receptorů u potkanů se současným sledováním hladin plazmatických lipoproteinů.

Vliv kyseliny ursolové na lipidový metabolismus byl sledován nejen při podávání standardní diety, ale i při podávání diety vysokotukové. Kyselina ursolová je látka hydrofobní, s čímž souvisí její nízká biologická dostupnost. Díky tomuto úskalí mnoho experimentů využívá extrakci kyseliny ursolové v organických rozpouštědlech, což sice zvýší její biologickou dostupnost, ale pro budoucí použití v potravinářství nebo farmacii je tento postup nevhodný. Zvýšení biologické dostupnosti jsme se snažili docílit využitím mikronizace a homogenizace – postupů ve farmacii často používaných. Pro experiment byla zvolena velikost částic 5  $\mu\text{m}$  (nebo více jak 5  $\mu\text{m}$ ), která již byla vyzkoušena v experimentu Biswase [54], a který potvrdil zvýšení biologické dostupnosti kyseliny ursolové ve formě fosfolipidových komplexů s touto velikostí částic. Další možností bylo vyzkoušení enkapsulátu s  $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextriny, oligosacharidy často používanými v potravinářském průmyslu, kdy se využívá zapouzdření kyseliny ursolové v jejich hydrofobním středu.

Cílem práce bylo ověřit efekt přírodních zdrojů kyseliny ursolové a enkapsulovaných forem kyseliny ursolové na jaterní regeneraci a najít dostupný biochemický marker z krve pro ověření jaterní regenerace.



Homeostáza cholesterolu po příjmu vysokotukové diety byla pozměněna a rovnováha mezi *de novo* syntézou v játrech, absorpcí ve střevě a biliární exkrecí by měla být narušena. V našem experimentu podání vysokotukové diety po dobu 6 týdnů potkanům kmene Wistar vedlo k signifikantnímu zvýšení hladin celkového cholesterolu a triacylglyceridů v krvi. Při podávání kyseliny ursolové v mikronizované formě a ve formě enkapsulátu s  $\gamma$ -cyklodextrinem bylo docíleno snížení koncentrací hladin cholesterolu a triacylglyceridů v porovnání s kontrolní skupinou již po sedmi dnech od začátku experimentu. Tyto výsledky jsou v souladu se známými hypolipidemickými účinky kyseliny ursolové [65]. Důvodem by mohlo být snížení aktivity HMG-CoA reductázy, což je v souladu s experimentem po podávání flavonoidového komplexu s kyselinou ursolovou [66].

Enzymatické aktivity aminotransferáz jsou velmi citlivé při prokazování poškození hepatocytů, jejich aktivita je nezávislá na etiologických faktorech a ALT je jedním ze spolehlivých markerů indikujících degradaci hepatocytů. V našem experimentu enzymatická aktivita ALT před parciální hepatektomií po podávání kyseliny ursolové nepotvrdila jaterní poškození, aktivity ALT i AST byly v porovnání s kontrolní skupinou stejné.

Vliv kyseliny ursolové byl sledován nejen na průběh jaterní regenerace, ale i na metabolismus lipidů, protože iniciační fáze jaterní regenerace je závislá na dostupnosti volných mastných kyselin a proliferační fáze začínající nejdříve 12 až 18 hodin po částečné hepatektomii preferuje jako primární zdroj energie lipidy a z tohoto důvodu je důležitá přechodná akumulace lipidů v játrech potkanů. Ve všech skupinách byla po parciální hepatektomii nalezena významně zvýšená exprese PPAR $\alpha$ . Tento nukleární receptor podporuje oxidaci mastných kyselin a tím podporuje urychlení nástupu syntézy DNA v hepatocytech. V našem experimentu se ukázalo, že i přes podávání vysokotukové diety nedošlo ke snížení exprese PPAR $\alpha$ , resp. exprese PPAR $\alpha$  zůstaly stejné v porovnání s ostatními skupinami potkanů. Exprese dalšího jaderného receptoru SREBP potvrdila signifikantní zvýšení exprese pouze ve skupině s kyselinou ursolovou podávanou ve formě homogenátu (HAP), kde byl též prokázán nejrychlejší nástup jaterní regenerace. Nárůst *de novo* syntézy mastných kyselin přes SREBP, který ovlivňuje expresi HMGCoA reductázy a LDL receptoru, souvisí s rychlejším nástupem proliferační fáze.

Parciální hepatektomie potvrdila u ALT a AST nižší aktivity enzymů v porovnání s kontrolní skupinou u všech experimentálních skupin s kyselinou ursolovou kromě vysokotukové diety s mikronizovanou kyselinou ursolovou. Toto zjištění potvrzuje domněnku, že kyselina ursolová má protizánětlivé účinky a inhibuje aktivaci NF $\kappa$ B a AP-1. [67].

