

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Změny v epigenetické regulaci v *in vivo* modelu
NAFLD

Bc. Klára Osobová

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Gabriela Svobodová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Datum

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí této diplomové práce doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za její ochotu, čas a cenné rady. Neméně bych chtěla poděkovat Mgr. Gabriele Svobodové za její pomoc při zpracování experimentální části, trpělivost a ochotu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Klára Osobová

Školitel: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Gabriela Svobodová

Název diplomové práce: Změny v epigenetické regulaci v *in vivo* modelu NAFLD

Tato diplomová práce se zabývá nealkoholovou tukovou chorobou jater (NAFLD), jedná se o skupinu jaterních onemocnění s různou mírou poškození jaterní tkáně, od prosté steatózy (NAFL) přes steatohepatitidu (NASH) po jaterní fibrózu až cirhózu. Diplomová práce se zaměřuje na popis patogeneze NAFLD a epigenetické změny s ní spojené. Cílem předkládané diplomové práce bylo zmapovat změny v epigenetické regulaci v *in vivo* myších modelech NAFLD, která byla navozena dietou s vysokým obsahem tuků, fruktózy a cholesterolu (FFC), aplikací glutamátu monosodného (MSG) nebo kombinací těchto faktorů. Na myších modelech byl také zkoumán vliv léčby pomocí liraglutidu a peptidu LipR31. Pomocí kvantitativní PCR (polymerázová řetězcová reakce) byly stanoveny změny v jaterní expresi mRNA pro enzymy regulující epigenetické modifikace (histondeacetylázy, DNA-metyltransferázy, histonacetyltransferázy) a v expresi mikroRNA (miR). Pro stanovení exprese proteinů HDAC8 (histondeacetyláza 8) a HDAC3 (histondeacetyláza 3) byla použita metoda imunoblot. Statisticky významné změny byly zaznamenány zejména mezi kontrolní skupinou na standardní dietě (K STD) a skupinou MSG STD a to v expresi HDAC2, HDAC3, HDAC5, Sirt2 a Ep300. Exprese HDAC5 byla snížena vlivem FFC diety (u kontrolních i MSG myší) i podání MSG. FFC dieta způsobila zvýšení exprese miR-200a-3p a miR-200b-3p u kontrolních i MSG myší. Vlivem podání liraglutidu i LiPR klesla exprese miR-200a-3p u skupiny K FFC, zatímco u MSG STD myší byla vlivem podaných látek zvýšená.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Klára Osobová

Supervisor: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Gabriela Svobodová

Title of diploma thesis: Changes in epigenetic regulation in the *in vivo* model of NAFLD

This diploma thesis deals with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), a group of liver diseases with varying degrees of damage to liver tissue, from simple steatosis (NAFL) to steatohepatitis (NASH), liver fibrosis and cirrhosis. The diploma thesis focuses on the description of the pathogenesis of NAFLD and the epigenetic changes associated with it. The aim of this thesis was to map the changes in epigenetic regulation in *in vivo* mouse models of NAFLD, which was induced by a high fat, fructose, and cholesterol (FFC) diet, the application of monosodium glutamate (MSG) or a combination of these factors. The effect of treatment with liraglutide and the peptide LipR31 was also investigated in mouse models. Changes in hepatic mRNA expression for enzymes regulating epigenetic modifications (histone deacetylase, DNA-methyltransferase, histone acetyltransferase) and microRNA expression (miR) were determined using quantitative PCR (polymerase chain reaction). The immunoblot method was used to determine the protein expression of HDAC8 (histone deacetylase 8) and HDAC3 (histone deacetylase 3). Statistically significant changes were observed in particular between the control group on the standard diet (K STD) and the MSG STD group in expression of HDAC2, HDAC3, HDAC5, Sirt2 and Ep300. Expression of HDAC5 was reduced by both FFC diet (control and MSG mice) and MSG administration. The FFC diet caused an increase in expression of miR-200a-3p and miR-200b-3p in control and MSG mice. Due to both liraglutide and LiPR administration, expression of miR-200a-3p was decreased in the K FFC group, while in MSG STD mice it was increased by administered substances.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Teoretická část.....	2
2.1	Nealkoholová tuková choroba jater.....	2
2.1.1	Epidemiologie.....	3
2.1.2	Patogeneze.....	3
2.1.2.1	Inzulinová rezistence.....	4
2.1.2.2	Oxidační stres a antioxidační systém.....	5
2.1.2.3	Prozánětlivé cytokiny a adipocytokiny.....	7
2.1.2.4	Střevní dysmikrobie.....	7
2.1.2.5	Genetické predispozice.....	8
2.1.3	Diagnostika.....	9
2.1.3.1	Laboratorní testy.....	9
2.1.3.2	Jaterní biopsie.....	10
2.1.3.3	Zobrazovací metody.....	11
2.1.4	Léčba.....	11
2.1.4.1	Transplantace jater.....	12
2.1.4.2	Farmakologická léčba.....	12
2.2	Epigenetické mechanismy.....	14
2.2.1	Acetylace histonů.....	15
2.2.1.1	Rozdělení histonacetyltransferáz.....	17
2.2.1.2	Histonacetyltransferázy a NAFLD.....	17
2.2.1.3	Rozdělení histondeacetyláz.....	18
2.2.1.4	HDAC a NAFLD.....	18
2.2.1.5	Sirtuiny a NAFLD.....	21
2.2.2	Metylace histonů.....	22
2.2.3	Metylace a demetylace DNA.....	22
2.2.3.1	Změny v metylaci DNA u NAFLD.....	23
2.2.3.2	Vliv diety na metylaci DNA v buňkách hepatocytů.....	24

2.2.4	MikroRNA	24
2.2.4.1	Biosyntéza miR	25
2.2.4.2	miR a NAFLD	26
3	Cíl práce	29
4	Experimentální část	30
4.1	Biologický materiál a použité zvířecí modely	30
4.2	Izolace RNA	31
4.2.1	Použité reagensie	31
4.2.2	Pracovní postup	31
4.3	Ošetření DNázou	32
4.3.1	Použité reagensie	32
4.3.2	Pracovní postup	32
4.4	Reverzní transkripce	33
4.4.1	Použité reagensie	33
4.4.2	Pracovní postup	33
4.5	Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR)	34
4.5.1	Použité reagensie	35
4.5.2	Pracovní postup	36
4.6	Imunoblot	36
4.6.1	Použité reagensie	36
4.6.2	Příprava vzorku pro imunoblot.....	38
4.6.3	Příprava polyakrylamidovém gelu	38
4.6.4	Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu	39
4.6.5	Blotování.....	40
4.6.6	Chemiluminiscence	40
4.7	Statistické vyhodnocení.....	40
5	Výsledky	42
5.1	Expres mRNA u kontrolních skupin	42
5.2	Vliv podávání léků na expresi mRNA	44

5.3	Exprese miR u kontrolních skupin	46
5.4	Vliv podávání léků na expresi miR	47
5.5	Detekce proteinů	49
6	Diskuze	53
7	Závěr	57
8	Seznam zkratek.....	58
9	Seznam použité literatury	61
	Přílohy.....	1

1 Úvod

Nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD) je nejčastějším jaterním onemocněním, jehož incidence každým rokem narůstá. Výskyt NAFLD je spjatý s obezitou a metabolickým syndromem, obě tyto onemocnění jsou v poslední době častá a jejich četnost neustále narůstá a objevuje se i u mladších ročníků.

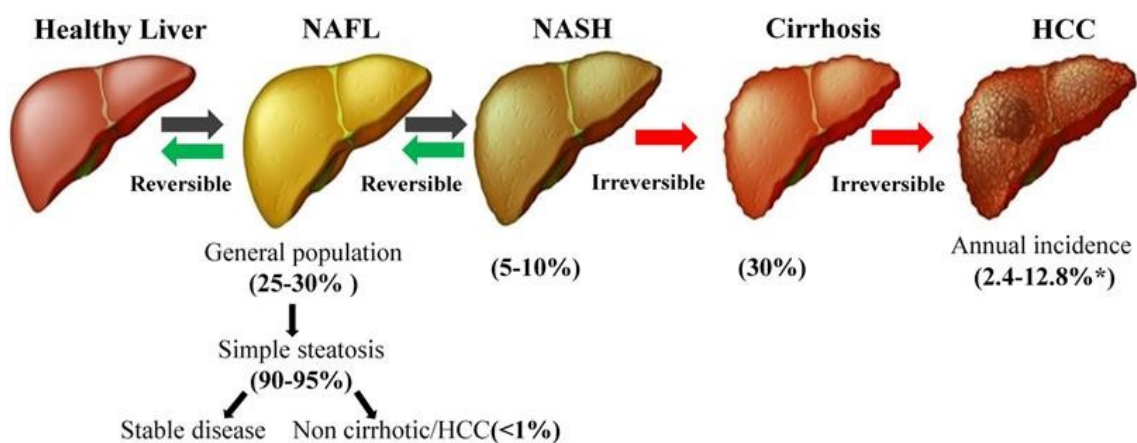
Hlavní léčebný postup NAFLD je zaměřen na změnu životního stylu, redukci hmotnosti, úpravu diety a zvýšení fyzické aktivity. V praxi se bohužel velké části pacientů nepodaří dostatečně změnit svůj životní styl, nebo se jim nedaří ho dlouhodobě udržet. Zatím neexistuje žádný léčivý přípravek určený k léčbě NAFLD. Farmakologická léčba těchto pacientů se zaměřuje na ostatní onemocnění, která jsou s NAFLD spojena. Jedná se především o onemocnění spojená s metabolickým syndromem, jako jsou například, dyslipidemie, hypercholesterolemie, hypertenze, ateroskleróza, inzulinová rezistence a diabetes mellitus 2. typu (T2DM). Pro výzkum nových léčiv pro NAFLD je klíčové porozumět, jakými mechanismy dochází ke vzniku a progresi NAFLD.

Přesný mechanismus vzniku a progresi NAFLD zatím není znám. Ví se, že tyto mechanismy jsou multifaktoriální a patří mezi ně vysokokalorická dieta, inzulinová rezistence, oxidační stres, zánětlivé procesy, genetická zátěž i epigenetické změny. Tyto mechanismy jsou spojeny s dysregulací jaterního metabolismu. Jedním způsobem regulace metabolismu jsou epigenetické mechanismy, mezi které patří například modifikace histonů, modifikace DNA a mikroRNA. Vznik a progresi NAFLD jsou spojeny s epigenetickými změnami. Poznatky o těchto změnách by šlo v budoucnu využít pro diagnostiku, prognózu nebo léčbu NAFLD.

2 Teoretická část

2.1 Nealkoholová tuková choroba jater

Nealkoholová tuková choroba jater (*non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD*), dle současné nomenklatury označovaná jako *metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD)* (Rinella et al., 2023) je termín zahrnující spektrum patologických stavů, které jsou charakterizovány nadměrným ukládáním lipidů, převážně triacylglycerolů (TAG) v hepatocytech u osob, které významně nekonzumují alkohol (do 20 g/den). NAFLD zahrnuje širokou škálu jaterních onemocnění s různou mírou poškození jater od prosté steatózy (NAFL), přes steatohepatitidu (NASH), fibrotizaci jater, až po cirhózu či hepatocelulární karcinom (HCC) (Brůha, 2019; Rodríguez-Sanabria et al., 2022). Přesto, že se NAFL považuje za benigní onemocnění, ve 20 až 30 % případů progreduje do NASH, při které už dochází k zánětlivým změnám a poškození hepatocytů, v tomto stádiu se může vyskytovat i fibrotizace jater (Ucar et al., 2013). NASH v 15-20 % případů vede k jaterní cirhóze, která může vyústit až v selhání jater (Tilg, 2010). U malého procenta pacientů může dojít i ke vzniku HCC (Rodríguez-Sanabria et al., 2022). Patogeneze NAFLD je uvedena v Obrázku 1.



Obrázek 1 Stádia NAFLD (převzato z Chen et al., 2020)

Onemocnění je považováno za jaterní manifestaci metabolického syndromu (Brůha, 2019; Rodríguez-Sanabria et al., 2022). U pacientů s metabolickým syndromem se velmi často vyskytuje inzulínová rezistence, T2DM, obezita, kumulace viscerálního a ektopického tuku, dyslipidemie, hypercholesterolemie a/nebo hypertenze (Hůlek & Dresslerová, 2015). Játra mají sníženou schopnost oxidovat lipidy, což přispívá k jejich další akumulaci v hepatocytech. Dále dochází k aktivaci prozánětlivých procesů a zvýšenému oxidačnímu stresu (Rodríguez-Sanabria et al., 2022). Genetické predispozice a epigenetické změny hrají u tohoto onemocnění také velkou roli (Ucar et al., 2013).

2.1.1 Epidemiologie

Jedná se o nejčastější chronické onemocnění jater u dospělých i dětí, kterým trpí 20 až 30 % dospělé populace v západních zemích a jeho incidence každoročně stoupá (Rodríguez-Sanabria et al., 2022; Sweeny & Lee, 2021). Onemocnění se častěji vyskytuje u mužů než u žen, prevalence u mužů v západní populaci se odhaduje zhruba na 30-40 %, kdežto u žen se pohybuje mezi 15 a 20 % (Byrne & Targher, 2015). Výskyt NAFLD stoupá s věkem, nejvyšší prevalence je ve věkové skupině od 50 do 60 let, v této věkové skupině se incidence pohybuje mezi 32,8 % a 50,1 %, ve vyšších věkových skupinách incidence pozvolně klesá. U žen po menopauze se incidence výrazně zvýší a je srovnatelná s incidencí u mužů (Perumpail et al., 2017; Pitisuttithum & Treeprasertsuk, 2022). Prevalence NAFLD se u dětí pohybuje okolo 7,6 % v západních zemích. Dětsí pacienti s NAFLD mají větší šanci na výskyt dalších komorbidit spojených s metabolickým syndromem během svého života než dospělí (Powell et al., 2021).

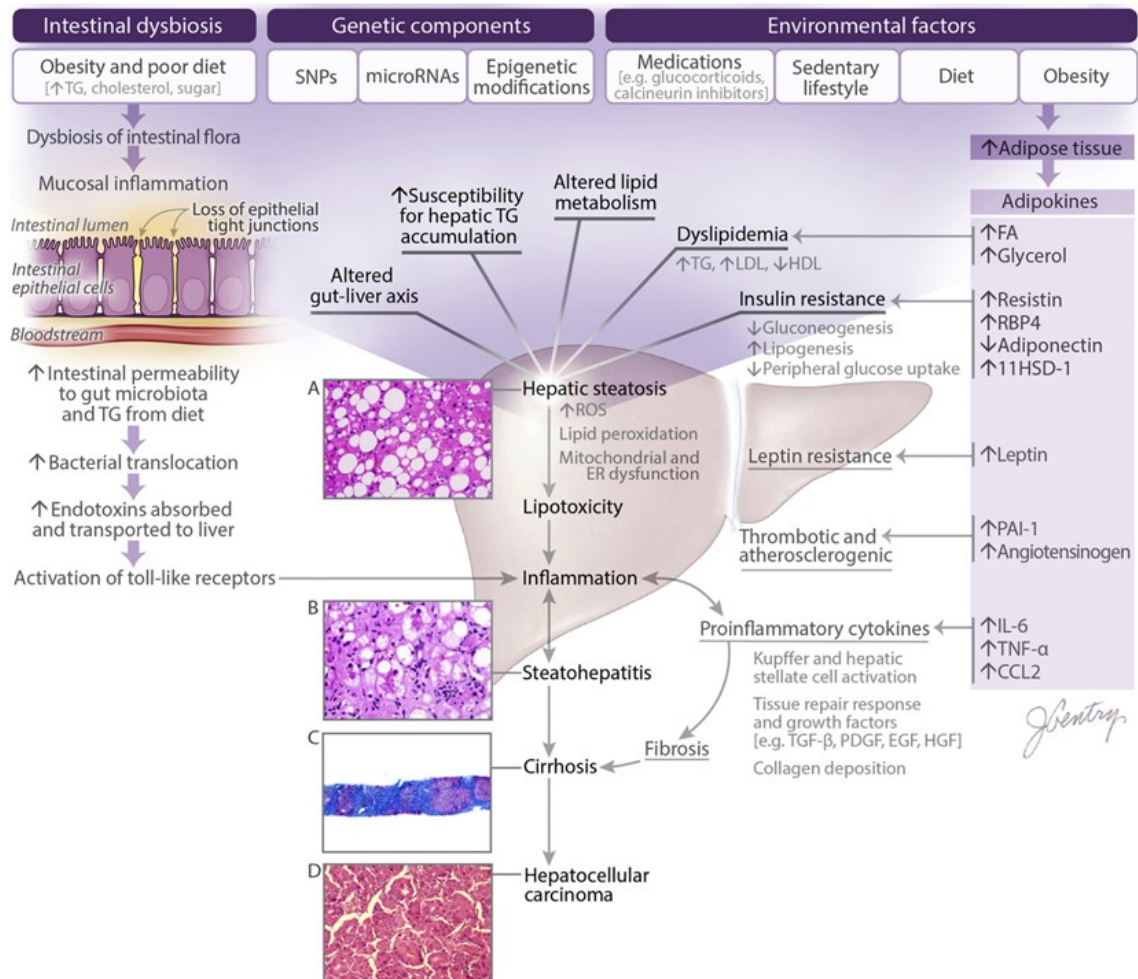
Četnost tohoto onemocnění se na různých kontinentech liší. Nejvyšší prevalence připadá na Blízký východ (32 %) a Jižní Ameriku (31 %), o něco menší je v Asii (27 %), Spojených státech amerických (24 %) a Evropě (23 %), nejmenší je v Africe (13 %) (Younossi et al., 2018). Prevalence se taky liší u různých populací, nejvyšší je u hispánské populace, menší u bělošské a asijské, nejnižší je u černošské populace. V západních zemích se incidence NAFLD pohybuje kolem 28 na 1000 obyvatel za rok (Brůha, 2019). Prevalence NASH v západních zemích se pohybuje v rozpětí 2-5 %.

Celosvětově se prevalence NAFLD zvyšuje, například v Asii byla prevalence od roku 1999 do roku 2005 25,28 %, mezi lety 2012 a 2017 vzrostla na 33,9 %. Odhaduje se, že v roce 2040 by mohla celosvětová prevalence NAFLD vzrůst až na 55,7 %. U více než 80 % pacientů s těžkou obezitou se vyskytuje NAFLD, 75 % pacientů s T2DM také trpí NAFLD (Le et al., 2022). Nicméně se NAFLD může vyskytnout i u jedinců, kteří mají normální BMI a nemají T2DM, ale vyskytuje se u nich abdominální obezita nebo jiné metabolické onemocnění (Powell et al., 2021).

2.1.2 Patogeneze

Počátečním faktorem vedoucím ke vzniku NAFLD je prostá jaterní steatóza, což je stav, kdy dojde k hromadění lipidů u více než 5 % hepatocytů (Hůlek & Dresslerová, 2015). Vznik NAFL podporuje zvýšená jaterní lipogeneze, zvýšená lipolýza tukové tkáně a dieta s vysokým obsahem tuků. Mechanismy vedoucí k progresi NAFL do NASH jsou multifaktoriální, mezi hlavní faktory progresu patří obezita a inzulinová rezistence.

Dalšími důležitými faktory jsou lipotoxicita, oxidační stres, prozánětlivé cytokiny, střevní dysmikrobie, genetické a epigenetické faktory (Fu et al., 2021). Všechny tyto faktory přispívají a urychlují rozvoj jaterního poškození (Hůlek & Dresslerová, 2015). Progrese onemocnění z NAFL do NASH trvá několik let, průměrná doba se odhaduje na 7,7 let (Fu et al., 2021). Faktory podílející se na patogenezi NAFLD jsou shrnuty v Obrázku 2.



Obrázek 2 Faktory ovlivňující vznik a progresi NAFLD (převzato z Kovalic et al., 2018)

U pacientů s NAFLD se často vyskytují různé komorbidity spojené s metabolickým syndromem. Mortalita pacientů s NAFLD je oproti zdravé populaci vyšší o 57 % (Byrne & Targher, 2015). Pacienti s NAFLD nejčastěji umírají na komplikace spojené s jaterním selháním a kardiovaskulárním systémem (Papatheodoridi & Cholongitas, 2019). Při progresi prosté jaterní steatózy do NASH se zvyšuje mortalita na jaterní komplikace 5x až 10x (Byrne & Targher, 2015).

2.1.2.1 Inzulinová rezistence

Inzulinová rezistence je přítomná téměř u všech pacientů s NAFLD. U těchto pacientů má inzulin sníženou schopnost potlačit jaterní glukoneogenezi (Utzschneider & Kahn, 2006). Jedním z mechanismů progrese NAFL do NASH je vliv inzulinové

rezistence na *de novo* lipogenezi v hepatocytech. Inzulinová rezistence aktivuje transkripční faktor SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*), který podporuje *de novo* lipogenezi v hepatocytech (Guo et al., 2022). Při nadměrné lipogenezi se hromadí lipidy a jejich meziprodukty a dochází k lipotoxicitě, což může vést k poškození až odumření hepatocytu. Dochází k uvolnění zánětlivých cytokinů, které vyvolají migraci Kupfferových a Itoových buněk, které zánětlivou reakci v játrech podpoří a usnadní progresi onemocnění do NASH (Fu et al., 2021). Inzulinová rezistence také ovlivňuje funkci adipocytů tím, že sníží jejich schopnost inhibovat lipolýzu, čímž se zvýší hladina volných mastných kyselin v krvi, ty jsou ukládány v játrech ve formě TAG. V adipocytech také dochází ke změně v sekreci adipokinů a zvýšené tvorbě prozánětlivých cytokinů (Buzzetti et al., 2016).

2.1.2.2 Oxidační stres a antioxidační systém

Oxidační stres nastává při nerovnováze mezi vznikem reaktivních forem kyslíku (ROS) a/nebo reaktivních forem dusíku (RNS) a jejich odstraňováním pomocí antioxidačního systému. V buňce je oxidační stres nejčastěji způsoben ROS, méně často i RNS či reaktivními formami síry nebo chlóru. ROS a RNS dělíme na neradikálové sloučeniny a volné radikály. Volný radikál je molekula, která obsahuje jeden nebo více nepárových elektronů, také se vyznačuje vysokou reaktivitou a nízkou stabilitou (Delli Bovi et al., 2021). Hlavním zdrojem volných radikálů je molekulární kyslík, který velmi snadno přijímá elektrony. Nejběžnějšími volnými radikály v buňce jsou hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$), superoxid anion radikál ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a oxid dusnatý (NO^{\bullet}). Tyto volné radikály jsou produktem intracelulárního metabolismu endogenních i exogenních látek. Hlavním endogenním zdrojem ROS jsou mitochondrie, peroxisomy a endoplazmatické retikulum. Superoxid anion radikál je výsledkem enzymatických reakcí katalyzovaných například cytochromy P450 nebo xantinoxidázou (Ucar et al., 2013). Volné radikály svojí reaktivitou poškozují řadu biomolekul včetně polynenasycených mastných kyselin v fosfolipidech biomembrán, proteinů a DNA (Delli et al., 2021).

Odhaduje se, že zvýšená míra oxidačního stresu usnadňuje progresi NAFL do NASH tím, že přispívá k zánětlivým reakcím a fibrotizaci jater. Mitochondriální dysfunkce hraje velkou roli při vzniku a progresi NAFLD tím, že přispívá k tvorbě ROS. Kumulace mastných kyselin v hepatocytech vede k jejich zvýšené β -oxidaci v mitochondriích, tím se zvyšuje tok elektronů v elektronovém transportní řetězci, zvyšuje se tak šance na únik elektronu a vznik ROS (Ezhilarasan & Lakshmi, 2022). Výsledkem mitochondriální dysfunkce u hepatocytů je tedy zvýšená produkce ROS, ta má za následek oxidativní poškození membránových proteinů a lipidů a poškození mitochondriální DNA (mtDNA). Mitochondrie poškozené oxidačním stresem bývají

zvětšené, ztrácí krysty a v jejich matrix se nacházejí krystalové inkluze. Tyto změny narušují funkci mitochondrie a snižují její schopnost tvořit adenosintrifosfát (ATP). Postupně dochází k zánětu a později i nekróze hepatocytu, dochází k aktivaci dalších prozánětlivých drah (Buzzetti et al., 2016; Ucar et al., 2013).

Existuje spojení oxidačního stresu se stresem endoplazmatického retikula a progresí NAFLD. Stres endoplazmatického retikula (ER) je způsoben hromaděním proteinů s patologickou konformací uvnitř ER, tyto proteiny neplní svou fyziologickou funkci. Pro správnou konformaci proteinu je klíčová tvorba disulfidických můstků. Proces skládání proteinů je vysoce citlivý proces, který může být narušen změnou redoxní homeostázy, zánětem, nedostatkem energie, zvýšenými nároky na translaci mRNA nebo vyčerpáním vápenatých iontů. Za normálních podmínek se v ER nachází malé množství proteinů s patologickou konformací, jejich počet se při narušení homeostázy uvnitř ER zvyšuje, což vede ke stresu ER. Reakcí na stres ER je UPR (*unfolded protein response*), tento obranný mechanismus způsobí degradaci proteinů s patologickou konformací, zvýšení exprese genů pro chaperony a zpomalení translace mRNA. Při selhání těchto mechanismů a při dlouhotrvajícím stresu ER nastává apoptóza buňky (Chong et al., 2017). UPR bývá často aktivováno v játrech pacientů s NAFLD a NASH (Ashraf & Sheikh, 2015). Redoxní homeostáze je uvnitř ER udržována pomocí glutationu, ten se v ER nachází v redukované a oxidované formě ve stejném poměru. Narušení tohoto poměru vede ke zvýšené tvorbě proteinů s patologickou konformací a zvýšení produkce ROS. Disulfidické můstky proteinu s patologickou konformací, ty jsou opakovaně rozpojovány a spojovány ve snaze obnovit jeho správnou konformaci, během tohoto procesu vznikají další ROS, což vede k vyčerpání glutationu (Ashraf & Sheikh, 2015).

Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jsou oxidovány v peroxisomech za vzniku peroxidu vodíku, který podléhá přeměně na $\cdot\text{OH}$ (Ucar et al., 2013). Tímto procesem se dále prohlubuje mitochondriální dysfunkce a dochází k porušení homeostázy metabolismu lipidů v hepatocytech (Ucar et al., 2013). K dalšímu poškození jater dochází peroxidací lipidů. K tomu dochází, když volné radikály reagují s polynenasycenými mastnými kyselinami, čímž vznikají reaktivní aldehydy malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Ucar et al., 2013). Peroxidaci podléhají i lipoproteiny, zejména lipoprotein o nízké hustotě (LDL) má potenciál aktivovat Kupfferovy a Itovy buňky, čímž se podpoří zánět i fibrotizace tkáně (Buzzetti et al., 2016).

Oxidační stres také spouští reakci buněk imunitního systému. Produkty peroxidace lipidů jsou Toll-like receptory (TLR) rozeznávány jako DAMP (*damage-associated molecular pattern*) (Sutti & Albano, 2020). Produkty peroxidace lipidů také tvoří s ostatními makromolekulami antigeny, ty jsou označovány jako OSE

(*oxidative stress-derived epitopes*). OSE jsou rozeznány buňkami imunitního systému a proti těmto antigenům jsou vytvářeny protilátky společně s tvorbou prozánětlivých cytokinů. To vše podporuje zánět v játrech a zvyšuje infiltraci jater dalšími buňkami imunitního systému. V játrech 60 % pacientů s NASH byly pozorovány agregáty tvořené z B-lymfocytů a T-lymfocytů. Velikost a četnost těchto agregátů korelovala se stupněm zánětu a fibrózy. Protilátky proti OSE byly přítomny u 40 % dospělých s NAFLD a NASH (Sutti & Albano, 2020).

