

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program
Klinická biochemie

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

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

Ing. Lenka Žaloudková

Školitel: doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.

Hradec Králové, 2021

Prohlášení autora

Prohlášení:

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

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

Hradec Králové, 2021

Lenka Žaloudková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Pavlovi Živnému, CSc. za odborné vedení, rady i cenné připomínky a prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., dr. h. c. za podporu během mých let doktorského studia. Zároveň děkuji mým kolegům z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky a zejména paní přednostce ústavu MUDr. Ladislavě Pavlíkové.

Zvlášť bych chtěla poděkovat svým přátelům – trpělivým kolegům, kteří mě celou dobu nejen podporovali, ale laskavě „postrkávali“ k dokončení práce - RNDr. Aleně Tiché, Ph.D. a MUDr. Radomírovi Hyšplerovi, Ph.D.

Veliké poděkování patří mému manželovi, našim klukům a rodičům ☺

Práce byla finančně podpořena projektem **MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906)**, granty **IGA NR8500-3, SVV-260398**, programem **PRVOUK P37/11** a programem **Progress Q40/01**.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
SOUHRN	10
SUMMARY	11
1. ÚVOD	13
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	15
2.1. Jaterní regenerace	15
2.2. Parciální hepatektomie	16
2.2.1. Iniclace	18
2.2.2. Proliferace	19
2.2.3. Terminace	22
2.3. Jaterní regenerace z pohledu lipidů	23
2.3.1. Význam lipidů	23
2.3.2. Vstřebávání a metabolismus cholesterolu	24
2.3.3. Regulace metabolismu lipidů	25
2.3.4. Lipidy a změny metabolismu lipidů po částečné hepatektomii	25
2.4. Jaterné receptory	27
2.4.1. Receptory aktivované proliferátory peroxisomů (PPAR)	27
2.4.2. TGF alfa	28
2.4.3. Jaterní receptor X (LXR)	29
2.4.4. Farnesoid X receptor (FXR)	29
2.4.5. Sterol regulující element vazebný protein (SREBP)	30
2.5. Nealkoholové ztukovatění jater (NAFLD)	31
2.6. Experimentální modely NAFLD u potkanů	33
2.6.1. Nutriční modely NAFLD	34
2.6.2. Genetické modely NAFLD	36
2.7. Metody hodnocení intenzity regenerace	36
2.7.1. Hodnocení regenerace zobrazovacími technikami	36
2.7.2. Hodnocení regenerace s použitím laboratorních technik	36
2.8. Funkční testy jaterní regenerace	38
2.8.1. Dechové testy	39
2.9. Možnosti ovlivnění jaterní regenerace	41
2.9.1. Kyselina ursolová	42
3. CÍLE PRÁCE	45

4. METODY	46
4.1. Chemikálie	46
4.2. Pokusná zvířata	46
4.2.1. Experiment vlivu steatózy jater na jejich regenerační schopnost	47
4.2.2. Experiment s kyselinou ursolovou	50
4.2.3. Experiment s kyselinou ursolovou – dechové testy	51
4.3. Regenerace jater po 2/3 parciální hepatektomii	52
4.3.1. Experiment vlivu steatózy jater na jejich regenerační schopnost	52
4.3.2. Experiment s kyselinou ursolovou	52
4.3.3. Experiment s kyselinou ursolovou – dechové testy	53
4.4. Metody stanovení	53
4.4.1. Biochemické metody	53
4.4.2. Kalkulace hmotnosti jater	53
4.4.3. Syntéza jaterních DNA	54
4.4.4. Kvantitativní RealTime RT-PCR	54
4.4.5. Western blot	55
4.4.6. Dechové testy - provedení	55
4.4.7. Histologické vyšetření jater	56
4.5. Statistická analýza	56
5. VÝSLEDKY	57
5.1. Experiment vlivu steatózy jater na jejich regenerační schopnost	57
5.1.1. Základní charakteristika potkanů – hmotnosti potkanů a spotřeba diety	57
5.1.2. Hladiny biochemických markerů	58
5.1.3. Metabolismus cholesterolu – exprese vybraných proteinů zapojených do homeostázy cholesterolu	64
5.1.4. Syntéza jaterních DNA	65
5.1.5. Histologické vyšetření jaterní tkáně	67
5.2. Experiment s kyselinou ursolovou	69
5.2.1. Základní charakteristika potkanů - hmotnost potkanů a spotřeba diety	69
5.2.2. Hladiny biochemických markerů	71
5.2.3. Exprese mRNA HGF a koncentrace HGF v plazmě	73
5.2.4. Exprese mRNA CYP7A1 a koncentrace žlučových kyselin v plazmě	75
5.2.5. Regulace syntézy cholesterolu během parciální hepatektomie – SREBP a PPAR α	75
5.3. Experiment s kyselinou ursolovou - dechové testy	76

6. DISKUZE	78
6.1. Experiment s navožením NAFLD	78
6.2. Experiment s kyselinou ursolovou	80
6.3. Experiment s kyselinou ursolovou – dechové testy.....	83
7. ZÁVĚR.....	85
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	86

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABCG5/8	kanalikulární transportní proteiny
ACAT2	acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-2
ALP	alkalická fosfatáza
ALR	augmenter liver regeneration
ALT	alaninaminotransferáza
API	aktivovaný protein 1 (transkripční faktor)
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
β-CD	beta-cyklodextrin
BrdU	bromdeoxyuridin
c-Met	transmembránový receptor s tyrosinkinázovou aktivitou
CCl4	tetrachlormetan
cDNA	komplementární DNA
Ckd	cyklin dependentní kináza
CPT	karnitin palmitoyltransferáza
CYP7A1	cytochrom P450 7A1
CTRL	kontrolní skupina potkanů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EIA	enzymatická Immuno Assay

FAS	geny kódující proteiny účastníci se syntézy lipidů
FXR	Farnesoid X receptor
γ -CD	gama-cyklodextrin
HAP	forma kyselina ursolová připravená homozenizací
HB-EGF	heparin binding epidermální růstový faktor
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HGF	hepatocytární růstový faktor
HF	vysokotuková dieta, <i>high-fat diet</i>
HMG-CoA	HMG-CoA reduktáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie; <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRR	<i>hepatic regeneration ratio</i>
IDL	lipoprotein se střední hustotou
<i>i.v.</i>	<i>podání látky intravenózně</i>
IL-6	interleukin-6
LDH	laktátdehydrogenáza
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- κ 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 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor α</i>
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
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>
RXR	retionoid X receptor
SD	směrodatná odchylka
SREBP	sterol regulatory element – binding protein
SLD	standardní laboratorní dieta
STAT-3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TAG	triacylglycerol
tCH	celkový cholesterol
TGF- α	transformující růstový faktor α
TGF- β	transformující růstový faktor β
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TNFR	receptor pro TNF- α
UA	kyselina ursolová
uPA	urokinázový aktivátor plazminogenu
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
ŽK	žlučové kyseliny

SOUHRN

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 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 cholesterolémií 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 $^3\text{[H]}$ -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.

SUMMARY

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 $^3\text{[H]}$ -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.

1. 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 redukcii nebo poškození různé etiologie [1]. Změny v metabolismu související s nezdravou výživou, nezdravým životním stylem 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.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Jaterní regenerace

Regenerační schopnost jater je u dospělých jedinců důležitá hlavně z důvodu zachování regenerační schopnosti jaterního parenchymu, k čemuž pomáhá cévní propojení i umístění v břišní dutině. Vzhledem k různorodosti jaterních onemocnění u pacientů existuje mnoho přístupů ke studiu regenerace jater. Mezi nejběžnější a nejčastěji používané modely patří experimenty s využitím toxických nebo chirurgických inzultů [16]. Experimenty využívající toxické inzulty jsou založeny na principu poškození jaterních buněk chemickou toxikou, která může působit na všechny buňky bez, nebo selektivně pouze na určité typy buněk. V současnosti se často využívá tetrachlormetan pro posouzení hepatotoxických účinků radikálů na buněčné membrány či thioacetamidu způsobující nekrózu jaterní tkáně, ale též je používán D-galaktosamin vyvolávající obraz poškození jater připomínající virovou hepatitidu [17]. Pro posouzení jaterní regenerace se využívají modely prováděné na již předem poškozených játrech jako stimulace konkrétních onemocnění (NAFLD, cirhotické poškození jater, cholestatické modely anebo dědičné modely). Farmakologické či toxické ovlivnění jaterní regenerace závisí na množství dávky a druhu aplikace. Standardizace těchto experimentů je závislá na řadě dalších neovlivnitelných faktorů, např. pohlaví, nutriční stav, způsob a délka podání chemické látky [18].

Chirurgické modely jsou prvně popisovány kolem roku 1860, kdy byla omezením přítoku portální krve *podvazem větve vena portae* zdokumentována hypertrofie ostatních laloků. I přes optimalizování tohoto postupu z pohledu operační techniky i volby pokusného zvířete, je v dnešní době častěji využíván postup parciální hepatektomie vypracovaný v roce 1931 Higginsem a Andersonem [19]. Nejčastěji prováděná hepatektomie se týká odstranění středního a levého laloku, jejichž hmotnost představuje 67-70 % celkové hmotnosti jater. Po provedené částečné hepatektomii následuje synchronizovaná kompenzační odpověď celé tkáně zahrnující vstup zralých buněk do buněčného cyklu ukončeného mitotickým dělením. Nespornou výhodou chirurgických pokusů je přesné určení doby zahájení regeneračního procesu. U některých pokusů se využívá menší stimulace jaterní proliferace pouze s 30% či 50% hepatektomií, ale provádějí se i hepatektomie 90%, u nichž bylo zjištěno, že jde o natolik závažný zásah, že vede k akutnímu jaternímu selhání [20].

2.2. 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 [20], byť v některých experimentech cílového objemu jater nebylo dosaženo ani po 3 týdnech po parciální hepatektomii [21,22].

Jaterní regenerace je složitý systém řízený nyní všeobecně přijímanou teorií souhry 3 systémů – cytokinů, růstových faktorů a metabolických změn [23]. 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- α , 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 [24].

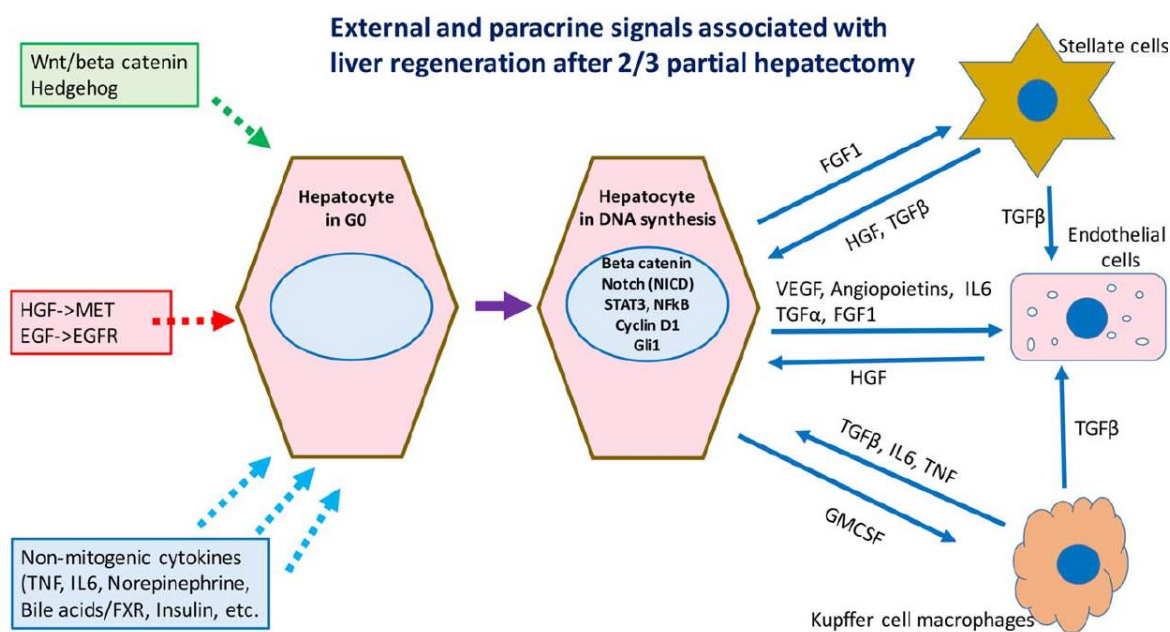
Regenerace jater nezahrnuje pouze hepatocyty (představují 60 – 80 % buněk jater), ale i buňky neparenchymové - žlučové epiteliální buňky, endoteliální sinusoidální buňky, Itovy buňky (jaterní hvězdicové buňky) a Kupfferovy buňky. Hepatocyty a cholangiocyty jsou první buňky, které vstupují do buněčného cyklu, podstupují proliferaci a produkci mitogenních signálů pro další typy jaterních buněk [24]. 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 myší 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 [25]. 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 trávající 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 [20].

Chronologicky seřazené události po PH (Obr.1 – *vysvětlení v kapitole 2.2.1. a 2.2.2.*) :

1. Zvýšení aktivity urokinázového aktivátoru plazminogenu (uPA) - prvních 5 minut po PH
2. Translokace β -cateninů do jádra (5 - 10 minut až 6 hodin) - aktivací β -cateninů dochází k aktivaci c-Met signální cesty a zároveň i k aktivaci metaloproteináz
3. Snížení hladin zásobního hepatocytárního růstového faktoru (HGF) 30 minut – 3 hodiny
4. Aktivace receptoru c-Met (30 - 60 minut po PH)
5. Aktivace epidermálního růstového faktoru (EGF) 30 - 60 minut
6. Aktivace AP 1, NF κ B a STAT3 (30 - 60 minut)
7. Zvýšení hladin HGF, norepinefrinu, IL-6, TNF- α , TGF β 1 a kyseliny hyaluronové v plazmě (1 - 2 hodin)
8. Rozšíření genové exprese hepatocytů během 30 – 60 minut



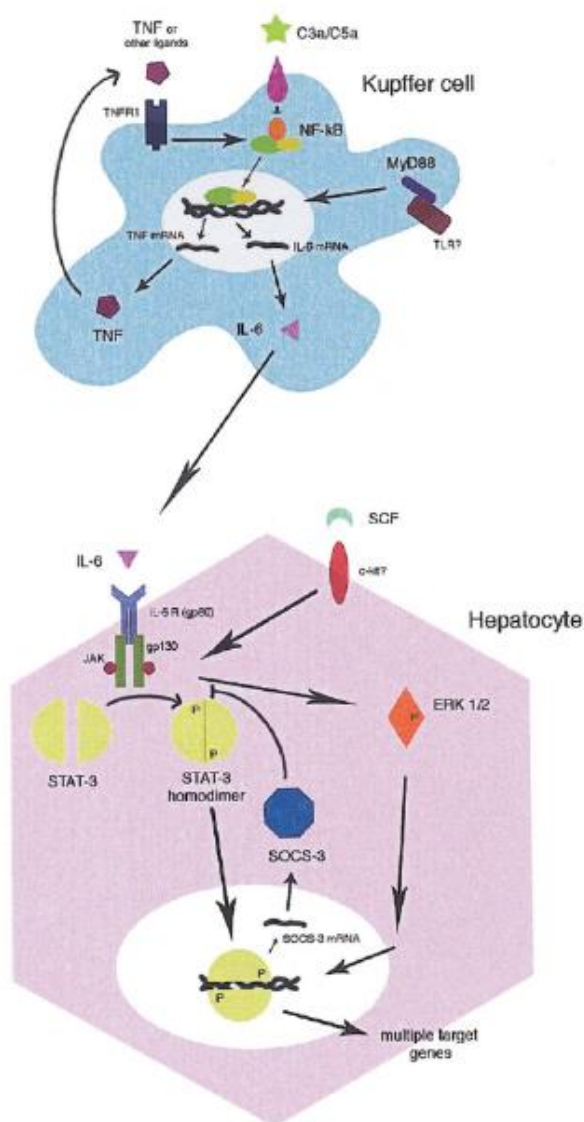
Obr. 1. Vliv růstových faktorů, mediátorů metabolických cest na přechod hepatocytů z klidové G₀ fáze do G₁ fáze buněčného cyklu a vzájemné ovlivnění [20]

2.2.1. Iniacie

Ve fázi iniciace dochází k přechodu klidových jaterních buněk z G₀ do G₁ fáze a je v buněčném cyklu vymezena až do místa, kdy buňky přejdou přes restriční bod na rozhraní G₁ a S fáze buněčného cyklu. Kontrolní systém buněčného cyklu je založen na aktivitě cyklin-dependentních kináz (Ckd), jejichž činnost a funkce jsou závislé na informacích z vnějšího i vnitřního prostředí. Cyklin-dependentní kinázy jsou proteinkinázy tvořící komplexy s cykliny, které katalyzují fosforylaci bílkovinných substrátů. Tím dochází ke změně v jeho enzymatické aktivitě a k interakci s jinými proteiny. Klíčovou událostí ve fázi iniciace vnímanou jako bod bez návratu pro vstup hepatocytů do fáze S je migrace cyklinu D1 do jádra [23]. Cyklin D1 se aktivuje 6 hodin po částečné hepatektomii. Jeho aktivaci s následnou migrací do jádra buňky se spouští syntéza DNA hepatocytů [26]. Cykliny D mají pozitivní vliv na průběh G₁ fáze, nadměrná exprese urychluje G₁ fázi [27,28].

Časná fáze G₁ 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- α) a Interleukinu-6 (IL-6). Zdrojem cytokinů jsou neparenchymové jaterní buňky (Kupfferovy, endotelové buňky jaterních sinusoid a hvězdicové buňky). Cytokinová kaskáda (Obr. 2) začíná vazbou TNF- α na receptor TNFR1 v Kupfferových buňkách. Tímto dochází k aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NF- κ 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 resekcii jater [20,23].



Obr. 2. Schématické znázornění vlivu transkripčních faktorů na koncentrace cytokinů TNF- α a IL-6 během jaterní regenerace. Interakce mezi Kupfferovými buňkami a hepatocyty [23].

2.2.2. Proliferace

Proliferační fáze navazující na iniciaci z pohledu buněčného cyklu zahrnuje fáze S, G₂ a M. U potkanů jde o období 12 - 18 hodin po 2/3 parciální hepatektomii (67 – 70% PH). Počáteční tvorbou TNF- α (a tím spuštění regenerace) dochází k stimulaci dvou významných tyrosinkinázových receptorů na membráně hepatocytů – c-Met a EGFR. Ligandem pro c-Met je Hepatocytární růstový faktor (Hepatocyte growth factor - HGF), pro EGFR je ligandů více

– Epidermální růstový faktor (Epidermal growth factor - EGF), Transformující růstový faktor α (Transforming growth factor α - TGF- α), Heparin vázající EGR podobný růstový faktor (Heparin binding EGF-like growth factor - HB-EGF) a Amphiregulin (AR). Následně jsou aktivovány četné intracelulární metabolické cesty, které regulují transkripční faktory a iniciují translaci.

Hepatocytární růstový faktor (HGF)

HGF je produkován hvězdicovými 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. Remodelaci 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 hvězdicových a endoteliálních buňkách následuje během dalších 36 - 48 hodin. Hladiny HGF se zvyšují 10 - 20 násobně po částečné hepatektomii [29], 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 [20].

HGF se zdá být iniciátor jaterní regenerace a bylo potvrzeno, že patří mezi přímé mitogeny aktivující receptory ihned po částečné hepatektomii [20]. Na druhou stranu je evidentní, že neexistuje jen jedna cesta iniciace, ale příspěvek hepatocytárního růstového faktoru se zdá být nenahraditelný. DeFrances a Michalopoulos [30] ověřili, že při vyloučení signální cesty HGF/cMet nedochází k úplnému zastavení jaterní regenerace, ale jen k jejímu dočasnému útlumu. Bowen [31] 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 [32].

Epidermální růstový faktor (EGF)

Aktivace receptoru pro EGF fosforylací probíhá již 30 minut po částečné hepatektomii, aktivace vyvolává mnohačetnou proliferační stimulaci [33]. EGF patří stejně jako HGF mezi přímé mitogeny. Jeho zvýšená produkce z Brunnerových žlázek v duodenu (a u samců myši též ze slinných žlázek) je ovlivněna koncentrací adrenalinu a noradrenalinu jako reakce na PH. Díky nárůstu portálního průtoku se dostává EGF portální žilou do jater, ale Adamek [34] zvýšené hladiny EGF po parciální hepatektomii nepotvrzuje. Stejně tak bylo potvrzeno, že u částečné hepatektomie, kdy je odstraněna pouze 1/3 jater, nedochází ke změně hladin EGF [35]

Heparin vázající EGR podobný růstový faktor (HB-EGF)

Tento růstový hormon je produkován endoteliálními a Kupfferovými buňkami jater rychleji než HGF i EGF. I přesto, že u myši HB-EGF $-/-$ byla potvrzena opožděná regenerace, tato deficiencie byla částečně nahrazena zvýšeným TGF α [23] a z tohoto důvodu není HB EGR brán jako přímý mitogen.