V našem experimentu byl průběh jaterní regenerace sledován na základě stanovení hepatocytárního růstového faktoru (HGF) molekulárně – biologickými technikami, ale i rutinně dostupnými kity založenými na principu enzymatické EIA. Hepatocytární růstový faktor je prokázán jako mitogenní látka s hlavními účinky na jaterní růst [16, 66, 68]. Výsledky exprese mRNA HGF potvrzují zvýšení exprese ve všech skupinách potkanů v porovnání s kontrolní skupinou. Signifikantní zvýšení bylo potvrzeno u skupiny s kyselinou ursolovou ve formě homogenátu i u vysokotukové diety s  $\gamma$ -cyklodextrinem (HFgCD). Stanovení HGF s využitím kitu EIA stejně jako exprese mRNA HGF potvrdilo signifikantní zvýšení u stejných skupin potkanů a byla nalezena korelace odpovídající lineární závislosti mezi HGF stanovením běžně dostupnou technikou v rutinní laboratoři a molekulárně biologickými technikami. Hladiny HGF i výsledky exprese HGF jsou v souladu s kalkulovanou jaterní regenerací [94] vycházející z porovnání hmotností jater před a po částečné hepatektomii. Zvýšený hepatocytární regenerační poměr (HRR) by u vysokotukové diety mohl souviset s vyšší akumulací tuků v játrech díky jejímu dietnímu příjmu, ale zároveň v těchto skupinách byla nalezena signifikantně zvýšená exprese HGF. To potvrzuje myšlenku, že dřívější akumulace lipidů v játrech po částečné hepatektomii by mohla být benefitem pro regenerující játra. Podobné závěry zvažuje ve své publikaci Haldrup [69]. Naše výsledky jaterní regenerace jsou v souladu s jedinou publikací rozpouštějící kyselinu ursolovou ve fyziologickém roztoku [53], kdy i přes nízkou biologickou dostupnost bylo potvrzen vliv na UA na buněčný cyklus stimulací exprese

cyklinů v G1 fázi buněčného cyklu a C/EBP proteinů – speciálně na cyklin D1 a E proteiny zapojené v buněčném cyklu.

Významná změna hladin žlučových kyselin po parciální hepatektomii související s nárůstem toku krve zbývající jaterní tkání, ukazuje žlučové kyseliny jako důležitou součást probíhající jaterní regenerace. Koncentrace žlučových kyselin byly nižší u skupiny s mikronizovanou kyselinou ursolovou, a to jak s dietou standardní laboratorní, tak s vysokotukovou dietou, nicméně podle koncentrací žlučových kyselin a podle exprese CYP7A1 nedošlo k blokování toku žlučových kyselin v žádné skupině potkanů a nedošlo ke snížení či zablokování jaterní regenerace. U skupin s cyklodextriny jsou hladiny žlučových kyselin mírně zvýšené a zároveň je zvýšená i exprese CYP7A1 i HGF, což by mohlo potvrzovat myšlenku, že mírné přetížení žlučovými kyselinami působí pozitivně jako regenerační spouštěč [70]. Zhang [71] prokázal, že strava obsahující 0,2 % kyseliny cholové vykazuje stimulační a antioxidační účinky při jaterní regeneraci, ale též bylo potvrzeno, že vyšší koncentrace kyseliny v dietě cholové 1 % vyvolává apoptózu a vedlo k vyšší úmrtnosti myši po PH.

Kyselina ursolová připravená homogenizací byla prokázána v našem experimentu jako nejvíce vhodná forma pro jaterní regeneraci, přestože kyselina ursolová jako inkluzní sloučenina s  $\gamma$ -cyklodextriny též ukazuje na akceptovatelné výsledky. Dále bylo v experimentu prokázáno, že kyselina ursolová stimuluje DNA syntézu s nižší enzymatickou aktivitou ALT a AST po invazivním zákroku. Výsledky ukazují, že homogenizované jablečné slupky odrůdy Jonagold jsou vhodným biologicky dostupným zdrojem kyseliny ursolové připraveným bez použití toxických chemických rozpouštědel. Kyselina ursolová se na základě našich dosažených výsledků ukazuje jako účinné hepatoprotektivum.