U NASH dochází nejen ke zvýšení oxidačního stresu, ale také ke snížení hladin antioxidantů, což účinky oxidačního stresu prohlubuje. U pacientů s NASH bylo pozorováno snížení antioxidantních enzymů, konkrétně glutathionperoxidázy, katalázy a superoxiddismutázy (Ezhilarasan & Lakshmi, 2022). Koncentrace jiných antioxidantů byla v plazmě pacientů s NAFLD také výrazně snížena, jednalo se o glutathion, β -karoten, α -tokoferol, lutein, zeaxantin a lykopen (Ashraf & Sheikh, 2015).

2.1.2.3 Prozánětlivé cytokiny a adipocytokiny

Zvýšená tvorba prozánětlivých cytokinů je spřažena s metabolickým syndromem, jedná se o stav, při kterém tuková tkáň produkuje zvýšené množství mediátorů zánětu. Dlouhodobý zánět hepatocytů vede k jejich postupnému odumírání, fibróze až cirhóze. Na tvorbě zánětu se podílí například interleukin 6 (IL-6) a tumor-nekrotizující faktor α (TNF α). Ke změnám dochází i v produkci cytokinů, které jsou specifické pro tukovou tkáň, tzv. adipocytokiny, mezi které patří adiponektin, leptin, rezistin, RBP4 (*retinol binding protein*) a PBEF (*pre-B-cell colony enhancing factor*). Adiponektin je nejběžnější adipocytokin s protizánětlivými a anti-steatotickými účinky. U jedinců s obezitou nebo inzulinovou rezistencí je hladina adiponektinu v séru snížena. A u pacientů s NASH hladina adiponektinu v séru negativně koreluje se stupněm zánětu a fibrózy (Moschen et al., 2009). Adiponektin potlačuje zánětlivé procesy tím, že indukuje protizánětlivý interleukin 10 (IL-10) a antagonistu receptoru pro interleukin 1 (IL-1), také inhibuje TNF α (Tilg, 2010).

2.1.2.4 Střevní dysmikrobie

NAFLD a obezita jsou spojovány s narušením integrity střevní bariéry, dysmikrobií a zánětlivými procesy ve střevech (Buzzetti et al., 2016). Předpokládá se, že změny ve střevní mikroflóře jsou u pacientů s obezitou a NAFLD způsobeny nadměrnou konzumací potravin s vysokým obsahem tuků a sacharidů, především fruktózy. Střevní dysmikrobie přispívá ke vzniku NAFLD prostřednictvím mnoha mechanismů. Nevhodná skladba střevní mikroflóry podporuje fermentaci sacharidů na mastné kyseliny s krátkými řetězci (2-6 uhlíků), tím stimuluje syntézu TAG v játrech

(Kirpich et al., 2015). Střevní dysmikrobie zasahuje do energetické homeostázy, narušuje metabolismus cholinu, moduluje endokannabinoidní systém a ovlivňuje homeostázu žlučových kyselin (Cani, 2012; Swann et al., 2011). Střevní mikroflóra může také přispívat k jaterní fibróze prostřednictvím stimulace profibrotických drah závislých na TLR-9 v jaterních Kupfferových buňkách (Kirpich et al., 2015). U pacientů s NAFLD a NASH je zvýšená prevalence syndromu bakteriálního přerůstání tenkého střeva (Kirpich et al., 2015; Wigg et al., 2001).

Stěna gramnegativních bakterií obsahuje lipopolysacharid, ten je po jejich zániku uvolněn do okolí. Při narušení střevní bariéry a vysokotučné dietě se zvyšuje propustnost střevní bariéry a usnadňuje se absorpce lipopolysacharidu do krevního řečiště, kde aktivuje produkci prozánětlivých cytokinů, ty mohou aktivovat jaterní makrofágy a přispívat tak k zánětu hepatocytů. Lipopolysacharid dokáže stimulovat i syntézu endokannabinoidů a ovlivnit tak adipogenezi v adipocytech, také snižuje sekreci adiponektinu (Cani, 2012; Kirpich et al., 2015).

2.1.2.5 Genetické predispozice

Existuje souvislost mezi NAFLD a dědičností. Odhaduje se, že genetické faktory ovlivňují vznik NAFLD z 20-70 % (Powell et al., 2021). Výskyt variant genů, které se podílejí na regulaci jaterního metabolismu lipidů, se mohou podílet na vzniku NAFLD, usnadňovat progresi onemocnění nebo zvyšovat výskyt komplikací. Přítomnost varianty ale neznámá, že se u pacienta NAFLD vyskytne, důležité jsou i ostatní faktory (Vachher et al., 2022). Varianta I148M genu *PNPLA3* (*patatin like phospholipase domain-containing protein 3*) ovlivňuje tvorbu lipidových kapének v hepatocytech, a tím zvyšuje jejich nositelům šanci na výskyt prosté steatózy, NASH, jaterní fibrózy a HCC a urychluje progresi těchto onemocnění. Varianta neovlivňuje inzulinovou rezistenci. Tato varianta se velmi často vyskytuje u hispánské populace, jejím nositelem je 49 % populace, méně často je zastoupená v evropské populaci a to u 23 % (Basu, 2019). Varianta rs58542926 C>T v genu *TM6SF2* E167K vede ke snížené tvorbě lipoproteinu o velmi nízké hustotě (VLDL), to vede k hromadění TAG v játrech. V evropské populaci je tato varianta zastoupena v 7 % (Krawczyk et al., 2020). U pacientů s touto variantou je zvýšená šance pro vznik NAFLD, NASH a jaterní fibrózy. Pacienti s touto variantou mají v séru snížené hladiny TAG a celkového cholesterolu, dochází tak u nich ke snížené tvorbě aterosklerotických plátů a ateroskleróza se u nich vyskytuje v menší míře (Dongiovanni et al., 2015). S NAFLD jsou spojovány i varianty v genech pro glukokinázový regulační protein (*GCKR*), *LYPLAL1* (*lysophospholipase-like 1*) a *PPP1R3B* (*Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B*). Přítomnost těchto variant zvyšuje riziko vzniku NAFLD, NASH a jaterní fibrózy (Krawczyk et al., 2020; Vachher

et al., 2022). Naopak varianta rs72613567:TA v genu 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáza 13 (*HSD17B13*) potlačuje vznik NASH, HCC, jaterní fibrózy a cirhózy (Vachher et al., 2022). Pacienti s touto variantou mají také snížené riziko vzniku alkoholického tukového onemocnění jater (AFLD) a snížené hladiny alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST). U homozygotů s touto variantou genu je riziko vzniku NAFLD nižší o 30 % a u heterozygotů o 17 % oproti běžné populaci. Tato varianta *HSD17B13* také snižuje riziko vzniku jaterní cirhózy o 49 % u homozygotů a o 26 % u heterozygotů. Varianta ale nemá vliv na výskyt NAFL (Abul-Husn et al., 2018).

2.1.3 Diagnostika

Pro diagnózu NAFLD je nutné vyloučit jiné příčiny vzniku jaterního poškození, především nadměrnou konzumaci alkoholu, chronickou virovou hepatitidu B a C, polékové poškození, autoimunitní hepatitidu, Wilsonovu chorobu, hemochromatózu nebo porfyrie. U pacienta musí být přítomna akumulace lipidů u více než 5 % hepatocytů, tu lze prokázat pomocí jaterní biopsie nebo zobrazovacími metodami. Většina pacientů s NAFLD nepociťuje v počáteční fázi onemocnění žádné symptomy. Po progresi onemocnění do NASH pociťuje malé množství pacientů únavu, slabost, pocit plnosti nebo tlak v pravém podžebří, tyto symptomy jsou často způsobeny hepatomegalíí a zánětlivými procesy (Dumitrascu & Neuman, 2018). Ve fázi jaterní cirhózy se mohou vyskytnout závažné příznaky, jako jsou například ikterus, otoky nohou, ascites, zvýšená krvácivost, hepatosplenomegalie, únava, nechutenství a ztráta hmotnosti. Protože NAFLD nemá v počáteční fázi žádné příznaky nebo jen ty nespecifické, trvá řadu let, než je pacientovi NAFLD diagnostikována. K diagnóze časných stádií NAFLD dochází nejčastěji náhodně při vyšetření prováděném z jiného důvodu (Powell et al., 2021).

2.1.3.1 Laboratorní testy

Typickým laboratorním nálezem u pacientů s NAFLD jsou zvýšené hladiny jaterních enzymů. Všichni pacienti se zvýšenými jaterními enzymy by se měli vyšetřit pro NAFLD, jedná se totiž o nejčastější příčinu zvýšení jaterních enzymů ve vyspělých zemích (Papatheodoridi & Cholongitas, 2019). U pacientů bývá také zvýšená hladina TAG a snížená hladina lipoproteinu s vysokou hustotou (HDL). Základním markerem jaterního poškození jsou zvýšené hladiny ALT a AST. Poměr AST a ALT menší než 1 je přítomen u NAFL a NASH. Na základě poměru ALT a AST nelze od sebe odlišit NAFL a NASH. Poměr větší než 1 značí výraznou jaterní fibrózu až cirhózu (Basaranoglu & Neuschwander-Tetri, 2006). Pacienti také mívají zvýšené hladiny

γ -glutamyltransferázy (GGT) někdy i 10x oproti normální hladině (Hovorková & Dvořák, 2018).

U pacientů s NASH dochází k zánětlivým procesům, hladiny zánětlivých cytokinů u nich bývají zvýšené. Významně bývají zvýšené hladiny IL-6 a IL-8 (Papatheodoridi & Cholongitas, 2019). Pacienti s NASH naopak mívají sníženou hladinu adiponektinu, což je protizánětlivý adipocytokin, u pacientů s NAFL ke snížení adiponektinu nedochází (Dumitrascu & Neuman, 2018). S NASH bývají spojené zvýšené hladiny markerů zánětu, jako je například feritin a C-reaktivní protein (CRP) (Papatheodoridi & Cholongitas, 2019).

Vhodným skórovacím testem pro diagnostiku NAFLD je *Fatty liver index*, který zohledňuje BMI, obvod pasu, sérové TAG a GGT.

Slibným markerem pro diagnostiku a určení závažnosti NASH je cytokeratin 18 (CK-18), jedná se o marker aktivace hepatocytární kaspázy-3. Specifita CK-18 se pohybuje mezi 77-82 %, ale senzitivita mezi 66-75 %, což je pro screening nedostačující, a proto se CK-18 zatím používá jako marker jenom v rámci výzkumu (Papatheodoridi & Cholongitas, 2019).

2.1.3.2 Jaterní biopsie

Zlatým standardem pro diagnózu NAFLD je provedení jaterní biopsie. Pomocí biopsie lze také určit závažnost, rozsah jaterního poškození a prognózu. U jaterní tkáně se hodnotí stupeň steatózy, rozsah zánětlivých změn, stupeň fibrózy, přítomnost balónových hepatocytů a lobulárního zánětu. Podle procenta hepatocytů, ve kterých jsou akumulovány lipidy, lze rozdělit steatózu na lehkou s 5-33 %, střední s 33-66 % a těžkou nad 66 % (Basaranoglu & Neuschwander-Tetri, 2006). Nejpoužívanějšími skórovacími systémy jsou NAS (*NAFLD activity score*) a SAF (*steatosis-activity-fibrosis*). Hodnocení skórovacím systémem NAS je zaměřené na stupeň steatózy, přítomnost a počet balónových hepatocytů a míru lobulárního zánětu. Na základě hodnocení se přiřadí skóre, když je menší než 5, jedná se o NAFL, skóre nad 5 značí NASH. Skórovací systém SAF také zohledňuje stupeň steatózy odděleně od hodnocení lobulárního zánětu a balónových hepatocytů. Na rozdíl od NAS hodnotí i stupeň fibrózy (Dumitrascu & Neuman, 2018).

Hlavní limitací jaterní biopsie je fakt, že lze odebrat pouze malou část tkáně, která nemusí být reprezentativní a nemusí tedy odrážet celkový stav jater. Také se jedná o invazivní zákrok, který s sebou nese určitá rizika. Pacienti často po zákroku pociťují bolest, která může být i výrazná, také může dojít k infekci nebo i k závažnému krvácení, v 0,3 % může dokonce dojít i ke smrti. Proto je důležité zvážit přínos jaterní biopsie v porovnání s neinvazivními metodami (Fazel et al., 2016).

2.1.3.3 Zobrazovací metody

Zobrazovací metody jsou vhodným nástrojem pro pacienty, kteří nemohou či nechťejí podstoupit biopsii. Ultrazvuk je díky své dostupnosti a nízké ceně nejpoužívanější zobrazovací metodou (Dumitrascu & Neuman, 2018). U pacientů s NAFLD lze pomocí ultrazvuku pozorovat hepatomegalii a steatózu. Zhruba u 75 % pacientů s NAFLD je přítomná hepatomegalie. Tuková tkáň má oproti jaterní tkáni větší echogenitu, steatózu lze pomocí ultrazvuku detekovat pouze, když více než 20 % hepatocytů obsahuje lipidy. Ultrazvukem nelze rozlišit prostou steatózu od NASH a různého stupně fibrotizace jater. Pro určení stupně fibrózy je vhodnější používat ultrazvukovou elastografii, která měří elastické vlastnosti tkáně, ty bývají u fibrotické tkáně snižené (Li et al., 2018).

Pro detekci NAFLD je specifitější výpočetní tomografie (CT), která hodnotí množství lipidů v hepatocytech. CT je citlivější zobrazovací metodou pro detekci střední a pokročilé steatózy, jaterní fibrózy a cirhózy. Pro detekci lehké steatózy je klasická CT méně citlivá. Pro kvantifikaci lehké steatózy je vhodné použít CT s duálním zářením. Pomocí CT nelze rozlišit, jestli jsou v hepatocytech uloženy lipidy, železo, měď, glykogen nebo amidaron (Li et al., 2018).

Magnetická rezonance (MRI) je považována za zobrazovací metodu s nejvyšší specifitou a senzitivitou pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení jaterní steatózy. Pro hodnocení steatózy je nejvhodnější použít MRI spektroskopii, pomocí ní je určení stupně steatózy srovnatelné s jaterní biopsií (Brůha, 2019). Magnetická rezonanční elastografie (MRE) je vhodná pro určení stupně fibrotizace jater. Dokáže s vysokou spolehlivostí rozlišit závažnou jaterní fibrózu od jaterní cirhózy. V současné době však neexistuje zobrazovací metoda, pomocí které lze diagnostikovat NASH (Li et al., 2018).

2.1.4 Léčba

Léčba NAFLD je zaměřená na změnu životního stylu, snížení hmotnosti, úpravu diety a zvýšení fyzické aktivity. Při redukci hmotnosti o 7-10 % dochází u pacientů během jednoho roku k výraznému snížení stupně jaterní fibrózy. Pro snížení stupně steatózy stačí snížit hmotnost o 3-4 % (Nassir, 2022). Problémem zůstává fakt, že se více než polovině pacientů nepodaří dlouhodobě snížit hmotnost o více než 7 %. Při zvýšení fyzické aktivity u obézních pacientů s NAFLD došlo během 3 měsíců ke snížení steatózy o 9,5 % a snížení fibrózy o 6,8 %, přestože nedošlo k výraznému snížení hmotnosti. U pacientů dále došlo k redukci množství tukové tkáně a nárůstu svalové tkáně a ke snížení markerů zánětu a oxidačního stresu (Oh et al., 2021). Pro morbidně obézní

pacienty, kterým se nedaří dodržovat změnu životního stylu, je vhodná bariatrická operace (Nassir, 2022). Už po 1 roce po bariatrické operaci došlo u 85 % pacientů k vymizení NASH. U pacientů také došlo ke snížení BMI, ALT a GGT. V průměru došlo ke snížení množství lipidů v hepatocytech z 60 % na 10 %. Ke snížení zánětu došlo v 67,1 %, ke snížení balónových hepatocytů v 84,2 % a ke snížení fibrózy ve 33,8 % případů (Lassailly et al., 2015). Zákrok má ale řadu komplikací, a proto není vhodný jako léčebný postup první volby (Nassir, 2022).

2.1.4.1 Transplantace jater

Poškození jater spojené s NAFLD je třetí nejčastější indikací pro transplantaci jater. Transplantace jater bývá poslední možností léčby pro pacienty s pokročilou jaterní cirhózou nebo HCC, kde ostatní metody léčby již selhaly (Terrault et al., 2023). Samotná diagnóza jaterní cirhózy či HCC nestačí pro zařazení pacienta na čekací listinu pro transplantaci jater. Pro indikaci transplantace jater se u pacienta s cirhózou musí vyskytnout komplikace spojené s jaterním selháváním, jako jsou například ascites, jaterní encefalopatie, stav po krvácení z jícnových varixů nebo hepatorenální syndrom. Musí být splněn i předpoklad, že transplantace prodlouží pacientovi život a zvýší jeho kvalitu života. U pacientů s HCC je transplantace možná pouze v počáteční fázi onemocnění, přítomnost mimojaterních metastáz je totiž kontraindikací pro transplantaci (Graziadei et al., 2016).

2.1.4.2 Farmakologická léčba

Zatím neexistuje žádný lék určený přímo pro léčbu NAFLD. V současnosti se farmakologicky léčí pouze jednotlivé komponenty metabolického syndromu - T2DM, hypertenze a dyslipidemie (Brůha, 2019). Pacienty s NAFLD a T2DM je vhodné léčit perorálními antidiabetiky, jejichž účinkem je i redukce hmotnosti, mezi taková léčiva patří například glifloziny a agonisté peptidu podobného glukagonu 1 (GLP1) (Dvořák & Šmíd, 2022).

Pacienti s dyslipidemií mají dvakrát vyšší riziko úmrtí na kardiovaskulární komplikace, ty jsou nejčastější příčinou úmrtí u pacientů s NAFLD. Vhodným lékem pro léčbu dyslipidemie u pacientů s NAFLD jsou statiny, ty mají kromě hypolipidemického účinku i protizánětlivé, antioxidantní a antifibrotické účinky (Dvořák & Šmíd, 2022). Léčba statiny snižuje u pacientů s NAFLD riziko vzniku jaterní fibrózy. Statiny snižují riziko vzniku NAFLD u pacientů bez tohoto onemocnění (Lee et al., 2021).

Pro léčbu NAFLD se testuje spousta léčiv ze skupiny antidiabetik, antioxidantů nebo statinů. Mezi nejslibnější kandidáty pro léčbu NAFLD v probíhajících klinických studiích patří semaglutid a lanifibanor (Dvořák & Šmíd, 2022).

Liraglutid

Liraglutid je antidiabetikum a antiobezitikum, tedy lék pro léčbu T2DM, obezity a nemocí s obezitou spojených, jako je například hypertenze, dislipidemie nebo spánková apnoe. Jedná se o analog inkretinového hormonu GLP-1 (Jackson et al., 2010). Metaanalýza zaměřená na léčbu pacientů s NAFLD pomocí liraglutidu prokázala významné snížení BMI a hladiny TAG v séru. Tyto změny byly významnější u pacientů s T2DM. Léčba neměla vliv na změnu množství lipidů v jaterní tkáni, ani na hladinu ALT v séru. Také nedošlo ke změně hladin lipidů v séru kromě TAG (Kalogirou et al., 2021).

Semaglutid

Semaglutid je antagonist receptoru GLP-1, který má antidiabetické a antiobezitické účinky (Loomba et al., 2023). U pacientů s T2DM semaglutid snižuje riziko vzniku infarktu myokardu a cévní mozkové příhody (Marso et al., 2016). Studie Loomba et al. (2023) zkoumala vliv semaglutidu u dospělých pacientů s histologicky potvrzenou NASH. Pacientům byl podáván semaglutid jednou týdně po dobu 48 týdnů, dávka byla během prvních 16 týdnů postupně navyšována na 2,4 mg, léčba byla porovnána se skupinou pacientů, kteří dostávali placebo. Po 48 týdnech měli pacienti s léčbou snížené sérové hladiny ALT, AST, GGT, TAG, VLDL a glukózy, také měli nižší BMI a obvod pasu v porovnání s pacienty ve skupině s placebem. Po 48 týdnech byl pomocí MRI stanoven stupeň jaterní steatózy, u léčených pacientů došlo ke snížení jaterní steatózy. Pomocí MRE nebyl zjištěn zásadní rozdíl v jaterní fibróze mezi skupinami. Na základě vyšetření biopsie nebyly zjištěny zásadní rozdíly ve stupni steatózy, jaterní fibrózy, NASH a balónových hepatocytů (Loomba et al., 2023).

Lanifibranor

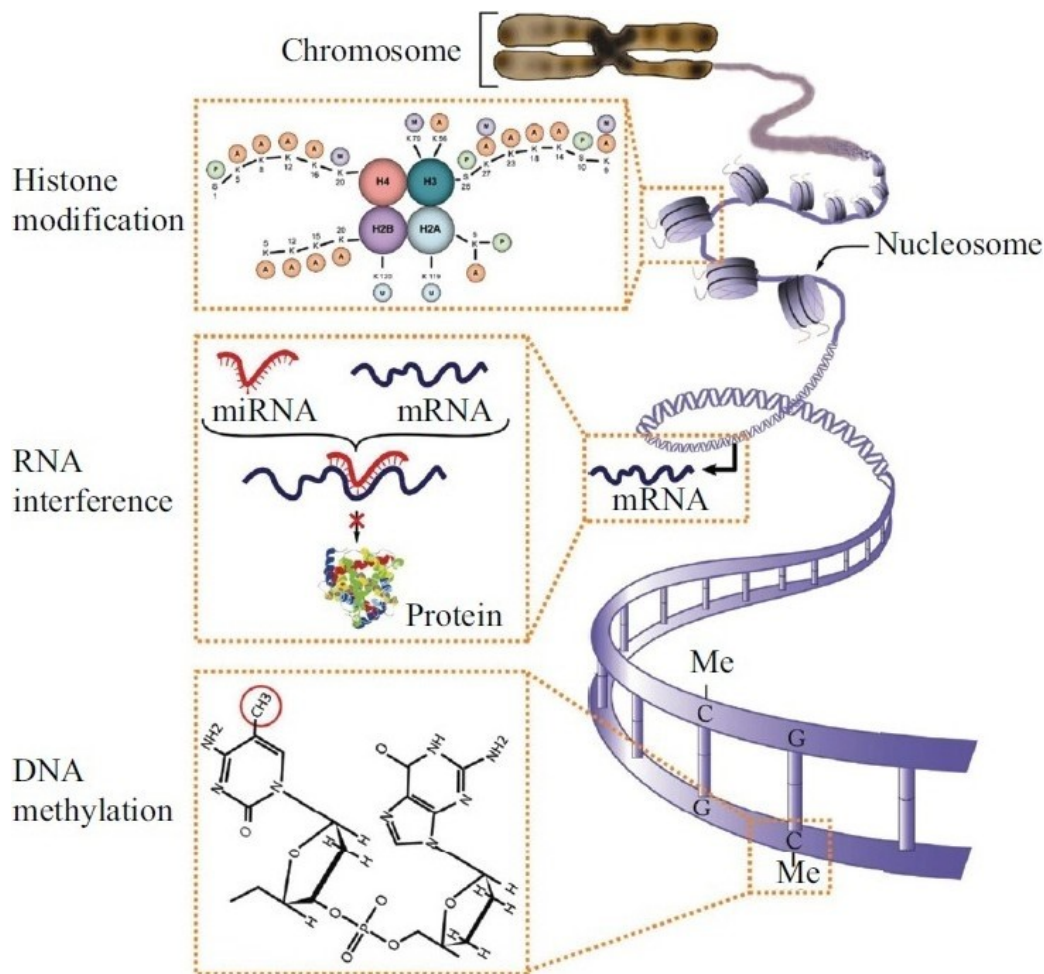
Lanifibranor je agonistou pro všechny receptory PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), tedy pro PPAR α , PPAR β a PPAR γ . Studie Francque et al. (2021) zkoumala vliv lanifibranoru u dospělých pacientů s NASH se středním nebo pokročilým stupněm fibrózy. Pacienti byly rozděleni do tří skupin, první byl podáván lanifibranor v dávce 1 200 mg denně, druhé skupině v dávce 800 mg denně a třetí skupina dostávala placebo. Po 6 měsících léčby byla pacientům provedena biopsie jater. U pacientů v první skupině došlo k vymizení NASH, ale u druhé skupiny k výraznému zlepšení nedošlo v porovnání s placebo skupinou. Ke zlepšení stupně fibrózy došlo u první skupiny u 48 % pacientů, 34 % u druhé skupiny a 29 % u placebo skupiny. Ke zlepšení NASH i fibrózy došlo v první skupině u 35 % pacientů, v druhé skupině u 25 % a v placebo skupiny pouze u 9 %. U pacientů léčených lanifibranorem došlo ke snížení ALT, AST a GGT, ale došlo u nich k nárůstu hmotnosti v porovnání s placebo skupinou (Francque et al., 2021).

Vitamin E

Vitamin E patří mezi účinné antioxidanty a podílí se na snižování oxidačního stresu. Řada studií zkoumá účinky vitaminu E u pacientů s NAFLD. Studie Kawanaka et al., (2004) zkoumala vliv vitaminu E u dospělých pacientů s NASH, studovala u nich změny v hladinách jaterních enzymů a markerů oxidačního stresu. Podávání 300 mg vitaminu E denně po dobu 6 měsíců vedlo u pacientů s NASH ke snížení hladin ALT a GGT. Došlo také ke snížení hladiny tioredoxinu (TRX) a TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*), což jsou markery oxidačního stresu. Léčba vitaminem E ale neměla vliv na BMI pacientů (Kawanaka et al., 2004). Při podávání vitaminu E dětským pacientům s NAFLD došlo ke snížení balónových hepatocytů ve 44 % případů, při užívání placebo došlo ke snížení pouze v 21 % případů. Podávání vitaminu E mělo vliv na zlepšení skóre pro NAFLD. Nicméně podávání vitaminu E nemělo vliv na stupeň steatózy, zánětu nebo jaterní fibrózy. Ke změnám nedošlo ani v hladinách ALT, AST, GGT, celkového cholesterolu, HDL, LDL, TAG a glukózy v séru (Lavine et al., 2011).

