

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**Možnosti indukce UCP2 (uncoupling protein 2) v hepatocytech potkana
v podmínkách *in vivo***

Radka Bolehovská

Autoreferát dizertační práce

Doktorský studijní program *Fyziologie a patologická fyziologie*

Hradec Králové

2012

Dizertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Fyziologie a patologická fyziologie na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Radka Bolehovská, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc., Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Oponenti: doc. RNDr. Martin Kalous, CSc., Katedra buněčné biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Ing. Dalibor Novotný, Ph.D., Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky, Fakultní nemocnice Olomouc

Obhajoba dizertační práce se bude konat před Komisí pro obhajobu dizertačních prací doktorského studijního programu Fyziologie a patologická fyziologie dne

Tato práce vznikla za podpory grantu *GAUK 123/2004 a GAČR 303/03/H065*.

S dizertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Předseda komise pro obhajobu dizertačních prací
v doktorském studijním programu Fyziologie a patologická fyziologie

Obsah

1. Seznam použitých zkratk	4
2. Souhrn	5
3. Summary	6
4. Úvod do problematiky	7
5. Cíle práce	8
6. Materiál a metody	8
6.1. Stanovení enzymové aktivity mGPDH	9
6.2. Stanovení množství mGPDH pomocí western blotu	9
6.3. Izolace RNA	10
6.4. Stanovení RNA mGPDH pomocí northern blotu	10
6.5. Stanovení RNA UCP2	10
6.6. Stanovení koncentrace celkového a volného trijodtyroninu	11
6.7. Statistické vyhodnocení výsledků	11
7. Výsledky	11
7.1. Výsledky stanovení mGPDH	11
7.2. Výsledky stanovení mRNA UCP2	13
8. Diskuze	18
9. Závěr	22
10. Použitá literatura	23
11. Přehled publikační aktivity	27

1. Seznam použitých zkratk

ϵ_λ	molární absorpční koeficient
A	ampér
A/min.	absorbance v čase
ATP	adenosintrifosfát
B2M	β -2-mikroglobulin
BMCP1	mozkový mitochondriální přenašečový protein 1 (z angl. brain mitochondrial carrier protein 1) nebo-li UCP5
bp	počet párů bází
BSA	hovězí sérum albumin
cDNA	copy DNA (komplementární DNA) vzniklá přepisem in vitro ze sekvence RNA
Ct	threshold cyklus
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DCPIP	dichlorfenolindofenol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	směs nukleotidů (deoxyribonukleosidtrifosfátů)
DTT	dithiotreitol
E	účinnost real-time polymerázové řetězové reakce
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
HG	housekeepingový gen
HPRT1	hypoxantin fosforibosyl-transferáza 1
IgG	imunoglobulin G
mGPDH	mitochondriální glycerofosfátdehydrogenáza
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
<i>n</i>	celkový počet potkanů v jednotlivých skupinách
<i>p</i>	statistická významnost
PCR	polymerázová řetězová reakce
PH	parciální hepatektomie
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT	reverzí transkripce
SDS	dodecylsulfát sodný
SSC	fyziologický roztok citrátu sodného
SURF1	surfeit 1
T ₃	3,5,3'-trijodtyronin
TBP	TATA box vázající protein
TNF α	tumor nekrotizující faktor
TRIS	Trizma base (Tris(hydroxymethyl)-aminometan)
UCP	odpřahující (uncoupling) protein
UCP1 – UCP5	odpřahující protein 1 až 5
UCPs	odpřahující proteiny

2. Souhrn

Úvod

Odpřahující (uncoupling) protein 2, objevený v roce 1997, je prvním popsáním homologem odpřahujícího proteinu 1. Odpřahující proteiny (UCP) zvyšují permeabilitu vnitřní mitochondriální membrány pro protony, snižují účinnost energetické přeměny, inhibují syntézu ATP a stimulují uvolnění energie ve formě tepla. UCP také zvyšují oxidaci substrátů a redukují produkci reaktivních kyslíkových radikálů v mitochondriích.

Cíle

Hlavním cílem projektu bylo zavést a optimalizovat kvantitativní real-time PCR pro detekci kinetiky exprese mRNA UCP2 u vzorků jaterní tkáně potkana. Prezentovaná studie zjišťovala účinek akutního a chronického působení trijodtyroninu a efekt parciální hepatektomie na množství mRNA odpřahujícího proteinu 2 u potkanů kmene Wistar.

Výsledky

Intraperitoneální injekce jedné dávky trijodtyroninu (200 µg/kg tělesné hmotnosti potkanů) zvýšila téměř dvakrát mRNA expresi odpřahujícího proteinu 2 ($p < 0,01$ vs. kontrolní skupina) v jaterní tkáni po 12 hodinách po aplikaci. Koncentrace trijodtyroninu a volného trijodtyroninu se v séru zvýšila 122-krát, respektive 77-krát ($p < 0,001$). Statisticky nevýznamná indukce exprese mRNA UCP2 byla pozorována po aplikaci tří dávek trijodtyroninu (3×200 µg/kg tělesné hmotnosti potkanů). Maximální hodnota celkového T_3 byla oproti kontrolní skupině 33-násobná a u volného T_3 47-násobná ($p < 0,001$). Navíc maximum bylo zjištěno až 6 hodin po aplikaci poslední dávky, což je o tři hodiny později než při podání jedné dávky hormonu. Exprese mRNA UCP2 byla zvýšena téměř 4-násobně 3 hodiny po provedení parciální hepatektomie.

Závěry

Tyto výsledky naznačují, že uncoupling protein 2 je gen indukovatelný v játrech krátce po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu. Data ohledně kinetiky trijodtyroninem zprostředkované indukce mRNA UCP2 během prvních 24 hodin po aplikaci nejsou doposud v literatuře dostupná, proto patří mezi naše prioritní poznatky.

Parciální hepatektomie, ale i trijodtyronin zvyšují mitochondriální produkci kyslíkových radikálů. To podporuje předpoklad, že indukce UCP2 v játrech je fyziologickým antioxidačním ochranným mechanismem proti zvýšené produkci ROS.

Klíčová slova: uncoupling protein 2, exprese mRNA UCP2, trijodtyronin, parciální hepatektomie

3. Summary

Possibilities of UCP2 (uncoupling protein 2) induction in rat hepatocytes in *in vivo* conditions

Introduction

Uncoupling protein 2, discovered in 1997, is the first described homologue of uncoupling protein 1. Uncoupling proteins increase the permeability of inner mitochondrial membrane for protons, decrease the efficiency of energy conversion, inhibit the ATP synthesis and stimulate energy release in form of heat. Uncoupling proteins also increase the substrate oxidation and reduce production of reactive oxygen species in mitochondria.

Objective, material and method

The aim of this study was to establish and optimised the quantitative real-time PCR for detection of UCP2 mRNA expression kinetics in rat liver tissue. The present study was conducted to assess the effects of acute and chronic treatment with triiodothyronine and the effect of partial hepatectomy on liver uncoupling protein 2 mRNA levels in male Wistar rats.

Results

Intraperitoneal injection of one dose of triiodothyronine (200 µg/kg rat body weight) increased mRNA expression of uncoupling protein 2 in liver tissue almost 2-fold ($P < 0.01$ vs. control group) in rats 12 hours after T_3 administration. Concentrations of total triiodothyronine and free triiodothyronine in serum were increased 122-fold and 77-fold ($p < 0.001$), respectively. Induction of UCP2 mRNA expression was observed also after the administration of three doses of 200 µg T_3 /kg rat body weight; nevertheless, this change was not statistically significant. Maximal values of serum concentration of total T_3 were 33-fold and of free T_3 47-fold increased in comparison with control groups ($p < 0.001$). The maximal concentrations were detected 6 hours after application of the last dose of T_3 , instead of after single administration of T_3 the highest values were found 3 hours after the hormone injection. Expression of UCP2 mRNA was increased almost 4-fold 3 hours after partial hepatectomy.

Conclusion

Results of our work suggest that gene coding UCP2 is a gene inducible in the liver shortly after single administration of triiodothyronine or partial hepatectomy. The data concerning kinetics of triiodothyronine mediated induction of UCP2 mRNA during the first 24 hours after treatment were not available in literature so far and therefore represent our priority findings.

Triiodothyronine and partial hepatectomy increased the production of reactive oxygen species in mitochondria. This supports the idea that induction of UCP2 in the liver is physiological antioxidant protection against enhanced production of ROS.

Key words: uncoupling protein 2, expression of UCP2 mRNA, triiodothyronine, partial hepatectomy

4. Úvod do problematiky

U většiny buněk a tkání mitochondrie představují hlavní zdroj adenosintrifosfátů (ATP), univerzální energetický přenašeč uvnitř buňky. Proces energetického přenosu z živin do ATP se obecně rozděluje do dvou kroků. V prvním kroku - dýchacím řetězci - je energie uskladněná v chemických vazbách přeměněna v elektrochemický gradient protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. V druhém - oxidační fosforylaci - je energie gradientu využita pro syntézu ATP.