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 přerušáním 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 [36].

Delgado-Coello *et al.* [37] potvrdila, že HGF přímo moduluje expresi CYP7A1, který patří mezi rate-limiting enzym kontrolující syntézu ŽK z cholesterolu, ale kromě přímého

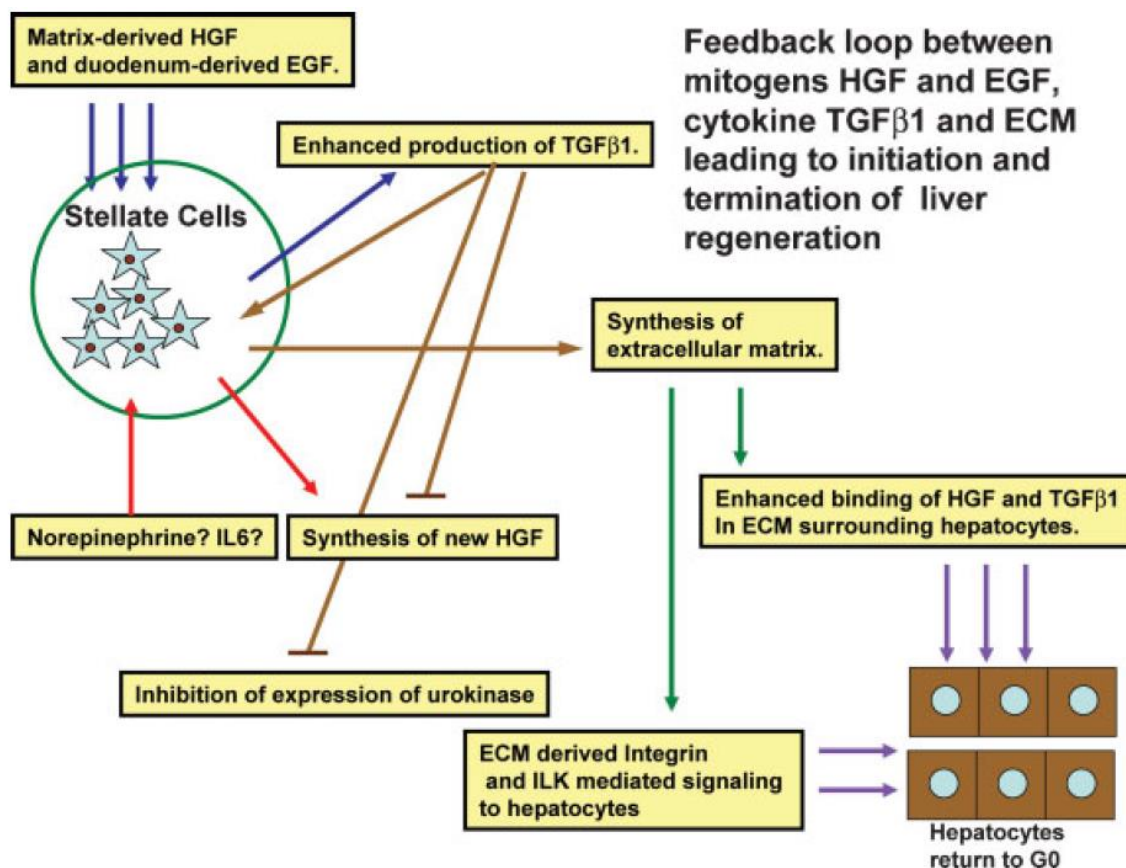
ovlivnění přes HGF, syntéza CYP7A1 je ovlivněna inhibicí c-Jun N-terminální kinázi C. Tyto závěry potvrdil i Naugler [36], který kromě snížené aktivity c-Jun bezprostředně po PH (4 hodiny) našel i snížený střevní Fibroblastový růstový faktor 15 (FGF15).

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.

2.2.3. Terminace

Ukončení regenerační odpovědi po parciální hepatektomii je poslední fází jaterní regenerace. Po dosažení cílového objemu jater vůči velikosti těla tzv. hepatostatu se jaterní buňky vrací do klidové G_0 fáze. Tato fáze trvá obvykle 4 - 7 dní, přičemž maximální doba jejího trvání je 14 dní. V této fázi dochází k převaze inhibičních účinků, proto byl z tohoto důvodu studován účinek transformujícího růstového faktoru beta ($TGF-\beta$) produkovaný hvězdicovými buňkami. Exprese $TGF-\beta$ mRNA se zvyšuje v játrech již za 4 - 5 hodin po PH a má též stimulační účinky na produkci extracelulární matrix (ECM). Během proliferace hepatocytů se jeho hladina výrazně snižuje a je postupně eliminována z periportální do pericentrální oblasti [38]. Výzkumy nicméně ukazují, že $TGF-\beta$ není přímým klíčovým faktorem ukončujícím terminaci, ale organizuje ji a tím je nezbytnou součástí události vedoucí k návratu do G_0 fáze (Obr. 3) [26].

Remodelace ECM je komplexní proces, který poskytuje podporu epiteliálním a endoteliálním buňkám, moduluje buněčnou diferenciaci, migraci, růst a apoptózu. Kolem sedmého dne se složení ECM vrací ke stavu před operací, proliferující hepatocyty stimulují expresi $TGF-\beta_1$ a zároveň v tuto dobu inhibuje $TGF-\beta_1$ expresi HGF přes uPA. Nová ECM syntetizuje hvězdicové buňky a obnovuje klidovou G_0 fázi. Vliv ECM na buňky je zprostředkován přes receptory známé jako integriny α_3/β_1 [26].



Obr 3. Schematické zobrazení zpětné vazby mezi růstovými faktory, TGFβ1 a extracelulární matrix během iniciace a terminace jaterní regenerace [20].

Dalším důležitým regulátorem z hlediska regenerace a velikosti jater se zdá být protein Yap (Yes-associated protein) primárně produkovaný cholangiocyty, jehož zvýšená koncentrace je nalezena v hepatocytech až 10 dní po parciální hepatektomii a v terminační fázi se exprese proteinu Yap snižuje, zároveň bylo ověřen vliv signální dráhy Hippo/Yap jako hlavní regulační drahou ovlivňující velikost jater [39].

2.3. Jaterní regenerace z pohledu lipidů

2.3.1. Význam lipidů

Játra jsou hlavním orgánem metabolizujícím látky tukové povahy, jejichž bazální homeostáza je řízena rovnováhou mezi příjmem, využitím a exkrecí. Zároveň je třeba zajistit komplexní transkripční síť schopnou zabránit nadměrné kumulaci mastných kyselin a zajistit dostatek energie dle požadavků buněk.

Pro jaterní buňky nejsou lipidy pouze významným zdrojem energie, ale též představují důležitou stavební složku plazmatických membrán. Cholesterol moduluje propustnost a tekutost buněčné membrány, řídí aktivitu membránových proteinů a přispívá k regulaci proteinů.

Lipidy jsou získávány buď potravou nebo *de novo* syntézou z lipidových složek tzv. lipogenezí. U savců probíhá mohutná, potravou regulovaná kontrola lipogeneze převážně v játrech a v tukové tkáni, u člověka převládají játra. Mezi plazmatické lipidy řadíme triacylglyceroly, fosfolipidy, volný cholesterol, estery cholesterolu a volné mastné kyseliny. Všechny lipidy v plazmě cirkulují jako součást makromolekulárních komplexů – lipoproteinů, pouze mastné kyseliny s krátkým řetězcem se mohou vázat na albumin [40]. Zda budou lipidy v podobě tukových kapének zabudovány do tukové tkáně nebo oxidovány v mitochondriích a peroxisomech závisí na dostupnosti metabolických substrátů, energetické bilanci a endokrinní signalizaci organismu. K vytvoření dostatečné zásoby lipidů živočichové syntetizují buňky cholesterol *de novo* z acetylkoenzymu, i když lidské tělo využívá řádově více cholesterolu z potravy. Potkan syntetizuje 24 mg cholesterolu za den, okolo 50 % syntézy sterolů probíhá v játrech, 24 % v tenkém střevě, 8 % v kůži a ve zbylých částech těla [41]. Vstřebávání cholesterolu a rostlinných sterolů ze střeva je zprostředkováno proteinem Nieman-Pick like 1, který ovlivňuje nejen přísun cholesterolu do jater, ale i počet receptorů LDL, a proto je cílem i mnoha hypolipidemik [42].

2.3.2. Vstřebávání a metabolismus cholesterolu

Hladina cholesterolu je udržována v jaterních buňkách dlouhodobě v rovnovážném stavu syntézou cholesterolu z acetyl CoA cestou přes HMG-CoA reduktázu, hlavní kontrolní místo v biosyntéze cholesterolu určující rychlost tvorby mevalonátu. Složitý proces syntézy a degradace cholesterolu začíná vychytáváním cholesterolu z cirkulace receptory pro LDL, jeho hydrolýzou na volný cholesterol v lysozomech, pokračuje skladováním cholesterolu ve formě esterů a končí sekrecí cholesterolu ve formě žlučových kyselin do žluči. Reabsorbci žlučových kyselin a zpětnovazebnou inhibici řídí cytochrom P450 7A1 (CYP7A1). Cholesterol z potravy indukuje jaterní expresi CYP7A1, jehož zvýšení má za následek zvýšený katabolismus cholesterolu. Při deficitu CYP7A1 dochází k hyperlipidemii.

Pokles intracelulární hladiny cholesterolu vede k expresi LDL receptorů jako nejúčinnější cesty ovlivnění hladiny cholesterolu v buňce. Tento proces zahrnuje změnu

několika jaderných receptorů. Sterol regulatory element – binding protein (SREBP) je v klidovém stavu udržován vazbou s regulačním proteinem SCAP (SREBP cleavage-activating protein) a tento komplex je blokován pro přesun činností proteinů nazývaných Insig1 a Insig2 (*Insulin induced gene 1, 2*) [43]. Při potřebě syntézy cholesterolu jako reakce na pokles hladiny cholesterolu v buňce, dojde k uvolnění komplexu SREBP-SCAP, který poté putuje z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu. Zde dochází k proteolytickému štěpení SREBP a uvolněná N-terminální doména putuje do jádra, kde dimerizuje a ovlivňuje expresi genů LDL receptorů, HMG-CoA reductázy, skvalensyntázy [43]. Zvyšující se koncentrace cholesterolu v buňce vede ke snížení plazmatické hladiny LDL, protože hromadící se množství sterolů v buňce snižuje aktivitu HMG-CoA reductázy, a tím potlačí syntézu receptorů pro LDL v buňce [44].

Krátkodobá regulace cholesterolu je založena na inhibici či stimulaci HMG-CoA reductázy fosforylací katalyzovanou prostřednictvím AMP-dependentních kináz, jejichž aktivita souvisí s hladinou glukagonu a adrenalinu.

2.3.3. Regulace metabolismu lipidů

Tukové tkáně představují největší tělesnou zásobárnu energie, její výstavba je závislá na rovnováze mezi lipogenezí a lipolýzou mastných kyselin. K lipogenezi dochází v případě velké zásoby sacharidů, resp. lipogeneze je stimulována dietou s vysokým obsahem karbohydrátů a naopak inhibována dietním příjmem polynenasycených mastných kyselin a hladověním [45]. Toto působení je částečně zprostředkováno hormony, které inhibují (růstový hormon, leptin) nebo stimulují lipogenezi (inzulin). Současné výzkumy ukázaly, že transkripční faktor SREBP-1 je kritický mezičlánek v prolipogenním nebo antilipogenním působení různých hormonů a nutrientů (kap. 2.4.5.). Další transkripční faktor účastnící se lipogeneze je receptor aktivovaný proliferátory peroxismů – PPAR [46].

2.3.4. Lipidy a změny metabolismu lipidů po částečné hepatektomii

Potřeba obnovení jaterní tkáně a membrán po parciální hepatektomii ovlivňuje hladinu lipidů v krevním řečišti a v játrech. Akumulace lipidů v játrech, hlavně ve formě triacylglyceridů (TAG) a esterů cholesterolu (CE), začíná být viditelná již 12 hodin po parciální hepatektomii. Delgado-Coello [36] tuto přechodnou steatózu potvrzuje u potkanů a myši s maximální hodnotou 12 - 24 hodin po parciální hepatektomii. V souvislosti se zvýšenou akumulací lipidů ve formě malých kapének v játrech je popisována snížená

koncentrace cholesterolu a TAG v plazmě hlodavců. Zároveň byla zjištěna zvýšená koncentrace mastných kyselin v séru již 8 hodin po PH s maximem 20 hodin po PH u potkanů [47]. Popsaná přechodná steatóza je dokladem regulační úlohy lipidů v průběhu regenerace.

Iniciační fáze jaterní regenerace je velmi náročnou fází, kdy hemodynamické změny v organismu vyvolané parciální hepatektomií souvisí současně s omezením zásob jaterního glykogenu a poklesem možnosti novotvorby glukózy. Reakcí na resekci jater je ihned se zvyšující koncentrace hormonů katecholaminů a kortikosteroidů, ale i glukagonu, aby útlum glykolýzy po resekci byl co nejrychleji nahrazen glukoneogenezí ve zbytku jater s využitím aminokyselin, laktátu a glycerolu. Dále iniciační fáze jaterní regenerace využívá dostupnosti zvýšeného množství volných mastných kyselin a dalších polynenasycených lipidů (ω -6MK); též i tuků z adipocytů mobilizované přes PPAR. Touto změnou vyrovnávají tkáň energetické potřeby v iniciační fázi jaterní regenerace. Volné mastné kyseliny se stávají zásadním energetickým substrátem. Na druhou stranu nadbytek volných mastných kyselin s dlouhým řetězcem působí nepříznivě - rozpráhuje oxidační fosforylaci, snížení aktivity ATP syntázy vyvolávající oxidační stres a zvýšenou peroxidaci lipidů [48].

Dále bylo potvrzeno, že uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně do oběhového systému ovlivňuje následnou esterifikaci mastných kyselin a skladování ve formě TAG. V tomto procesu hraje roli časná cytokinová signalizace. Jakmile je adipogenní proces blokován podáváním rekombinantního leptinu nebo inaktivací specifického receptoru zapojeného do regulace exprese adipocytů (tj. glukokortikoidních receptorů), je regenerace jater narušena právě z nedostatečného množství mastných kyselin [49]. Lipoproteinová lipáza (LPL), která hydrolyzuje TAG přítomné v séru, během jaterní regenerace dopravuje odstraněné mastné kyseliny z TAG do jater, kde slouží jako zdroj energie. Aktivita LPL u potkanů vzrostla 2,5 krát proti kontrolní skupině 6 hodin po parciální hepatektomii, toto odpovídá i expresi LPL mRNA [50].

Při proliferaci na rozdíl od iniciační fáze je glukoneogeneze utlumena a zároveň dochází k útlumu v oxidaci mastných kyselin. V této fázi dochází naopak k výrazné změně související se syntézou ATP, syntézou mastných kyselin hrazených z citrátového cyklu za současného rozkladu glukózy glykolýzou [48]. Dochází ke zvýšené akumulaci TAG a esterů cholesterolu v cytoplazmě hepatocytů [37], jejichž makroskopický projev je v jaterní tkáni viditelný. Peng [51] potvrzuje akumulaci TAG a esterů cholesterolu v játrech 12 - 24 hodin

po PH. Dva dny po PH se hladiny koncentrace lipidů dramaticky mění k normálním hodnotám, což odpovídá době, kdy začíná fáze jaterní replikace. Potlačená jaterní akumulace TAG vede ke zhoršené jaterní regeneraci po PH [49].

2.4. Jaderné receptory

Jaderné receptory nacházející se uvnitř buňky ovlivňují růst a reprodukci, metabolismus a regeneraci buněk. Chemicky jde o proteiny skládající se ze dvou funkčních částí: ligand vázající domény a DNA vázající domény. Ligand po navázání receptoru na specifické místo cílového genu způsobí konformační změnu, a touto aktivací dojde k regulaci transkripce cílového genu buď zvýšením či snížením exprese. K úplnému popisu regulačních mechanismů během jaterní regenerace je třeba vedle přímých mitogenů tj. HGF a EGF zahrnout i jaderné receptory regulující metabolismus lipidů FXR a PPAR a další [37,35]. Přímá vazba na genomickou DNA odlišuje jaderné receptory od všech ostatních receptorů.

2.4.1. Receptory aktivované proliferátory peroxisomů (PPAR)

Jaderné receptory PPAR, patří do skupiny nukleárních receptorů regulujících metabolismus lipidů i žlučových kyselin, a tím ukazují dietní vliv zejména lipidů na ovlivnění exprese genů a řízení metabolismu buněk. V současné době známe 3 izoformy těchto ligandem aktivovaných transkripčních faktorů – PPAR α , β/δ , γ . I když je každý z nich kódován jiným genem, liší se místem výskytu i metabolickými účinky, všechny formy PPAR modulují expresi genů zapojených v metabolismu glukózy, lipidů a cholesterolu. PPAR tvoří heterodimer s retinoidním receptorem RXR (PPAR-RXR), který vazbou na specifické receptory na peroxisomech zvyšuje expresi mRNA genů účastnících se oxidace mastných kyselin a genů cytochromů P450 (CYP1A1) [52]. Cílových genů pro PPAR α je pravděpodobně více než 80. Experimenty využívající hepatotoxické poškození jaterních buněk (acetaldehyd, CCl₄) inhibují aktivitu PPAR α na receptoru genů a zamezují komplexu PPAR α -RXR v interakci s DNA [53]. Stresové situace s větším množstvím vyloučených kortikoidů korelují se zvýšeným PPAR v jaterních buňkách a kolísání kortikoidů během dne odpovídá kolísání PPAR [54].

V buňkách s největším katabolismem mastných kyselin jako jsou hepatocyty, kardiomyocyty a v dalších buňkách s vysokou aktivitou peroxisomů (buňky proximálního tubulu ledvin, v cévní stěně v buňkách hladké svaloviny atd.) je metabolismus lipidů

regulován a ovlivňován fosfoproteinem PPAR α . Aktivace PPAR α vede k útlumu syntézy apoCIII (*apolipoprotein CIII*), který je inhibítoem lipoproteinové lipázy (LPL) a jehož nedostatkem se aktivita LPL zvyšuje a vede ke zrychlené degradaci lipoproteinů bohatých na TAG. Důsledkem tohoto děje je snížená hladina celkového cholesterolu a LDL v krvi. Snížení produkce protrombogenních cytoadhezivních molekul potvrdilo antiaterogenních účinků PPAR α [55]. PPAR α váže ligandy ze skupiny mastných kyselin s dlouhým řetězcem – polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) a podporuje expresi Sterol regulatory element binding protein - SREBP [56]. PPAR α ovlivňuje i metabolismus HDL cholesterolu zvýšením syntézy apo A-I (*apolipoprotein AI*), který je základem nascentní HDL částice, a tím zintenzivňuje reverzní transport cholesterolu.

Shodnost lidské PPAR α z 92 % potvrdil s PPAR α myši a potkanů Borel [57]. U PPAR α -/- myši byla zpožděná jaterní regenerace spojená se sníženou velikostí syntézy DNA, zároveň i zpoždění exprese G1/S fáze a zvýšení IL-1beta a u těchto myši nedošlo ke 100% obnově jaterní tkáně [58].

PPAR γ jsou exprimovány v adipocytech, podporuje příjem a zásoby lipidů, triacylglyceridů a up-reguluje expresi LDL receptoru. U pacientů s jaterní steatózou (popř. NAFLD) je PPAR γ up-regulován a zvýšenou expresí se snaží chránit hepatocyty před zvýšenou steatózou. PPAR γ sehrává i klíčovou roli v při regulaci metabolických účinků inzulinu, kdy ovlivněním syntézy enzymů účastníci se aktivaci genů ovlivňuje PPAR γ inzulinovou senzitivitu [58].