### 8.3. Experiment s kyselinou ursolovou – dechové testy

Během regenerace mají játra dvě důležité funkce - první je zregenerovat jaterní tkáň z hlediska velikosti a druhá je udržovat základní funkce, kdy jsou jen vitální funkce udržovány. Aktuální data potvrzují, že fenylalanin je popisován jako dynamický marker regenerace reagující rychleji než další katalytické aktivity enzymů ALT, AST, ALP či syntéza albuminu nebo hladina bilirubinu. V grafu rozdílů  $^{13}\text{CO}_2$  během procesu regenerace je po podání ursolátu i po parciální hepatektomii v obou formách vidět signifikantně zvýšená hladina  $^{13}\text{CO}_2$ . Enzym fenylalaninhydroxyláza (PAH), který je důležitý pro  $^{13}\text{C}$  fenylalaninový metabolismus, je přítomen nejen v játrech, ale i v ostatních orgánech jako jsou ledviny. Nicméně Manjumath [73] indikoval, že částečná hepatektomie u potkanů nemění signifikantně hladinu enzymu PAH u ledvin. Proto lze předpokládat, že změny v exprimovaném vzduchu  $^{13}\text{CO}_2$  během procesu regenerace mohou být ovlivněny pouze jaterní regenerací a ukazují na metabolickou kapacitu jaterní tkáně [39]. Výhodou neinvazivních dechových testů je jejich nezávislost vůči lékovým interakcím a minimální vedlejší účinky po požití fenylalaninu.

Degradace cyklodextrinu probíhá ve střevě, po podání *per os* je cyklodextrin degradován na  $\text{CO}_2$  z 99,98 % [75]. Při podání  $\gamma$ -cyklodextrinů *i.v.* je poločas rozpadu 20 minut a následně se dostává z 90 % do moči. Kyselina ursolová uvolněná z cyklodextrinu či ve formě mikronizátu přechází přes buněčné membrány střevní epitelie transcelulárně [74, 76], což bylo potvrzeno i *in vitro* experimentem s Caco2 transportním modelem [77]. Rychlost degradace cyklodextrinů a uvolnění kyseliny ursolové byly během našeho experimentu potvrzeny.

Klinický přínos dechových testů prokázal Burke *et al.* [78], kdy porovnal výsledky experimentu  $^{13}\text{C}$  phenylalaninu u pacientů a porovnal s Child Plughovou klasifikací používanou k hodnocení pacientů s chronickým jaterním onemocněním. Výsledky dechového testu v našem experimentu při podávání kyseliny ursolové prokázaly před i po parciální hepatektomii zlepšení jaterní funkce, a potvrzují tím myšlenku možnosti ovlivnění případných preoperačních i postoperačních komplikací u pacientů podstupivších resekci či transplantaci jater.

Dechovými testy bylo prokázáno, že kyselina ursolová podávaná oběma způsoby (*p.o.* a *i.v.*) ve formě enkapsulátu s cyklodextriny i jako mikronizát vykazuje pozitivní účinky na jaterní tkáň ještě před parciální hepatektomií a potvrzují tím kyselinu ursolovou jako látku s hepatoprotektivními účinky.

## 9. ZÁVĚR

Disertační práce rozšiřuje a doplňuje poznatky týkající se jaterní regenerace a jejího ovlivnění po částečné hepatektomii. Pozornost byla zaměřena na hodnocení průběhu jaterní regenerace u poškozených jater navozených nutričně vysokocholesterolovou dietou, dietou methionin-cholin deficientní a dietou s přidavkem kyseliny orotové. Příjem diety s vyšším obsahem cholesterolu ovlivnil lipidový metabolismus a způsobil očekávanou prostou jaterní steatózu u této skupiny potkanů bez známek zánětu a fibrózy. Při porovnání rychlosti regenerace zhodnocením syntézy DNA za 18 a 24 hodin po částečné hepatektomii mezi potkany kmene Wistar a PHHC bylo prokázáno zpoždění nástupu regenerace u diety vysokocholesterolové potvrzující možné komplikace pro pacienty s prostou steatózou podstupující resekci či transplantaci jater. Jaterní regenerace u diety methionin-cholin deficitní neprokázala změnu proti kontrolní skupině a tento model pro studium jaterní regenerace není zcela vhodný, stejně tak jako model s přidavkem kyseliny orotové, která způsobila poškození jaterní tkáně takového rozsahu, že po parciální hepatektomii bylo neslučitelné s přežitím.