Permeabilita vnitřní mitochondriální membrány pro protony je zvýšena uncoupling proteiny (UCPs). Ty snižují účinnost energetické přeměny a snižují potenciál pro tvorbu ATP, neboť odpřahují oxidační fosforylaci od dýchacího řetězce. Protony přenesené komplexy dýchacího řetězce ven z mitochondrie jsou UCPs transportovány zpět do matrix mitochondrií. Tím protony obcházejí dráhu ATP syntézy a energie nevyužitá pro tvorbu ATP se nevratně uvolňuje ve formě tepla. UCPs také zvyšují oxidaci substrátů a snižují tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v mitochondriích, protože již nepatrný vzestup zpětného toku protonů do matrix, který zmenšuje protonmotivní sílu, značně sníží tvorbu ROS (1, 2).

V současné době je známo pět homologů UCPs (3). Jako první byl objeven uncoupling protein 1 (UCP1), zpočátku nazývaný thermogenin. Nachází se výhradně na vnitřní mitochondriální membráně hnědé tukové tkáně savců. Jeho hlavní funkcí je termogeneze, která je aktivována sympatickým neurotransmiterem noradrenalinem prostřednictvím β -receptorů. U lidí má význam jen v novorozeneckém a kojeneckém období, ale u hlodavců a především hibernujících živočichů se uplatňuje po celý život.

Mezi další uncoupling proteiny patří UCP2 identifikovaný v roce 1997, lokalizovaný v mitochondriích většiny tkání savců, UCP3 exprimovaný v hnědé tukové tkáni a kosterním svalstvu, UCP4 a UCP5, též nazývaný BMCP1, které byly zatím izolovány z mozků savců.

Potkaní UCP2 vykazuje 59% homologii v aminokyselinové sekvenci s potkaní UCP1 a 95% homologii s lidským UCP2 (4). UCP2 se nachází ve velkém množství v plicích, střevě, slezině (5), bílé tukové tkáni a thymu (6). Hepatocyty jater dospělých potkanů neexprimují UCP2, na rozdíl od fetálních hepatocytů (6) a neparenchymových buněk jater, zejména Kupfferových buněk (7). Tento stav je ovšem reverzibilní a exprese genu pro UCP2 se může v krátké době mnohonásobně zvýšit.

Velkou neznámou zůstává funkce UCP2. Někteří autoři ho dávají do souvislosti s udržováním bazálního metabolismu a udržováním stálé tělesné hmotnosti (8), jiní s termogenní odpovědí organismu na zánětlivé stimuly (9), s obrannými mechanismy proti tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů (1, 10, 11), s mírnou adaptivní termogenezí (9), s regulací stupně oxidace volných mastných kyselin (2), případně s diferenciací a funkcí myelopoetické řady (6). Byla také zjištěna regulační funkce u diabetu 2. typu, podíl na prevenci aterosklerózy a stárnutí, neuroprotektivní efekt, navíc je diskutována potenciálně ochranná role UCP2 v rozvoji rakoviny (12, 13).

Expresi UCP2 v hepatocytech lze indukovat stavy, které vedou k dediferenciaci hepatocytů, např. regenerace jater navozená parciální hepatektomií (14), podání endotoxinu resp. TNF α (15, 16), k expresi dochází rovněž u některých typů hepatomů (17).

Možnost indukce UCP2 pomocí trijodtyroninu byla již také popsána, ale malá pozornost byla dosud věnována kinetice exprese UCP2 v játrech po aplikaci hormonů štítné žlázy. Vzhledem k významné roli hormonů štítné žlázy v regulaci energetického metabolismu jsme se rozhodli zjistit, jaká je indukce exprese RNA UCP2 v jaterní tkáni potkanů během prvních 24 hodin po aplikaci trijodtyroninu a po parciální hepatektomii.

5. Cíle dizertační práce

Hlavním cílem naší práce bylo studium indukce exprese mRNA uncoupling proteinu 2 v jaterní tkáni potkana. S ohledem na skutečnost, že hormony štítné žlázy vykazují významný účinek na energetický metabolismus, který může být zprostředkován kromě přímého efektu také indukcí genové exprese proteinů účastnících se metabolických pochodů, soustředili jsme se na sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 v časných hodinách po aplikaci trijodtyroninu. Pro optimalizaci experimentálních podmínek jsme nejprve použili jako modelový systém genové indukce hormony štítné žlázy mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázu, u které lze na rozdíl od UCP2 hodnotit nejen expresi mRNA, ale také množství proteinu i jeho enzymovou aktivitu. Za takto definovaných podmínek jsme hodnotili kinetiku exprese mRNA UCP2.

V další části práce jsme ověřovali expresi mRNA UCP2 v jaterní tkáni potkana po parciální (2/3) hepatektomii. Jedná se o proliferační děj vyžadující značné množství energie, zároveň je však provázen zvýšenou tvorbou ROS. Případná zvýšená tvorba UCP2 by mohla být významným ochranným mechanismem proti oxidačnímu stresu.

V jednotlivých etapách naší práce jsme provedli:

1. studium vlivu jednorázového a opakovaného podání trijodtyroninu na biogenezi mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázy
2. optimalizace metody pro stanovení exprese RNA UCP2
3. sledování exprese mRNA UCP2 v intervalech 1, 3, 6, 12 a 24 hodiny po i. p. aplikaci jedné resp. tří dávek trijodtyroninu
4. studium exprese mRNA UCP2 za 1, 3, 6, 12 a 24 hodiny po parciální hepatektomii.

6. Materiál a metody

Všechny pokusy jsme prováděli na dospělých potkanech, samcích kmene Wistar (BioTest, Česká republika) o počáteční hmotnosti 200 až 250 g. Zvířata byla chována v klecích při 23 ± 1 °C, relativní vlhkosti 55 ± 10 %, výměně vzduchu 12 až 14× za hodinu a světelném režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy s volným přístupem ke standardní laboratorní krmné směsi (ST-1, Velaz) a vodě. O všechna zvířata bylo pečováno podle metodických pokynů Odborné komise pro ochranu zvířat Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze. Protokoly pokusů in vivo byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání podle zákona č. 246/92 Sb. v platném znění, §17, 3c. při Lékařské fakultě v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

V první části naší práce jsme se zaměřili na zjištění vlivu aplikace trijodtyroninu na biogenezi mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázy (mGPDH) jako modelového systému, který nám umožní lépe navrhnout schéma pokusů pro následné studium exprese UCP2. Nejprve jsme prováděli analýzy mGPDH u potkanů, kterým byla aplikována jedna dávka trijodtyroninu (200 µg/kg tělesné hmotnosti), schéma pokusu je uvedeno v tabulce č. 1.

Tab. č. 1: Schéma jednotlivých skupin potkanů při sledování kinetiky mRNA mGPDH po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu (T₃).

Skupina	n	Charakteristika skupiny
kontrolní	4	potkani usmrcení 3 hodiny po aplikaci jedné dávky fyziologického roztoku
T ₃ _3h	4	potkani usmrcení 3 hodiny po aplikaci jedné dávky T ₃
T ₃ _6h	4	potkani usmrcení 6 hodin po aplikaci jedné dávky T ₃
T ₃ _12h	4	potkani usmrcení 12 hodin po aplikaci jedné dávky T ₃
T ₃ _24h	4	potkani usmrcení 24 hodin po aplikaci jedné dávky T ₃
T ₃ _72h	4	potkani usmrcení 72 hodin po aplikaci jedné dávky T ₃

V další části práce jsme potkanům podávali tři dávky trijodtyroninu ($3 \times 200 \mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti). V tomto případě jsme potkany rozdělili pouze do tří skupin. První skupině (KO) byl po tři dny podáván fyziologický roztok a druhé skupině trijodtyronin ($3T_3_{24h}$). Obě tyto skupiny byly po 24 hodinách od poslední aplikace usmrceny. Třetí skupině ($3T_3_{72h}$) byl rovněž tři dny aplikován roztok trijodtyroninu, ale potkani byli usmrceni až po 72 hodinách od aplikace poslední dávky.

Schémata pokusů pro studium exprese UCP2 v játrech po aplikaci jedné a tří dávek trijodtyroninu a po parciální hepatektomii byla navržena až na základě výsledků modelového systému.

6.1. Stanovení enzymové aktivity mGPDH

Izolace jaterních mitochondrií byla prováděna metodou frakční centrifugace podle Schneidera a Hogebooma (18).

Koncentrace bílkovin byla stanovena metodou podle Lowryho a spol. (19), kde jako standard byl použit bovinní sérum albumin (BSA, 0,1% roztok). Podstatou detekce je barevná reakce tyrozinových zbytků proteinu s Folinovým reagens v alkalickém prostředí. Měření bylo prováděno na spektrofotometru UV – 1601 (Shimadzu, Japonsko).

GPDH po přeměně glycerofosfátu na dihydroxyacetonfosfát předává redukční ekvivalenty na dichlorfenolindofenol (DCPIP), který slouží jako umělý akceptor elektronů. DCPIP je schopen odebírat dva elektrony, má spíše hydrofobní charakter a proniká membránou mitochondrií. Jeho redukce je spojena se ztrátou charakteristického modrého zbarvení. Měření absorbance bylo prováděno na spektrofotometru UV – 1601 Shimadzu při vlnové délce 610 nm. Pro výpočet specifické aktivity je proto nutné odečíst endogenní aktivitu od celkové aktivity enzymu a vše přepočítat na koncentraci proteinu daného vzorku. Výsledná aktivita je vyjádřena v nmol/min/mg proteinu s použitím molárního absorpčního koeficientu (ϵ_λ) DCPIP $19,1 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$, tj. aktivita mGPDH [nmol/l] = $[A/\text{min.} : (\epsilon_\lambda \cdot d)]$, kde A/min. je absorbance v čase a d je tloušťka květy (1 cm). Aktivita mGPDH [nmol/min./mg mitochondriálního proteinu] = aktivita mGPDH [nmol/l] : (koncentrace mitochondriálního proteinu:ředění vzorku do květy).