2.4.2. TGF alfa

TGF α je produkován hepatocyty během jaterní regenerace, 2-3 hod po parciální hepatektomii s maximem 48 hod. TGF α má vliv na vaskularizaci, ale hlavní efekt TGF α při jaterní regeneraci je podpora hepatocytární proliferace [35]. Expresie mRNA TGF α je normálně velmi nízká a zvyšuje se po parciální hepatektomii před začátkem replikace DNA. TGF α je přikotven v neaktivní formě k buněčným membránám, z kterých může být uvolněn pomocí metaloproteináz. Ve studii na buňkách hepatocytů [59] bylo prokázáno, že efekt HGF při parciální hepatektomii je částečně stimulován i TGF α , ale experiment s myši TGF -/- neukázal žádný efekt na expresi TGF α [60,35]. Purup [61] potvrdil, že TGF α je mitogen pro

endoteliální buňky, žlučové epiteliální buňky a též potvrdil vliv TGF α na zánětlivou reakci během hojení.

2.4.3. Jaterní receptor X (LXR)

Metabolismus cholesterolu, jeho transport i regulace metabolismu mastných kyselin je ovlivněn dalším jaderným receptorem - jaterní X receptor (LXR), vyskytující se ve dvou izoformách LXR α a LXR β . Po navázání ligandu na receptor obě jeho izoformy tvoří komplex s retinoid X receptorem (RXR) [62], který reguluje při nadbytku cholesterolu návrat cholesterolu do jater a jeho exkreci do žluče přes indukci transmembránových aktivních přenašečů ABCG5 a ABCG8 na kanalikulární membráně hepatocytů [63]. LXR podporuje exkreci cholesterolu cestou ve střevě a v játrech na žlučové kyseliny regulací exprese genů CYP7A1 a sekreci do žlučových cest. Tímto spojením je ovlivněna i exprese farnesoid X receptoru (FXR), regulujícího syntézu žlučových kyselin.

Transportéry ABCG5/8 jsou exprimovány též na membráně enterocytů, a tím dochází k přenosu absorbovaného cholesterolu zpět do střevního lumen [64]. Při nadbytku cholesterolu ve střevě dochází k omezení příjmu cholesterolu a fytosterolu i přes membránový Niemann-PickC1 like1 protein, jehož exprese je též ovlivněna LXR zvýšenou či sníženou regulací podle příjmu cholesterolu [65]

Vliv LXR na metabolismus lipidů bylo potvrzeno v experimentu Endo-Umeda [66], který potvrdil u LXR α knockout myši (nikoli LXR β) zvýšené hladiny cholesterolu v játrech, zvýšení hmotnosti jater i zvýšení populace F4/80+ makrofágů u těchto myší.

LXR samoreguluje vlastní supresí indukci SREBP-1c, který se podílí na metabolismu mastných kyselin a cholesterolu [67].

2.4.4. Farnesoid X receptor (FXR)

Farnesoid X receptor reguluje především syntézu žlučových kyselin z cholesterolu ovlivněním aktivity CYP7A1, ale i konjugaci a exkreci žlučových kyselin prostřednictvím signální cesty FXR/ŽK [68]. Z tohoto důvodu je spojován jako jediný nukleární faktor s proliferací vedoucí k obnově jaterní tkáně [26]. Zachování enterohepatální cirkulace je klíčové pro stimulaci regenerace a FXR nukleární receptor chrání před akumulací žlučových kyselin a zároveň inhibuje syntézu žlučových kyselin. FXR zvyšuje aktivitu lipoproteinové

lipázy, čímž se zvyšuje clearance chylomikronů a VLDL a zároveň inhibuje sekreci VLDL z jater [69].

Odpověď zprostředkovaná nukleárním receptorem FXR při jaterní regeneraci zajišťuje dva protektivní účinky před akumulací hepatotoxických žlučových kyselin – inhibuje jejich novou syntézu a navozuje proliferaci hepatocytů, aby mohly čelit této metabolické zátěži [36]. Zpomalení jaterní regenerace v experimentu s využitím FXR knockout myši bylo potvrzena snížená exprese cyclin D1 korelující se sníženou hladinou HGF a sníženou buněčnou proliferací [70].

Aktivace FXR u hlodavců prokázala ochranu před aterosklerózou a onemocněním NAFLD [71] a proto je FXR jeden z dalších důležitých cílů pro regulaci jaterní regenerace [72].

2.4.5. Sterol regulující element vazebný protein (SREBP)

Nutriční a hormonální regulace cholesterolu je během jaterní regenerace klíčová a z tohoto důvodu má sterol regulující element vazebný protein (*SREBP*) důležitou úlohu. Ovlivněním hladiny SREBP dochází ke změně genomové informace s následnou tvorbou esenciálních lipidů pro stavbu buněčných membrán, pro které je cholesterol látkou esenciální. Syntéza a absorpce cholesterolu je řízena negativní zpětnou vazbou, kterou má na starosti právě SREBP [43]. Molekula SREBP nacházející se v membráně ER (*endoplazmatické retikulum*), reguluje při poklesu sterolů v intracelulárním prostoru rozklad intaktního SREBP a dochází k uvolnění jeho N-terminální domény do cytosolu. Uvolněná doména pak migruje do nukleonu a řídí transkripci vzestupem intracelulární koncentrace sterolů a již zmíněnou negativní zpětnou vazbou vede k inhibici rozkladu SREBP.

SREBP je kódován 2 geny – SREBP 1 (1a, 1c) a 2. Speciálně SREBP 2 je zapojen do regulace exprese genů spojený s metabolismem cholesterolu a je tedy permanentně aktivován HMG-CoA reduktázou.

SREBP 1c zvyšuje expresi genů účastnících se metabolismu glukózy a syntézy mastných kyselin. Hraje zásadní roli v *de novo* syntéze mastných kyselin (*MK*), TAG a reguluje metabolismus a syntézu mastných kyselin - nízká hladina cholesterolu aktivuje SREBP 1c [55]. SREBP 1c aktivita je zvyšována PPAR α , LXR a hladinou inzulinu [63].

2.5. 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 % [2,3,73].

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 inzulinovou 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 [74]. Pokud by jaterní steatóza měla být považována za nezávislý faktor vzniku hypertenze, event. arterosklerózy, pak je třeba to podepřít vznikem a progresí již časných stadií, tedy prearterosklerotických 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 [75]. 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 [75].

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 tkáně. Subklinický zánět potencuje lipolýzu, inzulinorezistenci 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 [76], nebo volné mastné kyseliny destabilizací lysozomů uvolní katepsin B a následně jeho aktivací NF- κ B se zvýší produkce TNF- α 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 – rozpážením fosforylace snížením tvorby mitochondriálního ATP a snížením ROS v poškozených ztukovatěných hepatocytech [77]. Peroxisomy přejímají β -oxidaci mastných kyselin, protože mitochondriální oxidační kapacita je u onemocnění NAFLD je překonána. Peroxisomální enzymy jsou regulovány aktivačním receptorem proliferace nukleárního hormonálního receptoru (PPAR α). Zvýšená transkripční exprese (up-regulace) PPAR α s následovným indukovaným oxidačním stresem je pozorována u obézních a diabetických hlodavců [78].

Centrální inzulinová rezistence vede ke snížené produkci glykogenu v játrech, zvyšuje glukoneogenezi, omezuje β -oxidaci, a vede tak ke snížené utilizaci volných mastných kyselin a stimulaci *de novo* syntézy triacylglyceridů [79]. Další akumulace triacylglyceridů v hepatocytech vedoucí ke steatóze prohlubuje inzulinovou rezistenci. Volné mastné kyseliny aktivující kinázy inhibují fosfatidylinositol-3 kinázu ((PI3), která přenáší dál nitrobuněčný signál z inzulinu na glukózové přenašeče GLUT-4, čímž je omezen příjem a utilizace glukózy hepatocyty i periferními tkáněmi [80].

Zvýšený příjem lipidů v játrech u pacientů se steatózou pochází jednak z příjmu, který je odhadován na 15 % lipidů obsažených v játrech, ale též *de novo* syntézou, kterou vzniká cca 30 % triacylglyceridů v játrech. Z těchto důvodů se při léčbě NAFLD/NASH uplatňují především dietní a režimová opatření, která vedou ke snížení obsahu tuku v játrech i v periférii a k obnovení citlivosti tkání na inzulín, což je klíčovým faktorem v léčbě NAFLD. K redukci váhy lze přispět farmakologicky a rovněž metodami bariatrické chirurgie. Ve farmakoterapii NAFLD/NASH se uplatňují především látky zvyšující citlivost k inzulínu, zejména stimulatory PPAR- γ – glitazony a další léky, které mají v léčbě NAFLD/NASH pouze dílčí význam - hypolipidemika, antioxidanty, hepatoprotektiva a probiotika.

Všeobecně je uváděno, že jaterní regenerace je u NAFLD a NASH zhoršena, navíc je manifestována vyšší mortalitou, mitochondrie patřící mezi kritické buněčné orgány poškozené intracelulárním množstvím mastných kyselin ze zvýšené peroxidace lipidů a snížené ATP hladiny, která je kriticky důležitá pro správný průběh buněčného cyklu. Regenerace u steatotických jater, která nadále aktivuje mitogenní signály odpovědné za iniciaci buněčného cyklu hepatocytů, vede k selhání na úrovni G₁/S fáze inhibicí cyklinů D1 a MAP kináz (*mitogen asociované proteinkinázy*) [81]. Toto je možné vysvětlení blokování proliferace hepatocytů u onemocnění NAFLD vedoucí k nekróze. Dalším vysvětlením je ovlivnění S - G2 fáze buněčného cyklu defosforylací cyklinů D2 a STAT3 [77,82].

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 veliká 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 [73]. Celkově se provedlo v roce 2019 v České republice 197 transplantací jater a dalších 90 pacientů na transplantaci čeká (Koordinační středisko transplantací, ČR).

2.6. Experimentální modely NAFLD u potkanů

Experimentální pokusy na zvířatech se staly nedílnou součástí základního výzkumu nejen kvůli zjištění a pochopení mechanismů stojících za patogenezí 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 [18]. Toto v současnosti nesplňuje žádný z dostupných modelů. Většina modelů vyvolaných dietou i modely genetické sice úspěšně simulují histologický obraz NAFLD/NASH, ale nezdědí jim schází metabolický nebo genetický kontext vývoje NASH u lidí (obezita, inzulinová rezistence, hyperglykémie, hyperinzulinémie, dyslipidémie, nerovnováha cytokinů a adipokinů) [83]. 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“.

2.6.1. Nutriční modely NAFLD

Methionin – cholin deficientní diety (MCDD)

Cholin je esenciální ve vodě rozpustná látka, která je součástí řady biologicky významných látek jako jsou fosfatidylcholin (lecitin), sfingomyelin nebo acetylcholin [84]. Lecitin je součástí prakticky všech buněčných membrán. Při nedostatku cholinu může být k jeho syntéze použit methionin. U lidí se deficeience cholinu objevuje při malnutrici, abúzu alkoholu nebo v těhotenství či při laktaci a může vést ke vzniku steatózy jater.

Absence methioninu i cholinu vede k narušení syntézy fosfatidylcholinu, který je zásadní pro vznik VLDL částic a jejich sekreci z jater. MCDD dieta vede u hlodavců k akumulaci triacylglyceridů v játrech s následnou steatohepatitidou a fibrogenézí [18], histologické změny charakteru steatohepatitidy se u myši vyvíjejí rychleji než u potkanů [85]. Methionin a cholin jsou látky nepostradatelné pro jaterní β -oxidaci [86]. Všechna zvířata krmená dietou s absolutním nedostatkem cholinu a methioninu obvykle ztrácí na váze, což neodráží reálnou situaci u pacientů s NAFLD, kteří trpí naopak nadváhou. Toto je jeden z faktů, který je tomuto modelu často vytýkán [83]. Model indukovaný podáváním striktní

MCDD diety tak simuluje zejména histopatologické rysy NASH, ale nekoresponduje s hlavními etiopatogenetickými faktory tohoto postižení u lidí [18].

Vysokotuková dieta

Model založený na vysokotukové dietě se více blíží patogenezi NAFLD u lidí. Podání těchto diet vede ke vzniku steatózy u všech druhů laboratorních hlodavců [86]. Vysokotuková dieta nebývá užívána pouze k indukci steatózy jater, ale rovněž u experimentálních modelů metabolického syndromu, obezity a inzulínové rezistence, což jsou významné prvky vzniku NAFLD, a tak tyto modely více odpovídají patogenezi než modely genetické, nebo založené na nutriční deficienci [18].

Diety s vyšším obsahem tuku představuje dietu s obsahem tuku vyšší jak 10 % energie ve formě tuků, obvykle jsou voleny diety s obsahem tuku ve formě energie vyšší jak 30 %. Existuje mnoho různých diet upravujících nejen obsah tuků, ale i složení tuků, v experimentech se liší délka podávání, forma i skupenství podávané diety (tekutina, pevná strava). V současnosti jsou kromě výše uvedených modelů využívány pro experimenty dietní modely typu „fast-food“, či modely se zvýšeným obsahem v dietě cholesterolu, triglyceridů a fruktózy. Z hlediska reklamy jsou často porovnávány experimenty s vyšším obsahem tuku a experimenty s dietou „zdravější“ s navýšením poměru esenciálních mastných kyselin v dietě (mono- a poly- nenasycené mastné kyseliny) [87].

Kyselina orotová

Kyselina orotová byla dříve považována za vitamín B₁₃ - patřící do skupiny vitamínů B, později bylo potvrzeno, že je tato kyselina i produktem střevní mikroflóry [88]. Jde o přirozeně se vyskytující látku zasahující jako meziprodukt do biosyntézy pyrimidinových nukleotidů i přirozený nosič pro minerální látky ovlivňující jaterní regeneraci zhoršením β -oxidace mastných kyselin a způsobující mikrovezikulární steatózu u potkanů [89]. Kyselina orotová brání tvorbě apolipoproteinů nutných k transportu VLDL a LDL do krve, čímž zabraňuje exportu nově syntetizovaných jaterních lipoproteinů z jater [90]. Následkem toho dochází k značnému ukládání jaterních triacylglycerolů a volných mastných kyselin [91]. Z tohoto důvodu je tento model využíván jako model NAFLD [92].

2.6.2. Genetické modely NAFLD

Nejčastěji využívaným genetickým modelem jsou obézní Zuckerovi potkani, kteří jsou běžně využívány jako model metabolického syndromu i pro simulaci inzulinové rezistence a rezistence na leptin. Další možností je využití vyšlechtěného kmene potkanů na základě zvýšené citlivosti k přívodu sacharózy v dietě z potkanů kmene Wistar v Praze na Institutu klinické a experimentální medicíny jako model lidské hypertriacylglyceridémie a nebo potkani hypercholesterolemičtí. Hypercholesterolemický potkan – přesně Pražský hereditárně hypercholesterolemický potkan (PHHC) je inbrední linií potkana odvozeného z kmene Wistar. Navození hypercholesterolémie vysokocholesterolovou dietou a složení lipoproteinů je velmi podobné lidské patologii, protože hypercholesterolémie je způsobena poruchou zpětnovazebné regulace syntézy cholesterolu v játrech a je výrazně posunuta k vyšším koncentracím cholesterolu v hepatocytu i intravazálně. Výsledkem je podstatné zvýšení koncentrace LDL a IDL po podání vysokocholesterolové diety [87].

2.7. Metody hodnocení intenzity regenerace

2.7.1. Hodnocení regenerace zobrazovacími technikami

Nejběžnější diagnostickou metodou steatózy jater u lidí je ultrazvukové vyšetření, jaterní biopsie, ale jaterní regenerace a její hodnocení není standardizováno. Za steatotická játra jsou považována taková játra, jejichž parenchym je více echogenní (světlejší) než je parenchym kůry sousedící pravé ledviny. Senzitivita a specificita ultrasonografie steatózy jater je více než 90 % pokud je steatózou postiženo přes 30 % hepatocytů [93]. Dalším kritériem je rozmazání okrajů větších jaterních cév (tzv. vessel blurring). Běžné ultrazvukové vyšetření jater není ani při kombinaci různých kritérií schopno predikovat přítomnost NASH nebo fibrózy s dostatečnou přesností. Ostatní zobrazovací metody (CT nebo MR) nepřinášejí další diagnostický benefit ani z pohledu radiačního zatížení ani ceny.

2.7.2. Hodnocení regenerace s použitím laboratorních technik

Existují možnosti ryze fyzikální, kdy podle hmotnosti jater lze posuzovat míru regenerace podle nárůstu objemu jaterní tkáně [83,94]. 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 [20].

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 (^3H -thymidinu) nebo bromdeoxyuridinu (BrdU) do buněčné DNA.

Další možností je monitorování hormonů štítné žlázy, které regulují aktivitu enzymů jako je thymidinkináza [95].

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 Δ exprese [96].

Alternativou zjištění syntézy DNA se kromě výše uvedených možností zdá být hepatotrofní protein Augmenter liver regeneration (ALR). ALR je uložen v hepatocytu v neaktivní formě, po PH je aktivován a uvolněn do cirkulace [97]. Hladiny ALR v krvi 12 hodin po PH se zvyšují a bylo prokázáno, že ALR funguje jako regulátor regenerace jater. Deficience ALR narušila mitochondriální biogenezi a tím ALR může být považován za jeden z mechanismů způsobujících zpoždění regenerace jater u myši [98].

Do popředí se dnes dostávají možnosti postgenomové analýzy tzv. metabolom, který je definován jako komplexní analýza malých molekul - intra a extracelulárních látek o molekulové hmotnosti $M_r < 1000 \text{ g/cm}^2$. Tyto látky účastní se metabolických reakcí jsou nezbytné pro růst a normální funkci buňky. Pro jejich stanovení se většinou používají buď chromatografické metody s hmotnostní detekcí v kombinaci s imunohistochemickými metodami založenými na reakci s protilátkou. Iguchi [99] při použití kombinace MALDI-TOF/MS potvrdil významnost albuminu a podjednotky α hemoglobinu 24 hodin po částečné

hepatektomii. Výrazná změna koncentrace aminokyseliny valinu po částečné hepatektomii prokázala stimulaci proliferace hepatocytů zvýšením hladin mastných kyselin, snížení nekrózy svými antioxidačními účinky a zvýšenou regulací superoxiddismutázy [100]. Změna hladiny aminokyseliny valin prokázalo, že valin není pouhým markerem poškození jater, ale hraje roli v remodelaci tkáně udržením redoxní rovnováhy $\text{NAD}^+/\text{NADH}^+$ a navíc slouží i jako i jako glukogenní substrát [101]. Zvýšené hladiny tryptofanu korelovaly se zvýšenou hladinou serotoninu. Zhao [102] potvrdil u potkanů Sprague-Dawley po PH jako biomarker dynamických změn metabolit 1,5-anhydroglucitol v rámci metabolomiky. Jde o metabolit indikující proliferaci jaterních parenchymálních buněk. Další možností syntézy DNA a nástup regenerace může být porovnávání složení kolagenu a kolagenových vláken [103].

2.8. Funkční testy jaterní regenerace

Měření jaterní metabolické kapacity bylo předmětem zájmu hepatologů od první jaterní resekce, protože játra mají klíčovou funkci v intermediálním a energetickém metabolismu, ale též vykonávají další funkce jako je tvorba žluči, biotransformace xenobiotik a řady látek endogenního původu, též zasahují do dějů imunitních a mají zásobní funkci. Limity chirurgického zákroku závisí na vaskulární a biliární anatomii i na metabolických rezervách zbytku neresektované tkáně. V klinické praxi se rutinně využívají klasické jaterní testy (aminotransferázy, bilirubin, alkalická fosfatáza a γ -glutamyltransferáza) a markery syntetické funkce jater (albumin, protrombinový čas). Tyto markery nejsou dostatečně senzitivní k hodnocení komplexních dějů a velmi často jsou ovlivněny komplikacemi jaterního onemocnění.

Z těchto důvodů byly zavedeny testy, u kterých je ve většině případů potřeba zajištění intravenózního podání speciálních látek s následným odběrem vzorků v časových intervalech, tzv. funkční testy. Analýza biologického materiálu vyžaduje speciální analytickou techniku, která není úplně běžnou součástí klinické laboratoře.

Funkční testy lze rozdělit na testy měřící na tzv. chemoexkrekční zkoušky, kdy látka podaná intravenózně je vychytána játry a vyloučena žlučí. Látka je stanovena většinou kolorimetricky v krvi a dávka je závislá na farmakokinetice dané látky – např. indocyaninová zeleň. Dalším typem testu je stanovení skutečné jaterní metabolické funkce např. stanovení mikrozomální enzymatické aktivity cytochromu P450 (test s lidokainem, aminopyrinem,

benzodiazepam, kofeinem i methacetinem. Poslední kategorií funkčních testů zahrnuje vyšetření cytosolové jaterní funkce stanovení přeměny např. oxidace aromatických aminokyselin fenylalaninu nebo konverzi galaktózy na glukózu.