Druhá část disertační práce se zaměřila na ovlivnění hladin lipidů podáním biologicky dostupné kyseliny ursolové, které se projevilo snížením hladin cholesterolu a triacylglyceridů v krevním řečišti bez poškození jaterního parenchymu. Jaterní regenerace byla u všech skupin hodnocena molekulárně biologickými technikami v jaterní tkáni i měřením hepatocytárního růstového faktorů v krvi. Při porovnání výsledků byla nalezena korelace, která potvrzuje možnost využití běžněji dostupné techniky rutinní laboratoří pro hodnocení regenerace jater po chirurgických operacích. Kyselina ursolová ve formě homogenátu i enkapsulátu s  $\gamma$ -cyklodextriny připravených bez použití rozpouštědel stimulovala jaterní regeneraci, což bylo potvrzeno měřením oběma technikami. U vybraných skupin potkanů bylo potvrzeno pozitivní ovlivnění funkční kapacity jater podáním kyseliny ursolové ještě před parciální hepatektomií. Sledované markery prokazují vliv kyseliny ursolové na jaterní tkáň za prospěšné a potvrzují kyselinu ursolovou jako významné hepatoprotektivum.

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

01. Bucher NL. Liver regeneration: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* Nov-Dec 1991; 6(6): 615-24. doi: 10.1111/j.1440-1746.1991.tb00921.x.
02. Zhao J, Xu H, Li H, et al. NAFLD Induction Delays Postoperative Liver Regeneration of ALPPS in Rats. *Dig Dis Sci* 2019 Feb; 64(2): 456-468. doi: 10.1007/s10620-018-5346-3.
03. Kaufmann B, Reza A, Wang B, Friess H, Felstein AE, Hartmann D. Mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease and implications for surgery. *Langenbecks Arch Surg* 2021 Feb; 406(1): 1-17. doi: 10.1007/s10620-018-5346-3.
04. DeAngelis RA, Markiewaki MM, Taub R, Lambris JD. A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology* 2005; 42: 1148-1157. doi: 10.1002/hep.20879.
05. Picard C, Lambotte L, Starkel P, et al. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2002; 36: 645-652. doi: 10.1016/s0168-8278(02)00038-7.
06. Kaibori M, Ha-Kawa SK, Uchida Y, et al. Liver regeneration in donors evaluated by Tc-99m-GSA scintigraphy after living donor liver transplantation. *Dig Dis Sci* 2008; 53(3): 850-855. doi: 10.1007/s10620-007-9902-5.
07. Garnol T, Kučera O, Staňková P, Lotková H, Červinková Z.: Does Simple Steatosis Affect Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Rats? *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2016; 59(2): 35-42. doi: 10.14712/18059694.2016.87.
08. Veteläinen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 Sep; 22(9): 1526-33. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04701.x.
09. Liu J: Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *J Ethnopharmacol.* 1995 Dec 1; 49(2): 57-68. doi: 10.1016/0378-8741(95)90032-2.
10. Miura Y, Washizawa N, Urita Y, Imai T, Kaneko H. Evaluation of remnant liver function using <sup>13</sup>C-breath tests in a rat model of 70% partial hepatectomy. *Hepatogastroenterology* Mar-Apr 2012; 59(114): 311-6. doi: 10.5754/hge11431.
11. Tang X, Gao J, Chen J, et al. Inhibition of ursolic acid on Calcium-induced mitochondria permeability transition and release of two proapoptotic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Nov; 337(1): 320-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.062.
12. Jeong HG. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Toxicol Lett.* 1999; 105: 215-222. doi: 10.1016/s0378-4274(99)00004-1.
13. Jaeschke H, Xie Y, McGill MR. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *J Clin Transl Hepatol* 2014 Sep; 2(3): 153-61. doi: 10.14218/JCTH.2014.00014.
14. Mizushima Y, Iida A, Ohta K, Sugamara F, Sakangchi K. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase, *Biochem J* 2000 Sep 15; 350 Pt 3(Pt 3): 757-63.
15. Hsu YL, Kuo PL, Lin CC. Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sci* 2004 Sep 24; 75(19): 2303-16. doi: 10.1016/j.lfs.2004.04.027.
16. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007 Nov; 213(2): 286-300. doi: 10.1002/jcp.21172.
17. Hockings PD, Roberts T, Cambell SP, et al. Longitudinal magnetic resonance imaging quantitation of rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Toxicol Pathol* 2002; 30(5): 606-610. doi: 10.1080/01926230290105811.
18. Humar A, Kosari K, Sielaff TD, et al. Liver regeneration after adult living donor and deceased donor split-liver transplants. *Liver Transpl* 2004; 10(3): 374-378. doi: 10.1002/lt.20096.

19. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006 Feb; 43(2 Suppl 1): 45-53. doi: 10.1002/hep.20969.
20. Kang LI, Mars WM, Michalopoulos GK. Signals and cells involved in regulation liver regeneration. *Cells* 2012; 1: 1261-1292. doi:10.3390/cells1041261.
21. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995; 9(14): 1401-1410. doi: 10.1096/fasebj.9.14.7589981.
22. Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga SP, Michalopoulos GK. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2001; 34(4 Pt 1): 688-693. doi: 10.1053/jhep.2001.27811.
23. DeFrances MC, Michalopoulos GK. Liver Regeneration and Partial Hepatectomy: Process and Prototype. Liver regeneration. Dieter Häussinger (ed). Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG 2011; 1-16. ISBN 978-3-11-025078-7.
24. Bowen DG, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity, *J Clin Invest*. 2004 Sep; 114(5): 701-12. doi: 10.1172/JCI21593.
25. Patijn GA, Lieber A, Schowalter DB, Schwall R, Kay MA. Hepatocyte growth factor induces hepatocyte proliferation in vivo and allows for efficient retroviral-mediated gene transfer in mice. *Hepatology* 1998; 28(3): 707-716. doi: 10.1002/hep.510280317.
26. Naugler WE. Bile Acid Flux Is Necessary for Normal Liver Regeneration. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e97426. doi.org/10.1371/journal.pone.0097426.
27. Delgado-Coello B, Briones-Orta MA, Macias-Silva M, Mas-Oliva J. Cholesterol: recapitulation of its active role during liver regeneration. *Liver International* 2011; 31 (9): 1271-1284. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02542.x.
28. Hejlova I, Honsova E, Sticova E, et al. Prevalence and risk factors of steatosis after liver transplantation and patient outcomes. *Liver Transpl* 2016 May; 22(5): 644-55. doi: 10.1002/lt.24393.
29. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, et al. The metabolit syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2005; 143: 722–728. doi: 10.7326/0003-4819-143-10-200511150-00009.
30. Schuppan D, Schattenberg JM. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. *J Gastroenterol Hepatol* 2013 Aug; 28 Suppl 1: 68-76. doi: 10.1111/jgh.12212.
31. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437–443. doi: 10.1016/s0016-5085(03)00907-7.
32. Hamano M, Ezaki H, Kiso S, et al. Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis. *J Gastroenterol* 2014 Feb; 49(2): 305-16. doi: 10.1007/s00535-013-0780-7.
33. Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 2012 Apr; 56(4): 952-64. doi: 10.1016/j.jhep.2011.08.025.
34. Kucera O, Cervinkova Z: Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 8364-8376. doi: 10.3748/wjg.v20.i26.8364.
35. Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23(11): 1635-1648. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05543.x.
36. Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* 2000, 31(1), 35-42. doi: 10.1002/hep.510310108.

37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec; 25(4): 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
38. Cortiella J, Marchini JS, Branch S, Chapman TE, Young VR. Phenylalanine and tyrosine kinetics in relation to altered protein and phenylalanine and tyrosine intakes in healthy young men. *Am J Clin Nutr* 1992 Sep; (3): 517-25. doi: 10.1093/ajcn/56.3.517.
39. Ishii Y, Asai S, Kohno T, Suzuki S, Ishii M, Hosoi I. <sup>13</sup>C<sub>13</sub>CO<sub>2</sub> peak value of L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine breath test reflects hepatopathy. *J Surg Res.* 2003 Jun 1; 112(1): 38-42. doi: 10.1016/s0022-4804(03)00135-5.
40. Kobayashi T, Imamura H, Takayama T, Makuuchi M. The role of preoperative phenylalanine breath test in hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1124-1127.
41. Heberer M, Talke H, Maier KP, Gerok W. Metabolism of phenylalanine in liver diseases. *Klin Wochenschr* 1980 Nov 3; 58(21): 1189-96. doi: 10.1007/BF01478875.
42. Brůha R. Hepatoprotektiva. *Klin Farmakol Farm* 2006; 20: 154–157.
43. Maiwald L: "Essential" phospholipids in liver diseases. *Fortschr Med.* 1986 Apr 10; 104(14): 299-302.
44. Goulis J, Leandro G, Burroughs AK. Randomised controlled trials of ursodeoxycholic-acid therapy for primary biliary cirrhosis: a meta-analysis. *Lancet.* 1999 Sep 25; 354(9184): 1053-60. doi: 10.1016/S0140-6736(98)11293-X.
45. Wu JP, Tsai CC, Yeh YL, et al. Silymarin Accelerates Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015: 603529. doi: 10.1155/2015/603529.
46. Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszyk MN, Scheffer A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants – Rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* 2009 Jun 4; 14(6): 2016-31. doi: 10.3390/molecules14062016.
47. Szakiel A, Pączkowski C, Pensec F, Bertsch C. Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. *Phytochem Rev* 2012 Jun; 11(2-3): 263-284. doi: 10.1007/s11101-012-9241-9.
48. Saraswat B, Visen PK, Agarwal DP. Ursolic acid isolated from *Eucalyptus tereticornis* protects against ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. *Phytother Res* 2000 May; 14(3): 163-6. doi: 10.1002/(sici)1099-1573(200005)14:3<163::aid-pt588>3.0.co;2-d.
49. Saravanan R, Viswanathan P, Pugalendi KV. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life Sci* 2006 Jan; 78(7): 713-8. doi: 10.1016/j.lfs.2005.05.060.
50. Sundaresan A, Harini R, Pugalendi KV. Ursolic acid and rosiglitazone combination alleviates metabolic syndrome in high fat diet fed C57BL/6J mice. *Gen Physiol Biophys* 2012 Sep; 31(3): 323-33. doi: 10.4149/gpb\_2012\_037.
51. Li S, Liao X, Meng F, et al. Therapeutic role of ursolic acid on ameliorating hepatic steatosis and improving metabolic disorders in high-fat diet-induced non alcoholic fatty liver disease rats, *Plos One* 2014; 9(1): e86724. doi: 10.1371/journal.pone.0086724.
52. Jin YR, Jin-ling J, Li CH, Piao XX, Jin NG. Ursolic acid enhances mouse liver regeneration after partial hepatectomy. *Pharmaceutical Biology* 2012; 50(4): 523-528, doi: 10.3109/13880209.2011.611143.
53. Kazmi I, Afzal M, Rahman S, Iqbal M, Imam F, Anwar F. Antiobesity potential of ursolic acid stearoyl glucoside by inhibiting pancreatic lipase. *European Journal of Pharmacology* 2013, 709, 28-36. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.032.
54. Biswas S, Mukherjee PK, Harwansh RK, Bannerjee S, Bhattacharjee P. Enhanced bioavailability and hepatoprotectivity of optimized ursolic acid-phospholipid complex. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2019; 45(6): 946-958. doi: 10.1080/03639045.2019.1583755.