6.2. Stanovení množství mGPDH pomocí western blotu

Stanovení množství mGPDH pomocí western blotu bylo prováděno pracovníky oddělení Bioenergetiky Fyziologického ústavu Akademie věd. Pro analýzu se použily vzorky proteinových alikvotů mitochondrií (10 μg /jamku) solubilizovaných v dodecylsulfátu sodném (SDS). V první části se nejprve provede diskontinuální gelová elektroforéza v SDS-10% polyakrylamidovém gelu s využitím tricinu jako táhnoucího iontu, který umožňuje rozlišení malých proteinů při nižších koncentracích akrylamidu. Separace v elektrickém poli se provádí v Mini Protean II elektroforetických celách (Bio-Rad, USA). Doporučené podmínky pro optimální rozlišení jsou konstantní napětí 200 V, obvyklá doba elektroforézy 45 minut.

Proteiny z gelu se následně blotují na nitrocelulóзовé membrány (HybondTM C-Extra, Amersham Biosciences, Velká Británie) přiložením gelu k membráně a pomocí blotovacího zařízení, který umožňuje polosuchý elektropřenos při 0,7 mA/cm² po dobu 1 hodiny. Pro detekci mGPDH je nutné zablockovat povrch membrány, která váže proteiny, tj. antigen, ale i přidané protilátky. Blokace nespecifických míst (resp. volných míst) se provádí umístěním membrány přes noc do roztoku 3% odtučněného mléka s 0,3% Tritonem X-100 v 0,15 mol/l NaCl a 0,02 mol/l Na₂HPO₄. Poté je membrána inkubována 3 hodiny s králičí polyklonální anti-mGPDH protilátkou (ředění 1:5000) zvětšenou o C-terminální peptid LDR RVP IPV DRS CGG myšího enzymu podle publikace Ueda et al. (20). Membrány byly dále inkubovány 1,5 hodiny za použití buď kozí anti-myší IgG (1:1000, A8924 Sigma, USA), nebo kozí anti-králičí IgG (1:1000, F0382 Sigma, USA) jako sekundární protilátky, která byla konjugována s křenovou peroxidázou. Detekce vzniklého imunokomplexu chemiluminiscenční reakcí probíhala za použití ECL kitu

(Amersham Biosciences, Velká Británie) na přístroji LAS 1000 (Fujifilm, Japonsko) a signál se kvantifikoval pomocí Aida 3.21 Image Analyser software (Raytest, Německo).

6.3. Izolace RNA

Základ izolační metody popsali ve své publikaci Chromczynski a Sacchi (21). Tkáň, resp. buňky jsou nejprve lyzovány a zhomogenizovány v chemikálii RNA Blue, která obsahuje fenol a další komponenty potřebné k lýze vzorku tkáně, tj. k rozvolnění nukleoproteinového komplexu. Ke vzniklému lyzátu se přidává chloroform a provede se extrakce. Pomocí krátké centrifugace se vzorek rozdělí do třech fází. První vodná fáze obsahuje RNA, druhá tzv. interfáze obsahuje DNA a spodní, modře zbarvená organická fáze obsahuje odpadní složky jako proteiny, resp. peptidy, lipidy a další. Pro další krok izolace se použije horní vodná fáze, ke které se přidá izopropylalkohol pro precipitaci RNA. Po centrifugaci a odsátí supernatantu se peleta promyje etanolem pro odstranění přítomných solí. Po další centrifugaci se opatrně odsaje veškerý etanol, vzniklá peleta RNA se vysuší a rozpustí se v aqua pro injektione.

6.4. Stanovení RNA mGPDH pomocí northern blotu

Northern blot analýzu RNA mGPDH prováděli pracovníci oddělení Bioenergetiky Fyziologického ústavu Akademie věd. Postup analýzy začíná elektroforetickou separací RNA v 1,25% agarózovém gelu obsahujícím 20 mmol/l MOPS (4-morfolinpropanosulfonová kyselina, pH 7,0), 6,7% formaldehyd, 50 mmol/l acetát sodný a 10 mmol/l EDTA. Poté byla rozdělená RNA přenášena přes noc na nylonovou Hybond-N-membránu (Amersham Biosciences, Velká Británie) pomocí kapilárního blotování. Membrána se pro potlačení nespecifických vazeb prehybridizuje při 42 °C po dobu 2 hodin v 10 ml prehybridizačního roztoku (5× SSC o pH 7,0, 5× Denhardtovo činidlo, 0,5% SDS, 50 mmol/l fosfát sodný o pH 6,5, 50% formamid a 100 µg/ml DNA ze slediho sperma). Následně se membrána hybridizuje ve stejném roztoku s přidavkem [³²P]dATP-značené cDNA, značené pomocí náhodného primingu pomocí DECAprime II kitu (Ambion, USA). Bloty se hybridizují na DNA sondu korespondující s 396 bp fragmentem potkaní mGPDH. Pro normalizaci se používá sonda korespondující s myší 18S rRNA (22). Radioaktivní signál je exponován pomocí Phosphor Storage Screen a kvantifikován pomocí BAS-5000 systému (Fuji, Japonsko).

6.5. Stanovení RNA UCP2

Pro přepis RNA jsme úspěšně zavedli reverzní transkripci (RT) pomocí rekombinantní reverzní transkriptázy myšího leukemického viru (M-MLV RT). Jako primer jsme využili oligo(dT)15VN (Generi-Biotech, Česká Republika), ostatní chemikálie včetně M-MLV RT byli od firmy Top-Bio (Česká Republika). Výsledek přepisu RNA na copy DNA (cDNA) byl srovnatelný s komerčním systémem „SuperScript™ First Strand Synthesis System“ (Invitrogen, USA), který je finančně velmi náročný.

Pro testování účinnosti RT jsme zavedli a optimalizovali PCR s primery pro housekeepingový gen glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (23) s následnou elektroforézou na 2% agarózovém gelu. U všech vzorků jsme touto metodou ověřili účinnost reverzní transkripce

Real-time PCR specifickou pro potkaní UCP2 jsme museli nejprve zavést. Primery a hydrolytickou sondu jsme si nechali navrhnout a nasyntetizovat firmou Generi-Biotech (Česká republika) tak, aby nebyla amplifikována genomická DNA. To znamená, že zvolené primery pro PCR mají exon-exonové uspořádání. Pro sledování exprese UCP2 genu je nutné všechny výsledky PCR reakcí normalizovat k nějakému housekeepingovému genu (HG), který vykazuje v pokusech minimální změny exprese. Pro vytvoření real-time PCR jsme vybírali ze čtyřech potkaních HG – B2M (β-2-microglobulin), HPRT1 (hypoxantine phosphoribosyl-transferase 1), SURF1 (surfeit 1) a TBP (TATA box binding protein). Real-time PCR reakcí specifickou pro UCP2 a pro HG jsme u všech experimentálních vzorků prováděli v dubletu. Odečet výsledků Ct hodnot PCR reakcí pro UCP2 a HG byl vždy za stejných podmínek, tj. při nastavení manuálního

thresholdu na 0,05 a pozadí mezi 3. a 15. cyklem. Vyhodnocení získaných výsledků jsme prováděli pomocí relativní kvantifikace využívající $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu s korekcí účinnosti amplifikace. Výsledky exprese UCP2 jsou tedy vyjádřeny jako poměr relativní exprese UCP2 ovlivněného vzorku vůči neovlivněným kontrolním vzorkům (100% exprese). Všechny výsledky exprese RNA UCP2 byly normalizovány na expresi housekeepingového genu.

6.6. Stanovení koncentrace celkového a volného trijodtyroninu

Stanovení koncentrace celkového a volného trijodtyroninu v séru se provádělo na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové na analyzátoru DPC IMMULITE 2000 (DPC, USA) pomocí komerčních souprav IMMULITE 2000 Total T3 a IMMULITE 2000 Free T3.

6.7. Statistické vyhodnocení výsledků

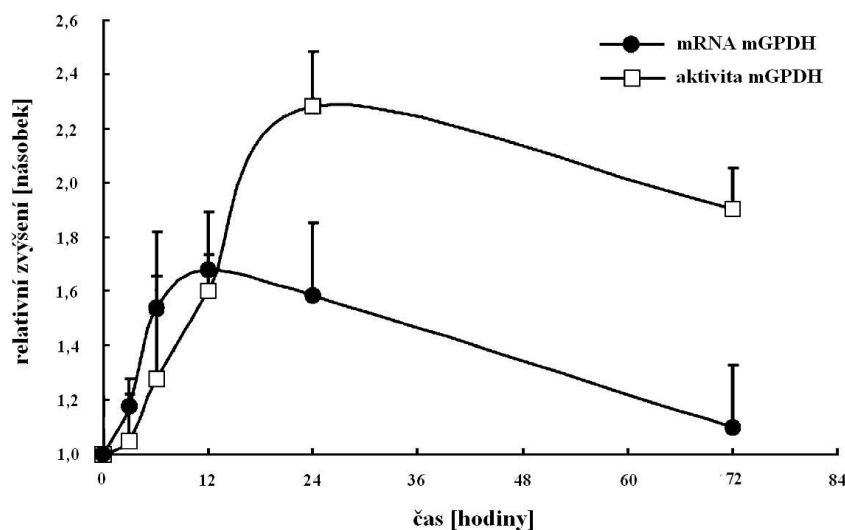
Testování statistické významnosti (p) bylo provedeno pomocí jednofaktorového ANOVA testu, pro porovnání rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl použit Tukey-Kramerův test. Pro statistické vyhodnocení byl použit statistický program Graph-Pad Prism 4.03 (GraphPad Software, USA). Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou. Hodnoty p nižší než 0,05 („*“) byly stanoveny jako statisticky významné na hladině významnosti 95 %, $p < 0,01$ („**“) na hladině 99 % a hodnoty $p < 0,001$ („***)“ na hladině významnosti 99,9 %.