2.2 Epigenetické mechanismy

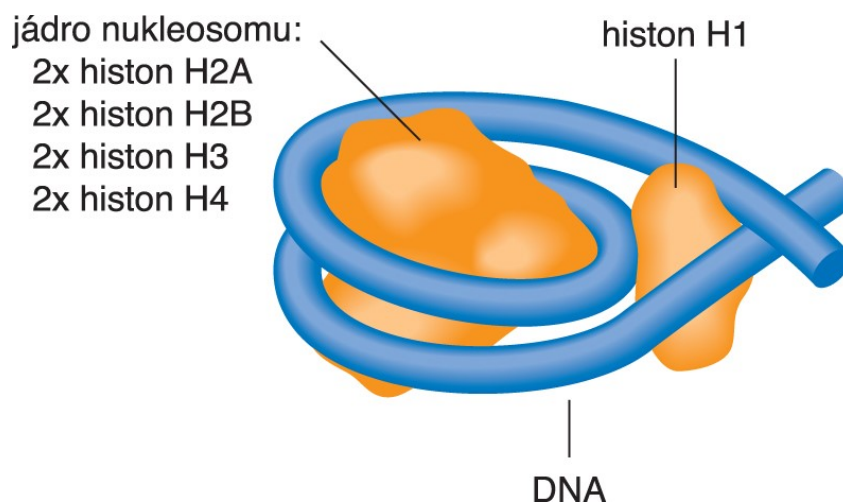
Epigenetické mechanismy regulují genovou expresi bez změny sekvence DNA. K regulaci dochází na mnoha úrovních, a to před transkripcí, po transkripci, před translací i po translaci. Mezi mechanismy ovlivňující transkripci patří modifikace histonů, ty mohou být modifikovány acetylací, metylací, fosforylací, ubikvitinylací, sumoylací, ADP-ribosylací nebo deiminací. Genová exprese může být regulována i přímou modifikací DNA, například navázáním metylové skupiny na cytosin. Po transkripci lze ovlivňovat degradaci nově vzniklé mRNA pomocí mikroRNA (Bannister & Kouzarides, 2011; Lee et al., 2020). Základní mechanismy epigenetické regulace jsou uvedeny v Obrázku 3.



Obrázek 3 Základní mechanismy epigenetické regulace – modifikace histonů, RNA-zprostředkované umlčování genů a metylace DNA (převzato z Kim et al., 2011).

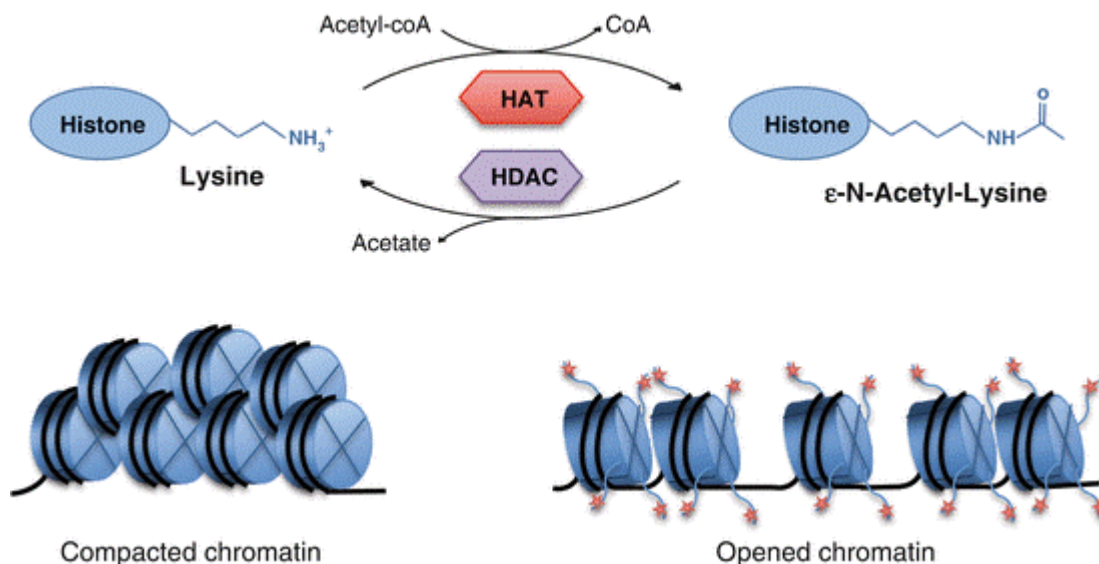
2.2.1 Acetylace histonů

Histon je bazický protein se schopností vázat na sebe DNA. Rozlišujeme 5 základních typů histonů: H1, H2A, H2B, H3 a H4. Dvojice histonů H2A, H2B, H3 a H4 společně tvoří oktamer, ten s navázanou DNA tvoří nukleosom (Obrázek 4). Jednotlivé nukleosomy jsou spojené pomocí spojky (tzv. *linker DNA*), jejíž součástí je histon H1. Nukleosomy jsou základní strukturou chromatinu v jádře buňky (Fang & Han, 2021).



Obrázek 4 Struktura nukleosomu (převzato z Kodíček 2007)

Aby došlo k transkripci určitého genu, je potřeba, aby promotor daného genu nebyl sbalen do struktury histonu, promotor musí být volně přístupný pro transkripční faktory. Histon má na svém povrchu pozitivní náboj, proto má vysokou afinitu k negativně nabitě molekule DNA. Enzym histonacetyltransferáza (HAT) katalyzuje přenos acetylů z acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) na ϵ -aminoskupinu lyzinového zbytku histonu. Tím se sníží pozitivní náboj lyzinu a sníží se afinita histonu k DNA. Dochází k rozvolnění chromatinu, pokud dojde k rozvolnění v místě promotoru, mohou se zde navázat transkripční faktory a zvyšuje se transkripce konkrétního genu (Bannister & Kouzarides, 2011). Histondeacetyláza (HDAC) odstraňuje acetyl z lyzinu a tím obnovuje pozitivní náboj na histonu. Zesiluje se tak vazba mezi histonem a DNA, snižuje se transkripce daného genu (Bannister & Kouzarides, 2011). Dysbalance mezi HAT a HDAC ovlivňuje genovou expresi, vyskytuje se u určitých onemocnění včetně NAFLD a zasahuje do metabolismu buňky (Sodum et al., 2021). Proces acetylace a deacetylace histonů je uveden v Obrázku 5.



Obrázek 5 Acetylace a deacetylace histonů (převzato z Steunou et al., 2014)

2.2.1.1 Rozdělení histonacetyltransferáz

Na základě lokalizace v buňce jsou HAT rozděleny do dvou skupin. Skupina A se nachází v jádře a podílí se na regulaci genové exprese, skupina B se nachází v cytoplazmě (Van den Bosch et al., 2016). Skupina A se dále dělí do tří rodin na základě podobností v primární struktuře jednotlivých HAT na skupinu Ep300/CBP, MYST a GNAT. Do rodiny Ep300/CBP patří Ep300 a CBP. V rodině MYST se nachází například KAT5, Sas2 a Sas3. Do rodiny GNAT řadíme například KAT2B, HAT1, Elp3 a Hpa2 (Roth et al., 2001). HAT ve skupině A obsahují bromodoménu, která jim umožňuje rozeznat a navázat se na lyzinový zbytek histonu (Dhalluin et al., 1999). HAT ze skupiny B zajišťují acetylaci nově nasyntetizovaného histonu ještě před tím, než je importován z cytoplazmy do jádra. Do této skupiny se řadí HAT1, která se podílí na acetylaci lyzinu 5 a 12 na histonu H4. HAT1 je součástí komplexu s HAT2 (Roth et al., 2001).

2.2.1.2 Histonacetyltransferázy a NAFLD

Ep300 acetyluje lyzin 672 v transkripčním faktoru ChREBP (*Carbohydrate-responsive element-binding protein*) a tím zvyšuje jeho transkripční aktivitu zvýšením jeho afinity k promotorům v cílových genech. Zvýšená exprese ChREBP způsobuje inzulinovou rezistenci a podporuje jaterní lipogenezi, dlouhodobě zvýšená exprese ChREBP vede k jaterní steatóze a později k zánětu. Při zvýšené expresi Ep300 došlo u myši ke vzniku jaterní steatózy, také došlo ke zvýšení hladiny glukózy, inzulínu a TAG v plazmě. Po inhibici Ep300 pomocí SIK2 (*salt-inducible kinase 2*) došlo u myších modelů ke zlepšení NAFLD (Bricambert et al., 2010; Rodríguez-Sanabria et al., 2022). Zvýšená exprese Ep300 byla pozorována u lidského HCC. Expresi Ep300 lze využít jako

marker pro pacienty s HCC, zvýšená exprese Ep300 značí nepříznivou prognózu (Tian et al., 2013). Bylo zjištěno, že zvýšená acetylace laktátdehydrogenázy B (LDHB) na lyzinu 82, která je zprostředkována pomocí KAT2B, snižuje aktivitu LDHB. Zvýšená acetylace LDHB byla zaznamenána v játrech pacientů s NAFL a NASH i u myších modelů. Snížená aktivita LDHB vede ke snížené přeměně laktátu v játrech, což vede k jeho hromadění. Akumulace laktátu v játrech vede k zánětlivým reakcím a podporuje ukládání lipidů v játrech. Při podání inhibitoru KAT2B myším na vysokotučné dietě (HFD) došlo ke zlepšení NASH (Wang et al., 2021).

2.2.1.3 Rozdělení histondeacetyláz

Existuje 18 savčích HDAC, ty jsou rozděleny do 2 rodin (rodina histonových deacetyláz a rodina sirtuinů) na základě přítomnosti konzervované deacetylázové domény a jejich závislosti na specifických kofaktorech. Rodina deacetyláz je rozdělena na třídu I (HDAC 1, 2, 3 a 8), II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 a 10) a IV (HDAC11) na základě sekvenční podobnosti s kvasinkovými HDAC, zatímco sirtuiny (Sirt) tvoří třídu III. Třída II je dále rozdělena na podtřídu IIa (HDAC4, 5, 7 a 9) a IIb (HDAC6 a 10) na základě složení domén. Třídy I, II a IV mají ve svém katalytickém místě zinek. HDAC ze třídy I se nachází uvnitř jádra, kdežto HDAC třídy II se nachází v cytoplazmě i jádře. Třída III zahrnuje sirtuiny, které ve svém katalytickém místě zinek neobsahují, ale využívají NAD⁺ (nikotinamidadenindinukleotid) jako kofaktor (Fang & Han, 2021).

Některé HDAC jsou schopny odstraňovat acetylovou skupinu nejen z histonů, ale i z ostatních proteinů a tím se podílejí na posttranslační regulaci. Zapojují se tak do regulace metabolismu a jejich změny jsou asociovány s různými patologickými stavy a nemocemi, například s nádorovými, neurodegenerativními, imunologickými, metabolickými, zánětlivými a kardiovaskulárními onemocněními (Fu et al., 2021; Kim et al., 2022).

2.2.1.4 HDAC a NAFLD

NAFLD je provázena změnami v acetylaci histonů, tím dochází ke změnám exprese určitých genů a dochází i ke změnám metabolismu nejen v játrech. Hlavně změny v expresi genů, které regulují metabolismus lipidů, glukózy nebo se podílí na regulaci zánětu, mají velký vliv na vznik a progresi NAFLD. Nejvíce prostudované jsou změny v expresi různých HDAC a jejich vlivu na metabolismus (Sodum et al., 2021).

HDAC1

Kromě známé funkce inzulinu na lipogenezi v játrech zvyšuje inzulin expresi proteinu Snail1 prostřednictvím fosfatidylinositol-3-kinázy. Snail1 se váže na promotor

syntázy mastných kyselin a poté rekrutuje HDAC1 a HDAC2, a tím vyvolává deacetylaci histonů (H3K9 a H3K27), čímž se potlačí exprese lipogenních genů. Tím se sníží efekt inzulinu na jaterní lipogenezi. Dráha inzulin-Snail1 je však při obezitě narušena vlivem inzulinové rezistence (Fu et al., 2021). *In vivo* experiment na myších se zvýšenou expresí Snail1 prokázal snížení jaterní steatózy. Bylo také zjištěno, že v játrech obézních myší, kde byla interakce inzulinu se Snail1 narušena, docházelo k rozvoji jaterní steatózy (Liu et al., 2018).

HDAC2

HDAC2 se podílí na regulaci apoptózy hepatocytů, jejich proliferaci, regeneraci jaterní tkáně a vzniku fibrózy. U pacientů s jaterní fibrózou byla zaznamenána zvýšená exprese HDAC2 v jaterní tkáni. Zvýšená exprese HDAC2 byla zaznamenána i u pacientů s HCC, kde byla spojována s negativní prognózou. HDAC2 by se dala využít jako prognostický faktor u pacientů s tímto onemocněním (Liu et al., 2021). ROS regulují expresi HDAC2, se snížením ROS se sníží i exprese HDAC2 v hepatocytech. Tím dojde ke snížení deacetylace histonu H3, uvolní se místo promotoru monocytárního chemotaktického proteinu 1 (MCP-1), což zvyšuje jeho expresi. MCP-1 hraje roli v progresi NAFLD tím, že zvýší migraci monocytů do jater a tím dochází k podpoře zánětlivých procesů. Za fyziologických podmínek je exprese MCP-1 regulována pomocí HAT, jaderného faktoru- κ B (NF- κ B), TNF α a HDAC, ale při NAFLD je exprese MCP-1 nepřímo úměrná aktivitě HDAC2 (Fu et al., 2021).

HDAC3

Během hladovění HDAC3 potlačuje syntézu lipidů v játrech a podporuje glukoneogenezi. Při snížení HDAC3 dochází k potlačení β -oxidace mastných kyselin a k podpoře syntézy lipidů. Při nadměrné syntéze lipidů dochází k hromadění jejich meziproductů, jejichž kumulace v hepatocytech vede k lipotoxicitě, zvýšenému oxidačnímu stresu a zánětu, což podporuje vznik a progresi NAFLD (Fu et al., 2021). Delece jaterní HDAC3 u myší vede ke vzniku vážné NAFL a paradoxně zvyšuje citlivost tkání k inzulinu. Experimentálně zvýšená exprese HDAC3 u myší na HFD ale nepůsobila protektivně proti vzniku NAFL (Sun et al., 2012). Delece HDAC3 narušuje reparační mechanismy DNA. U myší s delecí jaterní HDAC3 došlo ke vzniku vážné jaterní fibrózy a vzniku HCC (Bhaskara et al., 2010).

HDAC5

HDAC5 hraje důležitou roli v regulaci lipogeneze. U obézních myší na HFD byla naměřena snížená exprese HDAC5. Snížená exprese HDAC5 zvyšuje transkripci

žaterního X receptoru (LXR). LXR se podílí na regulaci metabolismu lipidů tím, že se váže na promotor SREBP-1c a ChREBP a podporuje jejich expresi (Jia et al., 2016).

HDAC5 se také podílí na regulaci buněčného cyklu, apoptózy a proliferace buněk. Dysregulace HDAC5 byla zaznamenána u řady nádorových onemocnění. Zvýšená exprese HDAC5 byla zaznamenána v žaterní tkáni pacientů s HCC. Podání inhibitoru HDAC5 buněčným liniím HepG2, Hep3B a Huh7 vedlo k zastavení jejich proliferace. Potlačení HDAC5 podporuje apoptózu a navozuje G1 fázi u buněk HCC (Fan et al., 2014).

HDAC6

Změny ve střevní mikroflóře usnadňují vznik NAFLD. K narušení střevní mikroflóry dochází nevhodnou stravou nebo užíváním antibiotik. Nízké dávky antibiotik snižují tvorbu mastných kyselin s krátkým řetězcem, které inhibují HDAC6 a narušují funkci regulačních T-lymfocytů, to vede k zánětu ve střevech a nárůstu hmotnosti. Myši s delecí HDAC6 na HFD jsou náchylnější ke vzniku žaterní steatózy, vzniku hyperlipidemie a dochází u nich ke zvýšenému ukládání tuků oproti kontrolní skupině. (Lieber et al., 2019). HDAC6 dokáže deacetylovat FOXO1 (*Forkhead box protein O1*) a tím zvýšit jeho transkripci. FOXO1 je transkripční faktor, který hraje roli v regulaci glukoneogeneze, glykolýzy, inzulínové signalizace a adipogenezi tím, že snižuje transkripci PPAR γ . Inhibice HDAC6 u myši vede ke zvýšenému ukládání lipidů v játrech (Zhang et al., 2021).

HDAC8

Zvýšená hladina HDAC8 je spojována s karcinogenezí a progresí NAFLD. HDAC8 reguluje transkripci, ovlivňuje buněčný cyklus a vývoj buněk, u nádorových buněk podporuje tvorbu metastáz, lékovou rezistenci a brání detekci nádoru buňkami imunitního systému (Kim et al., 2022). Zvýšená exprese HDAC8 bývá spojována se vznikem a progresí rakoviny prsu, vaječníků, žaludku, plic, akutní myeloidní leukemie nebo neuroblastomu (Kim et al., 2022; Wu et al., 2013).

Na karcinogenezi HCC se HDAC8 podílí pomocí interakce s histonmetyltransferázou EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*), kdy společně potlačují Wnt antagonisty prostřednictvím trimetylace lyzinu 27 na histonu H3 a deacetylaci histonu H4. Tím dochází k inhibici apoptózy prostřednictvím p53/p21 a podporuje se proliferace buněk, která je aktivovaná signalizací β -kateninu. HDAC8 společně s EZH2 tedy usnadňují progresi NAFLD do HCC tím, že podporují dělení žaterních buněk a inhibují jejich apoptózu. Byly naměřeny zvýšené hladiny HDAC8, EZH2, SREBP-1 a aktivního β -kateninu v buňkách HCC spojeného s NAFLD. U modelů obézních myši

s HCC byla pozorována zvýšená acetylace histonu H4 a zvýšené množství enzymu HDAC8 v hepatocytech (Tian et al., 2015). Zvýšené hladiny HDAC8 mohou být ovlivněny různými transkripčními faktory. Například transkripční faktor SREBP-1 zvyšuje expresi HDAC8 a také podporuje syntézu mastných kyselin v játrech a tím přispívá k rozvoji NAFLD (Shao & Espenshade, 2012; Tian et al., 2015).

HDAC11

HDAC11 se podílí na regulaci metabolismu. U myši bez HDAC11 na HFD nedochází k rozvoji obezity, metabolického syndromu, hypercholesterolemie, inzulinové rezistence a NAFLD. HDAC11 reguluje energetický výdej pomocí termogeneze. Nižší hladiny HDAC11 zvyšují expresi UCP1 (*uncoupling protein 1*) v hnědé tukové tkáni a podporují přeměnu energie na teplo. Inhibitory HDAC11 by bylo potenciálně možné použít pro léčbu obezity a nemocí s obezitou spojených (Sun et al., 2018).

2.2.1.5 Sirtuiny a NAFLD

Sirt1 je agonistou PPAR α , jehož aktivace podporuje oxidaci lipidů, snížení hladin TAG a LDL a potlačení zánětu. Inhibicí Sirt1 došlo u myších modelů ke zvýšenému výskytu NAFLD, naopak aktivací Sirt1 u myši s NAFLD došlo ke snížení jaterní steatózy, zmírnění zánětu a omezení syntézy lipidů (Wang et al., 2017). Sirt1 inhibuje aktivitu NF- κ B, tím dojde k potlačení zánětlivé reakce. Delece jaterní Sirt1 u myši vede k podpoře zánětu, usnadnění vzniku NAFLD a zvýšení inzulinové rezistence (Lee et al., 2017).

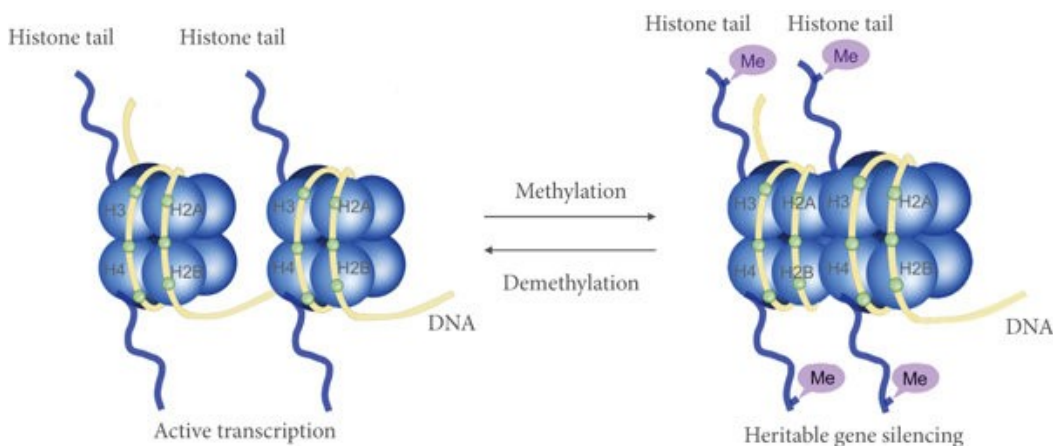
Sirt2 se podílí na regulaci lipidového metabolismu, zasahuje do syntézy lipidů, lipolýzy, diferenciaci adipocytů a β -oxidace. Bylo zjištěno, že pacienti s vyšším stupněm NAFLD, mají snížený jaterní Sirt2, oproti pacientům s nižším stupněm NAFLD. Myši s knock-outovaným Sirt2 na vysokotučné dietě měly závažnější steatózu a zánět, také měly zvýšené ALT a AST, oproti kontrolním myším na HFD. U myši na HFD se zvýšenou expresí Sirt2 došlo ke snížení jaterní steatózy a zánětu, také se u nich nevyskytla inzulinová rezistence. U myši na HFD s normální expresí Sirt2 byla inzulinová rezistence přítomná (Ren et al., 2021).

Sirt3 reguluje aktivitu mitochondriálních proteinů podílejících se na regulaci dýchacího řetězce a β -oxidace, tvorbě ATP a ROS. V porovnání s normálními myši na HFD, měly myši bez Sirt3 na stejné dietě větší výskyt steatózy jater, také měly sníženou aktivitu enzymů spojených s β -oxidací (Barroso et al., 2020).

2.2.2 Metylace histonů

K metylace histonů nejčastěji dochází na lyzinovém zbytku histonu H3 a H4 (Obrázek 6). Přenos metylové skupiny z S-adenosylmetioninu (SAM) na lyzinový zbytek histonu katalyzuje enzym histonmetyltransferáza (HMT). Lyzinové zbytky histonu se mohou vyskytovat ve třech formách – monometylované, dimetylované a trimetylované. Podle toho, na jakém lyzinovém zbytku se metylová skupina nachází, může dojít ke zvýšení genové exprese nebo k jejímu snížení. Pokud se metylace nachází na lyzinu 4, 36 nebo 79 histonu H3, dochází k zesílení genové exprese a rozvolnění chromatinu. Naopak při metylaci lyzinu 9 a 27 histonu H3 nebo lyzinu 20 histonu H4, dochází k potlačení genové exprese a ke kondenzaci chromatinu (Fang & Han, 2021).

Odstranění metylové skupiny z lyzinového zbytku na H3K4 katalyzuje enzym lyzin-specifická demethyláza (LSD1) (Fang & Han, 2021).



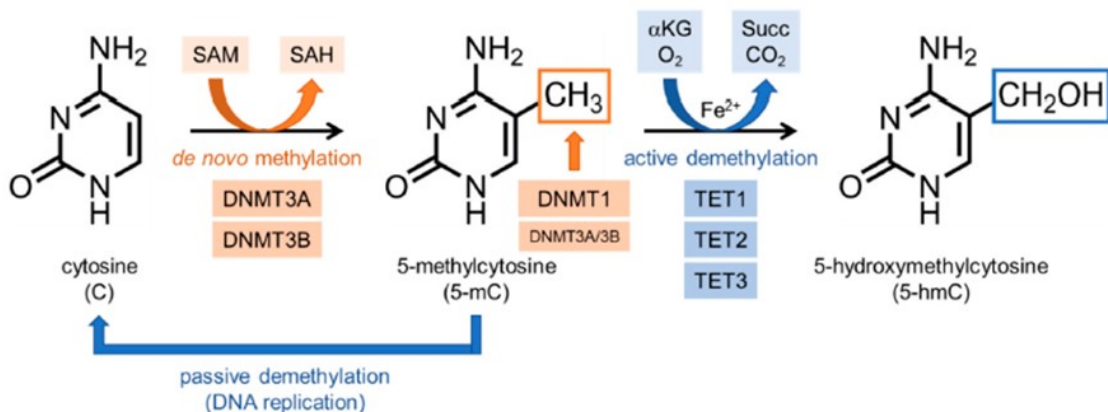
Obrázek 6 Methylace a demethylace histonů (převzato z Zhang et al., 2022)

2.2.3 Methylace a demethylace DNA

Methylace DNA je nejčastějším způsobem regulace genové exprese u eukaryotických buněk. Katalyzuje jí enzym DNA-metyltransferáza (DNMT), která přenáší metylovou skupinu z SAM na pátý uhlík cytosinu (5mc), odštěpením metylové skupiny z SAM vznikne S-adenosylhomocystein (SAH) (Rodríguez-Sanabria et al., 2022). K metylaci dochází nejčastěji v oblasti dinukleotidu CpG (cytosin-fosfát-guanin), tato oblast se také označuje jako CpG ostrůvky. Metylová skupina na CpG ostrůvcích fyzicky brání navázání transkripčních faktorů, nebo naopak podporuje navázání represorů. U lidí byli dosud identifikováni 4 členové DNMT rodiny – DNMT1, DNMT3A, DNMT3B a DNMT3L (Rodríguez-Sanabria et al., 2022). DNMT1 udržuje metylaci DNA, DNMT3B a DNMT3B zajišťují novou metylaci DNA (Lee et al., 2014).

Demethylaci DNA zajišťují enzymy skupiny *ten-eleven* translokázy (TET) do které patří TET1, TET2 a TET3, ty oxidují 5mc do tří izoform: 5 hydroxymetylcytosin (5hmC),

5-formylcytosin (5fC) a 5-karboxycytosin (5caC). 5fC a 5caC jsou rozeznány pomocí tymin-DNA-glykosylázy, ta hydrolyzou přeruší jejich N-glykosidickou vazbu. Odstraněný oxidovaný cytosin je následně nahrazen mechanismem BER (*base excision repair*) novým cytosinem (Sodum et al., 2021). Proces metylace a demethylace DNA je uveden v Obrázku 7.



Obrázek 7 Methylace a demethylace DNA (převzato z *Hyun & Jung, 2020*)

Množství metylovaných cytosinů se mění v průběhu vývoje jedince. V somatických buňkách dochází nejčastěji k metylaci v oblasti CpG ostrůvků, a to ve více než v 98 %. V embryonálních kmenových buňkách se až čtvrtina metylace DNA vyskytuje mimo oblasti dinukleotidu CpG. Během formování zygoty dochází k demethylaci většiny DNA. Methylace tedy hraje důležitou roli ve vývoji jedince a podílí se i na inaktivaci nadbytečného X chromosomu u samic savců a genomickém imprintingu (Jin et al., 2011). Podobně jako ostatní epigenetické změny, tak i změny v metylaci DNA byly pozorovány u různých onemocnění. Methylace DNA je ovlivnitelná životním stylem, pohybovou aktivitou, prostředím a stravou (Rodríguez-Sanabria et al., 2022).

2.2.3.1 Změny v metylaci DNA u NAFLD

Bylo zjištěno že změny v metylaci DNA ovlivňují jaterní funkci a metabolické procesy. Zejména změny metylace genů, které regulují transport lipidů, lipogenezi a β -oxidaci, vedou ke vzniku NAFLD (Vachher et al., 2022). Bylo pozorováno, že pacienti s NAFLD mají zvýšené hladiny SAH a homocysteinu a snížené hladiny SAM a metioninu, tento stav narušuje metylaci DNA. Také byla pozorována celková hypomethylace DNA v jaterní tkáni, která korelovala se závažností NAFLD a stupněm zánětu (Lai et al., 2020). Také bylo jisté, že u pacientů s NASH je v jaterní tkáni více metylovaný mitochondriální gen pro NADPH-dehydrogenázu-6 (MT-DN6) než u pacientů s NAFL. Zvýšená metylace genu se projevila sníženou expresí mRNA genu MT-DN6. Stupeň metylace koreloval se závažností NAFLD. Pacienti s NASH měli zvýšené hladiny DNMT1. Dále bylo zjištěno, že vlivem fyzické aktivity došlo ke snížení metylace genu

MT-DN6 (Pirola et al., 2013). Zvýšená metylace v oblasti promotoru pro gen PPARGC1A (*peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α*) výrazně koreluje s periferní inzulinovou rezistencí (Sookoian et al., 2010). Méně výrazná je korelace mezi metylací PPARGC1A a výskytem NAFLD (Vachher et al., 2022). Změny v metylaci DNA určitých genů byly pozorovány u pacientů s NAFLD. Jednalo se o geny kódující enzymy, které se podílejí na inzulinové signalizaci a metabolismu glukózy. V porovnání s kontrolní skupinou byly u pacientů s NAFLD pozorovány změny v metylaci DNA genů pro pyruvátkarboxylázu, ATP-citrátlyázu, fosfolipázu C gamma-1, inzulinu podobný růstový faktor 1, protein 2 vázající růstový faktor podobný inzulinu, proteinkinázu C epsilon, glutamátový receptor delta-1 a inositolhexafosfátkinázu 3 (Ahrens et al., 2013).