55. Yang L, Sun Z, Zu Z, et al. Physicochemical properties and oral bioavailability of ursolic acid nanoparticles using supercritical anti-solvent (SAS) process. *Food Chem* 2012 May; 132(1): 319-25. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.083.
56. European Medicines Agency. Background review for cyclodextrins used as excipients. 2014; EMA/CHMP/333892/2013.
57. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver – Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archives of Pathology* 1931; 12: 186-202.
58. Šiman P, Filipová A, Tichá A, Niang M, Bezrouk A, Havelek R. Effective Method of Purification of Betulin from Birch Bark: The Importance of Its Purity for Scientific and Medicinal Use. *PLoS ONE* 2016; 11(5): e0154933. doi: 10.1371/journal.pone.0154933.
59. Short J, Zemel R, Kanta J, Lieberman I. Stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver parenchymal cells of the intact rats. *Nature* 1969 Aug; 223(5209): 956-7. doi: 10.1038/223956a0.
60. Burton K. A study of the condition and mechanism of the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 1956; 62: 315-23. doi: 10.1042/bj0620315.
61. Micuda S, Fuksa L, Brackova E, et al. Zonation of multidrug resistance-associated protein 2 in rat liver after induction with dexamethasone. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 Jul; 23(7 Pt 2): e225-30. doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.05066.x.
62. Sobolová L, Skottová N, Vecera R, Urbánek K: Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. *Pharmacol Res* 2006 Feb; 53(2): 104-12. doi: 10.1016/j.phrs.2005.09.004.
63. Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ, Hruz PW, Rudnick DA. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology* 2004; 40(6): 1322-1332. doi: 10.1002/hep.20462.
64. Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. The role of nitric oxide in the modulation of hepatic microcirculation and tissue oxygenation in an experimental model of hepatic steatosis. *Microvasc Res* 2005 Nov; 70(3): 129-36. doi: 10.1016/j.mvr.2005.08.001.
65. Kim J, Jang DS, Kim H, Kim JS. Anti-lipase and lipolytic activities of ursolic acid isolated from the roots of *Actinidia arguta*. *Arch Pharm Res* 2009 Jul; 32(7): 983-7. doi: 10.1007/s12272-009-1702-3.
66. Kaviarasan K, Mohankumar R, Narasimhan S, Viswanathan P, Pugalendi KV. Antihyperlipidemic efficacy of flavonoid-rich fraction from *Spermacoce hispida* seed on high-fat diet fed rats: A dose-dependent study. *Journal of Food Biochemistry* 2010; doi: 10.1111/j.1745-4514.2010.00482.x.
67. Checker R, Sandur SK, Sharma D, et al. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- $\kappa$ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS One* 2012; 7(2):e31318. doi: 10.1371/journal.pone.0031318.
68. Adamek B, Zalewska-Ziob M, Strzelczyk JK, et al. Hepatocyte growth factor and epidermal growth factor activity during later staged of rat liver regeneration upon interferon  $\alpha$ -2b influence. *Clin Exp Hepatol* 2017;3; 1:9-15. doi:10.5114/ceh.2017.65499
69. Haldrup D, Heeboll S, Thomsen KL, et al. Preserved liver regeneration capacity after partial hepatectomy in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *World Journal of Hepatology* 2018; 10(1): 8-21. doi: 10.4254/wjh.v10.i1.8.
70. Chen X, Yan XR, Zhang LP. Ursodeoxycholic acid after common bile duct stones removal for prevention of recurrence: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)* 2018 Nov; 97(45): e13086. doi: 10.1097/MD.00000000000013086.
71. Zhang L, Huang X, Meng Z, et al. Significance and mechanism of CYP7a1 gene regulation during the acute phase of liver regeneration. *Mol Endocrinol* 2009 Feb; 23(2): 137-45. doi: 10.1210/me.2008-0198.