7. Výsledky

7.1. Výsledky stanovení mGPDH

mGPDH po jednorázovém podání trijodtyroninu

Jak vyplývá z grafu č. 1, již po 3 hodinách dochází k signifikantnímu zvýšení mRNA mGPDH, kdežto v případě aktivity mGPDH až po 6 hodinách. Výrazné zvýšení množství mRNA mGPDH probíhalo mezi 3 a 6 hodinou a maximální vzestup byl zjištěn u potkanů, kteří byli usmrceni 12 hodin po aplikaci T_3 . Poté docházelo k poklesu obsahu mRNA, přesto ještě 72 hodin od podání T_3 je detekováno signifikantní 20% zvýšení.



Graf č. 1: Změny enzymové aktivity mGPDH v mitochondriích izolovaných z jater potkanů a množství mRNA mGPDH v játrech potkanů po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu. RNA mGPDH byla normalizována k referenčnímu genu 18S rRNA a enzymová aktivita je vyjádřena jako relativní množství vůči aktivitě kontrolního vzorku.

V případě enzymové aktivity mGPDH v izolovaných mitochondriích bylo maximální zvýšení pozorováno až o 12 hodin později než u množství mRNA, tj. 24 hodin po hormonální aplikaci. Poté následoval pozvolný pokles, kdy mezi 24 a 72 hodinami byl zjištěn signifikantní 30% pokles. To lze pravděpodobně vysvětlit již redukovanou mRNA syntézou. Zvýšená enzymová aktivita po 24 hodinách dobře korelovala se zvýšeným obsahem proteinu měřeným ve stejném čase (skoro 2,3× indukce enzymové aktivity vs. 2,7× indukce množství proteinu). To může vyloučit možnou kinetickou aktivaci mGPDH a naznačit tak, že *de novo* syntéza enzymu je zodpovědná za indukci biogeneze mGPDH.

mGPDH opakovaném podání trijodtyroninu

Z výsledků v tabulce č. 2 vyplývá, že se aktivita mGPDH v homogenátech statisticky významně zvyšuje po aplikaci trijodtyroninu. Rozdíl aktivity mGPDH u vzorků získaných po 24 hodinách od poslední aplikace T₃ a kontrolních vzorků je trojnásobný. Pro zjištění chování aktivity mGPDH po aplikaci T₃ byla nechána jedna skupina potkanů naživu po 72 hodin od poslední aplikace. Stanovením aktivity mGPDH u těchto vzorků se zjistilo, že dochází k jejímu pozvolnému snižování, neboť poměr ku kontrolním vzorkům byl pouze 2,8.

Tab. č. 2: Spektrofotometrické stanovení aktivity mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázy (mGPDH) pomocí akceptoru elektronů DCPIP v homogenátech jaterní tkáně potkana.

skupina potkanů	<i>n</i>	aktivita mGPDH [nmol/min./mg proteinu]	poměr vůči KO	statistická významnost
KO	9	1,85 ± 0,76	---	---
3T ₃ _24h	9	5,61 ± 1,02	3,0	***
3T ₃ _72h	9	5,26 ± 0,96	2,8	***

Tab. č. 3: Spektrofotometrické stanovení aktivity mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázy (mGPDH) pomocí akceptoru elektronů DCPIP v mitochondriích jaterní tkáně potkana.

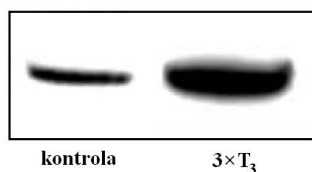
skupina potkanů	<i>n</i>	aktivita mGPDH [nmol/min./mg proteinu]	poměr vůči KO	statistická významnost
KO	9	4,99 ± 2,25	---	---
3T ₃ _24h	9	18,28 ± 8,52	3,7	***
3T ₃ _72h	9	17,53 ± 5,53	3,5	***

Tabulka č. 3 ukazuje opět statisticky významnou indukci aktivity mGPDH po přidání trijodtyroninu jako je tomu u homogenátů. U mitochondrií však byla pozorována o trochu větší indukce aktivity mGPDH, kdy po 24 hodinách dochází k výraznému vzestupu aktivity enzymu po aplikaci T₃. Poté následuje pozvolný pokles, což dokazuje výsledek aktivity mGPDH u potkanů, kteří se byli usmrceni až po 72 hodinách od poslední aplikace T₃.

Zvýšení hodnot u vzorků mitochondrií a homogenátů po indukci T₃ není z důvodu změny aktivity enzymu, ale nýbrž změnou množství enzymu, který je vysvětlován syntézou mRNA mGPDH a syntézou enzymu *de novo*.

Při detekci množství proteinu jsme pozorovali selektivní vzrůst mGPDH pomocí western blotu s využitím specifických polyklonálních protilátek proti mGPDH mezi kontrolními vzorky mitochondrií a vzorky po ovlivnění třemi dávkami T₃ (obr. č. 1). Stejnou detekci jsme provedli i u mitochondrií potkanů, kterým byla podána pouze jedna dávka hormonu. Po aplikaci jedné dávky T₃ dochází v mitochondriích potkanů ke 2,7× zvýšení mGPDH. V porovnání s potkany, kteří dostali tři dávky hormonu, byl tento vzestup o více než 50 % nižší (2,7× zvýšení u jedné dávky vs. 6,8× zvýšení u tří dávek T₃). Zvýšení mGPDH proteinu koreluje se zvýšenou enzymovou aktivitou, kde byl rozdíl mezi aktivitou mGPDH u jedné dávky a tří dávek necelých

50 % (2,3× zvýšení u jedné dávky vs. 3,7× zvýšení u tří dávek trijodtyroninu). Tato data tak potvrzují specifickou indukci mGPDH tyroidními hormony v jaterních mitochondriích potkanů.



Obr. č. 1: Obsah mGPDH v mitochondriích izolovaných z jater kontrolních potkanů a potkanů po stimulaci třemi dávkami trijodtyroninu (usmrcení 24 hodin po poslední aplikaci) detekovaný pomocí western blotu.

7.2. Výsledky stanovení mRNA UCP2

Schémata pokusů

Zejména na základě výsledků northern blotu pro mGPDH jsme se rozhodli rozdělit potkany v jednotlivých experimentech do 6 skupin, oproti předešlým pokusům jsme zařadili časový interval 1 hodiny a interval 72 hodin jsme naopak vynechali. Každá experimentální skupina obsahovala celkem 12 potkanů. Pro přehlednost je schéma pokusu po aplikaci T_3 uvedeno v tabulce č. 4. Stejně schéma jsme použili i při aplikaci tří dávek trijodtyroninu.

Tab. č. 4: Schéma jednotlivých skupin potkanů při sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu (T_3).

Skupina	n	Charakteristika skupiny
kontrolní	12	potkani usmrcení 3 hodiny po aplikaci jedné dávky fyziologického roztoku
T_3 _1h	12	potkani usmrcení 1 hodinu po aplikaci jedné dávky T_3
T_3 _3h	12	potkani usmrcení 3 hodiny po aplikaci jedné dávky T_3
T_3 _6h	12	potkani usmrcení 6 hodin po aplikaci jedné dávky T_3
T_3 _12h	12	potkani usmrcení 12 hodin po aplikaci jedné dávky T_3
T_3 _24h	12	potkani usmrcení 24 hodin po aplikaci jedné dávky T_3

Zároveň jsme se rozhodli zjistit, jak je to s kinetikou exprese mRNA UCP2 po parciální hepatektomii, kdy byly chirurgicky pod narkózou odstraněny 2/3 jater. Časové intervaly, ve kterých jsme analyzovali mRNA UCP2, zůstaly nezměněné (tab. č. 5). Potkani byli usmrceni stejným způsobem jako v předchozích pokusech.

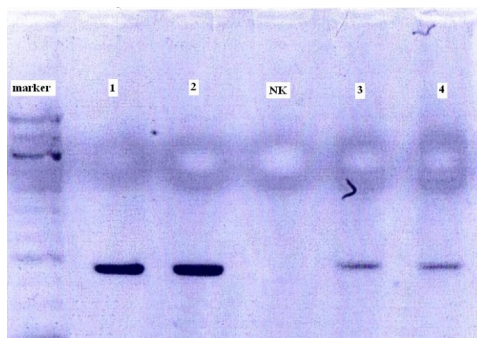
Tab. č. 5: Schéma jednotlivých skupin potkanů při sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 po parciální hepatektomii.