2.2.3.2 Vliv diety na metylaci DNA v buňkách hepatocytů

Dieta bohatá na cukry a tuky mění metylaci DNA v určitých oblastech. Změny v metylaci DNA zasahují oblasti regulačních genů pro metabolismus tuků, cukrů a genů podílejících se na regulaci zánětu. Ke zvýšené metylaci dochází v oblasti promotoru pro enzymy glykolýzy, konkrétně pro glukokinázu a jaterní izomer pyruvátkinázy. Oblasti promotoru pro enzymy jaterního metabolismu lipidů jsou zvýšeně metylovány u stearyl-CoA-desaturázu 1 a mikrosomálního triacylglycerolového transferového proteinu. Výrazněji metylovaná je i oblast promotoru pro leptin (Yoon et al., 2017). Strava bohatá na tuky způsobuje hypermetylacii promotoru pro PPAR α (Rodríguez-Sanabria et al., 2022). PPAR α podporuje β -oxidaci mastných kyselin v mitochondriích, jejich transport, podporuje jaterní glukoneogenezi (Soška, 2016). Hypermetylací tohoto genu dochází k jeho snížené expresi, což vede ke zvýšené kumulaci mastných kyselin v hepatocytech. Strava bohatá na fruktózu je také spojována s hypermetylací PPAR α , karnitin-palmitoyltransferázy 1A a celkovou hypometylací mitochondriální DNA (Ohashi et al., 2015). Promotor genu PPAR γ vykazuje oproti genu PPAR α sníženou metylaci u jedinců s T2DM, obezitou a NAFLD (Rodríguez-Sanabria et al., 2022).

2.2.4 MikroRNA

MikroRNA (miR) jsou krátké jednovláknové úseky RNA, které se podílejí na regulaci genové exprese, bývají dlouhé 21-25 nukleotidů. Vznikají transkripcí z vlastních genů nebo intronů (Ghafari-Fard et al., 2022). Jsou komplementární k mRNA, ale na rozdíl od mRNA nedochází k translaci miR do proteinu. Funkcí miR je se vázat na 3'-UTR oblast komplementární mRNA a znemožnit tak translaci této mRNA nebo způsobit její degradaci. Méně často miR interaguje s 5'-UTR, kódující sekvencí nebo s genovým promotorem. Podílí se tak na posttranskripční regulaci daného genu. Jedna mRNA může být regulována pomocí více miR a naopak jedna miR se může

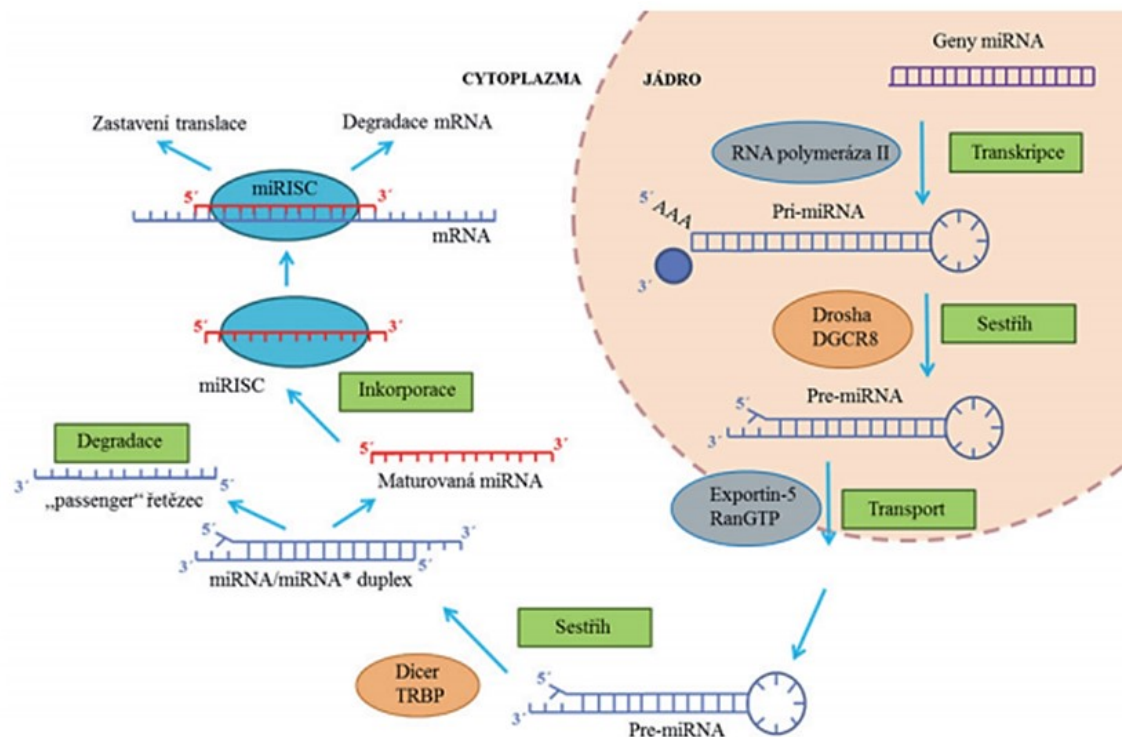
podílet na regulaci více mRNA. Za určitých podmínek může miR aktivovat genovou expresi (O'Brien et al., 2018).

Všechny jaderné buňky využívají miR k regulaci genové exprese, některé miR se vyskytují ve větším množství v konkrétních tkáních nebo bývají tkáňově či orgánově specifické. miR se podílejí na regulaci většiny buněčných procesů, jako je například buněčná diferenciaci, proliferace, přenos signálů, zánět, imunitní reakce a metabolismus. Některá onemocnění jsou provázena změnami v množství miR v buňce. miR mohou být pomocí exosomů vylučovány do extracelulárního prostoru, proto by je potencionálně šlo využít jako markerů určitých onemocnění. K uvolnění miR do extracelulárního prostoru dochází i po smrti buňky (Torres et al., 2018). Hladina miR v plazmě ale nemusí odrážet hladinu miR ve tkáni (Gjorgjieva et al., 2019).

miR dokáže interagovat i s jinými molekulami, než je mRNA, může se tak podílet na mezibuněčné komunikaci. Byly pozorovány interakce mezi miR a TLR buněk imunitního systému, miR byla produkována nádorovou buňkou a po navázání miR na TLR došlo k produkci cytokinů buňkou imunitního systému. Tyto cytokiny podporovaly proliferaci a metastatický potenciál buňky (Fabbri et al., 2013).

2.2.4.1 Biosyntéza miR

Počátek tvorby miR je podobný vzniku mRNA, vzniká transkripcí DNA pomocí RNA-polymerázy II/III. Většina miR vzniká přepisem z intronů, menší množství pak z vlastních genů. Pouhou transkripcí vznikne primární miR (pri-miRNA), která má strukturu vlásenky. Ta je dále zpracovávána pomocí mikroprocesorového komplexu, který se skládá z RNA-vázacího proteinu DGCR8 (*DiGeorge Critical Region 8*) a enzymu ribonukleázy III Drosha (Denli et al., 2004). Vzniká tak prekurzorová miR, která je exportována pomocí Exportinu 5 do cytoplazmy. V cytoplazmě je štěpena pomocí RNázy Dicer a vzniká zralá jednovláknová miR. Ta se s multiproteinovým komplexem RISC (*RNA-induced silencing complex*) a s rodinou proteinů Argonaut podílí na umlčování genů (MacFarlane & Murphy, 2010) (Obrázek 8).



Obrázek 8 Biogeneze miRNA (převzato z Vlahová et al., 2014)

2.2.4.2 miR a NAFLD

Při NAFLD dochází ke změně v expresi miR podílejících se na regulaci lipogeneze, transportu lipidů krví, exportu lipidů z jater, inzulinové signalizace, metabolismu cholesterolu, oxidaci lipidů nebo zánětu (Gjorgjieva et al., 2019). Spousta studií poukázala na to, že změny v expresi určitých miR v játrech vedou k narušení jejich metabolismu, to má za následek NAFLD, inzulinovou rezistenci nebo nádorová onemocnění jater (Calo et al., 2016).

miR-16

miR-16 je spojována s jaterní fibrózou a hepatokarcinogenezí. Dysregulace miR-16 způsobuje zvýšenou expresi *Gα12* (*guanine nucleotide-binding α-subunit 12*) v Itoových buňkách. *Gα12* stimuluje autofagii u Itoových buněk a podporuje vznik fibrózy (Kim et al., 2018). Zvýšené hladiny miR-16 byly pozorovány u pacientů s NAFLD v porovnání se zdravými jedinci. Hladiny miR-16 korelují se závažností NAFLD, proto by miR-16 šla využít jako marker stupně NAFLD (Dongiovanni et al., 2018).

miR-21-5p

miR-21-5p je vysoce exprimovaná v játrech, podílí se na regulaci glukoneogeneze a ovlivňuje citlivost jaterní tkáně k inzulinu. V ostatních tkáních je zvýšená exprese miR-21-5p pozorována při zánětu, fibrotizaci tkáně a karcinogenezi.

Za fyziologických podmínek je miR-21-5p málo aktivní, při patologickém stavu, jako je například NAFLD, inzulinová rezistence, obezita nebo jiná metabolická onemocnění jater, se aktivita miR-21-5p zvyšuje. U pacientů s NAFLD byly zaznamenány vyšší hladiny miR-21-5p v plazmě, ty jsou také zvýšené u pacientů s obezitou, HCC nebo cholangiogenním karcinomem. Bylo zjištěno, že delece miR-21-5p nemá u myší na normální dietě žádný vliv, ale u myší na HFD zlepšuje citlivost tkáně k inzulinu, jaterní steatózu a snižuje množství tukové tkáně (Calo et al., 2016).

miR-29

miR-29 reguluje množství TAG a cholesterolu v krevním řečišti. miR-29 se také podílí na regulaci inzulinové rezistence spojené s NAFLD. Snížená exprese jaterní miR-29 tlumí jaterní *de novo* lipogenezi. Hladiny miR-29 jsou v játrech obézních myší na HFD výrazně zvýšené. Byly zaznamenány snížené hladiny miR-29a a miR-29b v séru pacientů s NAFLD, hladiny miR-29c byly nezměněné. miR-29a a miR-29b by tak šly využít jako marker NAFLD (Hung et al., 2019; Jampoka et al., 2018).

miR-33a

Sekvence kódující miR-33 se nachází v intronu pro SREBP2 a SREBP1, ty se podílejí na regulaci metabolismu cholesterolu a mastných kyselin. miR-33 se také podílí na regulaci metabolismu cholesterolu a mastných kyselin tím, že inhibuje genovou expresi ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter*) a ABCG1 (*ATP-binding cassette sub-family G member 1*), ty kódují proteiny, které se podílejí na transportu cholesterolu (Rayner et al., 2010). Aplikace inhibitoru miR-33 snížila u myší vznik obezity a aterosklerózy (Gjorgjieva et al., 2019). Zvýšené hladiny miR-33a v hepatocytech a plazmě, byly naměřeny u pacientů s NAFLD. Pacienti s NASH měli hladiny miR-33a oproti pacientům s NAFL zvýšené (Vega-Badillo et al., 2016).

miR-34a

miR-34a se podílí na regulaci metabolismu lipidů tím, že interaguje s PPAR α a se Sirt1, dochází tak k omezení degradace mastných kyselin. Exprese miR-34a v hepatocytech je nízká, ale u pacientů s NAFLD se její exprese v játrech zvyšuje a zvýšené jsou i její hladiny v plazmě, které korelují s progresí nemoci (Gjorgjieva et al., 2019; Hochreuter et al., 2022).

miR-122

V játrech je nejvíce exprimovaná miR-122, která tvoří až 70 % všech exprimovaných miR v jaterní tkáni. Inhibicí miR-122 dochází ke zvýšené β -oxidaci,

snížené akumulaci TAG v hepatocytech, snížené syntéze cholesterolu. U pacientů s NAFLD je exprese miR-122 v hepatocytech snižena, ale hladina cirkulující miR-122 je zvýšená, což je nejspíš způsobeno poškozením hepatocytů (Gjorgjieva et al., 2019). miR-122 by šla teoreticky použít jako marker pro jaterní steatózu a také pro určení jejího stupně, protože hladiny miR-122 v séru korelují se stupněm jaterní steatózy. Hlavní nevýhodou tohoto markeru je fakt, že se jeho hladina v séru zvyšuje při poškození hepatocytů, které může být způsobeno například nádorovým onemocněním nebo hepatitidou B a C (Yamada et al., 2013).

miR-200a a miR-200b

Bylo pozorováno, že myši na HFD s NAFLD mají sníženou expresi miR-200a a miR-200b v játrech oproti myším na normální dietě. miR-200a a miR-200b regulují expresi HMGB1 (*high-mobility group box 1*) na posttranskripční úrovni tím, že se váží na 3'-UTR jeho mRNA a tím snižují jeho expresi. HMGB1 je prozánětlivý cytokin. Snížená exprese miR-200a a miR-200b vede ke zvýšené expresi HMGB1, tím dochází k podpoře zánětlivých procesů v játrech a usnadnění progresu NAFL do NASH (Chen et al., 2018).

miR-451

miR-451 se podílí na regulaci cholesterolu a mastných kyselin v játrech. Hladina miR-451 v séru pacientů s NAFLD je zvýšená, hladina koreluje se stupněm NAFLD, ale ne statisticky významně. miR-451 by šla využít jako biomarker NAFLD (Yamada et al., 2013).

3 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo:

- Stanovit expresi mRNA vybraných genů a vybraných miR pomocí RT-qPCR v jaterní tkáni *in vivo* myších modelů NAFLD
- Stanovit expresi proteinů vybraných histondeacetyláz pomocí imunoblotu v jaterní tkáni *in vivo* modelů
- Statisticky vyhodnotit změny v expresi mRNA a miR mezi skupinami *in vivo* modelů NAFLD
- Statisticky vyhodnotit vliv léčby u skupin *in vivo* modelů NAFLD na expresi vybraných mRNA a miR

4 Experimentální část

4.1 Biologický materiál a použité zvířecí modely

Pro praktickou část byly použiti myši samci kmene MNRI, kteří byli rozděleni do deseti skupin, přehled skupin a jejich označení jsou uvedeny v tabulce 1. Ve věku dvou měsíců se myším začala podávat předepsaná dieta po dobu pěti měsíců. Myši byly buď na standardní dietě (STD) nebo na dietě s vysokým obsahem tuků, fruktózy a cholesterolu (FFC). Standardní dieta obsahovala 8 % tuku (VELAZ), FFC dieta obsahovala 44 % kcal tuku, 22 % fruktózy a 1,8 % cholesterolu (Research Diets, D16010101). Myším v šesti skupinách byla od druhého den po narození po dobu 7 dní aplikována s.c. injekce glutamátu sodného (MSG) (4 mg/g (roztok 10 g/50 ml, injekce 50 µl/myš). Aplikace MSG poškodí leptinové receptory v *nucleus arcuatus* v hypotalamu (Dawson et al., 1997). Kontrolním myším (K) bylo pro vyvolání stejného stresu aplikováno stejné množství fyziologického roztoku. Určeným myším byl poslední měsíc denně podáván lék liraglutid (LIRA) nebo LipR31 (palm11-PrRP31, LiPR). LiPR je anorexigenní neuropeptid, který má antiobezitní účinek, snižuje příjem potravy. Tato látka byla vyvinuta na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky skupinou Dr. Maletínské. Oba léky byly myším podávány s.c., LIRA v množství 0,2 mg/kg a LiPR 5 mg/kg. Ostatním myším byl stejným způsobem podán fyziologický roztok. Ve skupině K STD bylo 5 myší, ostatní skupiny byly po 6 myších. Po skončení léčby byla myším vyjmuta játra, která byla použita k analýze.

Tabulka 1 Seznam skupin myší, jejich diety, léčby, aplikace MSG a jejich označení.

Označení skupiny	Dieta	Aplikace MSG	Léčba
K STD	Standardní	Ne	Ne
K FFC	S vysokým obsahem tuku, fruktózy a cholesterolu	Ne	Ne
K FFC LiPR	S vysokým obsahem tuku, fruktózy a cholesterolu	Ne	LipR31
K FFC LIRA	S vysokým obsahem tuku, fruktózy a cholesterolu	Ne	Liraglutid
MSG STD	Standardní	Ano	Ne
MSG STD LiPR	Standardní	Ano	LipR31
MSG STD LIRA	Standardní	Ano	Liraglutid
MSG FFC	S vysokým obsahem tuku, fruktózy a cholesterolu	Ano	Ne
MSG FFC LiPR	S vysokým obsahem tuku, fruktózy a cholesterolu	Ano	LipR31

MSG FFC LIRA	S vysokým obsahem tuku, fruktózy a cholesterolu	Ano	Liraglutid
--------------	---	-----	------------

4.2 Izolace RNA

Uvnitř buněk se nachází RNA ve formě mRNA, miR, rRNA a tRNA. Nejvíce je zastoupená rRNA, která tvoří 80-90 % celkové RNA, mRNA představuje 2,5-5 %, zbytek připadá na tRNA a miR. RNA je oproti DNA nestabilní a může být degradována RNázami, které se hojně vyskytují v okolním prostředí. Je proto důležité při práci s RNA dodržovat čistotu, používat rukavice, pracovat v laminárním boxu, používat vodu ošetřenou dietylpyrokarbonátem (DEPC) a vyhnout se kontaminaci vzorku RNázou (Tan & Yiap, 2009).

Izolace RNA byla prováděna pomocí TRIzolu, což je směs fenolu a guanidinisotiokyanátu. Při větším množství biologického materiálu je potřeba vzorek homogenizovat, aby bylo možné vyizolovat co největší množství RNA z tkáně. Po homogenizaci se ke vzniklému homogenátu přidá chloroform, který způsobí separaci vodné a organické fáze. Kyselé pH TRIzolu umožňuje separaci RNA a DNA (Tan & Yiap, 2009). V organické fázi se nacházejí proteiny, v mezifázi DNA a ve vodné fázi se nachází RNA. Vodnou fázi lze přečistit opětovným přidáním chloroformu, lze se tak zbavit zbytků fenolu a proteinů. Přidáním isopropanolu a centrifugací vodné fáze dochází k precipitaci RNA. Precipitací vznikne peleta RNA, kterou je nutné rehydratovat (Rio et al., 2010).

4.2.1 Použité reagensie

- TRIzol
- Chloroform
- Isopropanol
- 75% ethanol
- DEPC H₂O – redestilovaná voda (ddH₂O) ošetřená DEPC v poměru 1 l ddH₂O a 1 ml DEPC

4.2.2 Pracovní postup

Do 1,5 ml mikrozkuřavky se vzorkem jaterní tkáně a odměřkou kuliček bylo přidáno 0,5 ml TRIzolu. Tkáň byla homogenizována v kuličkovém homogenizátoru rychlostí 7 m/s po dvou 20 s intervalech. Poté se vzorek nechal 5 minut stát při laboratorní teplotě. Ke vzorku bylo přidáno 100 µl chloroformu a směs byla 15 s intenzivně protřepávána v ruce. Směs se nechala 2-3 minuty stát při laboratorní teplotě. Vzorek byl poté centrifugován 15 minut při 12 000×g v centrifuze vychlazené

na 4 °C. Horní vodná fáze, která obsahuje RNA, byla opatrně přepipetována do nové 1,5 ml mikrozkušavky, následně k ní bylo přidáno 250 µl isopropanolu, směs byla promíchána a nechala se při laboratorní teplotě 10 minut stát. Vzorek byl opět centrifugován po dobu 10 minut při 12 000×g a při teplotě 4 °C. Následně byl opatrně supernatant odstraněn tak, aby nedošlo i k odstranění pelety RNA. Peleta byla omyta 1 ml 75% etanolu, protřepána v ruce a znovu centrifugována 5 minut při 7 500×g a 4 °C. Supernatant byl odpipetován a peleta se nechala zhruba 10 minut usušit na vzduchu. Následně byla peleta podle velikosti rozpuštěna v 60, 90 nebo 120µl DEPC vody. Po důkladném promíchání se vzorek nechal 5 minut stát při laboratorní teplotě, poté byl znovu promíchán a uložen na led.

Koncentrace a čistota vyizolované RNA byla měřena pomocí spektrofotometru Tecan Spark na specializované měřící destičce. Nejdříve byly do jamky destičky napipetovány 2 µl ddH₂O a změřeny jako blank. Následně byly do stejných jamek destičky napipetovány 2 µl vzorků. Koncentrace RNA ve vzorku byla změřena na základě absorbance vzorku při vlnové délce 260 nm. Pro vyloučení kontaminace vzorku proteiny byla absorbance vzorku změřena při 280 nm. Absorbance RNA byla dána do poměru s absorbancí proteinů, poměr by měl být vyšší než 1,8. Pro vyloučení kontaminace vzorku fenolem, byla absorbance RNA vzorku porovnána s absorbancí fenolu při 230 nm, tento poměr by se měl blížit hodnotě 2. Po stanovení koncentrace RNA ve vzorku, byl vzorek buď uložen do hlubokomrazicího boxu (-80 °C) nebo rovnou ošetřen DNázou.

4.3 Ošetření DNázou

Z důvodu možné kontaminace vzorku genomovou DNA se provádí ošetření deoxyribonukleázou (DNáza), která přítomnou DNA degraduje. DNázu je nutné na konci ošetření inaktivovat, aby nedegradovala vznikající cDNA při reverzní transkripci.

4.3.1 Použité reagenty

- DEPC H₂O
- 0,1 M EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová), pH 8,0
- DNáza
- DNázový pufr

4.3.2 Pracovní postup

Do 0,5 ml mikrozkušavek bylo napipetováno takové množství vyizolované RNA, které odpovídalo 10 µg RNA. Do mikrozkušavky byla přidána DEPC H₂O do objemu

26 μL . Nakonec byly do reakční směsi přidány 4 μl naředěné DNázy, ta byla připravena smícháním DNázy a DNázového pufru v poměru 1:3. Takto připravená reakční směs byla zvortexována a zcentrifugována při nízkých otáčkách, následně se reakční směs nechala 25 minut inkubovat v termomixeru při teplotě 37 °C s třepáním 500 rpm. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 1,5 μl 0,1 M EDTA a po zvortexování a zcentrifugování byla směs znovu inkubována v termomixeru při 75 °C po dobu 10 minut, aby došlo k inaktivaci DNázy. Vzorky byly vyndány do ledu a bylo do nich napipetováno 18,5 μl DEPC H₂O. Celkový objem takto připravených vzorků byl 50 μl a koncentrace RNA v nich byla 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Vzorky byly následně uchovávány při teplotě -80 °C.

4.4 Reverzní transkripce

Reverzní transkripcí je RNA přepsána do komplementární DNA (cDNA), ta je oproti RNA stabilnější a lépe se s ní pracuje. Pro přepis se používá enzym reverzní transkriptáza, což je RNA-dependentní DNA-polymeráza. Bez primeru není schopna reverzní transkriptáza začít syntetizovat cDNA. Primery jsou krátké oligonukleotidy, které jsou komplementární ke krátkému úseku templátové RNA. STEM-Loop RT primery jsou používány pro přepis miR do cDNA. Pokud je naší templátovou molekulou mRNA, používá se směs náhodných hexamerů, což jsou oligonukleotidy skládající se ze 6 náhodných bazí.

4.4.1 Použité reagensy

- Reverzní transkriptáza - ProtoScript II
- Reakční pufr
- Ditiotritol (DTT)
- Směs dNTPs 5 mM
- DEPC H₂O
- Náhodné hexamery
- STEM-Loop RT primery (Tabulka 6)

4.4.2 Pracovní postup

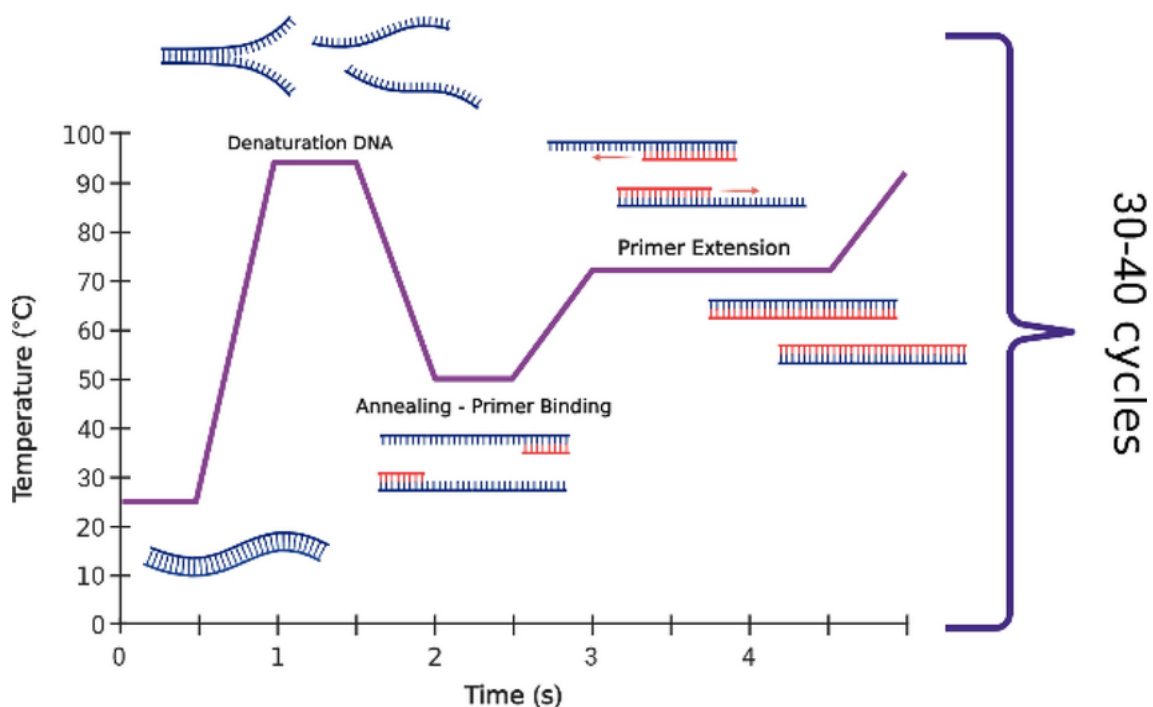
Pro reverzní transkripci mRNA bylo do příslušných mikrozkuvek napipetováno 5 μl vzorku RNA o koncentraci 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 1 μl náhodných hexamerů. Po důkladném promíchání byly vzorky vloženy do termocykléru a na 5 minut zahřáty na 65 °C. Po 5 minutách byly vzorky z termocykléru vyjmuty a umístěny do chladícího stojánku. Ke každému vzorku bylo pipetováno 14 μl mastermixu, který obsahoval 4 μl pufru, 2 μl DTT, 2 μl dNTPs, 0,5 μl reverzní transkriptázy a 5,5 μl DEPC H₂O. Vzorky byly důkladně

promíchány a vloženy zpět do termocykléru, kde byly 10 minut zahřívány na 25 °C, pak 50 minut na 42 °C (syntéza cDNA) a nakonec 5 minut na 85 °C (denaturace reverzní transkriptázy). Výsledná cDNA byla zředěna 180 µl ddH₂O. Vzorky cDNA byly uchovávány při –20 °C.