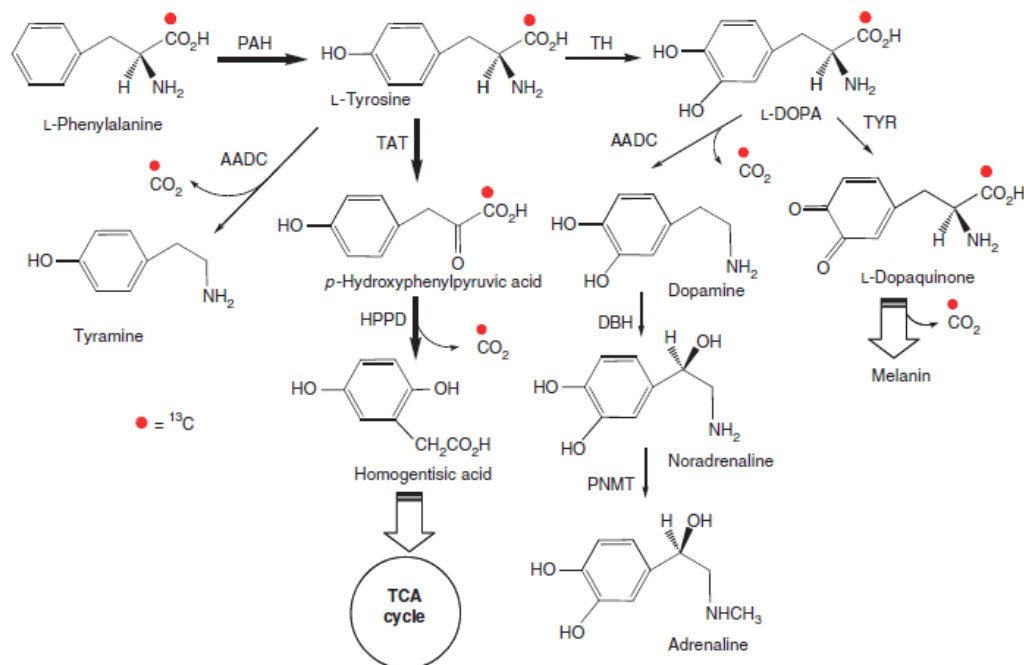
V dnešní době jsou testy s indocyaninovou zelení hojně využívány v kardiochirurgii, neurochirurgii i u robotických operací [104]. V případě posuzování jaterní regenerace je test založený na podání syntetické zelené barvy – indocyaninu, který je eliminován žlučovým systémem. Koncentrace indocyaninu je měřena fotometricky (805 nm) ve vzorcích odebíraných každých 5 minut, celkově 15 minut. Kalkulovaná clearance odhaduje kapacitu jaterního parenchymu, hodnota klesá s redukcí funkční jaterní hmoty. Většina funkčních testů byla převedena na méně invazivní formu dechových testů, důvodem je i rychlé zpracování a přesná kvantifikace.

2.8.1. 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}C uhlíkem mají výhodu v jednoduchosti provedení, nevyžadují odběr krve, jsou bezpečné a mají nízkou variabilitu. V dnešní době lze využít pro zhodnocení funkce jater více substrátů, záleží na důvodu a způsobu hodnocení jaterní funkce, např. podání ^{13}C galaktózy se využívá pro zhodnocení funkční kapacity jater v raných stádiích hepatocelulárního karcinomu, pro posouzení jaterního metabolismu léčiv je podáván ^{13}C aminopyrin, podáním ^{13}C methacetinu lze posoudit demethylační a oxidační funkce hepatocytů (např. požití při otravách muchomůrky zelené), podání ^{13}C oktanoátu sodného je vhodné pro zhodnocení β -oxidace v mitochondriích a ^{13}C fenylalanin je vhodným substrátem pro zhodnocení cytosolové funkce jater odrážející regenerační schopnost jater.

Orálně podaný ^{13}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 [105], poté je tyrosin přeměňován až na kyselinu homogentisovou za přístupu O_2 v reakci katalyzované homogentisátoxygenázou. Vznikající kyselina homogentisová je následně degradována v několika krocích na fumarát a acetoacetát v citrátovém cyklu (Obr. 4). Bylo zjištěno, že konverze v ledvinách neovlivňuje

jaterní regeneraci po PH [106]. Konverze fenylalaninu koreluje s Child Pughovým skórem i testy s indocyaninovou zelení [107].



Obr. 4 Schématické znázornění degradace fenylalaninu v organismu. Hlavní cesta metabolismu je naznačena tlustou šipkou a ukazuje degradaci tyrosinu přes *p*-hydroxyfenylpyruvát až na kyselinou homogentisovou. Při přeměně na homogentisát se uvolní H_2O a CO_2 . Červená tečka ukazuje tvorbu CO_2 , resp. ^{13}C při dechovém testu. [108], TCA = citrátový cyklus.

Dechové testy s ^{13}C fenylalaninem byl navržen jako dynamicky marker jaterní regenerace [106]. Heberer [109] prokázal, že centrální clearance plazmy poměru aminokyselin u jater může být považován jako prediktor jaterní funkce i rezerv a koreluje s operačním zásahem.

Dechové testy využívají v dnešní době neradioaktivní uhlíkem ^{13}C , který je přirozený, stabilní a vyskytuje se v přírodě i v lidském organismu zhruba v 1,1 % z celkového množství uhlíku. Oxid uhličitý jako konečný produkt většiny metabolických pochodů je rychle vstřebán, dostává se do systémové cirkulace a tím i do plic, kde je vylučován ve vydechaném vzduchu, ve kterém je následně stanoven. Rychlost přeměny fenylalaninu a detekce poměru značeného a neznačeného oxidu $^{13}\text{CO}_2$: $^{12}\text{CO}_2$ ve vydechaném vzduchu je v tomto případě měřítkem rychlosti a efektivity metabolismu resp. orgánových funkcí.

Množství stabilního izotopu uhlíku ^{13}C se vyjadřuje hodnotou $\delta^{13}\text{C}$ vyjadřující vztah poměru $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ k mezinárodně uznávanému standardu V-PDB, který má hodnotu 1,11237 %.

V-PDB = vídeňský belemnit Pee-Dee. PDB je primární referenční materiál pro měření přirozených změn obsahu izotopu uhlíku 13, sestávající z uhličitanu vápenatého ze schránek křídových belemnitů rodu Belemnitella z útvaru Pee Dee v Jižní Karolině (USA). Jeho poměr izotopů $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ neboli RPDB je 0,0112372. Zásoby PDB jsou dávno vyčerpány, ale PDB zůstal dále primárním referenčním materiálem pro vyjádření přirozených změn obsahu izotopu ^{13}C , na který je kalibrován referenční materiál dostupný u mezinárodní agentury pro atomovou energii ve Vídni.

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).

Přístroje (analyzátoři) pro stanovení poměru koncentrace $^{13}\text{CO}_2:^{12}\text{CO}_2$ ve vydechovaném vzduchu se liší principem detekce a analytickou citlivostí. Nejpřesnější metodou je poměrová hmotnostní spektrometrie (IRMS – Isotope Ratio Mass Spectrometry), kde hmotnostní spektrofotometr má speciální trojitý detektor počítající částice s hmotností 44 ($^{12}\text{CO}_2$), 45 ($^{13}\text{CO}_2$) a 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$). Systém dnes nabízí dva výrobci – SerCon (Velká Británie) a GV Instruments (Velká Británie). Druhým přístupem je detekce v infračerveném spektru (NDIRS – NonDispersive Isotope-selective Infrared Spectroscopy). Analyzátoři tohoto typu jsou jednodušší, menší, nevyžadují speciální služby a jsou řazeny mezi typy POCT (Point Of Care Testing) přístrojů.

2.9. 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 [110]. 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 [111]. Mechanismus využívající nahrazení toxických substancí látkami netoxickými je uplatňovaný pomocí kyseliny ursodeoxycholové při cholestatických jaterních chorobách [112]. V poslední době se využívají i další rostlinné přípravky a výtažky, u nichž je většinou největším problémem nízká biodostupnost [113]. Podpůrná léčba chronických jaterních chorob by měla směřovat ke zpomalení či zastavení procesu fibrotizace, stabilizovat poškozenou metabolickou funkci hepatocytu, snižovat rozsah nekrózy.

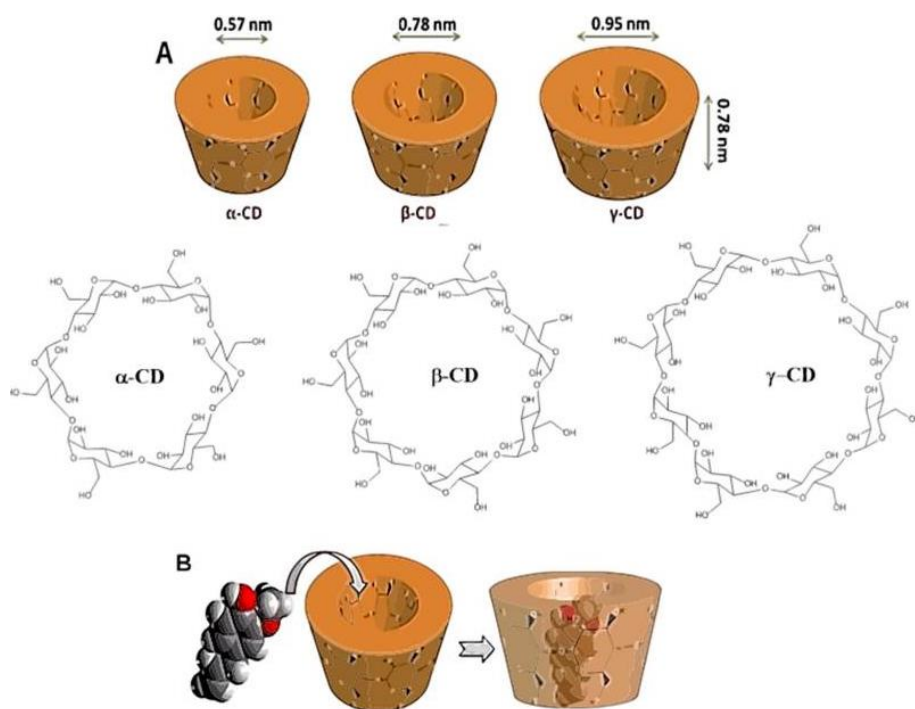
2.9.1. Kyselina ursolová

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. triterpenu (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 [114]. Nejvyšší koncentrace kyseliny ursolové [115] 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 [114].

Biologická dostupnost kyseliny ursolové je problematická 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 [116]. Podobný experiment potvrdil snížené hladiny markerů peroxidace lipidů i celkového bilirubinu [117]. 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 [118], k těmto závěrům došel i experiment s UA zamíchaný ve vysokotukové dietě [119]. Experiment zjišťující efekt kyseliny ursolové na izolovaných hvězdicových jaterních buňkách potkanů s jaterní fibrózou potvrdil rychlejší

apoptózu a následné částečné zlepšení fibrózy [120]. Některé experimenty rozpouští kyselinu ursolovou ve fyziologickém roztoku, jako i jediná publikace zkoumající vliv UA na jaterní regeneraci [121], 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 hydrofobním vlastnostem kyseliny ursolové se začaly v posledních letech objevovat publikace využívající kyselinu ursolovou navázanou ve formě stearylglukosidu ursolové kyseliny [122] různých fosfolipidových komplexů [123] nebo nanočástic [27]. Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, které v závislosti na počtu propojených glukózových jednotek glykosidickými α 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 (Obr. 5), přičemž volné hydroxylové skupiny se nacházejí na jeho okrajích – soustředěním hydroxylových skupin se okraje dutiny cyklodextrinů stávají relativně hydrofobní, čímž je možné vytvořit inkluzní komplexy. Další možností zvýšení dostupnosti hydrofobní kyseliny ursolové je mikronizace či homogenizace, tedy postup často využívaný ve farmacii. Tento postup byl v rámci vytvoření fosfolipidového komplexu též proveden [123]. Zapouzdření kyseliny ursolové do cyklodextrinu a tím zvýšení dostupnosti téměř o 1 řád, anebo zvýšení biologické dostupnosti mikronizací (ovlivnění velikostí) nebylo dodnes publikováno.



Obr.5 Vzorok α , β a γ cyklodextrinu a vznik inkluzní sloučeniny [124]

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 α - a γ -CD patří mezi látky s certifikací nejvyšší bezpečnosti. Cyklodextriny α při orálním podání mají dovolené dávky až 6000 mg/den, γ -cyklodextriny 10 000 mg/den. β -cyklodextriny mají přidělený tzv. „kód E“ používaný pro přídatné látky, tj. E 459. Maximální povolená koncentrace pro β -cyklodextriny v potravinářském výrobku činí 500 mg/den [125]. β -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 potravin.

3. 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 β a γ 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.

4. METODY

4.1. Chemikálie

Na přípravu diet byly použity ingredience: kasein (PML Inc, Nový Bydžov, Česká republika), kukuřičný škrob (Škrobárny Pelhřimov, Česká republika), celulóza (Phrikolat, Chemische Erzeugnisse GmbH, Německo), cukr moučka (Tereos TTD, a.s. Curovar Dobruška, Česká republika) a kukuřičný olej (CANO Ltd. Heřmanův Městec, Česká republika). Vitamíny, minerály, DL-methionin, L-cystein, cholin chlorid a L-arginin, kyselina orotová a cholesterol byly získány z firmy Fisher Scientific Ltd. (Pardubice, Česká republika), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Králičí polyklonální protilátky (kat. číslo 100027) a polyklonální protilátky (kat. číslo 10007665) byly získány od firmy Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Anti-HMG-CoA reduktáza protilátka byla získána z firmy Chemicon (Billerica, Mas, USA), CYP7A1 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), beta-actin protilátka ProSci Inc. (CA, USA) a další chemikálie pro elektroforézu byly získány od firem Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany) a GE Healthcare (Praha, Česká republika). Chemikálie TRIS, HCl, sacharóza, leupeptin, pepstatin, aprotinin, benzamid, phenylmethylsulfonyl, tween byly nakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA). ³H-Thymidin byl získán od firmy Lacomed Ltd., Řež u Prahy, Česká republika. ¹³C-fenylalanin byl získán též od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pro stanovení genů RT-PCR byly od firmy Roche (Roche Diagnostics, Švýcarsko) získány Proteinkináza K, High Pure RNA Tissue Kit, od firmy Qiagen (Holandsko) byl nakoupen RNA later. Pro RT-PCR reakci byly nakoupeny eseje pro jednotlivé geny a Master Mix (podrobněji popsáno v kapitole 4.4.4.) (ThermoFisher Scientific-LifeTechnologies, USA).

4.2. 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 (MSMT-42093-2015-5).

4.2.1. 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). Potkani byli chováni v klecích po jednotlivých skupinách se zajištěním standardních kontrolovaných podmínek (teplota 22 ± 1 °C, vzdušná vlhkost 55 ± 10 %, výměna vzduchu 10x/hod. a přirozeného cyklu světlo/tma 12/12 hod.). Všechna zvířata měla volný přístup k pitné vodě a k dietě *ad libitum*. Po týdenní aklimatizaci byli potkani rozděleni do jednotlivých skupin podle podávaných diet (viz níže testované substance). 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 °C. Experiment byl proveden na potkanech o počáteční tělesné hmotnosti 256 ± 15 g, a potkani PHHC 292 ± 20 g.

Potkani byli použiti jednak pro zavedení modelu NAFLD v podmínkách *in vivo* a následně pro sledování vlivu jaterní steatózy na regeneraci jater po 2/3 PH. Rozdělení potkanů, počty potkanů a délka doby krmení jsou uvedeny v Tabulce 1 (Tab.1).

Tab. 1. Rozdělení skupin potkanů pro zavedení modelu NAFLD

Kmen	Dieta	Počet	Označení		Označení		Doba krmení
			Skupina 18h	počet	Skupina 24h	počet	
Wistar - intakt	W-SLD-int	8					29
	W-CHOL-int	8					29
	W-MCDT-int	8					29
	W-ORO-int	8					29
Wistar			W-SLD-18	8	W-SLD-24	8	29
			W-CHOL-18	8	W-CHOL-24	8	29
			W-MCDD-18	8	W-MCDD-24	8	29
			W-ORO-18	8	W-ORO-24	8	29
PHHC			PHHC-SLD-18	8	PHHC-SLD-24	8	29
			PHHC-CHOL-18	8	PHHC-CHOL-24	8	29
			PHHC-MCDD-18	8	PHHC-MCDD-24	8	29
			PHHC-ORO-18	8	PHHC-ORO-24	8	29

V rámci této části experimentu byly stanoveny koncentrace lipidů (celkového cholesterolu – tCH, HDL a LDL cholesterolu, triacylglyceridů - TAG) a bilirubinu - BIL, koncentrace glukózy, inzulinu a leptinu. Dále byly stanoveny katalytické aktivity enzymů (alaninaminotransferázy - ALT, aspartátaminotransferázy – AST a γ -glutamyltransferázy - GMT). Technikou Western blot byly změřeny exprese proteinů zapojených do homeostázy cholesterolu (HMG-CoA reductáza, acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-2 - ACAT-2 a LDL receptor).

Složení diet a testované substance

Diety byly připraveny podle Tabulky 2 (Tab.2). Složení směsi vitamínů a minerálů (Tab. 3) bylo připraveno podle www.TestDiet.com. Diety byly vytvořeny promícháním jednotlivých součástí s pitnou vodou, cholesterolu s olejem a pak následně s vodou, na strojku na mletí masa byly vytvořeny pelety, které byly následně usušeny v sušičce potravin při teplotě do 60 °C.

Tab. 2 Příprava diet – složení jednotlivých diet

Název diety	SLD	CHOL	ORO	MCDD
1 kg diety	SLD	SLD se 4 % cholesterolu	SLD s 1 % kyseliny orotové	SLD cholin-methionin deficitní
Kasein	260 g	260 g	260 g	260 g
Kukuřičný škrob	491,7 g	453,7 g	491,7 g	491,7 g
Cukr moučka	60 g	60 g	60 g	60 g
Celulóza	50 g	50 g	50 g	50 g
Cholin chlorid	9,05 g	9,05 g	9,05 g	0 g
DL-methionin	10 g	10 g	10 g	0 g
L-cystein	2 g	2 g	2 g	2 g
L-arginin	5 g	5 g	5 g	7,2 g
Cholesterol	0 g	38 g	0 g	0 g
Orotová kyselina	0 g	0 g	100 g	0 g
Mix minerálů	50 g	50 g	50 g	50 g
Mix vitamínů	8,92 g	8,92 g	8,92 g	8,92 g
Olej s vitamíny	55,33 g	55,33 g	55,33 g	55,33 g
Do oleje přidáme pitnou vodu, přidáme vitamíny (viz níže) a rozšleháme roztok metlou.				
A vit (30000 IU/tobolka)	2600 IU	2600 IU	2600 IU	2600 IU
D vit (300000 IU/amp)	9000 IU	9000 IU	9000 IU	9000 IU
K vit (20 mg/ml)	0,8 mg	0,8 mg	0,8 mg	0,8 mg
E vit (30 mg/amp)	5 mg	5 mg	5 mg	5 mg
Vitamín B6 (50 mg/amp)	0,68 ml	0,68 ml	0,68 ml	0,68 ml
Vitamín B12 (300 µg/amp)	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml

Tab. 3 Příprava mixu minerálů a vitamínů:

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

Vitamíny	1 kg
Thiamin B1	3,78 g
Riboflavin B2	3,78 g
Ca panthotenát	6 g
Niacin PP	6,3 g
Biotin H	20 mg
C vitamín	63,03 g
Kyselina listová	110 mg
Inositol	6,3 g
Sucrose	Doplněno do 1000 g

* (jodidovaná, fluoridovaná kuchyňská sůl)

Obsah methioninu a cholinu v dietě SLD byl 11,68 g/kg, obsah v dietě methionin-cholin deficitní bylo 1,68 g/kg.

4.2.2. Experiment s kyselinou ursolovou

Standardní laboratorní dieta byla připravena firmou Velaz, Česká republika. Složení diety bylo: bílkovina 21,1 %, tuk 5,1 %, karbohydráty 60,0 %, vláknina 3,9 %, minerály 7,9 % a vitamíny 2,0 %. Dietu vysokotukovou připravila firma Weber s.r.o., Stříbrná Skalice, Česká republika o složení: tuky (hovězí lůj) 35,5 %, karbohydráty, bílkoviny a vláknina 58 %, minerály a vitamíny 6,5 %. Hovězí lůj obsahuje 49,8 % nasycených mastných kyselin. Vysokotuková dieta byla podávána 2 skupinám po dobu 6 týdnů.