Skupina	n	Charakteristika skupiny
kontrolní	5	jaterní tkáň z hepatektomovaných laloků
PH_1h	5	potkani usmrcení 1 hodinu po parciální hepatektomii
PH_3h	5	potkani usmrcení 3 hodiny po parciální hepatektomii
PH_6h	5	potkani usmrcení 6 hodin po parciální hepatektomii
PH_12h	5	potkani usmrcení 12 hodin po parciální hepatektomii
PH_24h	5	potkani usmrcení 24 hodin po parciální hepatektomii

Výsledky optimalizace reverzní transkripce a její kontroly

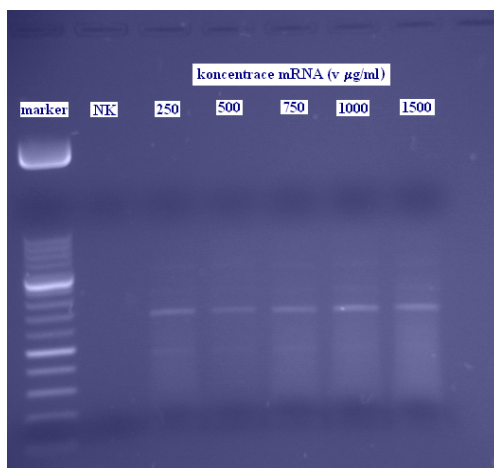
V rámci optimalizace reverzní transkripce jsme zkusili dva postupy, prvním byl přepis pomocí M-MLV reverzní transkriptázy a oligo(dT)₁₅VN primeru a druhým komplexní systém „SuperScript™ First Strand Synthesis System“. Výsledek reverzní transkripce, resp. výtěžnost byla u obou postupů naprosto srovnatelná (obr. č. 2). Vzhledem k finanční a pracovní náročnosti

druhého postupu jsme se rozhodli v našich dalších pokusech používat přepis RNA na cDNA pomocí enzymu M-MLV firmy Top-Bio.



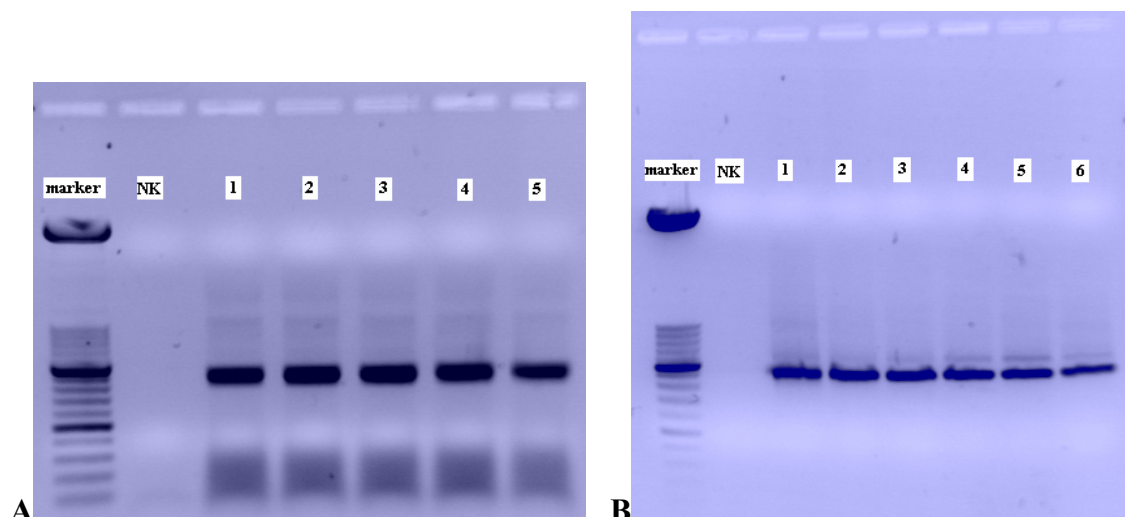
Obr. č. 2: Optimalizace reverzní transkripce. Reverzní transkripce provedená u vzorku 1, 3 pomocí SuperScript™ First Strand Synthesis System (Invitrogen), u vzorku 2, 4 pomocí M-MLV reverzní transkriptázy (Top-Bio), marker – velikostní marker s rozlišením 100 bp, NK – negativní kontrola.

V našich experimentech jsme potřebovali porovnávat výsledky exprese UCP2 v jednotlivých vzorcích. Bylo tedy nutné, aby vstupní koncentrace mRNA byla vždy stejná. Z tohoto důvodu jsme optimalizovali rovněž vstupní koncentraci RNA, kdy jsme testovali tyto koncentrace – 250, 500, 750, 1000 a 1500 $\mu\text{g/ml}$. Neoptimálnější byla koncentrace 1000 $\mu\text{g/ml}$, kdy jsme pozorovali nejintenzivnější band (obr. č. 3). Při izolaci RNA měly všechny jaterní vzorky koncentraci okolo 1000 $\mu\text{g/ml}$ nebo vyšší. V těchto případech byla RNA těsně před reverzní transkripcí naředěna na potřebnou koncentraci. Konečné složení reakční směsi pro jeden vzorek pro reverzní transkripci je následující – 12 μl vody, 6 μl 5 \times koncentrovaného pufru (250 mmol/l Tris-HCl, 375 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl_2), 1,5 μl dNTPs (2,5 mmol/l), 1,5 μl oligo (dT)₁₅VN primer (50 $\mu\text{mol/l}$), 3 μl M-MLV reverzní transkriptázy (200 U/ μl) a 3 μl RNA (o koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$).



Obr. č. 3: Optimalizace vstupní koncentrace RNA po reverzní transkripci. V první jamce zleva je velikostní marker s rozlišením 50 bp, NK – negativní kontrola, následující jamky obsahovaly vzrůstající koncentraci RNA.

Pro kontrolu účinnosti jsme úspěšně zavedli PCR reakci pro housekeepingový gen GAPDH s primery převzatými z literatury (23). Tuto reakci jsme používali zejména pro rychlé zjištění, zda reverzní transkripce proběhla či ne, proto jsme ji důkladněji neoptimalizovali a při zavádění reakce (složení PCR směsi, teplotní profil) jsme vycházeli z uvedené publikace. Na obrázku č. 4 je výsledek elektroforézy produktů PCR pro GAPDH ze vzorků jaterní tkáně a sleziny. cDNA sleziny jsme následně využili při zavedení real-time PCR specifické pro UCP2.



Obr. č. 4: Kontrola účinnosti reverzní transkripce pomocí PCR pro GAPDH. Délka požadovaného produktu je 489 bp. **A:** 1,2,3,4,5 – kontrolní vzorky sleziny, **B:** 1 - kontrolní vzorek jaterní tkáň, 2 - vzorek jaterní tkáň potkana usmrceného po 1 hod. od aplikace trijodtyroninu (T_3), 3 - vzorek jaterní tkáň potkana usmrceného po 3 hod. od aplikace T_3 , 4 - vzorek jaterní tkáň potkana usmrceného po 6 hod. od aplikace T_3 , 5 - vzorek jaterní tkáň potkana usmrceného po 12 hod. od aplikace T_3 , 6 - vzorek jaterní tkáň potkana usmrceného po 24 hod. od aplikace T_3 , marker – velikostní marker (rozdílení 50 bp, Roche), NK – negativní kontrola.

Výsledky optimalizace real-time PCR specifické pro UCP2

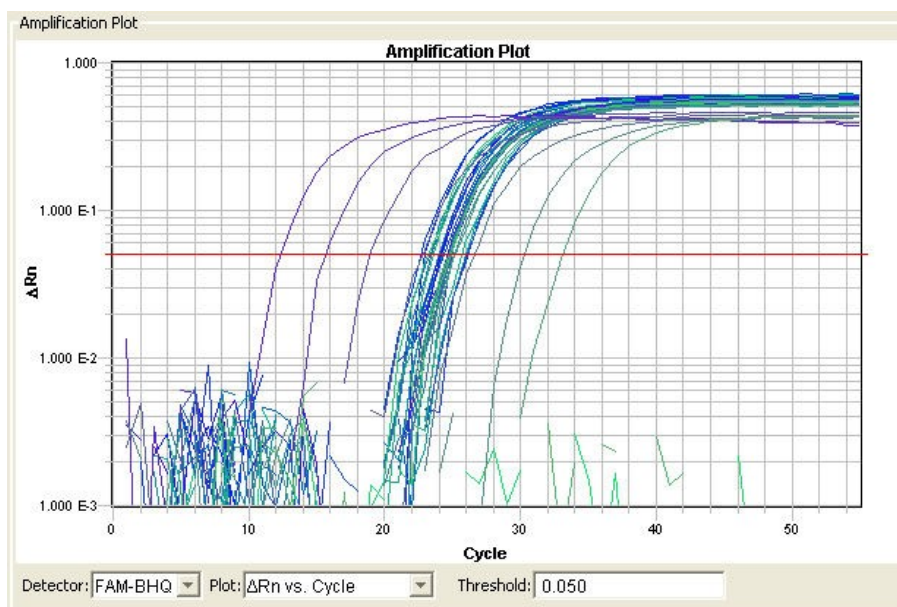
Vzhledem k použití komerčního mixu bylo nutné optimalizovat pouze koncentraci primerů a sondy, neboť všechny ostatní složky reakční směsi jsou v používaném mixu v optimálních koncentracích. Rovněž využití hydrolytických sond nám umožnilo použít univerzální teplotní profil, který není nutné optimalizovat. Průměrné hodnoty Ct cyklů u kontrolních vzorků sleziny pro jednotlivé koncentrace primerů a sondy použité při optimalizaci jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tab. č. 6: Testované koncentrace primerů a sondy s výsledky real-time PCR specifické pro UCP2 u vzorků sleziny.