73. Manjunath R, Shivaswamy V, Ramasarma T. Decrease of phenylalanine hydroxylase during hepatocyte proliferation. *Biochem Pharmacol* 1982 Apr 15; 31(8): 1521-5. doi: 10.1016/0006-2952(82)90375-6.
74. Michalopoulos GK. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 2017 Apr; 65(4): 1384-1392. doi: 10.1002/hep.28988.
75. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 Jul 30; 59(7): 645-66. doi: 10.1016/j.addr.2007.05.012.
76. Hua WJ, Fang HJ, Hua WX. Transepithelial transport of rosuvastatin and effect of ursolic acid on its transport in Caco-2 monolayers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinetic* 2012 Sep; 37(3): 225-31. doi: 10.1007/s13318-012-0094-9.
77. Qiang Z, Ye Z, Hauck C, et al. Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers. *J Ethnopharmacol* 2011 Oct; 137(3): 1107-12. doi: 10.1016/j.jep.2011.07.037.
78. Burke PA, Stack JA, Wagner D, Lewis DW, Jenkins RL, Forse RA. L-[1-13C] Phenylalanine oxidation as a measure of hepatocyte functional capacity in end-stage liver disease. *Am J Surg* 1997; 173(4): 270-273. doi: 10.1016/S0002-9610(96)00392-3.

## 10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY AUTORA

### Původní vědecké práce v impaktovaném časopise

#### **Different Forms of Ursolic Acid and Their Effect on Liver Regeneration**

Lenka Žaloudková, Alena Tichá, Jana Nekvindová, Ladislava Pavlíková, Zdeněk Zadák, Pavel Živný. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020 Jul 26;2020:4074068.

doi: 10.1155/2020/4074068. eCollection 2020.

IF<sub>2020</sub> 1,813

#### **Histopathological changes in dilated ascending aorta associated with aortic valve cuspidity**

Mikita Karalko, Vaclav Stejskal, Martin Dergel, Jan Gofus, Salifu Timbilla, Lenka Žaloudkova, Pavel Zacek, Marek Pojar, Jan Vojacek

*European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, Volume 59, Issue 5, May 2021, p.1103-1108, <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezaa440>*

IF<sub>2021</sub> 3,486

#### **Goeckerman Therapy of Psoriasis: Genotoxicity, Dietary Micronutrients, Homocysteine, and MTHFR Gene Polymorphisms.**

Beranek M, Malkova A, Fiala Z, Kremlacek J, Hamakova K, Zaloudkova L, Borsky P, Adamus T, Palicka V, Borska L. Beranek M, et al. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 17;20(8):1908.

doi: 10.3390/ijms20081908 *Int J Mol Sci.* 2019

IF<sub>2019</sub> 4,183

#### **Vitamin D status of very low birth weight infants at birth and the effects of generally recommended supplementation on their vitamin D levels at discharge.**

Matejek T, Navratilova M, Zaloudkova L, Malakova J, Maly J, Skalova S, Palicka V. Matejek T, et al. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019 Mar 18:1-7.

doi: 10.1080/14767058.2019.1586873.