Pro reverzní transkripci miR byl postup téměř stejný, lišil se jen v tom, že místo náhodných hexamerů byl použit multiplex 10 STEM-Loop RT primerů. Pro přípravu multiplexu bylo smícháno 7 µl každého RT primeru pro určitou miR. Směs byla promíchána na vortexu a stejně jako u mRNA byl pipetován 1 µl multiplexu k 5 µl vzorku RNA. Zbytek postupu byl totožný, jako u mRNA.

4.5 Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR)

Metoda se používá pro kvantifikaci DNA, oproti klasické PCR dochází k monitorování množství amplifikované DNA během každého cyklu. PCR probíhá ve třech krocích - denaturace, hybridizace a polymerace. Denaturace probíhá při zahřátí na 95 °C, při této teplotě dochází k rozvolnění vodíkových můstků a k rozdělení dvoušroubovice DNA na dvě jednovláknové DNA (ssDNA). Ochlazením na 60 °C dochází k obnovení vodíkových můstků, na příslušnou sekvenci ssDNA se může navázat primer. Pouze na místo, kde je na ssDNA navázaný primer, se může navázat DNA-polymeráza. Nejpoužívanější DNA-polymerázou je Taq DNA-polymeráza, jejíž teplotní optimum je 72 °C, nicméně vykazuje stabilitu i při teplotách nad 110 °C. Po navázání na primer syntetizuje Taq DNA-polymeráza vlákno z dNTPs ve směru od 5' k 3' konci, vzniklé vlákno je komplementární k templátové DNA. Tyto tři kroky se opakují obvykle ve 25 až 40 cyklech. Schéma průběhu PCR je uvedeno na Obrázku 9. K detekci dochází mezi fází polymerace a denaturace (Joshi & Deshpande, 2011).



Obrázek 9 Schéma průběhu PCR (převzato z Ľnce et al., 2023)

Pro detekci se nejčastěji používá fluorescenční barvivo nebo značené sondy. Fluorescenčním barvivem je například SYBR Green. SYBR Green je interkalační barvivo, které se nespecificky váže na dvouřetězcové struktury (DNA) a fluoreskuje pouze, pokud je navázáno. Tudíž nehrozí interference způsobená nenavázaným barvivem. K interferenci však může dojít, pokud se barvivo naváže na dvojici primerů, které jsou k sobě komplementární nebo vytvoří strukturu vlásenky. Přístroj zaznamenává intenzitu fluorescence. Intenzivnější fluorescence značí větší množství amplifikované DNA v jamce. Značené sondy se na rozdíl od fluorescenčního barviva váží na místo o specifické sekvenci. Patří mezi ně například TaqMan sondy, FRET sondy nebo Scorpion sondy (Ma et al., 2021).

Kvantitativním výsledkem RT-qPCR je hodnota C_t (*cycle of threshold*), tato hodnota udává, v kolikátém cyklu přesáhla intenzita fluorescence práh pozadí. Čím větší je počáteční množství templátové DNA v jamce, tím menší je hodnota C_t .

Při porovnávání změn v expresi studovaných genů se naměřené výsledky porovnávají s referenčními geny. Pro tyto účely se nejčastěji používají tzv. housekeeping geny, které jsou součástí základních metabolických pochodů a jejichž exprese zůstává neměnná (Maddocks & Jenkins, 2017).

4.5.1 Použité reagensie

- SG mix (Xceed PCR SG 2x Mix Lo-ROX-Biotech) obsahuje SYBR Green I, DNA-polymerázu, dNTPs a pufr

- Specifické F (forward) a R (reverse) primery pro mRNA (Tabulka 7)
- Specifické F primery pro miR (Tabulka 6)
- Univerzální R primer pro miR (Tabulka 8)
- ddH₂O

4.5.2 Pracovní postup

Pro RT-qPCR analýzu cDNA, vzniklé přepisem z mRNA, byl připraven mastermix tak, aby 5 µl mastermixu obsahovalo 3,5 µl SG mixu, 0,28 µl směsi specifického F a R primeru a 1,22 µl ddH₂O. Pro detekci cDNA, vzniklé přepisem z miR, byl mastermix připraven obdobně, rozdílem bylo pipetování 0,14 µl specifického F primeru a 0,14 µl univerzálního R primeru. Do jamek 384-jamkové destičky bylo napipetováno 5 µl mastermixu a 2 µl cDNA v duplikátech, negativní kontrola obsahovala místo cDNA ddH₂O. Po napipetování byla destička přikryta fólií, zamíchána na vortexu a stočena v centrifuze. Pro provedení RT-qPCR byl použit přístroj QuantStudio 6. Destička byla vložena do přístroje, kde byla ve 40 cyklech zahřívána na 95 °C a ochlazována na 60 °C pro denaturaci, hybridizaci a polymeraci. V každém cyklu přístroj zaznamenal fluorescenci v každé jamce.

4.6 Imunoblot

Imunoblot je analytická technika používaná k detekci specifického proteinu v biologickém materiálu. K separaci proteinů podle molekulové hmotnosti se využívá polyakrylamidová gelová elektroforéza. Takto rozdělené proteiny jsou z gelu přeneseny na membránu, kde jsou následně inkubovány s primární protilátkou, která je namířená proti hledanému proteinu, následuje inkubace se sekundární protilátkou, ta je namířená proti primární protilátce. Sekundární protilátka je značená a lze ji detekovat. Při kvantifikaci je vhodné použít housekeeping protein jako nanášecí kontrolu. Expres housekeeping proteinu by měla být neměnná, pokud detekujeme u vzorků různou intenzitu tohoto proteinu, byly nejspíš jednotlivé vzorky nanášeny v různém množství, nebo došlo k nerovnoměrnému přenosu proteinu z gelu na membránu. Nanášecí kontrolu lze tak použít k normalizaci výsledků (Yang & Mahmood, 2012).

4.6.1 Použité reagensie

- Elektrodový pufr – smícháno 100 ml 10x Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad) s 900 ml ddH₂O. Výsledná koncentrace 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3.

- 0,1 M TRIS pufr, pH 8,0 – 12,11 g TRISu rozpuštěno v 800 ml ddH₂O, pH upraveno na 8,0 pomocí 4 M HCl a doplněno ddH₂O do 1000 ml
- 10% APS – 10 mg persíranu amonného rozpuštěno v 100 µl ddH₂O
- Primární protilátky (Abcam) – HDAC3 naředěny v poměru 1 : 10 000 v 5% bovinním sérovém albuminu (BSA) a 0,5% TBST (tris-buffered saline, Tween), HDAC8 naředěna v poměru 1 : 5 000 v 5% BSA a 0,5% TBST
- Sekundární protilátka (Abcam) – anti-rabbit, naředěna v poměru 1 : 10 000 v 1% BSA a 0,1% TBST
- Blotovací pufr – smícháno 100 ml 10x Tris/Glycine Buffer (Bio-Rad) s 200 ml metanolu a 700 ml ddH₂O. Výsledná koncentrace byla 25 mM Tris, 192 mM glycin a 20% (w/v) metanol, pH 8,3
- TBST – 8,77 g NaCl rozpuštěno v 300 ml ddH₂O, přidán 1 mL (pro 0,1% TBST) nebo 5 ml (pro 0,5% TBST) Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufru o pH 8,0. Doplněno do 1000 ml ddH₂O.
- TEMED (Tetrametyletylendiamin) (Sigma-Aldrich)
- Kit pro výrobu gelů – TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 7,5% (Bio-Rad)
- 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad)
- Sušené mléko – Skim Milk Powder (Millipore)
- Detekční činidlo – Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent (Cytiva)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich)
- 4xSDS vzorkový pufr (Tabulka 2)
- Složení lyzačního pufru (Tabulka 3)

Tabulka 2 Složení 4xSDS vzorkového pufru

Složka (konečná koncentrace)	Koncentrace zásobního roztoku	Přidávané množství
200 mM Tris/HCl pH 6,8	1 M	4 ml
40 % glycerol	85 %	9,41 ml
6 % SDS	prášek	1,2 g
0,2 M DTT	prášek	0,617 g
0,1 g bromfenolová modř	prášek	špetka
ddH ₂ O		20 ml

Tabulka 3 Složení lyzačního pufru

Složka (konečná koncentrace)	Koncentrace zásobního roztoku	Přidávané množství
50 mM Tris/HCl pH 7,4	1M	50 ml
150 mM NaCl	prášek	8,766 g
10% glycerol	85%	117,65 ml
1% Triton X-100	100%	10 ml
2 mM EDTA	prášek	0,58 g
2 mM EGTA	prášek	0,76 g
40 mM β -glycerolfosfát	prášek	8,52 g
50 mM fluorid sodný	prášek	2,09 g
10 mM pyrofosfát sodný	prášek	4,46 g
2 mM dithiotreitol	prášek	0,3085 g
200 μ M Na ₃ VO ₄	prášek	0,03678 g
ddH ₂ O		doplněno do objemu 1 l

4.6.2 Příprava vzorku pro imunoblot

Do 1,5 ml mikrozkušavky s 300 ml lyzačního pufru byl vložen kousek jaterní tkáně. Tkáň byla zhomogenizována pomocí kuličkového homogenizátoru. Vzniklý homogenát se ponechal 20 minut stát na ledu, následně byl 10 minut centrifugován při 13 000 otáčkách při 4 °C. Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky. Koncentrace proteinu byla změřena bicinchoninovou metodou (BCA). Metoda je založena na principu redukce měďnatých iontů proteinem v alkalickém prostředí, vzniklý měďný iont je chelátován kyselinou bicinchoninovou za vzniku barevného komplexu, který vykazuje absorpenci při vlnové délce 562 nm (Wrolstad et al., 2004).

4.6.3 Příprava polyakrylamidového gelu

Sklo, sklo s 1 mm spacerem a hřeben byly důkladně omyty saponátem, ddH₂O, lihometanolem. Po oschnutí byla skla přiložena k sobě tak, aby mezi nimi vznikl 1 mm široký prostor pro gel, následně byla skla spojena sponami. Spojená skla byla položena a následně důkladně přitlačena na gumovou podložku v nalévacím stojánku. Gel se skládá ze dvou částí, separačního a zaostřovacího gelu. Spodní část gelu je tvořena separačním gelem, ten obsahuje 7,5 % polyakrylamidu, póry tohoto gelu jsou menší, použité reagensy jsou uvedeny v tabulce 4. Zaostřovací gel tvoří horní část gelu, má větší póry a obsahuje 4 % polyakrylamidu, použité reagensy jsou uvedeny v tabulce 5. Pro výrobu gelu byl použit TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 7,5%. Separací

gel byl vyroben napipetováním resolveru A a resolveru B do kádinky na magnetické míchače, přidáním 10% APS a TEMEDu se zahájila polymerace, a tak se směs pro separační gel musela rychle pipetovat do prostoru mezi skly. Obdobně byla připravena i směs pro zaostřovací gel, který byl pipetován na separační gel po horní okraj. Do vrchní části gelu byl zešikma vložen hřebek pro tvorbu jamek. Gel se nechal cca 30-45 minut polymerovat. Gel se skly byl vyjmut z nalévacího stojánku a opláchnut destilovanou vodou.

Tabulka 4 Reagencie použité pro výrobu separačního gelu

Separací gel (spodní) 7,5% 1mm	Pipetované množství pro 1 gel
Resolver A	2,5 ml
Resolver B	2,5 ml
APS 10%	25 μ l
TEMED	2,5 μ l

Tabulka 5 Reagencie použité pro výrobu zaostřovacího gelu

Zaostřovací gel (horní) 4% 1mm	Pipetované množství pro 1 gel
Stacker A	0,875 ml
Stacker B	0,875 ml
APS 10%	8,75 μ l
TEMED	1,75 μ l

4.6.4 Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu

Podle koncentrace proteinů ve vzorku byly vzorky naředěny tak, aby měly výslednou koncentraci proteinů 1 μ g/ μ l. Pro přípravu naředěného vzorku o celkovém objemu 400 μ l bylo smícháno 100 μ l 4x SDS, potřebné množství vzorku a lyzačního pufru. Pro přípravu 80 μ l molekulového standardu bylo smícháno 8 μ l 10x koncentrovaného molekulového standardu, 18 μ l 4x Laemmli pufru a 54 μ l lyzačního pufru.

Před zahájením elektroforézy bylo potřeba naředěné vzorky denaturovat zahřátím na 95 °C po dobu 5 minut v termobloku. Z gelu ve sklech byl opatrně vyjmut hřebek. Skla s gelem byla vložena do stojanu na elektroforézu a byla zajištěna sponami tak, aby delší skla byla na vnější straně. Stojan byl vložen do elektroforetické vany. Nejdříve byl nalit elektrodový pufr do vnitřního elektrodového prostoru, aby se zjistilo, zda gely podtékají. Pokud nebylo pozorováno podtékání gelů, byl elektrodový pufr nalit i do vnějšího elektrodového prostoru po značku. Do krajních jamek gelu bylo pipetováno 20 μ l molekulového standardu, do vnitřních jamek bylo pipetováno 20 μ l vzorku

v duplikátech. Elektroforetická vana byla přiklopena víkem a připojena ke zdroji. Bylo nastaveno konstantní napětí 150 V. Po 30-45 minutách byla elektroforéza ukončena. Horní část gelu s jamkami a spodní část gelu s neseparovanými proteiny byla odříznuta, gel byl připraven na blotování.

4.6.5 Blotování

Před blotováním bylo potřeba nitrocelulóзовou membránu, dva kusy filtračního papíru a separační gel z elektroforézy ponechat pár minut inkubovat v blotovacím pufru. Veškerá manipulace s gelem a membránou byla provedena v rukavicích. Blotování bylo provedeno v přístroji Trans Blot Turbo Transfer system (BioRad). Do kazety přístroje se nejdříve položil filtrační papír, na něj byla položena membrána, následně byl na membránu položen gel a uhlazen tak, aby mezi ním a membránou nezůstaly bublinky, nakonec byl položen druhý filtrační papír. Kazeta byla uzavřena a následně vložena do přístroje, který byl nastaven na napětí 25 V a proud 1,3 A na 20 minut. Po transferu byly označeny bandy molekulového standardu, poté byla membrána přenesena do plastové krabičky, ve které byla 3x opláchnuta ddH₂O. Pro kontrolu transferu byla membrána 3 minuty barvena pomocí Ponceau S v 0,5% kyselině octové. Po kontrole byla barva z membrány odmyta pomocí TBST. Pro blokování byla membrána ponechána přes noc v 5% roztoku mléka v 0,5% TBST za neustálého promíchávání na kývací třepačce.

4.6.6 Chemiluminiscence

Po blokování byla membrána opláchnuta ddH₂O a 1 h inkubována s primární králičí protilátkou. Po inkubaci byla membrána 6x promývána TBST pufrům po dobu 5 minut. Poté byla membrána inkubována se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou. Po hodině byla membrána opět 6x po dobu 5 minut promyta TBST pufrům. Pro detekci byl použit Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent. Ten obsahoval roztok A s luminolem a roztok B s peroxidem. Pro výrobu detekčního činidla byly do mikrozkušavky pipetovány 2 ml roztoku A a 2 ml roztoku B, mikrozkušavka byla obalena alobalem, aby nedošlo k rozkladu luminolu světlem. Detekční činidlo bylo pipetováno na membránu a ponechalo se 5 minut reagovat. Po okapání přebytečného množství detekčního činidla byla membrána vložena do folie a umístěna do přístroje pro detekci chemiluminiscence Uvitec Alliance Q9.

4.7 Statistické vyhodnocení

Výsledné hodnoty C_t byly zpracovávány v programu Excel. Jako referenční geny byly vybrány GADPH a RPLP0. Pro každý vzorek byl z C_t hodnot těchto genů spočítán

geometrický průměr. C_t hodnoty měřených genů byly vztaženy na geometrický průměr C_t hodnot referenčních genů pomocí metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$, kde ΔC_t je rozdíl mezi C_t měřeného genu a C_t geometrického průměru referenčních genů stejného vzorku. Výsledky byly vztaženy na kontrolní skupinu K STD, proto byly hodnoty vypočítané v předchozím kroku vyděleny průměrem skupiny K STD pro určitý gen. Následně byl spočítán průměr hodnot pro každou skupinu a měřený gen, obdobně byly spočítány i směrodatné odchylky. Výsledek všech průměrů pro skupinu K STD u každého genu byl roven 1. Pokud byla hodnota určitého genu v určité skupině menší než 1, znamenalo to, že exprese tohoto genu v této skupině je menší než u skupiny K STD, hodnota vyšší než 1 značila zvýšenou expresi.

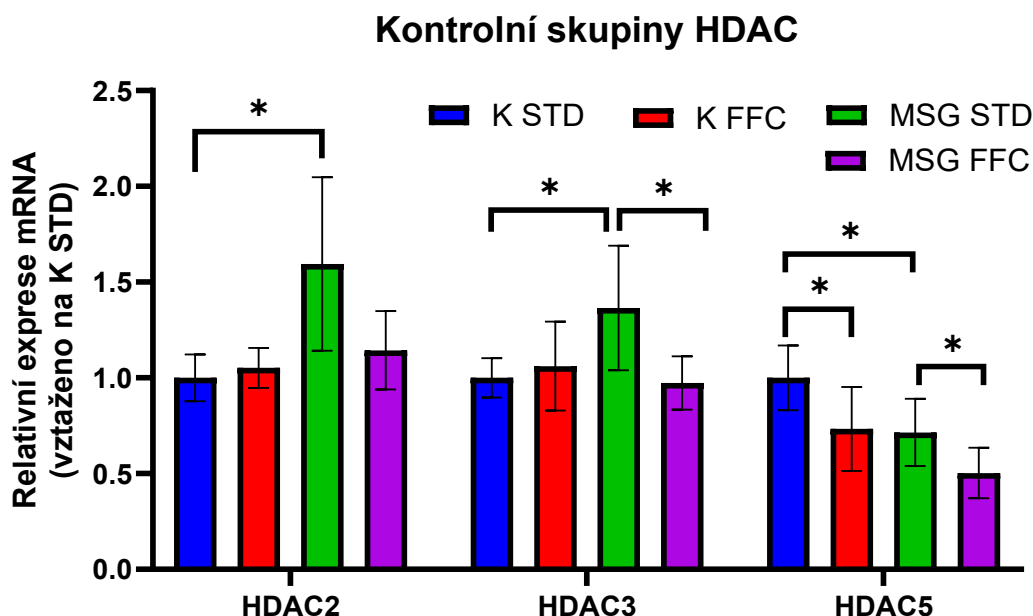
Statistické a grafické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism. Pro statistické vyhodnocení byl použit nepárový t-test s Welchovou korekcí. Za statisticky významný rozdíl byly považovány hodnoty $p < 0,05$. V grafech je statistická významnost označena *, přičemž platí že: * označuje $p < 0,05$, ** pro $p < 0,01$, *** pro $p < 0,001$ a **** značí $p < 0,0001$.

5 Výsledky

V játrech samců myši byla pomocí metody RT-qPCR stanovována exprese mRNA patnácti genů kódujících enzymy zprostředkovávající epigenetickou regulaci (histondeacetylázy, histonmetyltransferázy a DNA-metyltransferázy) a exprese devíti vybraných miR. V další části experimentální práce byla pomocí metody imunoblot stanovena proteinová exprese dvou vybraných histondeacetyláz HDAC3 a HDAC8.

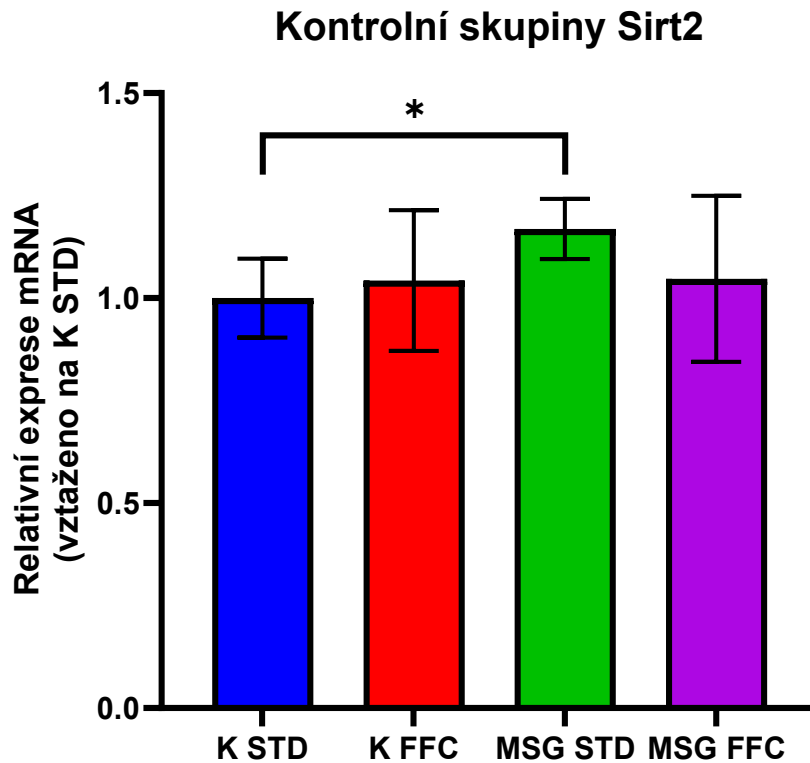
5.1 Exprese mRNA u kontrolních skupin

Nejdříve byla porovnána exprese mRNA u kontrolních skupin, byl zkoumán vliv diety a aplikace MSG na expresi mRNA pro skupinu enzymů HDAC (Obrázek 10). Kontrolní myši krmené FFC dietou měly ve srovnání s K STD sníženou expresi HDAC5. Nejvíce změn v expresi HDAC bylo pozorováno u MSG STD myši ve srovnání s K STD. U MSG STD myši došlo ke zvýšení exprese HDAC2 a HDAC3 a snížení HDAC5 oproti kontrolním myším na stejné dietě. U MSG myši na FFC dietě byla nalezena snížená exprese HDAC3 a HDAC5 oproti MSG STD myším. Nejvíce změn bylo tedy pozorováno u mRNA exprese HDAC5, u které došlo ke snížení exprese jak vlivem aplikace MSG, tak krmením FFC dietou u kontrolních i MSG myši.



Obrázek 10 Porovnání relativní exprese mRNA histondeacetyláz v játrech mezi kontrolními skupinami. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm SD ($n=6$, u K STD $n=5$). Výsledky označené * se významně liší (nepárový t-test s Welchovou korekcí, * $p < 0,05$).

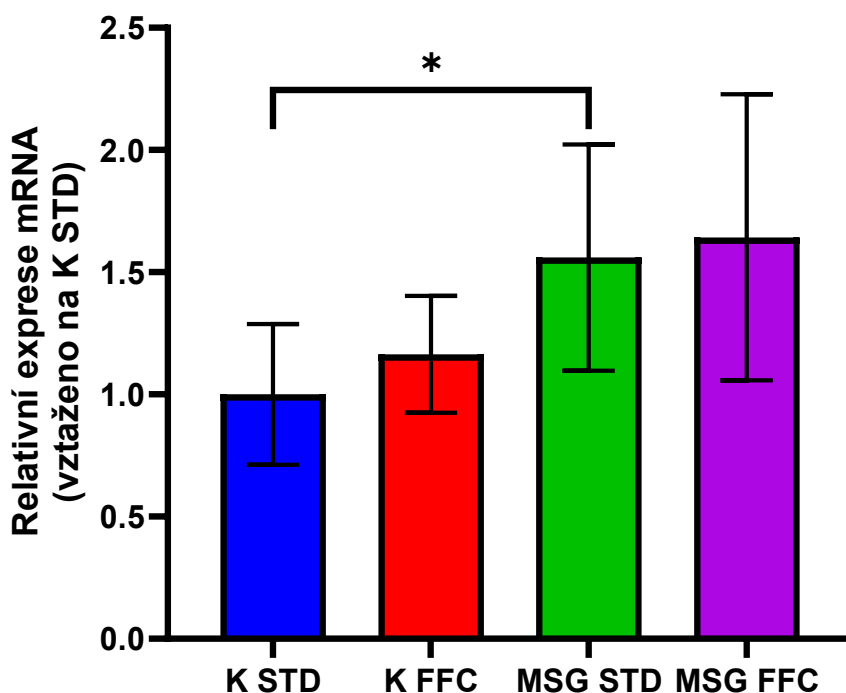
V expresi mRNA sirtuinů byla zaznamenána změna pouze u Sirt2. Aplikací MSG došlo k mírnému ale statisticky významnému zvýšení mRNA exprese Sirt2 oproti skupině K STD (Obrázek 11).



Obrázek 11 Porovnání relativní exprese mRNA Sirt2 v játrech mezi kontrolními skupinami. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm SD ($n=6$, u K STD $n=5$). Výsledky označené * se významně liší (nepárový t-test s Welchovou korekcí, $* p < 0,05$).

Aplikace MSG měla rovněž vliv na expresi mRNA Ep300. V porovnání se skupinou K STD došlo ke zvýšení exprese mRNA Ep300 u skupiny MSG STD (Obrázek 12).

Kontrolní skupiny Ep300



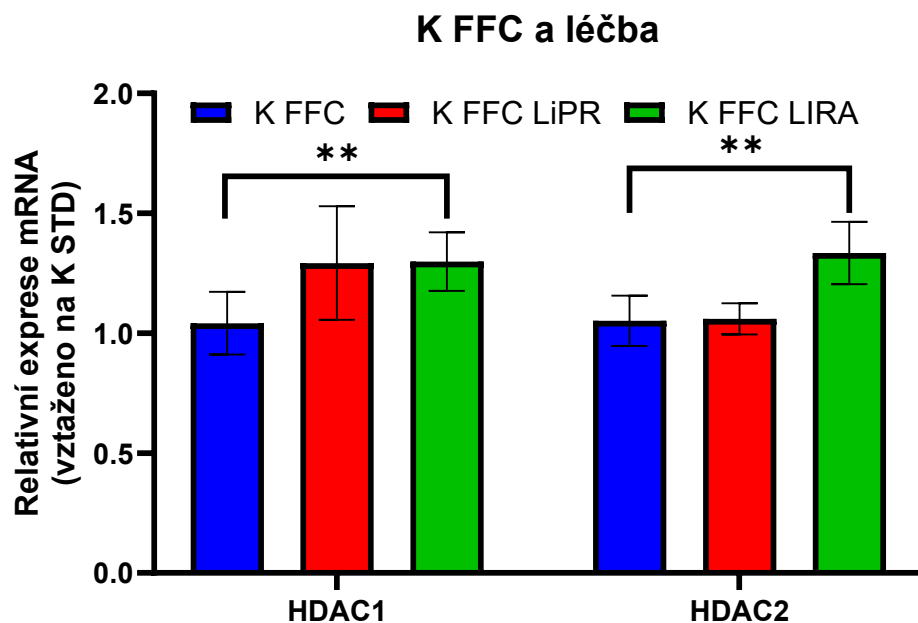
Obrázek 12 Porovnání relativní exprese mRNA Ep300 v játrech mezi kontrolními skupinami. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm SD (n=6, u K STD n=5). Výsledky označené * se významně liší (nepárový t-test s Welchovou korekcí, * p < 0,05).