Koncentrace (v $\mu\text{mol/l}$)		Výsledek real-time PCR (průměrné hodnoty Ct)
forward, reverse primer	hydrolytická sonda	
0,4	0,1	24,42
0,4	0,2	23,59
0,4	0,3	23,83
0,4	0,4	23,89
0,2	0,2	24,63
0,3	0,2	23,84
0,4	0,2	23,46
0,5	0,2	23,73
0,6	0,2	23,61

Všechny výsledky optimalizace byly velmi srovnatelné, přesto jsme jako nejvhodnější koncentraci obou primerů vybrali 0,4 $\mu\text{mol/l}$ a koncentraci sondy 0,2 $\mu\text{mol/l}$. Konečné složení reakční směsi, které jsme používali v našich experimentech, je 4 μl vody, 10 μl 2 \times koncentrovaného TaqMan Universal Master Mixu, 0,8 μl forward a reverse primeru (10 pmol/ μl), 0,4 μl sondy (10 pmol/ μl) a 4 μl cDNA. Celkový objem reakční směsi byl 20 μl .

Ukázka amplifikačních křivek real-time PCR specifické pro UCP2 je na obrázku č. 5. Vzhledem k použití kvantifikovaných standardů jsme mohli určit pro každou PCR pro UCP2 také účinnost reakce (E) podle vztahu $E = 10^{(-1/\text{směrnice kalibrační křivky PCR reakce})}$. Ta se pohybovala vždy mezi 90 až 100 % (průměrně $93,5 \% \pm 3,05 \%$).



Obr. č. 5: Amplifikační křivky real-time PCR pro UCP2 plazmidových standardů a vzorků.

Výběr housekeepingového genu pro real-time PCR

Pro real-time PCR pro referenční gen pro normalizaci jsme měli na výběr ze čtyř housekeepingových genů – B2M (β -2-microglobulin), HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1), SURF1 (surfeit 1) a TBP (TATA box binding protein). Na základě PCR reakcí těchto genů u vzorků jaterní tkáně a sleziny, které byly analyzovány v různých časových intervalech v dubletu, jsme vybrali jako nejvhodnější a nejstabilnější housekeepingový gen SURF1 (tab. č. 7). Tento gen totiž vykazoval minimální rozdíly tzv. threshold cyklů u jednotlivých tkání.

Pro kvantitativní analýzu tohoto genu byla také vytvořena kalibrační křivka desítkovým ředěním plazmidu o původní koncentraci $1,0 \cdot 10^{12}$ kopií/ml, která nám umožnila vypočítat účinnost real-time PCR specifické pro SURF1. Ta se pohybovala u všech reakcí mezi 90 až 100 %, s průměrem $94,5 \% (\pm 2,85 \%)$.

Tab. č. 7: Výsledky real-time PCR analýzy pro jednotlivé housekeepingové geny v jaterní tkáni.

Vzorek jaterní tkáně potkanů	Průměrné výsledky threshold cyklů (Ct) pro housekeepingové geny			
	<i>HPRT1</i>	<i>B2M</i>	<i>SURF1</i>	<i>TBP</i>
kontrolní tkáň	17,00	12,72	20,95	20,00
tkáň T ₃ _1h	18,71	15,50	21,68	23,82
tkáň T ₃ _3h	18,64	18,00	21,00	25,00
tkáň T ₃ _6h	21,00	19,17	21,32	23,00
tkáň T ₃ _12h	18,69	12,00	20,72	25,36
tkáň T ₃ _24h	18,33	13,66	21,53	23,00
Průměr a směrodatná odchylka	18,73 ± 1,09	15,18 ± 2,97	21,20 ± 0,39	23,36 ± 1,10

Výsledky exprese UCP2 v jaterní tkáni po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu

V jaterní tkáni jsme u kontrolní skupiny detekovali nízké množství mRNA UCP2. V porovnání se vzorky sleziny, které jsme analyzovali v rámci zavedení a optimalizace real-time PCR pro UCP2 a SURF1, jsme zjistili, že se jedná o přibližně 65× nižší expresi UCP2. Ta byla následně jednu hodinu po aplikaci jedné dávky T₃ snížena o 22 % oproti kontrolní skupině, avšak tento pokles nebyl signifikantní. Později exprese mRNA UCP2 dosáhla úrovně kontrolních vzorků a teprve 12 hodin po aplikaci T₃ jsme stanovili maximum exprese. Jednalo se o téměř 2-násobné zvýšení, které bylo statisticky signifikantní na hladině významnosti 99 %. Po dalších 12 hodinách došlo k poklesu hladiny na 1,63-násobek proti kontrole ($p < 0,01$ vs. kontrolní skupina). To znamená, že mezi 12 a 24 hodinou od aplikace T₃ došlo pouze k pozvolnému poklesu a lze se tedy domnívat, že snížení exprese na původní hodnoty bude velice pomalé. Výsledky sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 jsou shrnuty v tabulce č. 8.

Tab. č. 8: Změny v expresi mRNA UCP2 a koncentraci celkového trijodtyroninu (tT₃) a volného trijodtyroninu (fT₃) po i.p. aplikaci jedné dávky trijodtyroninu.

Skupina	n	UCP2 mRNA	tT ₃ (nmol/l)	fT ₃ (pmol/l)
kontrolní	12	1,00	1,62 ± 0,13	8,24 ± 0,32
T ₃ _1h	12	0,78 ± 0,44 ^N	133,00 ± 9,90 ***	496,00 ± 8,49 ***
T ₃ _3h	12	0,95 ± 0,49 ^N	198,00 ± 26,87 ***	631,00 ± 16,97 ***
T ₃ _6h	12	0,97 ± 0,44 ^N	126,00 ± 19,80 ***	460,00 ± 57,98 ***
T ₃ _12h	12	1,94 ± 0,50 **	57,95 ± 1,06 ***	163,50 ± 14,85 ***
T ₃ _24h	12	1,63 ± 0,36 **	18,60 ± 1,70 ***	65,93 ± 0,04 ***

Ve stejných časových intervalech jsme sledovali rovněž koncentrace celkového a volného trijodtyroninu, abychom si mohli udělat obraz kinetiky změny koncentrace trijodtyroninu v séru po jeho aplikaci. Jak ukazuje tabulka č. 8, sérové koncentrace tT₃ a fT₃ stoupají velmi rychle již během prvních třech hodin, kdy jsme zjistili maximální hodnoty. V případě celkového trijodtyroninu jsme zjistili signifikantní 122-násobek koncentrace oproti kontrolní skupině ($p < 0,001$) a pro volný T₃ 77-násobek ($p < 0,001$). Oba parametry poté postupně klesají, přesto po 24 hodinách od aplikace hormonu jsou koncentrace oproti kontrolám stále signifikantně zvýšené (11-násobek koncentrace tT₃ a 8-násobek u fT₃). Kinetika koncentrací celkového i volného T₃ má shodný průběh se zvýšením během prvních hodin, maximum ve třetí hodině, a následně relativně rychlým poklesem.

Celkově lze říci, že maximum koncentrací T₃ a fT₃ je ve třetí hodině, oproti tomu exprese UCP2 dosahuje svého maxima až o 9 hodin později, tj. ve 12. hodině po aplikaci hormonu. Hodina, kdy hodnota mRNA UCP2 byla maximální, je shodná jako u modelového systému, tedy u mRNA mGPDH.

Výsledky exprese UCP2 v jaterní tkáni po aplikaci tří dávek trijodtyroninu

Stejně pokusy jsme provedli ještě jednou, ale tentokrát jsme potkanům podávali tři dávky trijodtyroninu. V časových intervalech 1, 3 a 6 hodin jsme zjistili statisticky nevýznamné snížení a ve 12 hodině statisticky nevýznamné 0,15-násobné zvýšení. Pouze 24 hodin po poslední aplikaci hormonu jsme pozorovali 0,33-násobné snížení mRNA UCP2 ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině (tabulka č. 9).

Opět jsme sledovali i koncentrace celkového i volného trijodtyroninu (tabulka č. 9). Oproti pokusům s jednou dávkou T₃ jsme pozorovali méně výrazné zvýšení koncentrací. Maximální hodnota tT₃ byla v případě tří dávek 33-násobná oproti 122-násobku u jedné dávky a u fT₃ 47-násobek vs. 77-násobek. Navíc maximum bylo zjištěno až 6 hodin po aplikaci poslední dávky, což je o tři hodiny později než při podání jedné dávky hormonu. Tyto rozdíly mohou být pravděpodobně důvodem nevýznamné změny mRNA UCP2 v prvních 12 hodinách. Po 24

hodinách dosahují hodnoty tT_3 a fT_3 pouze přibližně 1,7-násobku, resp. 1,3-násobku hodnot u kontrolní skupiny.

Tab. č. 9: Změny v expresi mRNA UCP2 a koncentraci celkového trijodtyroninu (tT_3) a volného trijodtyroninu (fT_3) po i.p. aplikaci tří dávek trijodtyroninu.