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 $\varnothing > 5 \mu\text{m}$) a mikronizací (skupina MAP, velikost částic $\varnothing = 5 \mu\text{m}$). 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 [126]. 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. Molekulárně biologickými technikami byly stanoveny exprese mRNA HGF, PPAR α , SREBP a CYP7A1.

4.2.3. Experiment s kyselinou ursolovou – dechové testy

Všechny skupiny potkanů dostávaly standardní laboratorní dietu (složení: bílkovina 21,1 %, tuk 5,1 %, karbohydráty 60,0 %, vláknina 3,9 %, minerály 7,9 % a vitamíny 2,0 %, příprava diety Velaz, ČR.

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 a intragastricky. 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 podávána 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

V experimentu s kyselinou ursolovou – dechové testy byl stanoven poměr $^{13}\text{CO}_2$: $^{12}\text{CO}_2$ ve vydechaném vzduchu.

4.3. Regenerace jater po 2/3 parciální hepatektomii

Parciální hepatektomie (PH) byla provedena v celkové anestezii podle modelu 2/3 hepatektomie podle modelu Higgins a Anderson [19] ve Viváriu a radioizotopových laboratořích Lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Všechny invazivní zákroky byly prováděny v éterové inhalační anestezii ve funkční digestoři.

4.3.1. Experiment vlivu steatózy jater na jejich regenerační schopnost

Experiment s navození NAFLD byl u části potkanů ukončen 18 hod. po PH a u části potkanů za 24 hod. po PH. Jednu hodinu před usmrcením byl potkanům podán ^3H -thymidin v dávce 37 kBq/100 g tělesné hmotnosti potkana. Potkani byli usmrceni vykrvácením z bifurkace břišní aorty při předávkování anestetika.

4.3.2. Experiment s kyselinou ursolovou

U experimentu s kyselinou ursolovou byla poslední dávka podána ráno po PH testované substance. Potkani byli usmrceni vykrvácením abdominální aorty v anestezii.

Krev v obou experimentech byla centrifugována, plazma rozdělena do alikvotačních zkumavek a zamražena. Odebraný zbytek jaterní tkáně byl omyt, osušen, zvážen a okamžitě zmrazen k dalšímu zpracování a skladován v hlubokomrazícím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.3. Experiment s kyselinou ursolovou – dechové testy

U experimentu s kyselinou ursolovou byla poslední dávka podána ráno po PH testované substance. Potkani byli usmrceni vykrvácením abdominální aorty v anestezii. Celkově třikrát během experimentu byly provedeny na potkanech dechové testy - po aklimatizaci, před parciální hepatektomií a 24 hodin po parciální hepatektomii.

4.4. Metody stanovení

Byly provedeny analýzy z krve a jater potkanů. Krev byla odebírána do zkumavek s obsahem heparinu (Sarstedt, Německo), plazma byla po centrifugaci částečně zamražena pro další stanovení na -20°C a nebo v případě biochemických markerů proměřena ihned. Jaterní tkáň byla zamražena na -80°C .

4.4.1. Biochemické metody

Pro posouzení míry poškození jaterní tkáňe chirurgickou resekci byly změřeny katalytické aktivity enzymů - alaninaminotransferázy (ALT), aspartátaminostransferázy (AST), γ -glutamyltransferázy (GMT), dále glukóza (GLU), markery lipidového metabolismu – celkový cholesterol (tCH), HDL cholesterol (HDL), LDL cholesterol (LDL), triacylglyceridy (TAG) a bilirubin (BIL) na analyzátoru COBAS 8000, Roche, Mannheim, Německo. Žlučové kyseliny (ŽK) byly proměřeny enzymaticky, Diazyme Laboratories, Poway, California, USA. Stanovení hladin leptinu a inzulínu bylo provedeno s využitím kitů (RatLeptin and Insulin RIA kit) firmy DRG, Marburg, Germany.

Hepatocytární růstový factor (HGF) byl změřen v plazmě pomocí kvantitativního imunostanovení od firmy Cloud-Clone Corporation, Houston, USA.

4.4.2. Kalkulace hmotnosti jater

Hmotnost jater byla kalkulována podle rovnice Hepatic regeneration rate (HRR) autorů Selznera a Claviena [94]:

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

A - 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).

4.4.3. Syntéza jaterních DNA

Obsah a syntéza jaterních DNA byla vyhodnocena na základě inkorporace ³H-thymidinu na přístroji Beckman Coulter LS 6000LL (Fullerton, CA, USA). Syntéza DNA byla stanovena podle Short [127] a obsah jaterních DNA byl stanoven pomocí difenylaminové metody popsané Burtonem [128].

4.4.4. Kvantitativní RealTime RT-PCR

Celková RNA byla izolována pomocí izolačního kitu HighPure RNA Tissue Kit z přibližně 30 mg vzorku jaterní tkáně, která byla odebrána do RNA lateru. Koncentrace a čistota získané RNA byla spektrofotometricky měřena při 280/260 nm s využitím přístroje NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, USA). Pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit byla podle manuálu od výrobce provedena reverzní transkripce - reakce obsahovala 500ng celkové RNA, a dále byly použity oligo dT a náhodné hexamer primery (1:2). Real-time PCR reakce byla provedena v 10 µl reakční směsi, která obsahovala 1X eseje pro jednotlivé geny TaqMan Gene Expression Assays (Tab. 4), 1X Gene Expression Master Mix (oboje ThermoFisher Scientific-LifeTechnologies, USA) a 0,5 µl cDNA. Reakce jednotlivých vzorků byly připraveny vždy v triplicátu a amplifikace s teplotním profilem: 2 min při 50°C, 10 min při 95°C a 40 cyklů: 95°C při 15s a 60°C při 60s proběhla s využitím přístroje RotorGene 6000 (Qiagen-Corbett Research, Netherlands). Do každého běhu byla zařazena negativní kontrola, RT- a kalibrátory. Relativní exprese (RE) jednotlivých genů byla spočítána pomocí metody ddCT ($\Delta\Delta C_t$ method) v porovnání s vybraným referenčním genem (Hprt) [96].

Tab. 4 Seznam použitých genů

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

4.4.5. Western blot

Jaterní tkáň (cca 200 mg vzorku) byla smíchána s 1 ml vychlazeného pufru TRIS-sacharóza (10 mmol/l Tris- HCl, 250 mmol/l sacharóza, pH 7,6) obsahujícím 0,5 µg/ml leupeptinu, 0,5 µg/ml pepstatinu, 2 µg/ml aprotininu, 50 µg/ml benzamidinu a 40 µg/ml fenylmethylsulfonyl florid – PMSF a byla homogenizována přístrojem firmy Braun (Braun, Melsungen, Německo) při 1500 rpm. Následovala ultracentrifugace (100 000 g, 4 °C a 20 minut) při níž vznikla peleta. Celý postup stanovení exprese proteinů ACAT-2, HMG-CoA reductázy, CYP7A1 i LDL receptoru byl zpracován podle Mičudy [129]. Protilátky s katalogovým číslem a výrobcem jsou sepsány v kap. 3.1.

Pelety získané centrifugací byly resuspendovány v pufru Tris-HCl (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4 a inhibitory proteáz. Koncentrace celkového proteinu byla stanovena BCA metodou (BCA protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL, USA) a vzorky uloženy při -80 °C.

Homogenáty (100 µg) po inkubaci při pokojové teplotě byly separovány v 7,5% polyakrylamidovém gelu, a poté byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Zbylá vazebná kapacita membrány byla blokována v 5% roztoku odtučněného mléka v TRIS pufru obsahující 0,05% Tween 20 (TTBS) po dobu jedné hodiny. Membrány byly inkubovány s primární protilátkou (1:500) jednu hodinu. Po vymytí membrány (5x proplachem) s TTBS následovala jednogodinová inkubace s peroxid-konjugovanou sekundární protilátkou v poměru 1:1000. Po promytí v TTBS byla provedena detekce přidáním chemiluminiscenčního činidla (ECL kit, Amersham Biosciences, Buskinghamshire, Velká Británie). Získaný obraz expozicí filmu byl dále analyzován po naskenování do počítače s GS-800 Calibrated Densitometr (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a kvantifikován denzitometricky s použitím software Bio-Rad. Výsledné pruhy byly porovnány a vyhodnoceny denzitometricky. Jako endogenní kontrola byl stanoven β-aktin.

4.4.6. Dechové testy - provedení

Během experimentu byl vzorkován vydechovaný vzduch potkanů vzhledem k produkci značeného ¹³CO₂ ze substrátu do vydechovaného vzduchu. Pro vzorkování vydechovaného vzduchu budou potkani umístěni do fixační klícky 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):

1. 0 min
2. podání intragastricky 0,5 ml značeného traceru ^{13}C -fenylalaninu o koncentraci 10 mg/1 ml vody
3. 15 min
4. 30 min
5. 45 min
6. 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}C -fenylalaninu jsou vyjádřené jako kumulativní množství $^{13}\text{CO}_2/\text{hod}$.

4.4.7. 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 tkáně 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.

4.5. 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 $p < 0,05$.

5. VÝSLEDKY

5.1. Experiment vlivu steatózy jater na jejich regenerační schopnost

5.1.1. Základní charakteristika potkanů – hmotnosti potkanů a spotřeba diety

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 (Tab. 5), průměrný přírůstek potkanů Wistar i PHHC zcela koreluje se stářím potkanů.

Tab. 5. Tělesná hmotnost potkanů kmene Wistar a PHHC (g)

Ročet dní skupiny	5	10	15	20	25	28	18 h po PH	24 h po PH
W - SLD	263 ± 5	302 ± 6	341 ± 5	370 ± 6	383 ± 5	397 ± 6	383 ± 5	383 ± 13
W - CHOL	266 ± 6	311 ± 5	344 ± 6	371 ± 6	383 ± 7	397 ± 8	376 ± 9	377 ± 11
W - MCDD	270 ± 3	311 ± 3	355 ± 5	388 ± 6	404 ± 5*	418 ± 6*	402 ± 7	403 ± 17
W - ORO	278 ± 3	306 ± 5	334 ± 8	358 ± 9	372 ± 10	387 ± 9	368 ± 11	368 ± 17
P - SLD	284 ± 21	312 ± 19	328 ± 17	342 ± 15	346 ± 14	347 ± 12	323 ± 17	324 ± 11
P - CHOL	291 ± 16	315 ± 11	334 ± 17	350 ± 15	354 ± 15	359 ± 15	343 ± 15	344 ± 20
P - MCDD	291 ± 12	308 ± 15	324 ± 14	338 ± 12	344 ± 10	350 ± 9	331 ± 10	333 ± 17
P - ORO	304 ± 15	316 ± 14	330 ± 18	338 ± 20	339 ± 19	340 ± 18	319 ± 19	320 ± 21

Tab. 5 Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n = 8. W – potkani kmene Wistar, 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 (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001)
Signifikantní rozdíly proti kontrolní skupině PHHC-SLD (+ p < 0,05 ++ p < 0,01, +++ p < 0,001)

Potkani kmene PHHC měli celkově nižší spotřebu diety (Tab. 6) než potkani Wistar. Dieta s kyselinou orotovou měla nejmenší spotřebu u obou kmenů potkanů. U potkanů kmene Wistar krmených dietou MCDD došlo k signifikantnímu zvýšení spotřeby diety, u PHHC potkanů s touto dietou byla spotřeba diety srovnatelná s dietou CHOL, ale po PH je viditelný nárůst spotřeby diety nejspíš z důvodu co největšího doplnění esenciálních aminokyselin.

Tab. 6 Spotřeba diety během experimentu na jednoho potkana/den (g)

	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	18 po PH	24 po PH
W - SLD	19,2 ± 0,8	21,0 ± 0,3	22,1 ± 0,5	22,8 ± 0,8	5,4 ± 0,6	7,6 ± 1,0
W - CHOL	19,3 ± 0,2	21,9 ± 0,6	22,0 ± 0,2	24,2 ± 0,6	5,1 ± 0,1	6,2 ± 0,7
W - MCDD	24,7 ± 0,2*	23,9±0,8*	23,9 ± 0,2*	25,25± 0,5	9,0 ± 0,1*	9,6 ± 0,9
W - ORO	17,0 ± 0,2*	19,3 ± 0,4*	19,4 ± 0,4*	22,0 ± 0,4	9,0 ± 0,1	9,6 ± 0,9
P - SLD	20,3 ± 0,2	19,05± 0,7	16,4 ± 0,1	21,4 ± 0,1	2,9 ± 0,2*	4,2 ± 0,8*
P - CHOL	21,4 ± 0,2	18,8 ± 0,1	18,5 ± 0,3	19,2 ± 0,3	1,7 ± 0,1*	9,8 ± 0,3* ⁺
P - MCDD	21,3 ± 0,1	19,0± 0,7	19,6 ± 0,6	19,1 ± 0,4	4,0 ± 0,9	5,2 ± 0,4
P - ORO	18,9 ± 0,4⁺	18,5 ± 0,5 ⁺	18,8 ± 0,7*	17,0 ± 0,1* ⁺	3,4 ± 1,1*	3,7 ± 0,3*

Tab. 6 Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n = 8. W – potkani kmene Wistar, 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 (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001)
 Signifikantní rozdíly proti kontrolní skupině PHHC-SLD (⁺ p < 0,05, ⁺⁺ p < 0,01, ⁺⁺⁺ p < 0,001)

5.1.2. Hladiny biochemických markerů

Výsledky biochemických vyšetření lipidů – celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu a triacylglyceridů (Tab. 7 a Tab. 8) jsou rozděleny podle jednotlivých dietních skupin a podle časových intervalů – před PH (čas T1), 18 (čas T2) a 24 hodin (čas T3) po PH. Statisticky byly vyhodnocovány změny v porovnání s dietou SLD v daném časovém intervalu. U potkanů kmene Wistar krmených dietou s vyšším obsahem cholesterolu byly koncentrace celkového cholesterolu a LDL cholesterolu v porovnání se SLD dietou významně zvýšené již před PH, stejně tak i koncentrace bilirubinu. Hladiny TAG jsou v porovnání se SLD dietou zvýšené pouze 18 hod po PH (Tab. 7). Dieta s kyselinou orotovou vykazuje významné snížení celkového cholesterolu již před PH, koncentrace LDL cholesterolu v krvi u diety s kyselinou orotovou je signifikantně snížena 24 hod po PH proti SLD dietě a koncentrace bilirubinu je naopak signifikantně zvýšená (Tab. 7). Dieta methionin-cholin deficitní nevykazuje žádné změny proti skupině s SLD dietou.

Tab. 7. Potkani kmene Wistar - hladiny celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu, TAG a bilirubinu

Analyt	ČAS	SKUPINY			
		W-SLD	W-CHOL	W-MCDD	W-ORO
tCH (mmol/l)	T1	2,41±0,18	3,19 ± 0,10 ***	2,05 ± 0,11	1,45 ± 0,11**
	T2	1,39 ± 0,13	1,94 ± 0,13*	1,29 ± 0,10	1,50 ± 0,04
	T3	1,01 ± 0,07	1,32 ± 0,08 *	1,14 ± 0,10	1,86 ± 0,20*
HDL (mmol/l)	T1	1,32 ± 0,14	1,16 ± 0,15	0,90 ± 0,10	1,06 ± 0,09
	T2	0,82 ± 0,06	1,02 ± 0,12	0,77 ± 0,03	0,78 ± 0,11
	T3	0,69 ± 0,07	0,76 ± 0,04	0,71 ± 0,05	0,57 ± 0,11
LDL (mmol/l)	T1	0,11 ± 0,03	0,32 ± 0,07 *	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,01
	T2	0,27 ± 0,06	0,54 ± 0,10 *	0,27 ± 0,030	0,14 ± 0,04
	T3	0,17 ± 0,02	0,37 ± 0,05	0,17 ± 0,02	0,05 ± 0,03**
TAG (mmol/l)	T1	2,95 ± 0,41	2,44 ± 0,31	3,06 ± 0,38	0,51 ± 0,08 ***
	T2	0,29 ± 0,03	0,83 ± 0,45 *	0,37 ± 0,05	0,54 ± 0,06*
	T3	0,42 ± 0,04	0,38 ± 0,04	0,48 ± 0,06	1,15 ± 0,35
BIL (µmol/l)	T1	3,75 ± 0,16	4,37 ± 0,18**	4,25 ± 0,36	5,50 ± 0,37***
	T2	8,00 ± 1,19	21,00 ± 15,83**	12,87 ± 3,58	31,25 ± 8,01
	T3	14,62 ± 3,51	8,42 ± 2,48	8,37 ± 1,37	39,14 ± 14,08*

Tab. 7 Hodnoty jsou vyjádřeny jako 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 (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001)

T1 – hladiny celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu, TAG a bilirubinu před PH

T2 – hladiny celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu, TAG a bilirubinu 18 hod po PH

T3 – hladiny celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu, TAG a bilirubinu 24 hod po PH

Výsledky celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu u potkanů PHHC krmených SLD dietou vykazují signifikantně zvýšené výsledky proti potkanům Wistar. Hladiny TAG a bilirubinu nevykazovaly změny (Tab. 8). Dieta s vyšším obsahem cholesterolu vykazuje u PHHC potkanů signifikantní zvýšení celkového cholesterolu a LDL cholesterolu proti skupině Wistar i PHHC-SLD před PH a naopak u potkanů s dietou MCDD a ORO byly hladiny celkového cholesterolu signifikantně sniženy proti PHHC-SLD na

koncentraci podobnou potkanům Wistar. Po parciální hepatektomii PHHC výsledky potkanů vykazují ve všech parametrech stejný trend jako u dané skupiny potkanů kmene Wistar.

Tab. 8. PHHC potkani - hladiny celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu, TAG a bilirubinu

Analyt	ČAS	SKUPINY			
		P-SLD	P-CHOL	P-MCDD	P-ORO
tCH (mmol/l)	T1	3,32 ± 0,09	6,94 ± 0,70 *** ++	2,43 ± 0,05 *** +	1,13 ± 0,06 *** +++
	T2	2,40 ± 0,08 **	3,12 ± 0,27 * +	1,73 ± 0,07 *** +	1,55 ± 0,09 **
	T3	1,91 ± 0,05	2,62 ± 0,37	1,77 ± 0,09	1,65 ± 0,12 **
HDL (mmol/l)	T1	1,43 ± 0,12 *	0,83 ± 0,076	1,29 ± 0,14	1,18 ± 0,03
	T2	0,97 ± 0,08	0,86 ± 0,09	0,88 ± 0,09	0,79 ± 0,07
	T3	1,05 ± 0,06	0,74 ± 0,03 +	0,66 ± 0,11	0,65 ± 0,09
LDL (mmol/l)	T1	0,33 ± 0,03 *	3,38 ± 0,67 ** +	0,23 ± 0,02	0,04 ± 0,01 *** ++
	T2	0,29 ± 0,04	1,95 ± 0,25 ** +	0,22 ± 0,02	0,09 ± 0,01 **
	T3	0,32 ± 0,02	1,84 ± 0,21 ** +	0,27 ± 0,04	0,11 ± 0,03 **
TAG (mmol/l)	T1	2,26 ± 0,20	2,18 ± 0,26	1,77 ± 0,16 *	0,31 ± 0,05 ***
	T2	0,65 ± 0,05	0,69 ± 0,11	0,68 ± 0,06	0,69 ± 0,08
	T3	0,62 ± 0,07	0,42 ± 0,07	0,53 ± 0,03	0,83 ± 0,16
BIL (μmol/l)	T1	3,66 ± 0,61	3,85 ± 0,26	4,28 ± 0,36	5,85 ± 0,26
	T2	27,00 ± 6,99	21,33 ± 8,71	11,57 ± 2,80	35,00 ± 11,61
	T3	46,66 ± 25,55	14,60 ± 7,63	37,66 ± 14,69	69,50 ± 20,68

Tab. 8 Hodnoty jsou vyjádřeny jako 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 (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001)
Signifikantní rozdíly proti kontrolní skupině PHHC-SLD (+ p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001)
T1 – hladiny celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu, TAG a bilirubinu před PH
T2 – hladiny celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu, TAG a bilirubinu 18 hod po PH
T3 – hladiny celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu, TAG a bilirubinu 24 hod po PH

Koncentrace glukózy, inzulinu a leptinu jsou znázorněny u potkanů kmene Wistar v Tabulce 9 (Tab. 9) a u potkanů PHHC v Tabulce 10 (Tab. 10).

Před parciální hepatektomií byly signifikantně zvýšené hladiny glukózy u diety s vyšším obsahem cholesterolu a MCDD. Během jaterní regenerace byly koncentrace glukózy a inzulinu u potkanů kmene Wistar skupin CHOL a MCDD bez statistické významnosti proti skupině potkanů se SLD dietou. Dieta s kyselinou orotovou vykazovala signifikantní snížení u glukózy i inzulinu po pH byť před parciální hepatektomií byly hladiny glukózy a inzulinu signifikantně zvýšené ($p < 0,05$).