Mezi kontrolními skupinami nebyly nalezeny statisticky významné změny v expresi mRNA pro geny HDAC6, HDAC11, Sirt1, Sirt3, HAT1, KAT2B, KAT5, DNMT1 a DNMT3a, proto zde nejsou uvedeny příslušné grafy. Dieta, aplikace MSG, ani jejich kombinace neměly statisticky významný vliv na změnu exprese těchto genů v játrech zkoumaných myší.

5.2 Vliv podávání léků na expresi mRNA

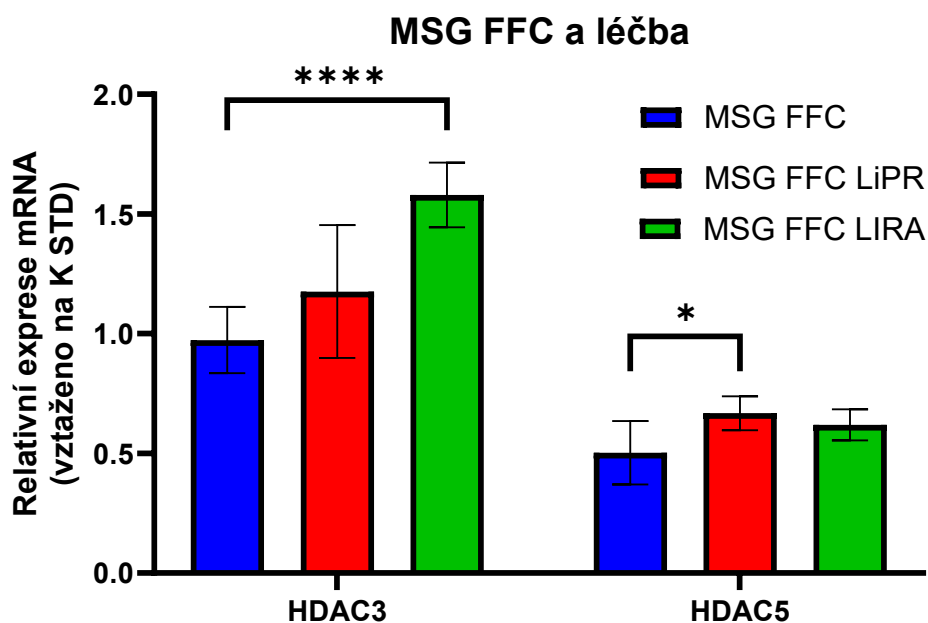
Byl zkoumán vliv podávání léku liraglutidu (LIRA) nebo peptidu palm11-PrRP31 (LiPR) na expresi mRNA u myších modelů s navozenou NAFLD pomocí diety, aplikací MSG, nebo jejich kombinací. Exprese mRNA u léčených skupin byla porovnána s příslušnou kontrolní skupinou.

Ve skupině K FFC léčené liraglutidem byly zaznamenány změny v expresi mRNA HDAC1 a HDAC2 ve srovnání s kontrolní skupinou K FFC (Obrázek 13). U obou genů došlo vlivem léčby liraglutidem ke zvýšení jejich mRNA exprese. Při podávání léku LiPR nebyly zaznamenány změny v expresi u žádného ze sledovaných genů.



Obrázek 13 Porovnání relativní exprese mRNA enzymů HDAC1 a HDAC2 v játrech K FFC myši a vliv léčby léky LiPR a LIRA. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± SD (n=6). Výsledky označené * se významně liší (nepárový t-test s Welchovou korekcí, ** p < 0,01).

Ve skupině MSG STD léčba významně neovlivnila expresi mRNA ani jednoho ze stanovovaných genů. V případě MSG myši krmených FFC dietou léčba ovlivnila expresi mRNA pro HDAC3 a HDAC5 (Obrázek 14). Léčba liraglutidem zvýšila expresi mRNA pro HDAC3, zatímco podání LiPR zvýšilo expresi mRNA pro HDAC5 oproti kontrolní skupině MSG FFC bez léčby.



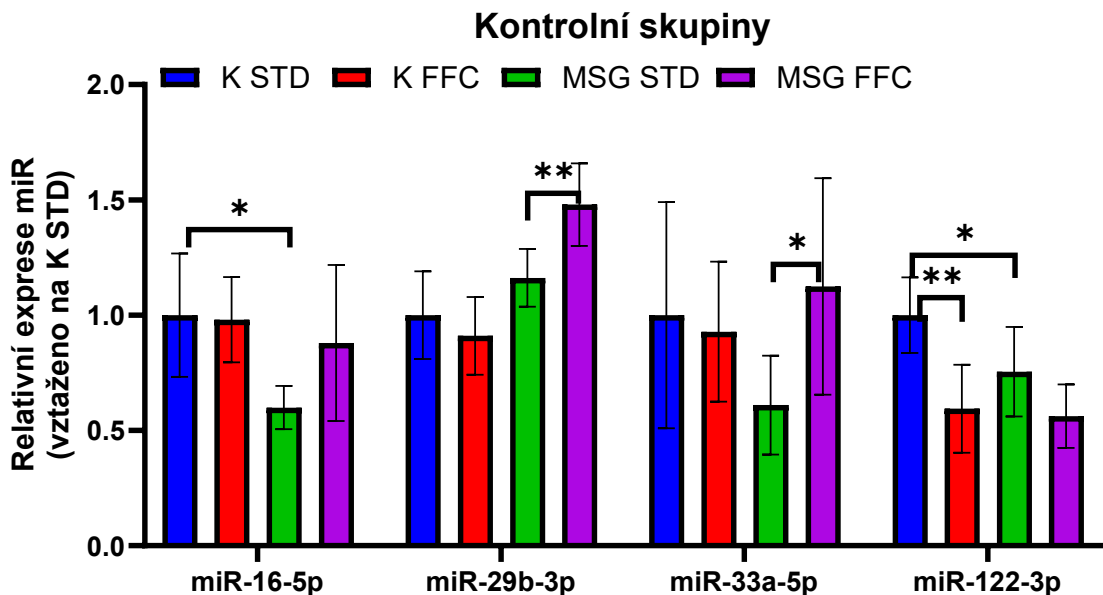
Obrázek 14 Porovnání relativní exprese mRNA enzymů HDAC3 a HDAC5 v játrech MSG FFC myši a vliv léčby léky LiPR a LIRA. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± SD

(n=6). Výsledky označené * se významně liší (nepárový t-test s Welchovou korekcí, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

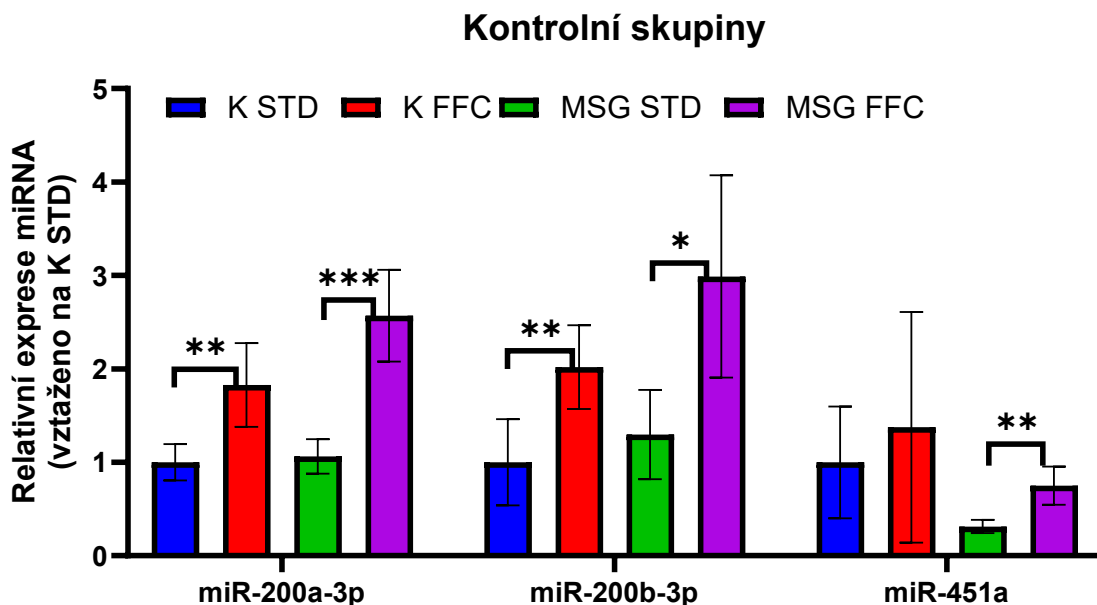
Podání léku LIRA nebo LiPR zásadně neovlivnilo expresi mRNA pro geny HDAC6, HDAC11, Sirt1, Sirt2, Sirt3, HAT1, KAT2B, KAT5, Ep300, DNMT1 a DNMT3a u žádné ze sledovaných skupin.

5.3 Expresie miR u kontrolních skupin

Nejdříve byla porovnána expresie vybraných miR mezi kontrolními skupinami. Zjišťovalo se tím, jestli má FFC dieta, aplikace MSG nebo jejich kombinace vliv na expresi sledovaných miR. Ve skupině kontrolních myší měla FFC dieta vliv na expresi miR-122-3p, miR-200a-3p a miR-200b-3p. FFC dieta způsobila u miR-122-3p snížení její exprese (Obrázek 15), naopak u miR-200a-3p a miR-200b-3p došlo vlivem FFC diety ke zvýšení exprese v porovnání s K STD (Obrázek 16). Ve skupině MSG STD došlo ke snížení exprese miR-16-5p a miR-122-3p v porovnání s K STD (Obrázek 15). MSG myši na FFC dietě měly proti MSG STD myším zvýšenou expresi miR-29b-3p, miR-33a-5p (Obrázek 15), miR-200a-3p, miR-200b-3p a miR-451a (Obrázek 16). Expresie miR-200a-3p a miR-200b-3p byla zvýšená jak u kontrolních, tak MSG myší vlivem FFC diety. Mezi studovanými skupinami nebyly zaznamenány změny v expresi miR-21a-5p a miR-152-3p.



Obrázek 15 Porovnání relativní exprese vybraných miR v játrech kontrolních skupin myší. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm SD (n=6, u K STD n=5). Výsledky označené * se významně liší (nepárový t-test s Welchovou korekcí, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

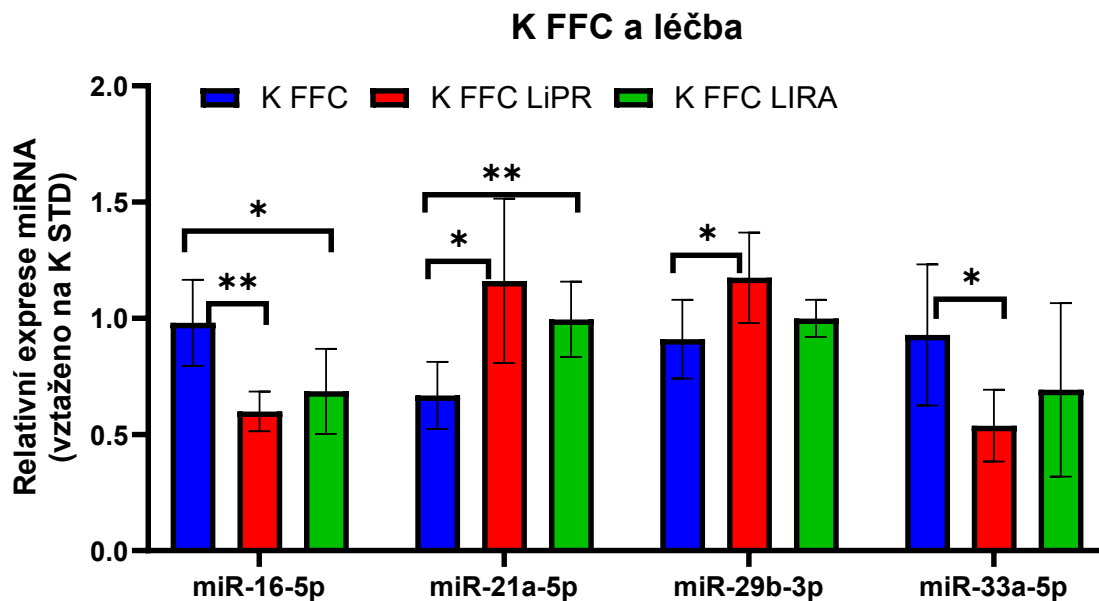


Obrázek 16 Porovnání relativní exprese vybraných miR v játrech kontrolních skupin myší. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm SD (n=6, u K STD n=5). Výsledky označené * se signifikantně liší (nepárový t-test s Welchovou korekcí, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

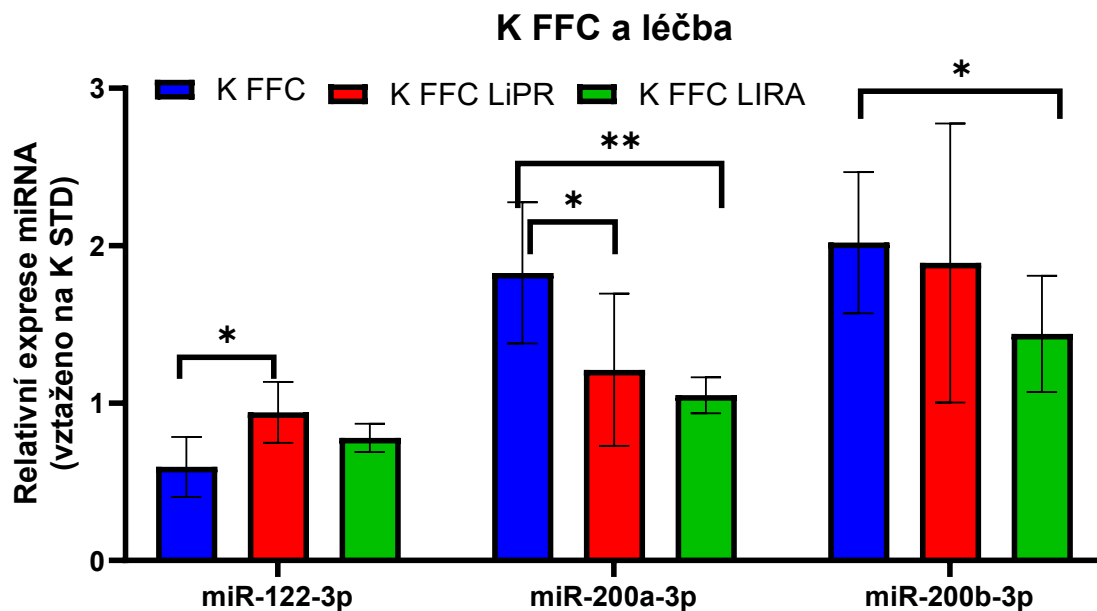
5.4 Vliv podávání léků na expresi miR

Byl zkoumán vliv podávání léku LIRA nebo peptidu LiPR na expresi miR u myších modelů s navozenou NAFLD pomocí diety, aplikace MSG nebo jejich kombinací. Expresi miR u léčených skupin byla porovnána s příslušnou kontrolní skupinou.

Ve skupině K FFC došlo podáváním LiPR ke snížení exprese miR-16-5p, miR-33a-5p (Obrázek 17) a miR-200a-3p (Obrázek 18), zatímco exprese miR-21a-5p, miR-29b-3p a miR-122-3p byla zvýšena. Podávání LIRA vedlo ke snížení exprese miR-16-5p (Obrázek 17), miR-200a-3p a miR-200b-3p (Obrázek 18), naopak exprese miR-21a-5p byla zvýšena (Obrázek 17). Podávání LiPR ani LIRA u skupiny K FFC nemělo vliv na expresi miR-152-3p a miR-451a.



Obrázek 17 Porovnání relativní exprese vybraných miR v játrech K FFC myší a vliv léčby léky LiPR a LIRA. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± SD (n=6). Výsledky označené * se významně liší (nepárový t-test s Welchovou korekcí, * p < 0,05, ** p < 0,01).

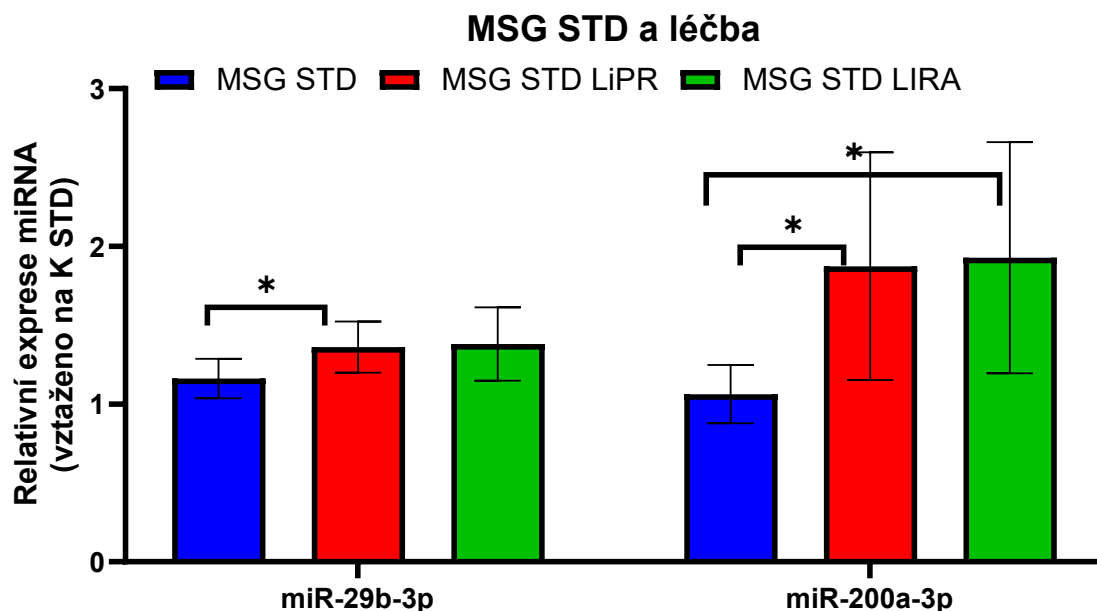


Obrázek 18 Porovnání relativní exprese vybraných miR v játrech K FFC myší a vliv léčby léky LiPR a LIRA. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± SD (n=6). Výsledky označené * se významně liší (nepárový t-test s Welchovou korekcí, * p < 0,05, ** p < 0,01).

Ve skupině MSG STD mělo podání LiPR vliv na zvýšení exprese miR-29b-3p a miR-200a-3p (Obrázek 19), zatímco LIRA v této skupině myší vyvolal pouze zvýšení

expresi miR-200a-3p. Podávání LIRA ani LiPR nemělo u skupiny MSG STD zásadní vliv na expresi ostatních sledovaných miR.

Ve skupině MSG FFC nedošlo vlivem LiPR nebo LIRA k žádným změnám v expresi pozorovaných miR.

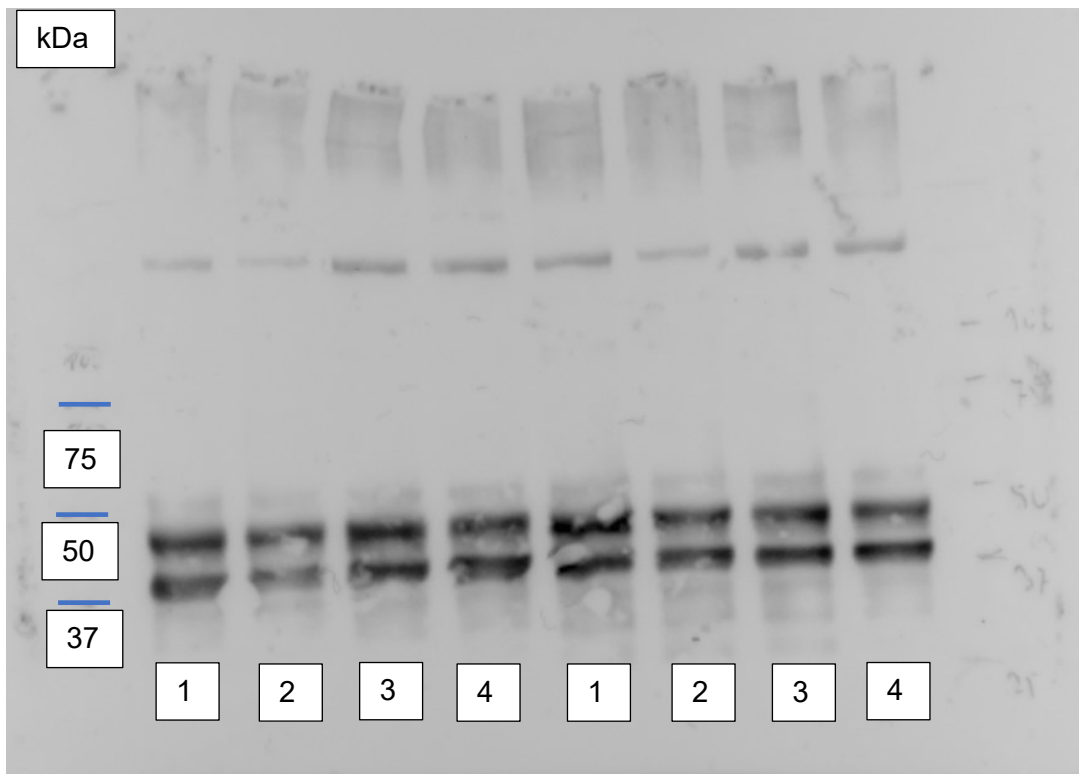


Obrázek 19 Porovnání relativní exprese miR-29b-3p a miR-200a-3p v játrech MSG STD myši a vliv léčby léky LiPR a LIRA. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm SD (n=6). Výsledky označené * se signifikantně liší (nepárový t-test s Welchovou korekcí, * $p < 0,05$).

5.5 Detekce proteinů

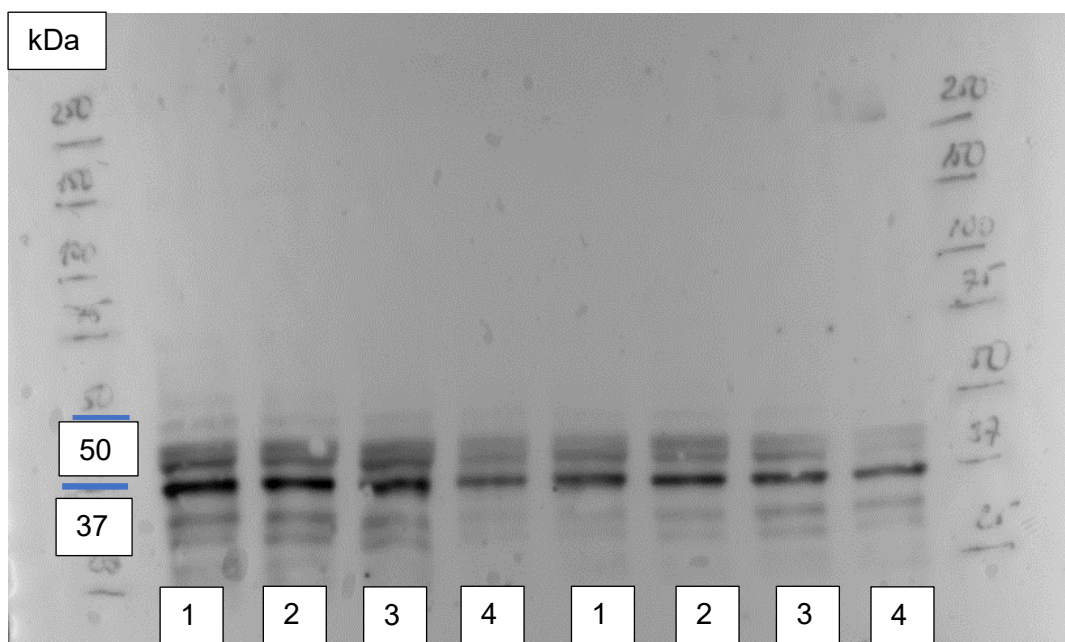
V rámci pilotního experimentu jsme se pomocí imunoblotu pokusili detekovat proteiny HDAC3 a HDAC8. Sledovala se změna v expresi těchto proteinů u skupin K STD, K FFC, MSG STD a MSG FFC. Jako nanášecí kontrola byl zvolen β -aktin. Molekulární hmotnost HDAC3 je 48 kDa, u HDAC8 je 45 kDa a u β -aktinu 42 kDa. Na snímcích imunoblotu jsou po stranách vyznačeny molekulární hmotnosti bandů molekulárního standardu. Skupiny jsou označeny čísly, K STD je značena 1, K FFC 2, MSG STD 3 a MSG FFC 4. Na všech vyhodnocených membránách je patrná přítomnost několika intenzivních bandů, to je pravděpodobně zapříčiněno tím, že se protilátka nescificky váže i na ostatní proteiny.

Výskyt bandu pro HDAC3 se předpokládá v oblasti značky 50 kDa, v této oblasti se kvůli nescifickému vázání protilátky vyskytuje více bandů. Nelze proto s jistotou identifikovat, který band patří HDAC3 (Obrázek 20). Bandy nejsou dostatečně zaostřené, jejich kvantifikace by byla nepřesná.



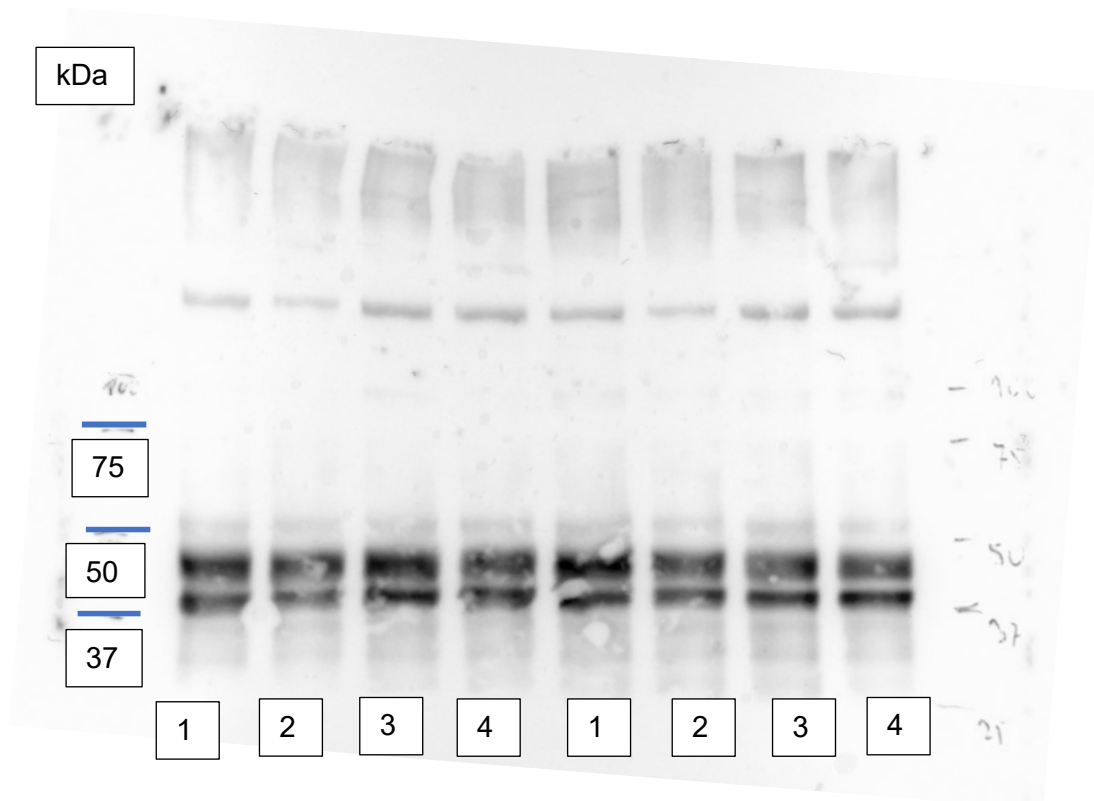
Obrázek 20 Imunoblot HDAC3. Označení skupin: K STD 1, K FFC 2, MSG STD 3 a MSG FFC 4, vlevo jsou označeny molekulární hmotnosti v kDa. Do jamky bylo naneseno 20 μ g proteinu.