Skupina	n	UCP2 mRNA	tT_3 (nmol/l)	fT_3 (pmol/l)
kontrolní	12	1,00	1,93 ± 0,04	5,40 ± 0,14
3 T_3 _1h	12	0,96 ± 0,37 N	34,05 ± 14,08 ***	61,88 ± 0,86 ***
3 T_3 _3h	12	0,87 ± 0,31 N	46,42 ± 32,05 ***	207,90 ± 71,71 ***
3 T_3 _6h	12	0,88 ± 0,37 N	64,02 ± 1,87 ***	254,33 ± 10,28 ***
3 T_3 _12h	12	1,15 ± 0,73 N	17,74 ± 11,79 ***	54,79 ± 24,73 ***
3 T_3 _24h	12	0,67 ± 0,20 **	3,30 ± 1,84 **	7,25 ± 0,92 **

Výsledky exprese UCP2 v jaterní tkáni po parciální hepatektomii

V poslední části práce jsme ověřovali expresi mRNA UCP2 v jaterní tkáni potkana po parciální (2/3) hepatektomii. Protože se jedná o proliferační děj vyžadující značné množství energie, což vede ke zvýšené tvorbě reaktivní kyslíkových radikálů, zajímalo nás, jak vypadá exprese UCP2, která by mohla být významným ochranným mechanismem.

Jak ukazuje tabulka č. 10, již v první hodině dochází ke zvýšení exprese, která je prozatím statisticky nevýznamná. Ale již 3 hodiny po parciální hepatektomii jsme pozorovali maximální zvýšení (4,71-násobný vzrůst mRNA UCP2 oproti kontrolní skupině). Poté dochází k pozvolnému poklesu exprese UCP2 na 3,40× a 3,09× vs. kontroly po 6 a 12 hodinách. V dalších 12 hodinách pak mRNA UCP2 klesá téměř o dvojnásobek na 1,59-násobek vůči kontrole, což už je opět statisticky nevýznamný rozdíl.

Tab. č. 10: Změny v expresi mRNA UCP2 po parciální hepatektomii.

Skupina	n	UCP2 mRNA	Statistická významnost
kontrolní	5	1,00	---
PH_1h	5	1,21 ± 0,26	nevýznamné
PH_3h	5	4,71 ± 1,01	*** $p < 0,001$
PH_6h	5	3,40 ± 0,82	*** $p < 0,001$
PH_12h	5	3,09 ± 0,91	*** $p < 0,001$
PH_24h	5	1,59 ± 0,85	nevýznamné

8. Diskuze

Játra jsou multifunkčním orgánem, který hraje klíčovou roli v intermediárním a energetickém metabolismu, biotransformaci, sekreci a exkreci. Tyto procesy jsou energeticky velmi náročné, proto se jedná o tkáň vysoce závislou na obsahu kyslíku a metabolicky velmi aktivní (24). Játra mají tedy důležitou roli v regulaci metabolismu různých energetických substrátů, rychle se přizpůsobují nadměrnému přísunu substrátů snížením účinnosti mitochondriální ATP produkce.

Játra jsou také orgánem často používaným pro studium účinků tyroidních hormonů, které se uplatňují v široké řadě biologických procesů. Hormony štítné žlázy mají důležitou roli v regulaci savčího energetického metabolismu a růstu a ve farmakologických koncentracích indukují odprášení oxidační fosforylace. Efekt přisuzovaný trijodtyroninu se děje na úrovni transkripční a post-transkripční regulace cílových genů kódujících komponenty mitochondriálního energetického aparátu. Trijodtyronin tedy ovlivňuje i expresi UCP2 v metabolicky aktivních tkáních jako například v srdci, ledvinách, kosterních svalech a játrech (25). Přestože byl vliv

trijodtyroninu na expresi UCP2 popsán již před řadou let, stále existuje málo informací o změně mRNA UCP2 během prvních hodin po aplikaci tohoto hormonu.

Mitochondriální glycerofosfátdehydrogenáza je flavoprotein dependentní enzym, který je vázán na povrchu vnitřní mitochondriální membrány a je součástí glycerofosfátového cyklu (26). Aktivita tohoto cyklu závisí především na množství mGPDH v mitochondriích jednotlivých tkání, které se značně liší (27). Není stále vyjasněna otázka, proč je exprese tohoto enzymu ve většině tkání v organismu potlačena a proč pouze v některých tkáních je aktivita mGPDH vysoká. Exprese mGPDH je silně potlačena ve většině savčích tkání (28). Vysoký obsah se nachází pouze v hnědé tukové tkáni (29) a mnohem méně, ale stále signifikantní aktivity se nalézají v placentě (30), varlatech, pankreatických β -buňkách (31) a kultivovaných fibroblastech (32). Naopak nízký obsah mGPDH se nachází v jaterní tkáni, kde však byla popsána indukce enzymu působením tyroidních hormonů (33). Detailní mechanismus jejich působení není stále dobře pochopen vzhledem složitosti této regulace.

Různé aspekty indukce mGPDH pomocí trijodtyroninu byly již rozsáhle studovány (34, 35, 36). Nicméně naše výsledky komplexně srovnávají obsah mRNA mGPDH a množství proteinu s enzymovou aktivitou mGPDH. Potvrdili jsme předchozí nálezy, které ukazují specifické působení tyroidních hormonů na mGPDH. Použitím specifických protilátek jsme také mohli popsat proporcionální vzrůst obsahu mGPDH proteinu, a to po jedné i třech dávkách trijodtyroninu.

V našich experimentech jsme používali model indukce biogeneze mGPDH po jedné dávce trijodtyroninu eutyroidním potkanům. Kvůli jednoduchosti tohoto systému jsme mohli sledovat kinetiku enzymové biogeneze. Ačkoliv indukce enzymové aktivity mGPDH po jedné dávce trijodtyroninu již byla studována Oppenheimerem a spol. (34), kteří zjišťovali kinetiku změny enzymové aktivity. Pro zajištění plného obsazení tyroidních receptorů používali vysoké dávky trijodtyroninu (200 nebo 5000 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti). Enzymová aktivita v jejich pokusech začínala stoupat 13 hodin po aplikaci hormonu a rostla, dokud bylo více než 95 % tyroidních receptorů obsazeno trijodtyroninem. Dále také studovali úbytek aktivity mGPDH a spočítali tak poločas degradace enzymu na 2,8 dne. Tato data celkově korespondují s našimi nálezy. Na rozdíl od Oppenheimera jsme však použili o 1 až 2 řády nižší koncentrace trijodtyroninu (20 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti), která by se mohla lépe podobat situaci při hypertyreóze. Z tohoto důvodu je míra indukce mGPDH v našich experimentech nižší. Při porovnání našich dat po jedné nebo třech dávkách je evidentní, že nepracujeme v koncentracích trijodtyroninu, kdy jsou jejich tyroidní receptory plně saturované.

Při opakované aplikaci trijodtyroninu jsme stanovili, že hormonální indukce mGPDH způsobuje tří- až čtyř-násobné zvýšení aktivity tohoto enzymu v jaterních homogenátech i mitochondriích. Müller a Seitz (37) zjistili pomocí kvantitativní PCR reakce mRNA daného enzymu, že trijodtyronin zvyšuje syntézu této nukleové kyseliny. Ta poté putuje k ribozomům, kde dochází k translaci a vzniku zvýšeného množství specifického proteinu. Vzestup aktivity mGPDH je tedy vysvětlován syntézou *de novo*.

Dále jsme zjistili, že mGPDH transkript je indukován již 3 až 6 hodin po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu (maximum indukce je ve 12 hodině). Tento nálezy je podobný výsledkům Dümmlera a spol. (33), kteří objevili zvýšení po 4 až 6 hodinách. Transkript mGPDH je proto nejčasnější ze všech mitochondriálních proteinů, které jsou kódovány buněčným jádrem a které jsou indukovány trijodtyroninem. Navíc se tato rychlost více podobá cytosolovým proteinům regulovaným trijodtyroninem (např. malátdehydrogenáza, glukokináza) (33). Transkripce mGPDH genu je aktivována pomocí TR/RXR vazby k sekvenci responsivního elementu pro tyroidní hormony (TRE) v promotorové oblasti genu (38, 39). Časný charakter změny exprese mRNA mGPDH naznačuje, že patří do rodiny na trijodtyronin rychle odpovídajících transkriptů indukovaných přímo pomocí vázaných tyroidních receptorů. Další mechanismus působení trijodtyroninu je prostřednictvím indukce transkripce a následné syntézy jiných transkripčních faktorů nebo koaktivátorů zapojených v mitochondriální biogenezi (např. NRF-1 nebo PGC-1) (40, 41). Geny

regulované tímto způsobem reagují na trijodtyronin po mnohem delší době (48 hodin) potřebné pro uskutečnění všech pomocných procesů (40). Časná indukce mGPDH transkriptu proto mluví proti zapojení takovéto dráhy v regulaci biogeneze mGPDH.