Koncentrace leptinu byly signifikantně sniženy před parciální hepatektomií u skupiny CHOL a ORO.

Tab. 9 Potkani kmene Wistar – koncentrace glukózy, inzulinu a leptinu

ANALYT	SKUPINY				
	ČAS	W-SLD	W-CHOL	W-MCDD	W-ORO
Glukóza (mmol/l)	T1	7,41 ± 0,17	8,85 ± 0,22 ***	8,12 ± 0,33 *	8,02 ± 0,19 *
	T2	7,68 ± 0,20	7,64 ± 1,06	8,72 ± 0,57	6,56 ± 0,25 **
	T3	7,40 ± 0,19	7,87 ± 0,37	7,83 ± 0,20	6,85 ± 0,30 **
Inzulin (mmol/l)	T1	1,94 ± 0,24	1,50 ± 0,20	2,01 ± 0,31	2,41 ± 0,20
	T2	1,30 ± 0,16	1,16 ± 0,26	1,35 ± 0,36	0,72 ± 0,17 ***
	T3	1,23 ± 0,13	1,13 ± 0,17	1,48 ± 0,19	0,46 ± 0,16 ***
Leptin (ng/l)	T1	8,59 ± 0,76	5,78 ± 1,02 ***	8,93 ± 1,54	5,17 ± 0,57 ***
	T2	7,39 ± 1,30	5,32 ± 0,77	6,09 ± 1,05	6,44 ± 1,12
	T3	7,48 ± 1,04	5,73 ± 1,11	7,56 ± 1,05	13,52 ± 9,45

Tab. 9 Hodnoty jsou vyjádřeny jako 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 čas PH (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

T1 – hladiny glukózy, inzulinu a leptinu před PH

T2 – hladiny glukózy, inzulinu a leptinu 18 hod po PH

T3 – hladiny glukózy, inzulinu a leptinu 24 hod po PH

Koncentrace glukózy u všech skupin kromě PHHC-SLD byly obdobné jako u potkanů Wistar a vykazovaly stejný trend po PH. Koncentrace inzulinu byly signifikantně sníženy i po parciální hepatektomii potkanů PHHC v porovnání s Wistar potkany a hladina leptinu u potkanů PHHC byly koncentrace leptinu vyšší než u Wistar kmene, nejvíce u skupiny SLD (Tab. 10).

Tab. 10. Potkani PHHC - koncentrace glukózy, inzulinu a leptinu

ANALYT	SKUPINY				
	ČAS	P-SLD	P-CHOL	P-MCDD	P-ORO
Glukóza (mmol/l)	T1	8,08 ± 0,19 **	8,41 ± 0,24	8,04 ± 0,20	7,56 ± 0,19 ⁺
	T2	7,37 ± 0,24	7,58 ± 0,26	7,75 ± 0,39	6,60 ± 0,26
	T3	7,65 ± 0,10	8,17 ± 0,18	7,62 ± 0,31	6,59 ± 0,34*
Inzulin (mmol/l)	T1	1,10 ± 0,20 *	0,83 ± 0,15 *	0,88 ± 0,11 *	1,58 ± 0,17 *
	T2	0,21 ± 0,035 *	0,19 ± 0,045 **	0,32 ± 0,092***	0,17 ± 0,047+++
	T3	0,29 ± 0,080 *	0,46 ± 0,12 *	0,29 ± 0,060**	0,11 ± 0,035+++
Leptin (ng/l)	T1	7,57 ± 1,25	9,13 ± 1,21	8,08 ± 1,14	8,72 ± 1,17
	T2	12,55 ± 3,09 *	8,80 ± 0,66 * ⁺	8,89 ± 0,79 ⁺	10,94 ± 3,42*
	T3	17,99 ± 6,04 *	6,70 ± 1,08 * ⁺	9,76 ± 1,50 ⁺	13,42 ± 4,31*

Tab. 10 Hodnoty jsou vyjádřeny jako 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 – hladiny glukózy, inzulinu a leptinu před PH
 T2 – hladiny glukózy, inzulinu a leptinu 18 hod po PH
 T3 – hladiny glukózy, inzulinu a leptinu 24 hod po PH

Katalytické aktivity enzymů charakterizující poškození jaterního parenchymu ukazují u potkanů kmene Wistar Tabulka 11 (Tab. 11) a u potkanů PHHC Tabulka 12 (Tab. 12). ALT bylo zvýšené u skupiny CHOL 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. U této diety byly potvrzeny po PH i významně zvýšené aktivity enzymů ALT i AST. Katalytická aktivita GMT nevykazovala žádné signifikance, katalytická aktivita tohoto enzymu jsou v podstatě na hladině stanovitelnosti.

Tab. 11. Potkani kmene Wistar - katalytické aktivity enzymů

Analyt	ČAS	SKUPINY			
		W-SLD	W-CHOL	W-MCDD	W-ORO
ALT (μkat/l)	T1	0,56 ± 0,05	0,62 ± 0,05	0,56 ± 0,07	1,64 ± 0,34 **
	T2	6,83 ± 1,01	20,93 ± 10,73	8,74 ± 1,627	17,66 ± 3,37 **
	T3	6,21 ± 1,84	9,49 ± 1,83	10,86 ± 2,88	21,97 ± 2,03 ***
AST (μkat/l)	T1	1,41 ± 0,12	1,57 ± 0,094	1,58 ± 0,14	3,38 ± 0,50
	T2	11,05 ± 1,51	43,19 ± 29,05	13,52 ± 2,43	25,93 ± 3,83
	T3	8,54 ± 1,70	11,34 ± 1,89	12,97 ± 2,40	35,56 ± 3,87 ***
GMT (μkat/l)	T1	0,04 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,05 ± 0,03
	T2	0,01 ± 0,0	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,00
	T3	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,01

Tab. 12. Potkani PHHC - katalytické aktivity enzymů

Analyt	ČAS	SKUPINY			
		P-SLD	P-CHOL	P-MCDD	P-ORO
ALT (μkat/l)	T1	0,67 ± 0,06	0,67 ± 0,08	0,84 ± 0,05	2,23 ± 0,20 ***
	T2	25,28 ± 3,18 ⁺	26,26 ± 1,72 ⁺	20,75 ± 4,17	21,98 ± 2,74
	T3	26,93 ± 7,31⁺⁺	24,18 ± 7,38⁺⁺	26,10 ± 5,96⁺⁺	31,35 ± 6,97
AST (μkat/l)	T1	1,34 ± 0,078	1,67 ± 0,16	1,74 ± 0,18	5,08 ± 0,34
	T2	28,74 ± 3,17 ⁺	28,28 ± 1,11 ⁺	68,90 ± 48,60 ⁺⁺	57,04 ± 29,86
	T3	43,28 ± 14,95 ⁺	25,56 ± 7,71 ⁺	28,55 ± 4,71	67,95 ± 17,30⁺⁺
GMT (μkat/l)	T1	0,04 ± 0,01	0,26 ± 0,08	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00
	T2	0,02 ± 0,00	0,16 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	T3	0,047 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,02

Tab. 11 a Tab. 12 Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n = 8. W – potkani kmene Wistar, 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 – katalytické aktivity enzymů před PH
 T2 – katalytické aktivity enzymů 18 hod po PH
 T3 – katalytické aktivity enzymů 24 hod po PH

5.1.3. Metabolismus cholesterolu – exprese vybraných proteinů zapojených do homeostázy cholesterolu

Pomocí metodiky Western blot byla vyšetřena jaterní exprese LDL receptoru - zásadního receptoru pro vylučování cholesterolu z plazmy a jaterní exprese enzymů zasahujících do metabolismu cholesterolu: 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A reductázy (HMG-CoA), klíčového enzymu regulace cholesterolové syntézy a acyl-coenzymu 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 (Tab. 13). U potkanů kmene Wistar byl nalezen významný vzestup exprese HMG-CoA reductázy u MCDD před i během parciální hepatektomie na 146 reps. 148 % ($p < 0,05$). Dieta CHOL vykázala snížené hodnoty exprese enzymu ACAT-2 a naopak vyšší expresi u LDL receptoru po PH v porovnání s kontrolní skupinou SLD, exprese HMG-CoA reductázy je i přes zvýšený příjem cholesterolu v dietě stejná. Výsledky exprese u diety ORO ukazují odlišný trend výsledků exprese 24 hod po PH proti dietě SLD – postupný pokles exprese HMG-CoA reductázy, významně sníženou esterifikaci cholesterolu (pokles exprese ACAT-2) a sníženou expresi LDL receptoru.

Tab. 13. Potkani kmene Wistar - exprese vybraných proteinů

Analyt	ČAS	SKUPINY			
		W-SLD	W-CHOL	W-MCDD	W-ORO
HMG-CoA reductáza	T1	100 ± 2	103 ± 4	146 ± 6 *	121 ± 3 *
	T2	91 ± 3	96 ± 2	148 ± 6 *	119 ± 4 *
	T3	123 ± 6	130 ± 5	151 ± 7 *	100 ± 5 *
ACAT-2	T1	100 ± 1	68 ± 5 *	183 ± 14	63 ± 5 *
	T2	255 ± 12	91 ± 4 *	48 ± 8	80 ± 7 *
	T3	62 ± 4	178 ± 12	105 ± 8	28 ± 5 *
LDL receptor	T1	100 ± 2	109 ± 4	183 ± 14*	147 ± 9 *
	T2	176 ± 14	234 ± 17 *	139 ± 13	290 ± 17 **
	T3	223 ± 19	230 ± 15 *	162 ± 13	226 ± 16 ***

Tab. 13 Hodnoty jsou vyjádřeny jako % v porovnání s intaktním SLD potkanům (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 – exprese vybraných proteinů před PH

T2 – exprese vybraných proteinů 18 hod po PH

T3 – exprese vybraných proteinů 24 hod po PH

Výsledky exprese HMG-CoA reduktázy 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 nebylo tak významné jako u potkanů Wistar. Exprese ACAT-2 je u všech skupin PHHC potkanů 24 hod po PH významně snižená a podporuje využití cholesterolu pro výstavbu nových membrán (Tab. 14). Dieta ORO u PHHC potkanů vyazuje významně snížené exprese po PH u HMG-CoA reduktázy, ACAT-2 i LDL receptoru za 24 hod.

Tab. 14. Potkani PHHC - exprese vybraných proteinů

Analyt	SKUPINY				
	ČAS	P-SLD	P-CHOL	P-MCDD	P-ORO
HMG-CoA reduktáza	T1	122 ± 8	149 ± 11	155 ± 9 * ⁺	194 ± 16 * ⁺
	T2	105 ± 8	114 ± 10	239 ± 14 *** ⁺	164 ± 14 * ⁺
	T3	124 ± 9	153 ± 9	198 ± 12 * ⁺	76 ± 10 * ⁺
ACAT-2	T1	115 ± 8	40 ± 6***	121 ± 15	48 ± 8***
	T2	100 ± 5	32 ± 6***	172 ± 28 *	29 ± 20***
	T3	170 ± 25	28 ± 8***	130 ± 6	15 ± 4***
LDL receptor	T1	112 ± 10	143 ± 15	155 ± 12	132 ± 18
	T2	137 ± 18	156 ± 25	201 ± 18	231 ± 21
	T3	161 ± 21	175 ± 22	153 ± 16	18 ± 4 ***

Tab. 14 Hodnoty jsou vyjádřeny jako % v porovnání s potkany intaktními (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 P-SLD v daném čase PH (+ p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001)
 T1 – exprese vybraných proteinů zapojených do homeostázy cholesterolu před PH
 T2 – exprese vybraných genů zapojených do homeostázy cholesterolu 18 hod po PH
 T3 – exprese vybraných genů zapojených do homeostázy cholesterolu 24 hod po PH

5.1.4. Syntéza jaterních DNA

Hmotnosti jaterního zbytku po PH byly u všech diet potkanů Wistar i PHHC v porovnání s kontrolní SLD dietou vyšší. Částečná hepatektomie odstraněním 2/3 jater navodila pokles celkového obsahu DNA (Tab. 15 a 16). 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. Nejnížší syntézu DNA vyazuje 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. 15. 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. 15 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 – 18 hod po PH T2 – 24 hod po PH

Tab. 16. 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. 16 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

5.1.5. Histologické vyšetření jaterní tkáně

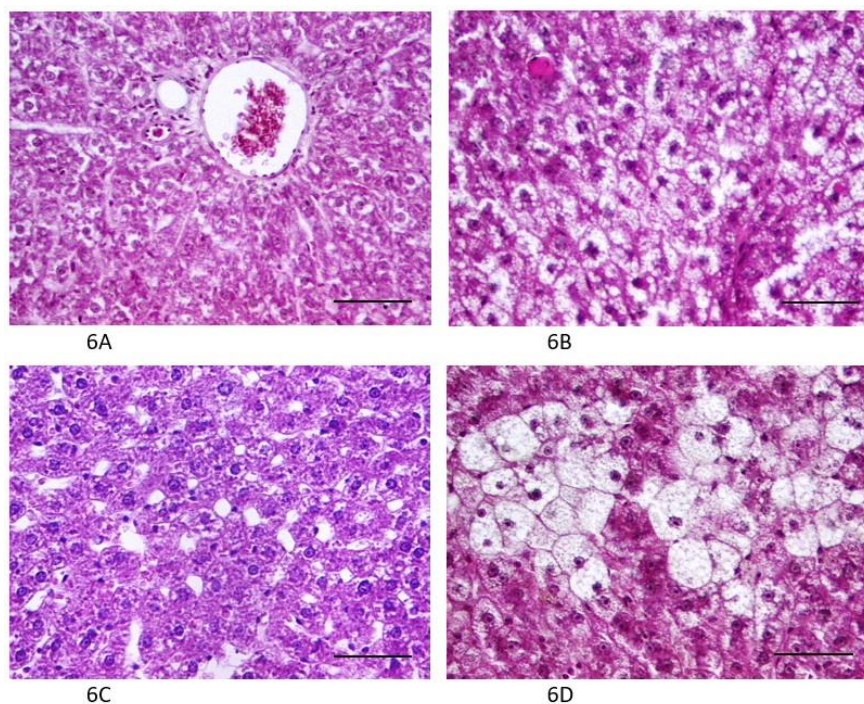
Histologické preparáty jater u jednotlivých experimentálních skupin nevykázaly vznik zánětu ani nekrózy před parciální hepatektomií. U potkanů kmene Wistar (Obr. 6A) s dietou s přídavkem cholesterolu byla na histologických preparátech potvrzena mikrokapénková steatóza 30-60 % ještě před parciální hepatektomií (Obr. 6B). U potkanů PHHC nebyla potvrzena mikrokapénková ani velkokapénková steatóza u více jak 10 % hepatocytů před parciální hepatektomií (Obr. 6C a 6D).

Nálezy 24 hod po parciální hepatektomii u kmene Wistar prokázaly mikrokapénkovou steatózu 80 % u skupiny se s dietou SLD (Obr. 7A), 90 % u diety s vysokocholesterolovou dietou (Obr. 7B) a u diety methionin-cholin deficitní byla pozorována mikrokapénková steatóza 70 % (Obr. 7C).

Po parciální hepatektomii u potkanů Pražských hereditárně hypercholesterolemických bylo pozorováno zpoždění proti potkanům kmene Wistar za 18 i 24 hodin, kdy u potkanů s dietou SLD (Obr. 8A) i diety methionin-cholin deficitní byla 24 hod po PH pozorována ojediněle mikrokapénková steatóza – pod 5 % (Obr. 8C), u diety s vysokocholesterolovou dietou bylo pozorována mikrokapénková steatóza nad 60 % (Obr. 8B).

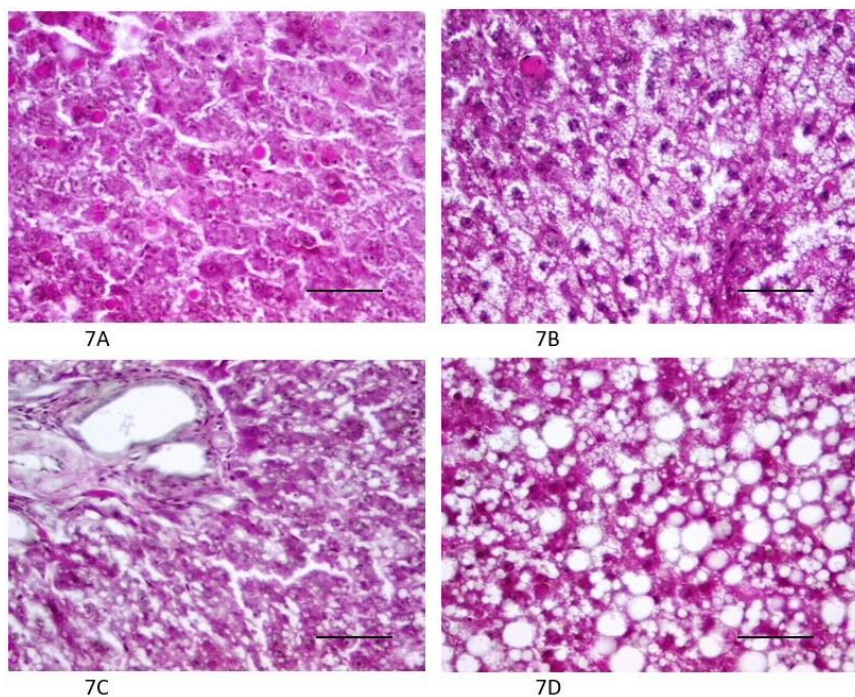
Samostatně hodnocenou skupinou potkanů s největší pozorovanou změnou v histologických preparátech jak u potkanů Wistar, tak i Pražských hereditárně hypercholesterolemických, byla skupina s podávanou dietou s kyselinou orotovou. U této diety byla před parciální hepatektomií potvrzena mikrokapénková steatóza nad 70 %, resp. 80 % u PHHC. Po parciální hepatektomii - 24 hod - byl u potkanů kmene Wistar pozorován zánik jader hepatocytů (Obr. 7D) a u potkanů PHHC mikrokapénková i velkokapénková steatóza nad 90 % (Obr. 8D).

Obr. 6 - Histologické preparáty jater u potkanů kmene Wistar a u potkanů PHHC po podávání diet SLD a CHOL před parciální hepatektomií



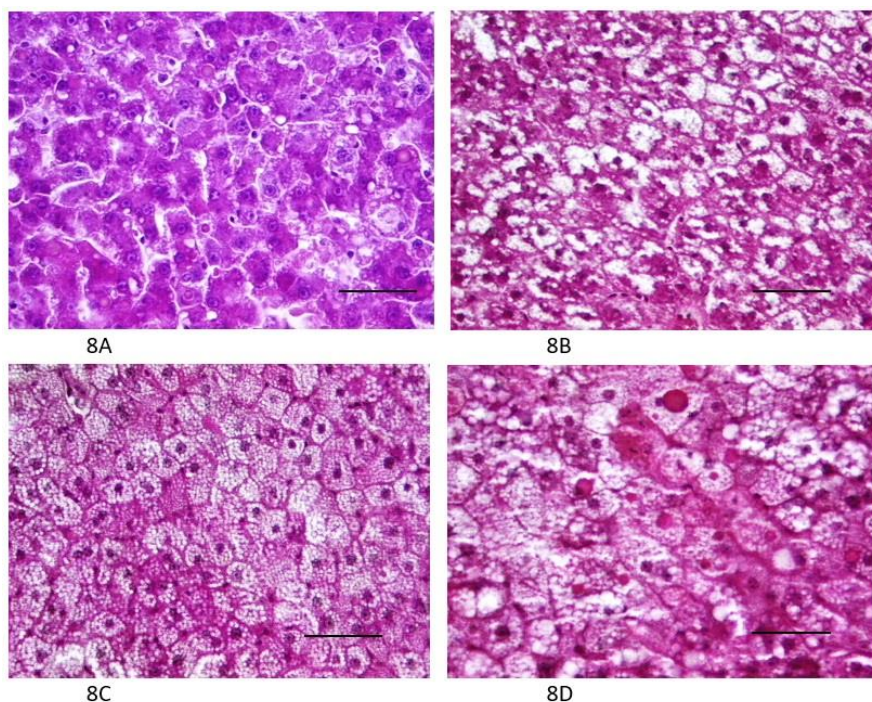
Obr. 6A - D – Histologické preparáty jater potkanů kmene Wistar (6A Wistar-SLD; 6B Wistar-CHOL) a PHHC (6C PHHC-SLD; 6D PHHC-CHOL) před parciální hepatektomií po 4 týdnech experimentu (měřítko - 100 μ m)

Obr. 7 Histologické preparáty jater potkanů kmene Wistar 24 hod po PH



Obr. 7A - D – Histologické preparáty jater potkanů kmene Wistar (7A Wistar-SLD; 7B Wistar-CHOL; 7C Wistar-MCDD a 7D Wistar-ORO) 24 hodin po parciální hepatektomií (měřítko - 100 μ m)

Obr. 8 Histologické preparáty jater potkanů PHHC 24 hod po parciální hepatektomii



Obr. 8A - D – Histologické preparáty jater potkanů kmene PHHC (8A PHHC-SLD 8A; 8B PHHC-CHOL, 8C PHHC-MCDD a 8D PHHC-ORO) 24 hodin po parciální hepatektomii (měřítko - 100 μ m)

5.2. Experiment s kyselinou ursolovou

5.2.1. Základní charakteristika potkanů - hmotnost potkanů a spotřeba diety

Výsledky přírůstků hmotnosti během podávání jednotlivých substancí kyseliny ursolové a spotřeba diety v experimentu je uvedena v Tab. 17 a 18.