Molekulární hmotnost HDAC8 je 45 kDa, výskyt bandu byl předpokládán mezi značkou 37 kDa a 50 kDa. Výrazný band se vyskytoval v oblasti 37 kDa, v jeho okolí se vyskytovalo více drobných spojitých bandů, což bylo způsobeno nespecifickým vázáním protilátky na jiné proteiny (Obrázek 21). Band pro HDAC8 nebylo možné identifikovat.



Obrázek 21 Imunoblot HDAC8. Označení skupin: K STD 1, K FFC 2, MSG STD 3 a MSG FFC 4, vlevo jsou označeny molekulární hmotnosti v kDa. Do jamky bylo nanášeno 20 μ g proteinu.

Výskyt bandu pro β -aktinu byl předpokládán v oblasti nad značkou 37 kDa. Opět se v této oblasti vyskytovalo více bandů, které nebyly dostatečně zaostřené. Band β -aktinu nebylo možné s jistotou identifikovat (Obrázek 22).



Obrázek 22 Imunoblot β -aktin. Označení skupin: K STD 1, K FFC 2, MSG STD 3 a MSG FFC 4, vlevo jsou označeny molekulární hmotnosti v kDa. Do jamky bylo nanášeno 20 μ g proteinu.

Z důvodu nespecifického vázání protilátek nebylo možné identifikovat bandy hledaných proteinů. Za předpokladu, že by se podařilo identifikovat band hledaného proteinu, nebylo by možné ho kvantifikovat, protože bandy nebyly dostatečně zaostřené. Bylo by potřeba buď použít jiné protilátky, nebo optimalizovat metodu imunoblotu (např. dobu blokování, dobu inkubace s primární protilátkou, koncentraci primární protilátky). Z časových důvodů to nebylo možné.

6 Diskuze

NAFLD je nejčastějším chronickým onemocněním jater na světě a jeho celosvětová prevalence každým rokem stoupá. NAFLD je multifaktoriální onemocnění, na jehož vzniku se podílí řada faktorů, patří mezi ně inzulinová rezistence, oxidační stres, zánětlivé procesy, genetická zátěž a epigenetické mechanismy. Epigenetické mechanismy se podílí na regulaci většiny biologických procesů, změny v epigenetické regulaci byly pozorovány u řady různých onemocnění, jako jsou například onkologická, autoimunitní, neurodegenerativní, kardiovaskulární nebo metabolická onemocnění (Moosavi & Motevalizadeh Ardekani, 2016). Z tohoto důvodu jsou změny v epigenetické regulaci studovány u řady onemocnění včetně NAFLD. Je důležité zmapovat změny v mRNA a proteinové expresi a aktivitě enzymů podílejících se na epigenetické regulaci u NAFLD. Změny v expresi těchto enzymů by mohly být v budoucnu využity jako neinvazivní marker NAFLD. Terapie by pak mohla být zaměřená na normalizaci těchto změn v epigenetické regulaci například podáváním inhibitorů pro regulaci konkrétních enzymů (Sun et al., 2018). Nepřeberné množství studií zkoumá souvislost mezi NAFLD a změnami v expresi miR, ať už na buněčných kulturách, zvířecích modelech nebo u pacientů. Určité miR by v budoucnu šly využít jako marker NAFLD nebo jako prognostické markery.

Studie Liu et al. (2021) zaznamenala u pacientů s jaterní fibrózou zvýšenou expresi HDAC2. Studie Fu et al. (2021) popsala mechanismus interakce mezi ROS, HDAC2 a MCP-1. Snížené hladiny ROS vedou ke snížené expresi HDAC2, to podporuje expresi MCP-1. Zvýšená exprese MCP-1 podporuje zánětlivé procesy, které usnadňují progresi NAFLD. V rámci této diplomové práce byla zjištěna zvýšená exprese HDAC2 mezi kontrolní skupinou a MSG STD, u ostatních skupin nebyla zvýšená exprese zaznamenána.

Studie Z. Sun et al. (2012) zjistila, že delece jaterní HDAC3 u myší vede ke vzniku závažné NAFL tím, že ovlivňuje metabolismus lipidů a podporuje jejich *de novo* syntézu. Studie také zjistila, že navození zvýšené exprese HDAC3 nezabraňuje vzniku NAFLD. V rámci této diplomové práce byl zaznamenán nárůst exprese HDAC3 pouze mezi skupinou MSG STD a kontrolní skupinou. Mezi ostatními skupinami nebyly zaznamenány změny v expresi HDAC3.

Studie Jia et al. (2016) naměřila v játrech myší na HFD s narušenou leptinovou signalizací sníženou expresi HDAC5. Detekce byla provedena pomocí RT-qPCR a imunoblotu. V rámci této diplomové práce jsme došli k podobným výsledkům, zjistili jsme, že FFC dieta nebo narušení leptinové signalizace aplikací MSG vede ke snížené expresi HDAC5, při kombinaci FFC diety a MSG aplikace bylo toto snížení výraznější.

Studie L. Sun et al. (2018) zjistila, že delece HDAC11 chrání myši na HFD před vznikem NAFLD a obezitou. Zvýšená hladina HDAC11 by mohla teoreticky souviset se vznikem NAFLD. V rámci této diplomové práce nebyly pozorovány žádné změny v expresi HDAC11 u použitých myších modelů NAFLD.

Studie Wang et al. (2017) zjistila, že aktivace exprese Sirt1 u obézních myší na HFD je ochránila proti NASH. Inhibice jaterní Sirt1 u myší vede ke vzniku NAFLD. Z toho by šlo vyvodit, že myši s NAFLD by mohly mít sníženou expresi Sirt1. V našich experimentech ale nebyly pozorovány jakékoliv změny v expresi Sirt1 u myší s navozenou NAFLD.

Studie Ren et al. (2021) zjistila, že pacienti s NAFLD mají v játrech sníženou expresi Sirt2, která je výraznější se stupněm onemocnění. Snížená exprese Sirt2 byla zaznamenaná i u obézních myší na HFD. Měření exprese Sirt2 bylo prováděno pomocí RT-qPCR a imunoblotu. V rámci této diplomové práce jsme došli k odlišným výsledkům. Nezaznamenali jsme změnu v expresi Sirt2 u většiny myších modelů NAFLD. Mezi kontrolní skupinou a skupinou MSG STD jsme dokonce zaznamenali zvýšenou expresi Sirt2. Přestože ve zmíněné studii a v této diplomové práci byla použita stejná detekční metoda a myši byly krmeny dietou s podobným obsahem tuků po srovnatelně dlouhou dobu, jsou naměřené výsledky odlišné. To by mohlo být způsobeno použitím odlišného kmene myší. V našem experimentu byly použity myši kmene NMRI, který lépe snáší aplikaci MSG zatímco ve studii Ren et al. (2021) byly použity myši kmene C57BL/6, které jsou náchylnější k rozvoji dietou navozené NAFLD než myši kmene NMRI.

Studie Bricambert et al. (2010) zjistila že, Ep300 zvyšuje transkripci genu ChREBP, dlouhodobě zvýšená exprese ChREBP podporuje vznik NAFL a NASH. Předpokládáme, že u myších modelů s NAFLD by mohla být zvýšená exprese Ep300. Výsledky této diplomové práce ukázaly, že myší modely s NAFLD mají zvýšenou expresi Ep300 oproti kontrolní skupině.

Studie Pirola et al. (2013) zjistila, že pacienti s NASH mají oproti pacientům s NAFL zvýšenou expresi DNMT1 v hepatocytech a míra exprese DNMT1 korelovala se závažností NASH. V rámci této diplomové práce nebyly zaznamenány změny v expresi DNMT1 mezi skupinami s navozenou NAFLD a kontrolní skupinou.

Studie Cheung et al. (2008) měřila pomocí RT-qPCR změny v expresi miR-16 mezi pacienty s NASH a zdravými jedinci. V jaterní tkáni pacientů zaznamenali zvýšenou expresi miR-16. Naše diplomová práce došla k opačnému závěru, mezi kontrolní skupinou a MSG STD skupinou s navozenou NAFLD došlo dokonce k poklesu exprese miR-16-5p. Při porovnání exprese miR-16-5p u ostatních skupin s NAFLD a kontrolní skupinou nebyla zaznamenána žádná změna.

V naší diplomové práci jsme nezaznamenali změny v expresi miR-21a-5p mezi kontrolními skupinami. Navození NAFLD u myší by podle našeho vyhodnocení nemělo mít vliv na expresi miR-21-5p. Studie Cheung et al. (2008) ale zaznamenala u pacientů s NASH zvýšenou expresi miR-21 za použití RT-qPCR.

Studie Hung et al. (2019) porovnávala expresi miR-29 u myší na HFD s kontrolní skupinou, zjistila, že myši na HFD mají zvýšenou expresi miR-29. V naší diplomové práci jsme zaznamenali zvýšenou expresi miR-29b-3p jen u skupiny MSG FFC v porovnání se skupinou MSG FFC.

Studie Vega-Badillo et al. (2016) pomocí RT-qPCR zaznamenala u pacientů s NAFLD nárůst exprese miR-33a v hepatocytech i v plazmě, menší nárůst byl u pacientů s NAFL, nejvyšší nárůst byl zaznamenán u pacientů s NASH. Ale studie Auguet et al. (2016) stejnou metodou neznamenala změnu v expresi miR-33a v hepatocytech nebo plazmě pacientů s NAFLD a různými stupni obezity. V rámci diplomové práce jsme nezaznamenali změnu v expresi miR-33a-5p mezi kontrolní skupinou a skupinami s NAFLD. Závěry naší diplomové práce se více shodují se závěry studie Auguet et al. (2016), přestože tato studie zkoumala NAFLD u lidí.

Studie Cheung et al. (2008) zjistila pomocí RT-qPCR, že exprese miR-122 byla v jaterní tkáni pacientů s metabolickým syndromem a NASH snižena. Studie Pirola et al. (2015) zaznamenala také sníženou expresi miR-122 v játrech pacientů s NAFL a NASH, pro detekci miR-122 byla použita metoda *in situ* hybridizace. Studie Auguet et al. (2016) nezjistila, že by pacienti s NAFLD a různým stupněm obezity měli sníženou expresi miR-122 v játrech pomocí RT-qPCR. My jsme v rámci této diplomové práce zaznamenali statisticky významný pokles v expresi miR-122-3p u všech myších skupin s navozenou NAFLD.

Cílem naší diplomové práce bylo i zkoumat vliv léčby na změny v expresi miR. Studie Capuani et al. (2018) studovala vliv liraglutidu na expresi miR-21 u buněčné linie hepatocytů se steatózou. Exprese miR-21 se u hepatocytů po podání liraglutidu snížila. V rámci této diplomové práce byl zaznamenán vzestup v expresi miR-21a-5p pouze u skupiny K FFC po podání liraglutidu, u ostatních skupin léčba liraglutidem neměla vliv.

Závěry ostatních studií se v některých případech shodují s poznatky této diplomové práce. Nicméně spousta studií došla k jiným nebo zcela protichůdným závěrům. Většina studií navozuje NAFLD u myší pomocí HFD, zatímco v naší diplomové práci je použita FFC dieta. Například fruktóza v námi použité dietě může měnit metylaci určitých genů nebo ovlivňovat střevní mikrobiotu myší (Kirpich et al., 2015; Ohashi et al., 2015). To může vést k epigenetickým změnám, které jsou ovlivnitelné stravou. Pro účely naší diplomové práce byla NAFLD navozena i pomocí aplikace MSG. Studie jen velmi zřídka používají k navození NAFLD aplikaci MSG. Data o změnách exprese u skupin s MSG

tak nelze moc porovnávat s výsledky ostatních studií. Část studií zkoumala epigenetické změny u pacientů s NAFLD. Spousta pacientů s NAFLD se léčí s různými komorbiditami, jako je například T2DM nebo hypertenze. Užívání antidiabetik, antihypertenziv a jiných léčiv má vliv na epigenetické změny (Csoka & Szyf, 2009). Epigenetické změny jsou také ovlivnitelné například životním stylem, pohybovou aktivitou, prostředím a stravou (Rodríguez-Sanabria et al., 2022). Naměřené výsledky mezi pacienty s NAFLD a myšími modely NAFLD jsou obtížněji srovnatelné, protože jsou zatíženy nejen mezidruhovou odlišností, ale i odlišným životním stylem a případnou medikací. Studie, které se zabývají expresí miR, často blíže nespecifikují, jestli jimi sledovaná miR pochází z 3' nebo z 5' konce prekurzorové miRNA (Novák, 2016).

7 Závěr

- Stanovili jsme mRNA expresi 15 vybraných genů, které kódují epigenetické regulační enzymy a 9 vybraných miR v jaterní tkáni tří myších modelů NAFLD – kontrolní myši na FFC dietě, MSG myši na standardní dietě a MSG myši na FFC dietě. Každá kontrolní skupina byla rozdělena na tři skupiny jedné byl podáván fyziologický roztok (kontrolní neléčené myši), druhé liraglutid a třetí LiPR.
- Metodou imunoblot jsme stanovovali proteinovou expresi dvou vybraných histondeacetyláz – HDAC3 a HDAC8 v jaterní tkáni myší z kontrolních skupin. Díky nescifické vazbě použitých protilátek však nebylo možné výsledky vyhodnotit. Metodu je třeba dále optimalizovat.
- Mezi skupinou K STD a K FFC byla pozorována snížená mRNA exprese HDAC5. Nejvíce rozdílů v mRNA expresi bylo nalezeno mezi K STD a MSG STD skupinou, u níž bylo zaznamenáno zvýšení exprese HDAC2, HDAC3, SIRT2 a Ep300 a snížení exprese HDAC5. Mezi MSG STD a MSG FFC skupinou byla pozorována snížená exprese HDAC3 a HDAC5. HDAC5 je tedy jediným genem, jehož exprese byla snížena jak FFC dietou (u kontrolních i MSG myší), tak aplikací MSG. V případě exprese miR bylo nejvíce změn zaznamenáno ve skupině MSG FFC myší ve srovnání s MSG STD skupinou. Zde bylo pozorováno zvýšení exprese miR29b-3p, miR33-5p, miR200a-3p, miR-200b-3p a miR-451a. U skupiny K FFC došlo k poklesu exprese miR-122-3p a k nárůstu exprese miR-200a-3p a miR-200b-3p. miR-200a-3p a miR-200b-3p byly zvýšeny podáním FFC diety jak u kontrolních, tak u MSG myší. U MSG STD myší byla pozorovány snížená exprese miR-16-5p a miR-122-3p oproti K STD.
- V případě podání liraglutidu bylo pozorováno zvýšení mRNA exprese HDAC1 a HDAC2 ve skupině K FFC (oproti K STD) a exprese HDAC3 ve skupině MSG FFC (proti MSG FFC). Podávání LiPR bylo provázeno zvýšením exprese HDAC5 ve skupině MSG FFC proti MSG STD. Podání liraglutidu způsobilo ve skupině K FFC snížení exprese miR-16-5p, miR-200a-3p a miR-200b-3p a zvýšení exprese miR-21a-5p. Dále bylo pozorováno zvýšení exprese miR-200a-3p ve skupině MSG STD. Aplikace LiPR vedlo ve skupině K FFC ke snížení exprese miR16-5p, miR33a-5p a miR-200a-3p, zatímco exprese miR-21a-5p, miR-29b-3p a miR-122-3p byla zvýšená. Ve skupině MSG STD byla zaznamenána zvýšená exprese miR-29b-3p a miR-200a-3p vlivem LiPR.

8 Seznam zkratek

4-HNE	4-hydroxynonenal
•OH	hydroxylový radikál
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ABCG1	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 1</i>
acetyl-CoA	acetylkoenzymu A
AFLD	alkoholického tukového onemocnění jater
ALT	alaninaminotransferáza
AST	asparátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
BCA	bicinchinová metoda
BMI	index tělesné hmotnosti
BSA	bovinní sérový albumin
cDNA	komplementární DNA
ChREBP	<i>Carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
CK-18	cytokeratin 18
CpG	cytosin-fosfát-guanin
CT	výpočetní tomografie
CTP1A	carnitine palmitoyltransferase 1A
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
ddH ₂ O	redestilovaná voda
DEPC	vodu ošetřená dietylpyrokarbonátem
DGCR8	<i>DiGeorge Critical Region 8</i>
DNáza	deoxyribonukleáza
DNMT	DNA-methyltransferáza
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina egtazová
ER	endoplazmatické retikulum
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
GGT	gamaglutamyltransferázy
GLP-1	<i>glucagon-like peptide 1</i>
H	histon
HAT	histonacetyltransferáza
HCC	hepatocelulární karcinom
HDAC	histondeacetyláza

HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HFD	vysokotučná dieta
HMT	histonmetyltransferáza
HSD17B13	17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza 13
IL	interleukin
LipR	LiPR31
LDHB	laktátdehydrogenáza B
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LIRA	liraglutid
LSD1	lyzin-specifická demetyláza 1
LYPLAL1	<i>lysophospholipase-like 1</i>
MASLD	<i>metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease</i>
MCP-1	monocytární chemotaktický protein 1
MDA	malondialdehyd
miR	mikroRNA
MRE	magnetická rezonanční elastografie
MRI	magnetická rezonance
MT-DN6	mitochondriální gen pro NADPH dehydrogenázu-6
mtDNA	mitochondriální DNA
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NAFL	prostá jaterní steatóza
NAFLD	nealkoholové postižení jater při steatóze
NAS	<i>NAFLD activity score</i>
NASH	steatohepatitida
NO \cdot	oxid dusnatý
O $_2^{\cdot-}$	superoxid anion radikál
OSE	<i>oxidative stress-derived epitopes</i>
PBEF	<i>pre-B-cell colony enhancing factor</i>
PCR	polymerázová řetězcová reakce
PNPLA3	<i>patatin like phospholipase domain-containing protein 3</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPP1R3B	<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B</i>
PPARGC1A	peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α
RBP4	<i>retinol binding protein 4</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku

RT-qPCR	kvantitativní PCR v reálném čase
SAF	<i>steatosis-activity-fibrosis</i>
SAH	S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmetioninu
SDS	dodecylsírán sodný
Sirt	sirtuin
SIK2	<i>salt-inducible kinase 2</i>
SREBP-1c	<i>(sterol regulatory element binding protein 1c</i>
ssDNA	jednovláknová DNA
T2DM	diabetes melitus 2. typu
TAG	triacylglycerol
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substance</i>
TBST	tris-buffered saline, Tween
TET	ten-eleven translokáza
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF α	tumor-nekrotizující faktor α
TRX	thiorexodin
UPR	<i>unfolded protein responce</i>
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě

9 Seznam použité literatury

- Abul-Husn, N. S., Cheng, X., Li, A. H., Xin, Y., Schurmann, C., & et al. (2018). A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease. *New England Journal of Medicine*, 378(12), 1096–1106. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1712191>
- Ahrens, M., Ammerpohl, O., von Schönfels, W., Kolarova, J., Bens, S., & et al. (2013). DNA Methylation Analysis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Suggests Distinct Disease-Specific and Remodeling Signatures after Bariatric Surgery. *Cell Metabolism*, 18(2), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.07.004>
- Ashraf, N. U., & Sheikh, T. A. (2015). Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radical Research*, 49(12), 1405–1418. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1078461>
- Auguet, T., Aragonès, G., Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., & et al. (2016). miR33a/miR33b* and miR122 as Possible Contributors to Hepatic Lipid Metabolism in Obese Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1620. <https://doi.org/10.3390/ijms17101620>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barroso, E., Rodríguez-Rodríguez, R., Zarei, M., Pizarro-Degado, J., Planavila, A., & et al. (2020). SIRT3 deficiency exacerbates fatty liver by attenuating the HIF1 α -LIPIN 1 pathway and increasing CD36 through Nrf2. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00640-8>
- Basaranoglu, M., & Neuschwander-Tetri, B. A. (2006). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Clinical Features and Pathogenesis. *Gastroenterology & hepatology*, 2(4), 282–291.
- Basu Ray, S. (2019). PNPLA3-I148M: a problem of plenty in non-alcoholic fatty liver disease. *Adipocyte*, 8(1), 201–208. <https://doi.org/10.1080/21623945.2019.1607423>
- Bhaskara, S., Knutson, S. K., Jiang, G., Chandrasekharan, M. B., Wilson, A. J., Zheng, S., Yenamandra, A., Locke, K., Yuan, J., & et al. (2010). Hdac3 Is Essential for the Maintenance of Chromatin Structure and Genome Stability. *Cancer Cell*, 18(5), 436–447. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.022>
- Bricambert, J., Miranda, J., Benhamed, F., Girard, J., Postic, C., & Dentin, R. (2010). Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), 4316–4331. <https://doi.org/10.1172/JCI41624>

- Brůha, R. (2019). Nealkoholové postižení jater při steatóze. *Vnitřní Lékařství*, 65(9), 571–575.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, 65(8), 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>
- Byrne, C. D., & Targher, G. (2015). NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*, 62(1), S47–S64. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012>
- Calo, N., Ramadori, P., Sobolewski, C., Romero, Y., Maeder, C., Fournier, M., Rantakari, P., Zhang, F.-P., Poutanen, M., Dufour, J.-F., Humar, B., Nef, S., & Foti, M. (2016). Stress-activated miR-21/miR-21* in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. *Gut*, 65(11), 1871–1881. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310822>
- Cani, P. D. (2012). Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: impact on the gut barrier function and the adipose tissue. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 50–53. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03866.x>
- Capuani, B., Pacifici, F., Della-Morte, D., & Lauro, D. (2018). Glucagon Like Peptide 1 and MicroRNA in Metabolic Diseases: Focusing on GLP1 Action on miRNAs. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00719>
- Csoka, A. B., & Szyf, M. (2009). Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: A potential new field in medicine and pharmacology. *Medical Hypotheses*, 73(5), 770–780. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.10.039>
- Dawson, R., Pelleymounter, M. A., Millard, W. J., Liu, S., & Eppler, B. (1997). Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 273(1), E202–E206. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.1.E202>
- Delli Bovi, A. P., Marciano, F., Mandato, C., Siano, M. A., Savoia, M., & Vajro, P. (2021). Oxidative Stress in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. An Updated Mini Review. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.595371>
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., Zhou, M.-M., & Zhou, M.-M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399(6735), 491–496. <https://doi.org/10.1038/20974>

- Dongiovanni, P., Meroni, M., Longo, M., Fargion, S., & Fracanzani, A. (2018). miRNA Signature in NAFLD: A Turning Point for a Non-Invasive Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12), 3966. <https://doi.org/10.3390/ijms19123966>
- Dongiovanni, P., Petta, S., Maglio, C., Fracanzani, A. L., Pipitone, R., Mozzi, E., Motta, B. M., Kaminska, D., Rametta, R., & et al. (2015). Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology*, *61*(2), 506–514. <https://doi.org/10.1002/hep.27490>
- Dumitrascu, D. L., & Neuman, M. G. (2018). Non-alcoholic Fatty Liver Disease: an Update on Diagnosis. *Medicine and Pharmacy Reports*, *91*(2), 147–150. <https://doi.org/10.15386/cjmed-993>
- Dvořák, K., & Šmíd, V. (2022). Současné možnosti léčby nealkoholového ztukovatění jater (NAFLD). *Časopis Lékařů Českých*, *161*(2), 77–79.
- Ezhilarasan, D., & Lakshmi, T. (2022). A Molecular Insight into the Role of Antioxidants in Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2022*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2022/9233650>
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., & Croce, C. M. (2013). A new role for microRNAs, as ligands of Toll-like receptors. *RNA Biology*, *10*(2), 169–174. <https://doi.org/10.4161/rna.23144>
- Fan, J., Lou, B., Chen, W., Zhang, J., Lin, S., Lv, F., & Chen, Y. (2014). Down-regulation of HDAC5 inhibits growth of human hepatocellular carcinoma by induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Tumor Biology*, *35*(11), 11523–11532. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2358-2>
- Fang, D., & Han, J. (2021). *Histone Mutations and Cancer* (Roč. 1283). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5>
- Fazel, Y., Koenig, A. B., Sayiner, M., Goodman, Z. D., & Younossi, Z. M. (2016). Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, *65*(8), 1017–1025. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.01.012>
- Francque, S. M., Bedossa, P., Ratziu, V., Anstee, Q. M., Bugianesi, E., Sanyal, A. J., Loomba, R., Harrison, S. A., Balabanska, R., & et al. (2021). A Randomized, Controlled Trial of the Pan-PPAR Agonist Lanifibranor in NASH. *New England Journal of Medicine*, *385*(17), 1547–1558. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2036205>
- Fu, S., Yu, M., Tan, Y., & Liu, D. (2021). Role of histone deacetylase on nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, *15*(4), 353–361. <https://doi.org/10.1080/17474124.2021.1854089>

- Ghafouri-Fard, S., Khoshbakht, T., Hussen, B. M., Abdullah, S. T., Taheri, M., & Samadian, M. (2022). A review on the role of mir-16-5p in the carcinogenesis. *Cancer Cell International*, 22(1), 342. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02754-0>
- Gjorgjieva, M., Sobolewski, C., Dolicka, D., Correia de Sousa, M., & Foti, M. (2019). miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. *Gut*, 68(11), 2065–2079. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-318146>
- Graziadei, I., Zoller, H., Fickert, P., Schneeberger, S., Finkenstedt, A., Peck-Radosavljevic, M., Müller, H., Kohl, C., Sperner-Unterweger, B., Eschertzhuber, S., Hofer, H., Öfner, D., Tilg, H., Vogel, W., Trauner, M., & Berlakovich, G. (2016). Indications for liver transplantation in adults. *Wiener klinische Wochenschrift*, 128(19–20), 679–690. <https://doi.org/10.1007/s00508-016-1046-1>
- Guo, X., Yin, X., Liu, Z., & Wang, J. (2022). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Pathogenesis and Natural Products for Prevention and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15489. <https://doi.org/10.3390/ijms232415489>
- Hochreuter, M. Y., Dall, M., Treebak, J. T., & Barrès, R. (2022). MicroRNAs in non-alcoholic fatty liver disease: Progress and perspectives. *Molecular Metabolism*, 65, 101581. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101581>
- Hovorková, A., & Dvořák, K. (2018). Zvýšení jaterních testů v terénní praxi. *Medicina pro Praxi*, 15(4), 203–208.
- Hůlek, P., & Dresslerová, I. (2015). Nealkoholové ztučnění jater v klinické praxi (NAFL). *Interní Medicína*, 17(5), 224–226.
- Hung, Y.-H., Kanke, M., Kurtz, C. L., Cubitt, R. L., Bunaciu, R. P., Zhou, L., White, P. J., Vickers, K. C., Hussain, M. M., Li, X., & Sethupathy, P. (2019). MiR-29 Regulates de novo Lipogenesis in the Liver and Circulating Triglyceride Levels in a Sirt1-Dependent Manner. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01367>
- Hyun, J., & Jung, Y. (2020). DNA Methylation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8138. <https://doi.org/10.3390/ijms21218138>
- Chen, J., Deng, X., Liu, Y., Tan, Q., Huang, G., Che, Q., Guo, J., & Su, Z. (2020). Kupffer Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe? *International Journal of Biological Sciences*, 16(13), 2367–2378. <https://doi.org/10.7150/ijbs.47143>
- Chen, X., Ling, Y., Wei, Y., Tang, J., Ren, Y., Zhang, B., Jiang, F., Li, H., Wang, R., Wen, W., Lv, G., Wu, M., Chen, L., Li, L., & Wang, H. (2018). Dual regulation of HMGB1 by combined JNK1/2–ATF2 axis with miR-200 family in nonalcoholic steatohepatitis