IF<sub>2019</sub> 1,569

#### **Parathyroid hormone - reference values and association with other bone metabolism markers in very low birth weight infants - pilot study.**

Matejek T, Navratilova M, Zaloudkova L, Malakova J, Maly J, Skalova S, Palicka V. Matejek T, et al. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019 Sep;32(17):2860-2867. doi:

10.1080/14767058.2018.1450858. Epub 2018 Mar 21. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019

IF<sub>2019</sub> 1,569

#### **Markers of Perioperative Bowel Complications in Colorectal Surgery Patients.**

Hyšpler R, Tichá A, Kaška M, Žaloudková L, Plíšková L, Havel E, Zadák Z. Hyšpler R, et al. *Dis Markers.* 2015;2015:428535. doi: 10.1155/2015/428535. Epub 2015 Dec 15. *Dis Markers.* 2015.

Trial.

IF<sub>2015</sub> 1,716

### Ostatní práce v impaktovaném časopise (přehledové, metodické, kazuistické)

#### **The problems of proteinuria measurement in urine with presence of Bence Jones protein.**

Maisnar V, Tichy M, Stulik J, Vavrova J, Friedecky B, Palicka V, Spirikova J, Zaloudkova L, Hernychova L, Spacilova J, Buchler T, Hajek R. Maisnar V, et al. *Clin Biochem.* 2011 Apr;44(5-6):403-5. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.01.008.

IF<sub>2011</sub> 2,430

### **Původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise**

#### **Ovlivnění regenerační schopnosti jater po částečné hepatektomii podáním diety se zvýšeným obsahem cholesterolu standardním a hypercholesterolemickým potkanům**

Pavlíková L., Živný P., Živná H., Mocková P., Palička V. Klin. Biochem. Metab. 16(37), 2008, No.1, p.43-45

#### **Modulation of Rat Liver Regeneration after Partial Hepatectomy by Dietary Cholesterol.**

Živný P, Živná H, Palička V, Žaloudková L, Mocková P, Cermanová J, Mičuda S. Živný P, et al. Acta Medica (Hradec Kralove). 2018;61(1):22-28. doi: 10.14712/18059694.2018.19. Acta Medica (Hradec Kralove). 2018

#### **The effect of cholesterol and orotic acid administration and methionin-chilin deficiency on liver DNA synthesis and lipid metabolism in rats**

Pavel Živný, Helena Živná, Lenka Pavlíková, Petra Hrubá, Vladimír Palička, Tomáš Soukup, Eva Šimáková, Folia Gastroneterol Hepatol 2007; 5(3-4), p 13-19

### **Přednášky a plakátová sdělení na odborných setkáních**

#### **Ischemia-modified albumin as a predictor of anastomosis dehiscence in intensive care patients after colorectal surgery**

Hyspler R., Ticha A, Zaloudkova L., Svobodová I, Kaska M, Zadak Z, Therapy, 14<sup>th</sup> European Congress of Internal Medicine, Moskva, Rusko, ISSN 2412-4036, 2015

#### **Plasma citrulline as a marker of paralytic ileus**

Ticha A., Hyspler R., Zaloudkova L., Svobodova I, Kaska M, Zadak Z. Therapy, 14<sup>th</sup> European Congress of Internal Medicine, Moskva, Rusko, ISSN 2412-4036 2015

#### **Vliv kyseliny ursolové získané z přírodních zdrojů na regenerační schopnost jater**

Žaloudková L. Tichá A., Hyšpler R., Živný P., XII. celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie, 2015, Brno

#### **Citrulin jako marker komplikací u perioperativního poškození střeva**

Tichá A., Hyšpler R., Žaloudková L., Vašatová M, Kaška M, Zadák Z. XII. celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie, 2015, Brno

#### **Vliv diety se zvýšeným obsahem cholesterolu na regenerační schopnost jater a lipidový metabolismus potkanů po částečné hepatektomii**

Žaloudková L., Živný P., Živná H., Mičuda S., Palička V., XI. celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie, 2013

#### **Preanalytická fáze laboratorních vyšetření a její kontrola kvality**

Žaloudková L., Friedecký B., Palička V. IX. celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie ČLS JEP, 2009

#### **The influence of cholesterol enriched diet to liver regeneration after partial hepatectomy in wistar and hypercholesterolemic rats**

Pavlíková L., Živná H., Živný P., Mocková P., Palička V. In: Clinical Nutrition//2.474, roč. 2, č. S2, 2007, s. 43-44, abstrakt

**Diet induced liver impairment could affect bone mineral density in male rats during 1 month**

Pavlíková L., Živná H., Živný P., Mocková P., Palička V.

In: Clinical Nutrition//2.474, roč. 2, č. S2, 2007, s. 44-44, abstrakt

**What does the comparison of the results of external hormone quality inspection since 1999 reflect?**

Pavlikova L., Friedecky B., Vavrova J., Clinica Chmica Acta, 16<sup>th</sup> European Congress of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine, EUROMEDLAB 2005