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.

Tab. 17. Hmotnostní přírůstky během experimentu s kyselinou ursolovou

Skupiny	počáteční váha (g)	den 2	den 3	den 4	den 5	den 6	den 7 (48) ♠	den 8 (49) ♠
CTRL	201 ± 12	220 ± 12	227 ± 15	230 ± 10	239 ± 13	255 ± 14	262 ± 12	240 ± 11
bCD	202 ± 10	216 ± 11	234 ± 14	237 ± 14	244 ± 12	251 ± 10	254 ± 10	239 ± 12
gCD	210 ± 10	224 ± 9	237 ± 9	240 ± 10	249 ± 10	254 ± 9	264 ± 10	245 ± 9
HAF	206 ± 8	224 ± 10	235 ± 10	241 ± 10	247 ± 11	256 ± 11	260 ± 9	248 ± 12
MAP	212 ± 13	221 ± 12	228 ± 11	231 ± 11	236 ± 11	246 ± 9	254 ± 11	231 ± 11
HfGCD	198 ± 12	218 ± 13	231 ± 10	242 ± 8	247 ± 12	257 ± 8	459 ± 15*	438 ± 14*
HFMAP	215 ± 12	234 ± 11	241 ± 10	246 ± 11	251 ± 10	260 ± 9	472 ± 17*	453 ± 13*

Tab. 17 Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n = 7, * p < 0,05, CTRL – kontrolní skupina (SLD dieta), bCD – SLD dieta + β-cyklohextrin, gCD – SLD dieta + γ-cyklohextrin, HAF – SLD dieta + homogenizované jablečné slupky, MAP – SLD dieta + mikronizované jablečné slupky, HfGCD - vysokotuková dieta + γ-cyklohextrin, HFMAP – vysokotuková dieta + mikronizované jablečné slupky SLD – standardní laboratorní dieta, ♠ hodnoty – 7. týden experimentu (den 48 a 49)

Tab. 18 Spotřeba diety během experimentu (včetně aklimatizace)

	1. týden (aklimatizace SLD dieta)	2. týden	3 - 7. týden ♠
CTRL	20,9 ± 0,3	20,5 ± 0,4	
bCD	20,0 ± 0,2	19,8 ± 0,4	
gCD	20,6 ± 0,4	20,9 ± 0,1	
HAF	19,8 ± 0,3	20,4 ± 0,3	
MAP	20,1 ± 0,4	20,3 ± 0,5	
HfGCD	24,2 ± 0,5 *	27,5 ± 0,3 *	25,6 ± 0,5 *
HFMAP	25,0 ± 0,6 *	24,3 ± 0,5 *	25,3 ± 0,4 *

Tab. 18. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n = 7, * p < 0,05; CTRL – kontrolní skupina (SLD dieta), bCD – SLD dieta + β-cyklohextrin, gCD – SLD dieta + γ-cyklohextrin, HAF – SLD dieta + homogenizované jablečné slupky, MAP – SLD dieta + mikronizované jablečné slupky, HfGCD - vysokotuková dieta + γ-cyklohextrin, HFMAP – vysokotuková dieta + mikronizované jablečné slupky SLD – standardní laboratorní dieta, ♠ hodnoty – 7. týden experimentu (den 48 a 49)

5.2.2. Výsledky biochemických vyšetření

Hladina cholesterolu a triacylglyceridů (Tab. 19) v plazmě potkanů u skupin krmených vysokotukovou dietou prokázaly signifikantní zvýšení proti kontrolní skupině (čas T1), ale podáním 20 mg kyseliny ursolové ve formě mikronizované i ve formě cyklodextrinů došlo k signifikantnímu poklesu těchto analytů (čas T2) na hladinu odpovídající ostatním experimentálním skupinám. Koncentrace triacylglyceridů po podání kyseliny ursolové byly 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 (v tabulce čas T3) potvrzen pokles koncentrace celkového cholesterolu, jenom u skupiny HFgCD zůstaly koncentrace celkového cholesterolu na stejné hladině jako před parciální hepatektomií. (Tab. 19).

Tab.19. Hladiny biochemických markerů

		Skupiny						
	Čas	CTRL	bCD	gCD	HAP	MAP	HFgCD ♠	HFMAP ♠
ALT (μ kat/l)	T1	0,9 (0,81-0,98)	1,02 (0,86-1,08)	0,8 (0,69-0,87)	0,78 (0,74-0,86)	0,78 (0,69-0,95)	0,81 (0,73-0,94)	0,91 (0,85-0,98)
	T2	0,89 (0,78-0,99)	1,01 (0,86-1,16)	0,75 (0,62-0,89)	0,81 (0,73-0,91)	0,78 (0,69-0,93)	0,76 (0,702-0,90)	0,94 (0,83-1,05)
	T3	7,03 (5,62-8,15)	4,51 (3,72-5,86)	7,34 (5,60-7,98)	5,12 (3,56-5,92)	4,97 (3,44-5,28)	5,05 (3,59-7,32)	10,54 (9,85-11,24)*
AST (μ kat/l)	T1	1,43 (1,36-1,89)	1,55 (1,50-1,95)	1,37 (1,20-1,74)	1,46 (1,38-1,82)	1,31 (1,25-1,60)	1,48 (1,24-1,79)	1,36 (1,23-1,44)
	T2	1,66 (1,30-1,87)	1,61 (1,31-1,89)	1,45 (1,20-1,73)	1,44 (1,31-1,68)	1,38 (1,24-1,62)	1,50 (1,28-1,78)	1,39 (1,25-1,50)
	T3	7,91 (6,92-10,02)	6,36 (5,45-8,83)	7,85 (4,93-10,62)	9,16 (5,97-11,01)	8,43 (7,12-9,85)	6,75 (5,74-9,38)	12,29 (10,21-13,77)
tCH (mmol/l)	T1	1,46 (1,31-1,58)	1,32 (1,24-1,36)	1,49 (1,34-1,56)	1,42 (1,28-1,58)	1,37 (1,30-1,8)	2,21 (2,01-2,30)*	2,24 (2,10-2,29)*
	T2	1,43 (1,25-1,62)	1,34 (1,21-1,39)	1,45 (1,38-1,56)	1,47 (1,37-1,72)	1,54 (1,37-1,72)	1,73 (1,54-1,88)⁺	1,42 (1,31-1,49)⁺
	T3	0,99 (0,94-1,02)	0,99 (0,93-1,02)	1,01 (0,82-1,14)	0,95 (0,65-1,00)	0,92 (0,90-1,06)	1,86 (1,74-2,00)*⁺	1,04 (1,01-1,16)⁺
TAG (mmol/l)	T1	2,19 (1,86-2,31)	1,59 (1,52-2,02)	1,78 (1,67-2,04)	1,76 (1,62-2,03)	1,71 (1,65-1,88)	3,81 (2,86-4,77)*	3,73 (3,01-4,56)*
	T2	2,03 (1,92-2,03)	1,56 (1,42-1,73)*	1,79 (1,58-1,90)*	1,73 (1,61-1,91)*	1,11 (0,90-1,38)*	2,09 (2,01-2,93)⁺	1,92 (1,64-2,51)⁺
	T3	0,46 (0,43-0,62)	0,46 (0,42-0,53)	0,49 (0,38-0,68)	0,36 (0,31-0,54)	0,56 (0,44-0,62)	0,79 (0,67-0,91)⁺	0,64 (0,57-0,72)⁺
ŽK (μ mol/l)	T1	33,53 (22,01-36,22)	18,85 (15,31-28,32)	23,89 (16,73-32,70)	18,29 (15,38-26,38)	15,70 (11,55-23,82)	15,80 (10,67-23,67)	18,56 (15,73-32,51)
	T2	30,19 (23,81-36,95)	17,86 (15,09-29,81)	23,07 (19,21-30,65)	19,85 (15,76-28,49)	16,43 (11,92-27,96)	14,18 (10,96-24,78)	19,71 (13,08-25,50)
	T3	97,04 (85,72-124,73)	111,49 (108,01-156,29)	123,52 (94,19-156,94)	74,05 (57,54-116,35)	40,88 (35,17-42,10)*	92,78 (74,51-112,01)	39,16 (32,71-45,61)*

Tab. 19. Hodnoty vyjádřené jako medián a interkvantilové rozpětí, *p < 0,05 vs. CTRL skupině, ⁺ p < 0,05 vs.T1 tj. před podáním kyseliny ursolové

CTRL – kontrolní skupina (SLD dieta), bCD – SLD dieta + β -cyklodextrin, gCD – SLD dieta + γ -cyklodextrin, HAF – SLD dieta + homogenizované jablečné slupky, MAP – SLD dieta + mikronizované jablečné slupky, HFgCD – vysokotuková dieta + γ -cyklodextrin, HFMAP – vysokotuková dieta + mikronizované jablečné slupky SLD – standardní laboratorní dieta, ♠hodnoty – 7. týden experimentu (den 48 a 49)

T1 - koncentrace vybraných biochemických markerů před podáním kyseliny ursolové

T2 - koncentrace vybraných biochemických markerů po podání kyseliny ursolové

T3 - koncentrace vybraných biochemických markerů 24 hodin po částečné hepatektomii

5.2.3. Expresa 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. 20. Expresa 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). Expresa 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 [94]. Byly nalezeny významně zvýšené výsledky u skupin HAP a HFgCD proti kontrolní skupině. Zvýšené ale nikoli již signifikantně jsou i výsledky skupiny gCD ($p < 0,05$).

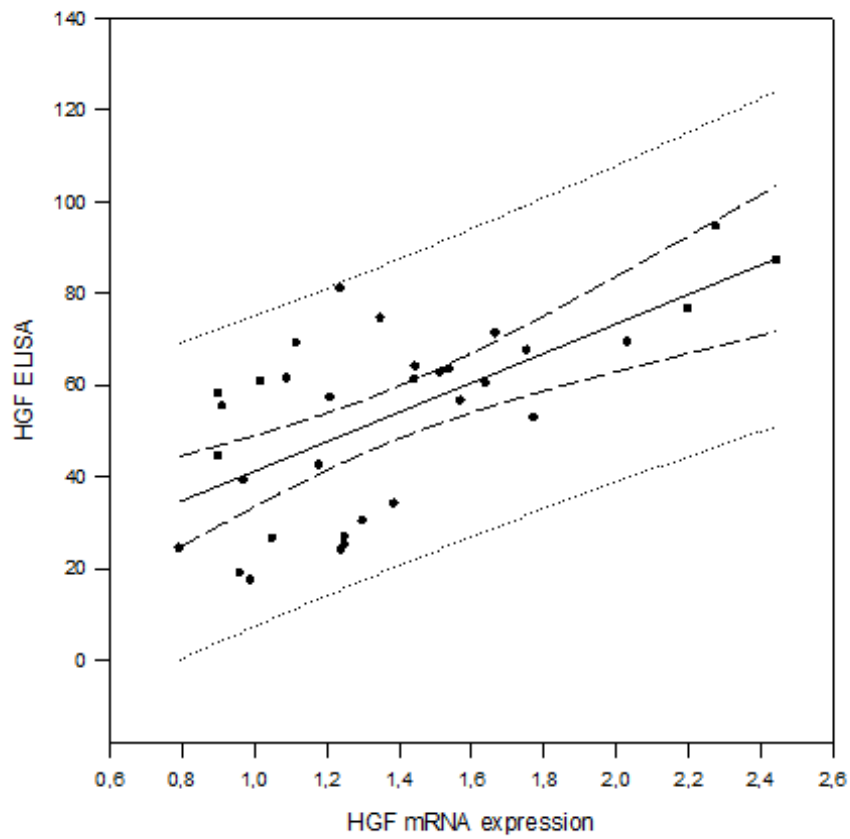
Tab. 20. Vliv jednotlivých diet na expresi mRNA HGF, koncentrace HGF v plazmě a výpočet HRR

Skupina	CTRL	bCD	gCD	HAP	MAP	HFgCD [♠]	HFMAP [♠]
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)
Expresa 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. 20 Hodnoty vyjádřené jako medián a interkvantilové rozpětí, * $p < 0,05$ vs. CTRL skupině; CTRL – kontrolní skupina (SLD dieta), bCD – SLD dieta + β -cyklodextrin, gCD – SLD dieta + γ -cyklodextrin, HAF – SLD dieta + homogenizované jablečné slupky, MAP – SLD dieta + mikronizované jablečné slupky, HFgCD - vysokotuková dieta + γ -cyklodextrin, HFMAP – vysokotuková dieta + mikronizované jablečné slupky SLD – standardní laboratorní dieta, [♠]hodnoty – 7. týden experimentu (den 48 a 49)

Graf 1. Serman korelace exprese mRNA HGF a koncentrace HGF v plazmě

Regression, Conf. & Pred.



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

5.2.4. Exprese mRNA CYP7A1 a koncentrace žlučových kyselin v plazmě

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 (Tab. 21). Korelace mezi expresí CYP7A1 a hladinou žlučových kyselin po parciální hepatektomii nebyla nalezena ($R = -0,0484$).

Tab. 21. Exprese mRNA CYP7A1 a hladiny žlučových kyselin 24 hodin po pH

SKUPINA	CTRL	bCD	gCD	HAP	MAP	HFgCD♣	HFMAP♣
ŽK po PH (umol/l)	97.04 (85.72-124.73)	111.49 (108.01-156.29)	123.52 (94.19-156.94)	74.05 (57.54-116.35)	40.88 (35.17-42.10)*	92.78 (74.51-112.01)	39.16 (32.71-45.61)*
exprese mRNA CYP7A1	0.535 (0.397-0.672)	0.751 (0.566-0.838)	0.543 (0.409-0.596)	0.852 (0.767-0.912)	0.769 (0.627-0.803)	0.885 (0.639-0.916)	0.370 (0.315-0.458)

Tab 21 Hodnoty vyjádřené jako medián a interkvantilové rozpětí, * $p < 0.05$ vs. CTRL skupině; CTRL – kontrolní skupina (SLD dieta), bCD – SLD dieta + β -cyklodextrin, gCD – SLD dieta + γ -cyklodextrin, HAF – SLD dieta + homogenizované jablečné slupky, MAP – SLD dieta + mikronizované jablečné slupky, HFgCD - vysokotuková dieta + γ -cyklodextrin, HFMAP – vysokotuková dieta + mikronizované jablečné slupky SLD – standardní laboratorní dieta, ♣hodnoty – 7. týden experimentu (den 48 a 49)

5.2.5. Regulace syntézy cholesterolu během parciální hepatektomie – SREBP a PPAR α

Klíčovou úlohu v udržení homeostázy cholesterolu mají receptory sterol regulatory element binding protein (SREBP) a nukleární receptor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR α), 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 α byla významně zvýšena u všech skupin kromě bCD.

Tab. 22. Exprese mRNA SREBP a PPAR α 24 hodin po pH

Skupina	CTRL	bCD	gCD	HAP	MAP	HFgCD♣	HFMAP♣
exprese mRNA SREBP	1,854 (1,701-1,962)	0,822* (0,711-0,895)	1,532 (1,287-1,721)	2,688* (2,395-2,922)	1,335* (1,264-1,508)	1,025* (0,861-1,115)	0,804* (0,734-0,829)
exprese mRNA PPAR α	0,498 (0,417-0,614)	0,721 (0,524-0,985)	1,644* (1,318-1,924)	2,128* (2,024-2,305)	1,404* (1,212-1,774)	1,974* (1,831-2,044)	2,144* (1,991-2,424)

Tab. 22 Hodnoty vyjádřené jako medián a interkvantilové rozpětí, * $p < 0.05$ vs. CTRL skupině; CTRL – kontrolní skupina (SLD dieta), bCD – SLD dieta + β -cyklodextrin, gCD – SLD dieta + γ -cyklodextrin, HAF – SLD dieta + homogenizované jablečné slupky, MAP – SLD dieta + mikronizované jablečné slupky, HFgCD - vysokotuková dieta + γ -cyklodextrin, HFMAP – vysokotuková dieta + mikronizované jablečné slupky SLD – standardní laboratorní dieta, ♣hodnoty – 7. týden experimentu (den 48 a 49)

5.3. Experiment s kyselinou ursolovou - dechové testy

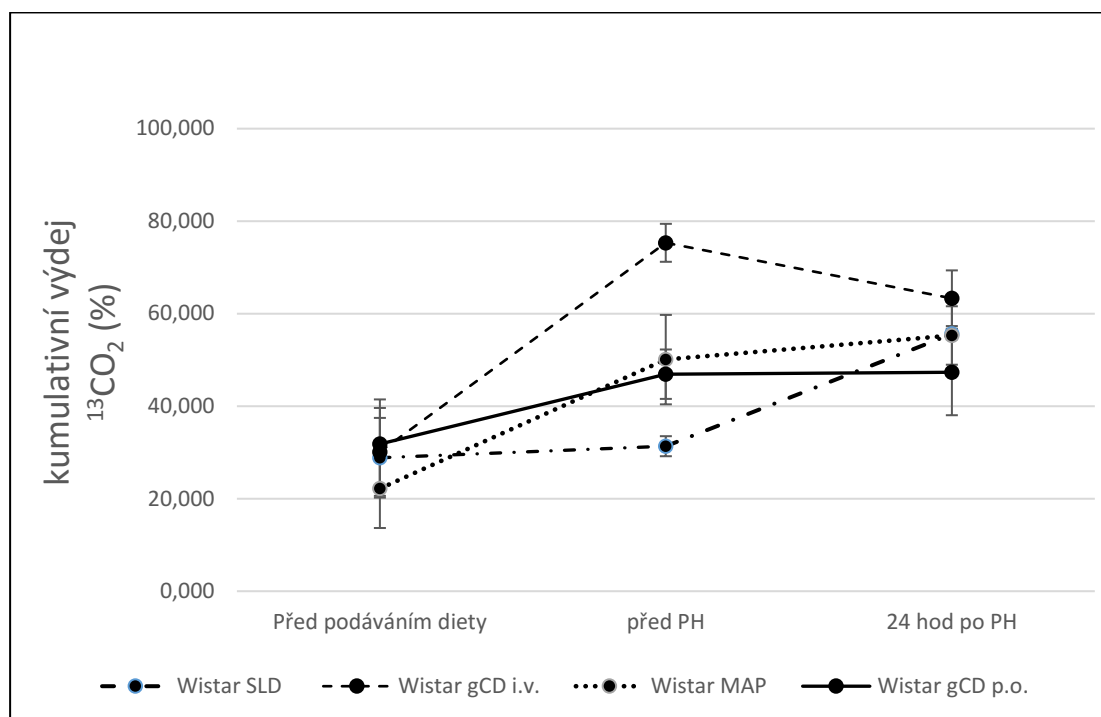
Do naší pilotní studie zjišťující funkční kapacitu jater pro metabolické funkce během jaterní regenerace prostřednictvím podání ^{13}C fenylalaninu byly vybrány dvě substance kyseliny ursolové – ve formě mikronizátu (MAP) a γ -cyklodextrinu (gCD podávaného dvěma způsoby *p.o.* a *i.v.*). Výsledky přeměny ^{13}C fenylalaninu vyjádřené jako kumulativní množství $^{13}\text{CO}_2/\text{hod.}$ jsou uvedeny v tabulce 23 (Tab. 23 a Graf 2.). Dechové testy byly provedeny u potkanů před částečnou hepatektomií, kdy výsledky prokázaly množství vydechovaného $^{13}\text{CO}_2$ ve všech skupinách stejné (v tabulce čas T_1). 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_2). Skupina potkanů s intravenózním podáním ursolátu ve formě γ -cyklodextrinu prokázala nejrychlejší přeměnu ^{13}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 vydechovaného $^{13}\text{CO}_2/\text{hod.}$ stejné jako před parciální hepatektomií. Po částečné hepatektomii zůstaly hodnoty kumulativního množství $^{13}\text{CO}_2/\text{hod.}$ u všech experimentálních skupin s kyselinou ursolovou obdobně vysoké jako před parciální hepatektomií a došlo k nárůstu vydechovaného $^{13}\text{CO}_2$ došlo i u kontrolní skupiny (v tabulce čas T_3). Naše výsledky prokázaly stimulaci jaterních hepatocytů přeměnou fenylalaninu ještě před částečnou hepatektomií.