- in mice. *The FASEB Journal*, 32(5), 2722–2734.
<https://doi.org/10.1096/fj.201700875R>
- Cheung, O., Puri, P., Eicken, C., Contos, M. J., Mirshahi, F., Maher, J. W., Kellum, J. M., Min, H., Luketic, V. A., & Sanyal, A. J. (2008). Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology*, 48(6), 1810–1820. <https://doi.org/10.1002/hep.22569>
- Chong, W., Shastri, M., & Eri, R. (2017). Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Nexus Implicated in Bowel Disease Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 771. <https://doi.org/10.3390/ijms18040771>
- İnce, G. T., Yükksekaya, M., & Haberal, O. E. (2023). Micro-polymerase chain reaction for point-of-care detection and beyond: a review microfluidics and nanofluidics. *Microfluidics and Nanofluidics*, 27(10), 68. <https://doi.org/10.1007/s10404-023-02677-w>
- Jackson, S. H., Martin, T. S., Jones, J. D., Seal, D., & Emanuel, F. (2010). Liraglutide (victoza): the first once-daily incretin mimetic injection for type-2 diabetes. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 35(9), 498–529.
- Jampoka, K., Muangpaisarn, P., Khongnomnan, K., Treeprasertsuk, S., Tangkijvanich, P., & Payungporn, S. (2018). Serum miR-29a and miR-122 as Potential Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *MicroRNA*, 7(3), 215–222. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180531093302>
- Jia, H.-Y., Li, Q.-Z., & Lv, L.-F. (2016). HDAC5 Inhibits Hepatic Lipogenic Genes Expression by Attenuating the Transcriptional Activity of Liver X Receptor. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(4), 1561–1567. <https://doi.org/10.1159/000447858>
- Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer*, 2(6), 607–617. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957>
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1). <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Kalogirou, M.-S., Patoulas, D., Haidich, A.-B., Akriviadis, E., & Sinakos, E. (2021). Liraglutide in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 45(3), 101568. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2020.10.012>
- Kawanaka, M., Mahmood, S., Niiyama, G., Izumi, A., Kamei, A., Ikeda, H., Suehiro, M., Togawa, K., Sasagawa, T., Okita, M., & et al. (2004). Control of oxidative stress and

- reduction in biochemical markers by Vitamin E treatment in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology Research*, 29(1), 39–41. <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2004.02.002>
- Kim, G., Ryan, J. J., Marsboom, G., & Archer, S. L. (2011). Epigenetic Mechanisms of Pulmonary Hypertension. *Pulmonary Circulation*, 1(3), 347–356. <https://doi.org/10.4103/2045-8932.87300>
- Kim, J. Y., Cho, H., Yoo, J., Kim, G. W., Jeon, Y. H., Lee, S. W., & Kwon, S. H. (2022). Pathological Role of HDAC8: Cancer and Beyond. *Cells*, 11(19), 3161. <https://doi.org/10.3390/cells11193161>
- Kim, K. M., Han, C. Y., Kim, J. Y., Cho, S. S., Kim, Y. S., Koo, J. H., Lee, J. M., Lim, S. C., Kang, K. W., Kim, J.-S., Hwang, S. J., Ki, S. H., & Kim, S. G. (2018). Gα12 overexpression induced by miR-16 dysregulation contributes to liver fibrosis by promoting autophagy in hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, 68(3), 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.011>
- Kirpich, I. A., Marsano, L. S., & McClain, C. J. (2015). Gut–liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Biochemistry*, 48(13–14), 923–930. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>
- Kovalic, A. J., Banerjee, P., Tran, Q. T., Singal, A. K., & Satapathy, S. K. (2018). Genetic and Epigenetic Culprits in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 8(4), 390–402. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.04.001>
- Krawczyk, M., Liebe, R., & Lammert, F. (2020). Toward Genetic Prediction of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Trajectories: PNPLA3 and Beyond. *Gastroenterology*, 158(7), 1865–1880.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.053>
- Kodíček, Milan. (2007). nukleosom. *Biochemické pojmy : výkladový slovník*. Praha: VŠCHT Praha. Dostupné z www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=nukleosom>
- Lai, Z., Chen, J., Ding, C., Wong, K., Chen, X., Pu, L., Huang, Q., Chen, X., Cheng, Z., Liu, Y., Tan, X., Zhu, H., & Wang, L. (2020). Association of Hepatic Global DNA Methylation and Serum One-Carbon Metabolites with Histological Severity in Patients with NAFLD. *Obesity*, 28(1), 197–205. <https://doi.org/10.1002/oby.22667>
- Lassailly, G., Caiazzo, R., Buob, D., Pigeyre, M., Verkindt, H., Labreuche, J., Raverdy, V., Leteurtre, E., Dharancy, S., Louvet, A., Romon, M., Duhamel, A., Pattou, F., & Mathurin, P. (2015). Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology*, 149(2), 379–388. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.014>

- Lavine, J. E., Schwimmer, J. B., Van Natta, M. L., Molleston, J. P., Murray, K. F., Rosenthal, P., Abrams, S. H., Scheimann, A. O., Sanyal, A. J., Chalasani, N., Tonascia, J., Ünalp, A., Clark, J. M., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Hoofnagle, J. H., Robuck, P. R., & Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. (2011). Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA*, *305*(16), 1659–1668. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.520>
- Le, M. H., Yeo, Y. H., Zou, B., Barnet, S., Henry, L., Cheung, R., & Nguyen, M. H. (2022). Forecasted 2040 global prevalence of nonalcoholic fatty liver disease using hierarchical bayesian approach. *Clinical and Molecular Hepatology*, *28*(4), 841–850. <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0239>
- Lee, H. T., Oh, S., Ro, D. H., Yoo, H., & Kwon, Y.-W. (2020). The Key Role of DNA Methylation and Histone Acetylation in Epigenetics of Atherosclerosis. *Journal of Lipid and Atherosclerosis*, *9*(3), 419. <https://doi.org/10.12997/jla.2020.9.3.419>
- Lee, J., Friso, S., & Choi, S.-W. (2014). Epigenetic Mechanisms Underlying the Link between Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases and Nutrition. *Nutrients*, *6*(8), 3303–3325. <https://doi.org/10.3390/nu6083303>
- Lee, J., Kim, Y., Friso, S., & Choi, S.-W. (2017). Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular Aspects of Medicine*, *54*, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.008>
- Lee, J., Lee, H. W., Lee, K. S., Lee, H. S., & Park, J.-Y. (2021). Effects of Statin Use on the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Nationwide Nested Case-Control Study. *American Journal of Gastroenterology*, *116*(1), 116–124. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000845>
- Li, Q., Dhyani, M., Grajo, J. R., Sirlin, C., & Samir, A. E. (2018). Current status of imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, *10*(8), 530–542. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i8.530>
- Lieber, A. D., Beier, U. H., Xiao, H., Wilkins, B. J., Jiao, J., Li, X. S., Schugar, R. C., Strauch, C. M., Wang, Z., Brown, J. M., Hazen, S. L., Bokulich, N. A., Ruggles, K. V., Akimova, T., Hancock, W. W., & Blaser, M. J. (2019). Loss of HDAC6 alters gut microbiota and worsens obesity. *The FASEB Journal*, *33*(1), 1098–1109. <https://doi.org/10.1096/fj.201701586R>
- Liu, Y., Jiang, L., Sun, C., Ireland, N., Shah, Y. M., Liu, Y., & Rui, L. (2018). Insulin/Snail1 axis ameliorates fatty liver disease by epigenetically suppressing lipogenesis. *Nature Communications*, *9*(1), 2751. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05309-y>
- Liu, Y.-R., Wang, J.-Q., Huang, Z.-G., Chen, R.-N., Cao, X., Zhu, D.-C., Yu, H.-X., Wang, X.-R., Zhou, H.-Y., Xia, Q., & Li, J. (2021). Histone deacetylase-2: A potential

- regulator and therapeutic target in liver disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 48(1), 131. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4964>
- Loomba, R., Abdelmalek, M. F., Armstrong, M. J., Jara, M., Kjær, M. S., Krarup, N., Lawitz, E., Ratziu, V., Sanyal, A. J., Schattenberg, J. M., & Newsome, P. N. (2023). Semaglutide 2·4 mg once weekly in patients with non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis: a randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 8(6), 511–522. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(23\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(23)00068-7)
- Ma, H., Bell, K. N., & Loker, R. N. (2021). qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 20, 152–168. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>
- MacFarlane, L.-A., & R. Murphy, P. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7), 537–561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>
- Maddocks, S., & Jenkins, R. (2017). Quantitative PCR. In *Understanding PCR* (s. 45–52). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802683-0.00004-6>
- Marso, S. P., Bain, S. C., Consoli, A., Eliaschewitz, F. G., Jódar, E., Leiter, L. A., Lingvay, I., Rosenstock, J., Seufert, J., Warren, M. L., Woo, V., Hansen, O., Holst, A. G., Pettersson, J., & Vilsbøll, T. (2016). Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 375(19), 1834–1844. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607141>
- Moosavi, A., & Motevalizadeh Ardekani, A. (2016). Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iranian biomedical journal*, 20(5), 246–258. <https://doi.org/10.22045/ibj.2016.01>
- Moschen, A. R., Molnar, C., Wolf, A. M., Weiss, H., Graziadei, I., Kaser, S., Ebenbichler, C. F., Stadlmann, S., Moser, P. L., & Tilg, H. (2009). Effects of weight loss induced by bariatric surgery on hepatic adipocytokine expression. *Journal of Hepatology*, 51(4), 765–777. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.06.016>
- Nassir, F. (2022). NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules*, 12(6), 824. <https://doi.org/10.3390/biom12060824>
- Novák, J. (2016). MikroRNA v kardiologii – přehled pro klinickou praxi. *Kardiologická revue – Interní medicína*, 18(4), 258–267.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

- Oh, S., Tsujimoto, T., Kim, B., Uchida, F., Suzuki, H., Iizumi, S., Isobe, T., Sakae, T., Tanaka, K., & Shoda, J. (2021). Weight-loss-independent benefits of exercise on liver steatosis and stiffness in Japanese men with NAFLD. *JHEP Reports*, 3(3), 100253. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100253>
- Ohashi, K., Munetsuna, E., Yamada, H., Ando, Y., Yamazaki, M., Taromaru, N., Nagura, A., Ishikawa, H., Suzuki, K., Teradaira, R., & Hashimoto, S. (2015). High fructose consumption induces DNA methylation at PPAR α and CPT1A promoter regions in the rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(1–2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.134>
- Papatheodoridi, M., & Cholongitas, E. (2019). Diagnosis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Current Concepts. *Current Pharmaceutical Design*, 24(38), 4574–4586. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190117102111>
- Perumpail, B. J., Khan, M. A., Yoo, E. R., Cholankeril, G., Kim, D., & Ahmed, A. (2017). Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 23(47), 8263–8276. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i47.8263>
- Pirola, C. J., Fernández Gianotti, T., Castaño, G. O., Mallardi, P., San Martino, J., Mora Gonzalez Lopez Ledesma, M., Flichman, D., Mirshahi, F., Sanyal, A. J., & Sookoian, S. (2015). Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut*, 64(5), 800–812. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306996>
- Pirola, C. J., Gianotti, T. F., Burgueño, A. L., Rey-Funes, M., Loidl, C. F., Mallardi, P., Martino, J. S., Castaño, G. O., & Sookoian, S. (2013). Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut*, 62(9), 1356–1363. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302962>
- Pitisuttithum, P., & Treeprasertsuk, S. (2022). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) among older adults. *Portal Hypertension & Cirrhosis*, 1(3), 184–191. <https://doi.org/10.1002/poh2.31>
- Powell, E. E., Wong, V. W.-S., & Rinella, M. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease. *The Lancet*, 397(10290), 2212–2224. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3)
- Rayner, K. J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M. L., Tamehiro, N., Fisher, E. A., Moore, K. J., & Fernández-Hernando, C. (2010). MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Science*, 328(5985), 1570–1573. <https://doi.org/10.1126/science.1189862>
- Ren, H., Hu, F., Wang, D., Kang, X., Feng, X., Zhang, L., Zhou, B., Liu, S., & Yuan, G. (2021). Sirtuin 2 Prevents Liver Steatosis and Metabolic Disorders by Deacetylation

- of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α . *Hepatology*, 74(2), 723–740. <https://doi.org/10.1002/hep.31773>
- Rinella, M. E., Lazarus, J. V., Ratzliff, V., Francque, S. M., Sanyal, A. J., & et al. (2023). A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology*, 78(6), 1966–1986. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000520>
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
- Rodríguez-Sanabria, J. S., Escutia-Gutiérrez, R., Rosas-Campos, R., Armendáriz-Borunda, J. S., & Sandoval-Rodríguez, A. (2022). An Update in Epigenetics in Metabolic-Associated Fatty Liver Disease. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.770504>
- Roth, S. Y., Denu, J. M., & Allis, C. D. (2001). Histone Acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 81–120. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.81>
- Shao, W., & Espenshade, P. J. (2012). Expanding Roles for SREBP in Metabolism. *Cell Metabolism*, 16(4), 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.09.002>
- Sodum, N., Kumar, G., Bojja, S. L., Kumar, N., & Rao, C. M. (2021). Epigenetics in NAFLD/NASH: Targets and therapy. *Pharmacological Research*, 167, 105484. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105484>
- Sookoian, S., Rosselli, M. S., Gemma, C., Burgueño, A. L., Fernández Gianotti, T., Castaño, G. O., & Pirola, C. J. (2010). Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: Impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α promoter. *Hepatology*, 52(6), 1992–2000. <https://doi.org/10.1002/hep.23927>
- Soška, V. (2016). Jaderné receptory PPAR α . *Vnitřní Lékařství*, 52(6), 628–631.
- Steunou, A.-L., Rossetto, D., & Côté, J. (2014). Regulating Chromatin by Histone Acetylation. In *Fundamentals of Chromatin* (s. 147–212). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8624-4_4
- Sun, L., Marin de Evsikova, C., Bian, K., Achille, A., Telles, E., Pei, H., & Seto, E. (2018). Programming and Regulation of Metabolic Homeostasis by HDAC11. *EBioMedicine*, 33, 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.06.025>
- Sun, Z., Miller, R. A., Patel, R. T., Chen, J., Dhir, R., Wang, H., Zhang, D., Graham, M. J., Unterman, T. G., Shulman, G. I., Sztalryd, C., Bennett, M. J., Ahima, R. S., Birnbaum, M. J., & Lazar, M. A. (2012). Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nature Medicine*, 18(6), 934–942. <https://doi.org/10.1038/nm.2744>

- Sutti, S., & Albano, E. (2020). Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(2), 81–92. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0210-2>
- Swann, J. R., Want, E. J., Geier, F. M., Spagou, K., Wilson, I. D., Sidaway, J. E., Nicholson, J. K., & Holmes, E. (2011). Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_1), 4523–4530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006734107>
- Sweeny, K. F., & Lee, C. K. (2021). Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. *Gastroenterology & hepatology*, 17(12), 579–587.
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Terrault, N. A., Francoz, C., Berenguer, M., Charlton, M., & Heimbach, J. (2023). Liver Transplantation 2023: Status Report, Current and Future Challenges. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 21(8), 2150–2166. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2023.04.005>
- Tian, Y., Wong, V. W. S., Wong, G. L. H., Yang, W., Sun, H., Shen, J., Tong, J. H. M., Go, M. Y. Y., Cheung, Y. S., Lai, P. B. S., Zhou, M., Xu, G., Huang, T. H. M., Yu, J., To, K. F., Cheng, A. S. L., & Chan, H. L. Y. (2015). Histone Deacetylase HDAC8 Promotes Insulin Resistance and β -Catenin Activation in NAFLD-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, 75(22), 4803–4816. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3786>
- Tian, Y., Wong, V. W.-S., Chan, H. L.-Y., & Cheng, A. S.-L. (2013). Epigenetic regulation of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. *Seminars in Cancer Biology*, 23(6), 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.08.010>
- Tilg, H. (2010). Adipocytokines in nonalcoholic fatty liver disease: key players regulating steatosis, inflammation and fibrosis. *Current Pharmaceutical Design*, 16(17), 1893–1895. <https://doi.org/10.2174/138161210791208929>
- Torres, J.-L., Novo-Veleiro, I., Manzanedo, L., Alvela-Suárez, L., Macías, R., Laso, F.-J., & Marcos, M. (2018). Role of microRNAs in alcohol-induced liver disorders and non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 24(36), 4104–4118. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i36.4104>
- Ucar, F., Sezer, S., Erdogan, S., Akyol, S., Armutcu, F., & Akyol, O. (2013). The relationship between oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: Its effects on the development of nonalcoholic steatohepatitis. *Redox Report*, 18(4), 127–133. <https://doi.org/10.1179/1351000213Y.0000000050>

- Utzschneider, K. M., & Kahn, S. E. (2006). The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(12), 4753–4761. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0587>
- Vachher, M., Bansal, S., Kumar, B., Yadav, S., & Burman, A. (2022). Deciphering the role of aberrant DNA methylation in NAFLD and NASH. *Heliyon*, 8(10), e11119. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11119>
- Van den Bosch, T., Leus, N. G. J., Timmerman, T., & Dekker, F. J. (2016). Small Molecule Inhibitors of Histone Deacetylases and Acetyltransferases as Potential Therapeutics in Oncology. In *Drug Discovery in Cancer Epigenetics* (s. 191–208). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802208-5.00008-4>
- Vega-Badillo, J., Gutiérrez-Vidal, R., Hernández-Pérez, H. A., Villamil-Ramírez, H., León-Mimila, P., Sánchez-Muñoz, F., Morán-Ramos, S., Larrieta-Carrasco, E., Fernández-Silva, I., Méndez-Sánchez, N., Tovar, A. R., Campos-Pérez, F., Villarreal-Molina, T., Hernández-Pando, R., Aguilar-Salinas, C. A., & Canizales-Quinteros, S. (2016). Hepatic miR-33a/miR-144 and their target gene ABCA1 are associated with steatohepatitis in morbidly obese subjects. *Liver International*, 36(9), 1383–1391. <https://doi.org/10.1111/liv.13109>
- Vlahová, V., Šmerková, K., Vaculovičová, M., & Kizek, R. (2014). MiRNA: Od biogeneze po využití v lékařství. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 1, 18–22.
- Wang, L.-F., Wang, X.-N., Huang, C.-C., Hu, L., Xiao, Y.-F., Guan, X.-H., Qian, Y.-S., Deng, K.-Y., & Xin, H.-B. (2017). Inhibition of NAMPT aggravates high fat diet-induced hepatic steatosis in mice through regulating Sirt1/AMPK α /SREBP1 signaling pathway. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0464-z>
- Wang, T., Chen, K., Yao, W., Zheng, R., He, Q., Xia, J., Li, J., Shao, Y., Zhang, L., Huang, L., Qin, L., Xu, M., Zhang, Z., Pan, D., Li, Z., & Huang, F. (2021). Acetylation of lactate dehydrogenase B drives NAFLD progression by impairing lactate clearance. *Journal of Hepatology*, 74(5), 1038–1052. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.028>
- Wigg, A., Dymock, R., McCarthy, P., Grose, R., & Cummins, A. (2001). The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*, 48(2), 206–211. <https://doi.org/10.1136/gut.48.2.206>
- Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., & Penner, M. H. (2004). Measurements of Protein Content. In *Handbook of Food Analytical Chemistry* (s. 73–121). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch3>

- Wu, J., Du, C., Lv, Z., Ding, C., Cheng, J., Xie, H., Zhou, L., & Zheng, S. (2013). The Up-Regulation of Histone Deacetylase 8 Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, *58*(12), 3545–3553. <https://doi.org/10.1007/s10620-013-2867-7>
- Yamada, H., Suzuki, K., Ichino, N., Ando, Y., Sawada, A., Osakabe, K., Sugimoto, K., Ohashi, K., Teradaira, R., Inoue, T., Hamajima, N., & Hashimoto, S. (2013). Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clinica Chimica Acta*, *424*, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.021>
- Yang, P.-C., & Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4*(9), 429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Yoon, A., Tammen, S. A., Park, S., Han, S. N., & Choi, S.-W. (2017). Genome-wide hepatic DNA methylation changes in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrition Research and Practice*, *11*(2), 105. <https://doi.org/10.4162/nrp.2017.11.2.105>
- Younossi, Z., Anstee, Q. M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., & Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *15*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>
- Zhang, H., Fu, H., Fang, H., Deng, Q., Huang, H., Hou, D., Wang, M., Yao, Q., Si, Q., Chen, R., Li, L., Weng, J., Guo, T., & Wang, M. (2022). Epigenetic Regulation of Methylation in Determining the Fate of Dental Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, *2022*, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2022/5015856>
- Zhang, L., Zhang, Z., Li, C., Zhu, T., Gao, J., Zhou, H., Zheng, Y., Chang, Q., Wang, M., Wu, J., Ran, L., Wu, Y., Miao, H., Zou, X., & Liang, B. (2021). S100A11 Promotes Liver Steatosis via FOXO1-Mediated Autophagy and Lipogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *11*(3), 697–724. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.10.006>

Přílohy

Tabulka 6 Primery miRNA

	miRNA	miRBase přístupové číslo	RT primer	Forward primer
referenční miRNA	miR-93-5p	MIMAT0000540	5'-GTC TCC TCT G GT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GC A C CA GAG GAG AC CTA CCT-3'	5'-GTC AAT CAA AGT GCT GTT CGT G-3'
miRNAs spojené s lipidovým metabolismem a obezitou	miR-16-5p	MIMAT0000527	5'-GTC TCC TCT G GT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GC A C CA GAG GAG ACC GCC AA-3'	5'-ACA GCC TAG CAG CAC GTA AAT-3'
	miR-21a-5p	MIMAT0000530	5'-GTC TCC TCT G GT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GC A C CA GAG GAG ACT CAA CA-3'	5'-GGA TGA CGT AGC TTA TCA GAC TG-3'
	miR-29b-3p	MIMAT0000127	5'-GTC TCC TCT G GT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GC A C CA GAG GAG AC AAC ACT-3'	5'-GCC GTT AGC ACC ATT TGA AAT C-3'
	miR-33a-5p	MIMAT0000667	5'-GTC TCC TCT G GT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GC A C CA GAG GAG AC TGC AAT-3'	5'-AGG TTC GGT GCA TTG TAG TTG-3'
	miR-122-3p	MIMAT0017005	5'-GTC TCC TCT G GT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GC A C CA GAG GAG AC TAT TTA-3'	5'-GAG CTC AAC GCC ATT ATC ACA-3'
	miR-152-3p	MIMAT0000162	5'-GTC TCC TCT G GT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GC A C CA GAG GAG AC CCA AGT-3'	5'-CGA CGT TCA GTG CAT GAC AG-3'
	miR-200a-3p	MIMAT0000519	5'-GTC TCC TCT G GT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GC A C CA GAG AC ACA TCG-3'	5'-GCG TCC TAA CAC TGT CTG GT-3'

	miR-200b-3p	MIMAT0000233	5'-GTC TCC TCT G GT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GC A C CA GAG GAG AC TCA TCA-3'	5'-GGT GCT AAT ACT GCC TGG TA-3'
	miR-451a	MIMAT0001632	5'-GTC TCC TCT G GT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GC A C CA GAG GAG AC AAC TCA-3'	5'-CGA CCG AAA CCG TTA CCA TT-3'

Tabulka 7 Primery mRNA

	Gene	NCBI přístupové číslo	Forward primer	Reverse primer	Velikost ampliconu
Geny spojené s epigenetickou regulací	<i>Dnmt1</i>	NM_001199432	5'-AACCCCAGATGTTGACCAGT-3'	5'-GGAAGTGAACCTATGCATGGG-3'	98
	<i>Dnmt3a</i>	NM_153743	5'-CCATGGGCGTTAGTGACAAG-3'	5'-TGCAGCAGACACTTCTTTGG-3'	86
	<i>Hdac1</i>	NM_008228	5'-GATCCCTAATGAGCTGCCCT-3'	5'-TGTTGGAAGGGCTGATGTGA-3'	80
	<i>Hdac2</i>	NM_008229	5'-AGGTGAAGGAGGTCGTAGGA-3'	5'-TGTCCTCTGTCTCCTTCTTGT-3'	89
	<i>Hdac3</i>	NM_010411	5'-ACTTCGAGTACTTTGCCCA-3'	5'-TTCTGATTCTCGATGCGGGT-3'	67
	<i>Hdac5</i>	NM_001077696	5'-CACGCTTCTTTGGACCAGAG-3'	5'-GGAAAGTCATCACGGCTGTC-3'	107
	<i>Hdac6</i>	NM_001411604	5'-CATGCTGGAGTCCTGTGTTG-3'	5'-AGTAGATGGAAGTCTGGGCG-3'	53
	<i>Hdac11</i>	NM_144919	5'-CGCACAGCCCGTATTATCG-3'	5'-CCCAGGTCATGCAAGTTGAG-3'	50
	<i>Sirt1</i>	NM_001159589	5'-ACATCTCATGATTGGCACCG-3'	5'-GCCACAGCGTCATATCATCC-3'	95
	<i>Sirt2</i>	NM_001122766	5'-AGAATACACGATGGGCTGGA-3'	5'-CTCTGACACTGCTCACACCT-3'	72
	<i>Sirt3</i>	NM_001177804	5'-GGCCTCTACAGCAACCTTCA-3'	5'-AAGATGGCTTCAGGGTACGG-3'	53
	<i>Hat1</i>	NM_026115	5'-TGGATGATGAAAGATGGCACT-3'	5'-CGGGTTTTGTCTGGGTACAC-3'	124
	<i>Kat2b</i>	NM_001190846	5'-AAAGAGCCCAAAGACCCTGA-3'	5'-AGGATGTTCTTGAGGGTGCT-3'	50
	<i>Kat5</i>	NM_001362370	5'-TGTCATCTCCACACTGCAGT-3'	5'-GCTCATGCCCATCCACGAT-3'	95
<i>Ep300</i>	NM_177821	5'-AGATTCCACCACAACCCAG-3'	5'-TGGCTGGCTTTGTTGATTCT-3'	50	

Tabulka 8 Univerzální primer

	Sekvence
univerzální <i>reverse primer</i>	5'-GTG CAG GGT CCG AGG TAT TC-3'