Tab. 23. Kumulativní množství vydechovaného $^{13}\text{CO}_2$ 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) – T_1	28,85 ± 5,6	29,6 ± 5,8	31,81 ± 4,65	22,18 ± 4,0
po podání ursolátů – T_2	31,35 ± 2,65	75,32 ± 2,24 *** +++	46,92 ± 2,58 * +	50,07 ± 4,67 *** +++
24 hod po PH – T_3	55,6 ± 1,40 *	63,34 ± 3,297 +++	47,33 ± 4,48 +	55,28 ± 3,05 +++

Tab. 23 Hodnoty vyjádřené jako medián a interkvantilové rozpětí, * $p < 0.05$ vs. CTRL skupině; CTRL – kontrolní skupina (SLD dieta), gCD *i.v.* – SLD dieta + γ -cyklodextrin podaný *i.v.*, gCD *p.o.* – SLD dieta + γ -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 vydechovaného $^{13}\text{CO}_2$



6. DISKUZE

6.1. 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 cholesterolémií, 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- κ B i TNF α s důsledkem zvýšené fibrotizace jaterní tkáně. Vysokocholesterolová dieta u potkanů kmene Wistar krmených 28 dní způsobila v souladu s literaturou [5, 130] 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 inzulínu a signifikantně zvýšené hladiny glukózy v porovnání s kontrolní skupinou v našem experimentu prokazují, že sekrece inzulínu není dostatečná k udržení normoglykemie a při delším podávání této diety by pravděpodobně mohlo dojít k rozvoji inzulínové 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 inzulínové rezistence [18]. 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 inzulínu 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 ³H-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 [49] a snížení ATP [77], 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 [131].

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, oxidací mastných kyselin a mitochondriální dysfunkci. Nicméně dieta s kyselinou orotovou se v našem experimentu prokázala jako nevhodná pro dietní model navozující NAFLD.

6.2. 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 μm (nebo více jak 5 μm), která již byla vyzkoušena v experimentu Biswase [123], a který potvrdil zvýšení biologické dostupnosti kyseliny ursolové ve formě fosfolipidových komplexů s touto velikostí částic. Další možností bylo vyzkoušení enkapsulátu s β - a γ -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 γ -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 [132]. Důvodem by mohlo být snížení aktivity HMG-CoA reductázy, což je v souladu s experimentem po podávání flavonoidového komplexu s kyselinou ursolovou [133].

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 α . 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 α , resp. exprese PPAR α 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 reduktázy 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 κ B a AP-1. [134].

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 [20, 34, 133]. 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 γ -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 [135]. Naše výsledky jaterní regenerace jsou v souladu s jedinou publikací rozpouštějící kyselinu ursolovou ve fyziologickém roztoku [121], 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 nárustem 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 [136]. Zhang [71] prokázal, že strava obsahující 0,2 % kyseliny cholové vykazuje stimulační a antioxidantní 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 γ -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.

6.3. 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}C fenylalaninový metabolismus, je přítomen nejen v játrech, ale i v ostatních orgánech jako jsou ledviny. Nicméně Manjumath [137] 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 můžou být ovlivněny pouze jaterní regenerací a ukazují na metabolickou kapacitu jaterní tkáně [106]. 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 CO_2 z 99,98 % [138]. Při podání γ -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 [26, 139], což bylo potvrzeno i *in vitro* experimentem s Caco2 transportním modelem [140]. Rychlost degradace cyklodextrinů a uvolnění kyseliny ursolové byly během našeho experimentu potvrzeny.

Klinický přínos dechových testů prokázal Burke *et al.* [141], kdy porovnal výsledky experimentu ^{13}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 hepatektomií zlepšení jaterní funkce, a potvrzují tím myšlenku možnosti ovlivnění případných preoperačních i postoperačních komplikací u pacientů podstoupivších 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.

7. 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 přídatkem 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 přídatkem 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 γ -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.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

001. 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.
002. 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.
003. 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.
004. 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.
005. 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.
006. 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.
007. 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.
008. 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.
009. 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.
010. Miura Y, Washizawa N, Urita Y, Imai T, Kaneko H. Evaluation of remnant liver function using ¹³C-breath tests in a rat model of 70% partial hepatectomy. *Hepatology* Mar-Apr 2012; 59(114): 311-6. doi: 10.5754/hge11431.
011. 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.
012. 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.
013. 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.

014. Mizushina 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.
015. 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.
016. Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 2004; 25(9): 1601-1611. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00508-8.
017. Decker K, Keppler D. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1974; 71: 77-106. doi: 10.1007/BFb0027661.
018. 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.
019. 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.
020. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007 Nov; 213(2): 286-300. doi: 10.1002/jcp.21172.
021. 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.
022. 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.
023. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006 Feb; 43(2 Suppl 1): 45-53. doi: 10.1002/hep.20969.
024. Kang LI, Mars WM, Michalopoulos GK. Signals and cells involved in regulation liver regeneration. *Cells* 2012; 1: 1261-1292. doi:10.3390/cells1041261.
025. 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.
026. Michalopoulos GK. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 2017 Apr; 65(4): 1384-1392. doi: 10.1002/hep.28988.
027. 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.
028. Núñez KG, Gonzalez-Rosario J, Thevenot PT, Cohen AJ. Cyclin D1 in the liver: Role of noncanonical signaling in liver steatosis and hormone regulation. *Ochsner Journal* 2017; 17(1): 56-65.

029. Padiaditakis 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.
030. 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.
031. 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.
032. 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.
033. Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, Kim TH, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* 1999; 59(16): 3954-3960.
034. Adamek B, Zalewska-Ziob M, Strzelczyk JK, et al. Hepatocyte growth factor and epidermal growth factor activity during later staged of rat liver regeneraion upon interferon α -2b influence. *Clin Exp Hepatol* 2017;3; 1:9-15. doi:10.5114/ceh.2017.65499
035. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 176: 2-13, 2010. doi: 10.2353/ajpath.2010.090675.
036. Naugler WE. Bile Acid Flux Is Necessary for Normal Liver Regeneration. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e97426. doi.org/10.1371/journal.pone.0097426.
037. 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.
038. Chari RS, Price DT, Sue SR, Meyers WC, Jirtle RL. Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. *Am J Surg* 1995; 169(1): 126-131; discussion 131-2. doi: 10.1016/s0002-9610(99)80120-2.
039. Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* 2014 Jun; 157(6): 1324-1338. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.060.
040. Hui DY, Howles PN. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2005; 16: 183-192. doi: 10.1016/j.semcdb.2005.01.003.
041. Turley SD, Andersen JM, Dietschy JM. Rates of sterol synthesis and uptake in the major organs of the rat in vivo. *J Lipid Res* 1981; 22(4): 551-569.

042. Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004; 303(5661): 1201-4. doi: 10.1126/science.1093131.
043. Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2010 Sep; 501(2): 177-81. doi: 10.1016/j.abb.2010.06.004.
044. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 2006; 124(1): 35-46. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.022.
045. Ferré P, Foufelle F. SREBP-1c Transcription Factor and Lipid Homeostasis: Clinical Perspective. *Horm Res* 2007; 68: 72-82. doi: 10.1159/000100426.
046. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2001; 2(4): 282-6. doi: 10.1093/embo-reports/kve071.
047. Murray AB, Strecker W, Solz ZS. Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results. *J Cell Sci* 1981; 50: 433-448.
048. Ockner RK. Metabolism and Gene Expression in Liver Regeneration In: OCKNER RK. *Unifying Foundations in Cell Growth and Death, Cancer, Atherosclerosis, and Alzheimer Disease*. Springer Science+Business Media, 2004: 177-200.
049. 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.
050. Sabugal R, Robert MQ, Julve J, Auwerx J, Llobera M, Peinado-Onsurbe J. Hepatic regeneration induces changes in lipoprotein lipase activity in several tissues and its re-expression in the liver. *Biochem J* 1996 Sep; 318(Pt 2): 597-602. doi: 10.1042/bj3180597.
051. Peng J, Yu J, Xu H, et al. Enhanced Liver regeneration after partial hepatectomy in sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c-Null mice is associated with increased hepatocellular cholesterol availability. *Cel Physiol Biochem* 2018; 47(2): 784-799. doi: 10.1159/000490030.
052. Gorla-Bajszczak A, Juge-Aubry C, Pernin A, Burger AG, Meier CA. Conserved amino acids in the ligand-binding and tau(i) domains of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha are necessary for heterodimerization with RXR, *Mol Cell Endocrinol* 1999 Jan 25; 147(1-2): 37-47. doi: 10.1016/s0303-7207(98)00217-2.
053. Kitamura S, Maeda K, Wang Y, Sugiyama Y. Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin. *Drug Metab Dispos* 2008; 36(10): 2014-2023. doi: 10.1124/dmd.108.021410.
054. Balakumar P, Mahadevan N. Interplay between statins and PPARs in improving cardiovascular outcomes: A double-edged sword? *Br J Pharmacol* 2012; 165(2): 373-9. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01597.x.

055. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20(5): 649-88. doi: 10.1210/edrv.20.5.0380.
056. Repa JJ, Liang G, Ou J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA α and LXRA β 2000. *Genes Dev* 2000 Nov; 14(22): 2819-30. doi: 10.1101/gad.844900.
057. Borel V, Gallot D, Marceau G, Sapin V, Blanchon L. Placental implications of peroxisome proliferator-activated receptors in gestation and parturition. *PPAR res* 2008; 2008: 758562. doi: 10.1155/2008/758562.
058. Cheng Z, Liu L, Zhang X, et al. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ negatively regulates liver regeneration after partial hepatectomy via the HGF/c-Met/ERK $\frac{1}{2}$ pathway. *Scientific Reports* 2018; 8(1): 11894. doi: 10.1038/s41598-018-30426-5.
059. Tomiya T, Ogata I, Yamaoka M, Yanase M, Inoue Y, Fujiwara K. The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor- α . *Am J Pathol* 2000 Nov; 157(5): 1693-701. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64806-7.
060. Russell WE, Coffey RJ, Ouellette AJ, Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(14): 5126-5130. doi: 10.1073/pnas.85.14.5126.
061. Purup S, Vestergaard M, Sejrsen K. Involvement of growth factors in the regulation of pubertal mammary growth in cattle. *Adv Exp Med Biol* 2000; 480:27-43. doi: 10.1007/0-306-46832-8_4.
062. Michael DR, Ashlin TG, Buckley ML, Ramji DP. Liver X Receptors, Atherosclerosis and Inflammation. *Curr Atheroscler Rep.* 2012; 14(3): 284-93. doi: 10.1007/s11883-012-0239-y.
063. Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59(7): 31-55.
064. Oosterveer MH, Grefhorst A, Groen AK, Kuipers F. The liver X receptor: control of cellular lipid homeostasis and beyond implications for drug design. *Progress Lipid Research* 2010; 49(4): 343–352. doi: 10.1016/j.plipres.2010.03.002.
065. Costet P. Molecular pathways and agents for lowering LDL-cholesterol in addition to statins. *Pharmacology & Therapeutics* 2010; 126 (3): 263–278. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.02.006.
066. Endo-Umeda K, Nakashima H, Komine-Aizawa S, Umeda N, Seki S, Makishima M. Liver X receptors regulate hepatic F4/80 + CD11b+ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice. *Sci Rep* 2018 Jun 18; 8(1): 9281. doi: 10.1038/s41598-018-27615-7.
067. Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson JA, Steffensen KR. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol Sci.* 2012; 33(7); 394-404. doi: 10.1016/j.tips.2012.03.013.

068. Trauner M, Claudel T, Fickert P, Moustafa T, Wagner M. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Digestive Diseases* 2010; 28(1): 220-4. doi: 10.1159/000282091.
069. Mencarelli A, Cipriani S, Renga B, et al. The bile acid sensor FXR protects against dyslipidemia and aortic plaques development induced by the HIV protease inhibitor ritonavir in mice. *PLoS One* 2010 Oct 8; 5(10): e13238. doi: 10.1371/journal.pone.0013238.
070. Borude P, Edwards G, Walesky C, et al. Hepatocyte specific deletion of farnesoid X receptor delays, but does not inhibit liver regeneration after partial hepatectomy in mice, *Hepatology* 2012 December; 56(6): 2344–2352. doi:10.1002/hep.25918.
071. 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.
072. Li G, Guo G. Farnesoid X receptor, the bile acid sensing nuclear receptor, in liver regeneration. *Acta Pharm Sin B* 2015 Mar; 5(2): 93–98. doi: 10.1016/j.apsb.2015.01.005.
073. 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.
074. 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.
075. 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.
076. 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.
077. 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.
078. 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.
079. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147–152. doi: 10.1172/JCI22422.
080. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004 Jul; 279(31): 32345-53. doi: 10.1074/jbc.M313478200.

081. Chen D, Hui Z, Chong S, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptors gene polymorphisms in type 2 diabetes and metabolic syndrome. *World J Diabetes* 2015 May 15; 6(4): 654-61. doi: 10.4239/wjd.v6.i4.654.
082. Murata H, Yagi T, Iwagaki H, et al. Mechanism of impaired regeneration of fatty liver in mouse partial hepatectomy model. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 Dec; 22(12): 2173-80. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04798.x.
083. 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.
084. Lombardi B, Pani P, Schlunk FF. Choline-deficiency fatty liver: impaired release of hepatic triglycerides. *J Lipid Res* 1968 Jul; 9(4): 437-46.
085. Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol* 2003 Nov; 18(11): 1272-82. doi: 10.1046/j.1440-1746.2003.03198.x.
086. Tanaka N, Takahashi S, Hu X, et al. Growth arrest and DNA damage-inducible 45alpha protects against nonalcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017 Dec; 1863(12): 3170-3182. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.08.017.
087. Vrána A, Kazdová L. The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc* 1990; 22(6): 2579.
088. West TP, Chunduru J, Murahari EC. Orotic Acid: Why it is Important to Understand Its Role in Metabolism. *Biochem Psychol* 2017; 6: e157. doi:10.4172/2168-9652.1000e157.
089. Harden KK, Robinson JL. Hypocholesteremia induced by orotic acid: dietary effects and species specificity. *J Nutr* 1984 Feb; 114(2): 411-21. doi: 10.1093/jn/114.2.411.
090. Hebbachi AM, Seelaender MC, Baker BW, Gibbons GF. Decreased secretion of very-low-density lipoprotein triacylglycerol and apolipoprotein B is associated with decreased intracellular triacylglycerol lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n-3 fatty acids. *Biochem J* 1997 Aug 1; 325 (Pt 3): 711-9. doi: 10.1042/bj3250711.
091. Su GM, Fiala-Ber E, Weber J, Jahn D, Robertson GR, Murray M. Pretranslational upregulation of microsomal CYP4A in rat liver by intake of a high-sucrose, lipid-devoid diet containing orotic acid. *Biochem Pharmacol* 2005 Feb; 69(4): 709-17. doi: 10.1016/j.bcp.2004.11.005.
092. Zhang B, Xue C, Hu X, et al. Dietary sea cucumber cerebroside alleviates orotic acid-induced excess hepatic adipogenesis in rats. *Lipids Health Dis* 2012 May; 11:48. doi: 10.1186/1476-511X-11-48.
093. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology* 2011 Sep 2; 54(3): 1082-1090. doi: 10.1002/hep.24452.

094. 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.
095. Maliekal TT, Sudha B, Paulose CS. Kinetic parameters of Thymidine kinase and DNA synthesis during liver regeneration: role of thyroid hormones. *Life Sci* 1997; 60(21): 1867-74. doi: 10.1016/s0024-3205(97)00147-1.
096. 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.
097. Gandhi CR. Augmenter of liver regeneration. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012 Jul 9; 5(1): 10. doi: 10.1186/1755-1536-5-10.
098. Han L, Dong L, Yu H, et al. Deceleration of liver regeneration by knockdown of augmenter of liver regeneration gene is associated with impairment of mitochondrial DNA synthesis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015 Jul 15; 309(2): 112-22. doi: 10.1152/ajpgi.00435.2014.
099. Iguchi K, Nirasawa T, Iwasaki N, et al. Chronological Profiling of Plasma Native Peptides after Hepatectomy in Pigs: Toward the Discovery of Human Biomarkers for Liver Regeneration. *Plos One* 2017 Jan 6; doi: 10.1371/journal.pone.0167647.
100. Saito Y, Morine Y, Iwahashi S, et al. Changes of liver metabolites following hepatectomy with ischemia reperfusion towards liver regeneration. *Ann Gastroenterol Surg* 2018 Jan; 2(3): 204-211. doi: 10.1002/ags3.12058.
101. Caldez MJ, Hul NV, Koh HWL, et al. Metabolic Remodeling during Liver Regeneration. *Dev Cell* 2018 Nov 19; 47(4): 425-438.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2018.09.020.
102. Zhao Y, Chen E, Huang K, et al. Dynamic Alterations of Plasma Metabolites in the Progression of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *J Proteome Res* 2020 Jan; 19(1): 174-185. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00493.
103. Godoy YPA, Gerson S, Pinto MS, Boff MF, Mascarenhas MA, Cardoso VV. Functional and cellular evaluation of the liver after low power laser stimulation during surgery. *Arq Bras Cir Dig Apr-June* 2017; 30(2): 122-126. doi: 10.1590/0102-6720201700020010.
104. Kufa R. Indocyaninová zeleň – vlastnosti, současné možnosti a trendy využití v klinických aplikacích. *Klin Farmakol Farm* 2013; 27(2): 89-91.
105. 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.
106. Ishii Y, Asai S, Kohno T, Suzuki S, Ishii M, Hosoi I. ^{13}C peak value of L-[1- ^{13}C]phenylalanine breath test reflects hepatopathy. *J Surg Res*. 2003 Jun 1; 112(1): 38-42. doi: 10.1016/s0022-4804(03)00135-5.

107. Kobayashi T, Imamura H, Takayma T, Makuuchi M. The role of preoperative phenylalanine breath test in hepatoctomy. *Hepatology* 2003; 50: 1124-1127.
108. Teraishi T, Ozeki Y, Hori H, et al. ¹³C-phenylalanine breath test detects altered phenylalanine kinetics in schizophrenia patients. *Transl Psychiatry* 2012 May; 2(5): e119. doi: 10.1038/tp.2012.48.
109. 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.
110. Brûha R. Hepatoprotektiva. *Klin Farmakol Farm* 2006; 20: 154–157.
111. Maiwald L: "Essential" phospholipids in liver diseases. *Fortschr Med.* 1986 Apr 10; 104(14): 299-302.
112. 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.
113. 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.
114. Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszcyk 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.
115. 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.
116. 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-ptr588>3.0.co;2-d.
117. 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.
118. 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.
119. 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.
120. Wang X, Ikejima K, Kon K, et al. Ursolic acid ameliorates hepatic cirrhosis in the rat by specific induction of apoptosis in hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2011 Aug; 55(2): 379-87. doi: 10.1016/j.jhep.2010.10.040.

121. 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.
122. Kazmi I, Afzal M, Rahman S, Iqbal M, Imam F, Anwar F. Antiobesity potential of ursolic acid stearyl glucoside by inhibiting pancreatic lipase. *European Journal of Pharmacology* 2013, 709, 28-36. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.032.
123. 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.
124. Carneiro SB, Duarte FIC, Heimfarth L, et al. Cyclodextrin Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *Int J Mol Sci* 2019 Feb 2; 20(3): 642. doi: 10.3390/ijms20030642.
125. European Medicines Agency. Background review for cyclodextrins used as excipients. 2014; EMA/CHMP/333892/2013.
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. Micuda S, Fuksa L, Breakova 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.
130. 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.
131. 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.
132. 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.
133. Kaviarasan K, Mohankumar R, Narasimhan S, Viswanathan P, Pugalendi KV. Antihyperlipidemic efficacy of flavonoid-rich fraction from *Spermocoe 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.

134. Checker R, Sandur SK, Sharma D, et al. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS One* 2012; 7(2):e31318. doi: 10.1371/journal.pone.0031318.
135. 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.
136. 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.
137. 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.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. 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.