Další důležité hledisko naší studie je hodnocení změny mGPDH proteinu. Až dosud bylo publikováno málo studií pojednávajících o změně mitochondriálních proteinů (42, 43). Ve skutečnosti detailní analýza poločasu rozpadu mitochondriálních OXPHOS enzymů a dalších proteinů z různých mitochondriálních částí, stejně jako údaje o tkáňové specifitě, stále chybí. Některé studie dokladují, že za degradaci mitochondrií je zodpovědný proces makroautofágie (44, 45). Kvantitativní studie v jaterních buňkách naznačují, že makroautofágie by mohla být zodpovědná za degradaci ne více než poloviny mitochondriálních proteinů (44). Studie na jaterní tkáni, kultivovaných hepatocytech nebo buňkách nádoru jater uvádějí, že poločas rozpadu mitochondriálních proteinů je velmi variabilní v rozmezí od 1,2 hodiny do 185 hodin pro matrixové proteiny a v rozmezí 35 až 156 hodin pro membránové proteiny. (43, 46). To svědčí o selektivní degradaci bílkovin, které již nejsou déle potřebné pro mitochondriální funkci, pravděpodobně pomocí příslušníků AAA-proteázové rodiny (47). Z našich pokusů měření enzymové aktivity můžeme odhadnout, že poločas rozpadu mGPDH může být přibližně 60 hodin. Tento relativně rychlý obrat naznačuje možnou existenci dráhy selektivní degradace, která by mohla fungovat k zajištění rychlejšího rozpadu mGPDH v porovnání s jinými proteiny vnitřní mitochondriální membrány.

Pro optimalizaci real-time PCR specifické pro UCP2 jsme využili vzorky sleziny z kontrolních neovlivněných potkanů, kde byla popsána výrazná exprese UCP2 (7, 48). Díky tomu jsme mohli porovnat míru exprese ve vzorcích sleziny a jaterní tkáně a zjistili jsme, že hladina mRNA UCP2 je výrazně vyšší ve slezině než v játrech. Větší množství UCP2 transkriptu ve slezině je možné vysvětlit vysokým obsahem makrofágů, v případě jater se popisuje výskyt zejména v Kupfferových buňkách (4, 7). Rozdílnost exprese v játrech a slezině jsme ověřili výsledky studie, kterou provedli Alán a spol. Ti sledovali množství mRNA UCP2 v osmi tkáních u potkanů a zjistili, že obsah UCP2 se snižuje v následujícím pořadí - slezina, srdce, plíce, bílá tuková tkáň, mozek, kosterní svalstvo, ledvina a játra, v obsahu UCP2 transkriptu navíc pozorovali 30-násobný rozdíl v obsahu (49).

Při sledování exprese RNA UCP2 po ovlivnění jednou dávkou trijodtyroninu (20 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti) jsme zjistili, že nejprve dochází k mírnému nesignifikantnímu poklesu, který je následován výrazným vzestupem. Po 12 hodinách od podání trijodtyroninu dochází k maximálnímu téměř k dvojnásobnému zvýšení exprese RNA UCP2. Za dalších 12 hodin však dochází pouze k malému poklesu exprese. Lze tedy říci, že po dosažení maximální exprese dochází k jejímu velmi pozvolnému návratu na původní hodnoty. Naše výsledky jsou podobné výsledkům studie, kterou provedli Voci a spol. (50). Na Kupfferových buňkách izolovaných z jater eutyroidních a hypertyreózních potkanů zjistili, že hladiny mRNA UCP2 závisí na délce trvání působení trijodtyroninu. Ve svých pokusech použili rovněž intraperitoneální jednorázovou aplikaci trijodtyroninu v dávce 25 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti a potkany usmrtili 48 hodin po podání. U kontrolních vzorků pomocí northern blotu jasně detekovali mRNA UCP2, která byla po ovlivnění trijodtyroninem u experimentálních vzorků více než dvojnásobná. Rychlá změna exprese mRNA UCP2 opět naznačuje, že patří do rodiny na trijodtyronin rychle odpovídajících transkriptů, které jsou indukovány přímo pomocí vázaných tyroidních receptorů. Rychlost exprese UCP2 však souvisí i s jeho stabilitou. Rousset a spol. (51) studovali na různých buněčných liniích poločas rozpadu UCP2 proteinu a zjistili, že je velmi nestabilní. K rozpadu UCP2 totiž dochází přibližně po 30 minutách oproti UCP1, kde to je až po 30 hodinách. Takto výrazný rozdíl vysvětlili tím, že teplo tvořené UCP1 v v hnědé tukové tkáni je zpravidla dlouhodobý a adaptivní jev, zatímco řízení tvorby kyslíkových radikálů v mitochondriích pomocí UCP2 vyžaduje spíše jemnou regulaci (51).

Voci a spol. (50) v další části svých pokusů aplikovali potkanům trijodtyronin i.p. v dávce 15 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti každý den po dobu 3 týdnů, čímž navodili chronický hypertyreózní

stav. U těchto potkanů ale zjistili pouze 30% nesignifikantní vzrůst exprese UCP2. Tento vzrůst byl ve srovnání se vzorky po akutním ovlivnění signifikantně nižší. Také Lanni a spol. (25) prováděli studii, ve které i.p. aplikovali potkanům trijodtyronin v dávce 15 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti po dobu 7 dní a usmrtili je 24 hodin po poslední dávce, a zjistili, že trijodtyronin výrazně ovlivňuje expresi mRNA UCP2 v srdci, menší efekt pozorovali u kosterního svalstva. V případě ledvin a jater však zjistili, že trijodtyronin zde téměř nepůsobí. Podobné výsledky jsme pozorovali i my u vzorků po aplikaci 3 dávek trijodtyroninu (20 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti), kdy jsme v prvních 12 hodinách po podání zjistili nesignifikantní změny exprese. Pouze 24 hodin po aplikaci jsme sledovali signifikantní pokles mRNA UCP2 na 67 % oproti kontrole. Voci a spol. (50) sledovali kromě vlivu trijodtyroninu na expresi RNA UCP2 také respirační parametry mitochondrií (např. celkový respirační poměr, ATP syntézu, únik protonů atd.) a zjistili, že u akutního podání trijodtyroninu dochází k velmi patrnému zvýšení příspěvku způsobeného únikem protonů k celkové buněčné respiraci. Nicméně u chronicky hypertyreózních potkanů, kteří měli oproti akutním hypertyreózním potkanům nižší expresi mRNA UCP2, pozorovali signifikantně vyšší příspěvek vytvořený únikem protonů na celkové respiraci. Pravděpodobným vysvětlením může být, že při akutním působení trijodtyroninu zvýšení UCP2 transkriptu nevede k obdobnému zvýšení koncentrace UCP2 proteinu v mitochondriích. Naopak při chronickém ovlivnění se zvyšuje i exprese UCP2 proteinu. Tyto výsledky mohou být ve shodě s pravděpodobným efektem UCP2 v odpáření oxidační fosforylace a mohou tak naznačit roli Kupfferových buněk v jaterní termogenezi (50).

Z výsledků exprese mRNA mGPDH a mRNA UCP2 je rovněž patrné, že v obou případech dochází ke zvýšení exprese ve stejném časovém intervalu – tedy 12 hodin po aplikaci trijodtyroninu (20 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti), a poté dochází v obou případech k pozvolnému poklesu. Změnu exprese RNA UCP2 v čase v hepatocytech potkanů sledovali také Cortez-Pinto a spol. (52) po inkubaci s 6% Intralipidem (emulze sojového oleje, kde se nachází v poměru 2:1 kyselina linolová a olejová). U kontrolních hepatocytů pozorovali malou expresi UCP2, u hepatocytů po ovlivnění Intralipidem docházelo k bifazickému zvýšení hladiny mRNA UCP2. Nejprve po 0,5 hodině pozorovali mírné zvýšení následované poklesem k bazálním hodnotám ve 3 a 6 hodině. Další časový interval byl až 24 hodin po ovlivnění, kdy došlo téměř až k 3,5-násobnému zvýšení. Jistě zajímavé by proto bylo porovnání exprese UCP2 po 12 hodinách, přesto lze předpokládat, že časový průběh exprese byl velmi podobný našim výsledkům pro mGPDH i UCP2.

Zvýšení UCP2 transkriptu v jaterní tkáni by mohlo být vysvětleno zvýšením energetického výdeje a metabolismu, který může být indukován a regulován tyroidními proteiny během odpáření oxidační fosforylace. Zvýšený energetický výdej a metabolismus rovněž indukuje zvýšení produkce reaktivních kyslíkových radikálů, jež jsou signálem pro up-regulaci UCP2 transkriptu a proteinu v hepatocytech. Důkaz, že trijodtyronin zvyšuje mitochondriální produkci kyslíkových radikálů (53), podporuje předpoklad, že indukce UCP2 v játrech je fyziologicky antioxidačním mechanismem ochrany proti zvýšené produkci ROS.

V naší studii jsme kromě sledování změny exprese UCP2 po aplikaci trijodtyroninu stanovovali rovněž koncentrace celkového a volného trijodtyroninu v séru. Po aplikaci jedné dávky jsme u $t\text{T}_3$ i $f\text{T}_3$ zjistili maximální hodnoty již po 3 hodinách, kdy u celkového trijodtyroninu došlo ke 122-násobnému zvýšení a u volného trijodtyroninu k 77-násobnému vzrůstu. Při opakovaném podání trijodtyroninu jsme pozorovali posun maxima až na 6 hodin po aplikaci a hodnoty obou trijodtyroninů byly nižší ($t\text{T}_3$ 33-násobek a $f\text{T}_3$ 47-násobek oproti kontrolní skupině potkanů). Příčinou nižší hladiny trijodtyroninu po opakovaných aplikacích hormonu je pravděpodobně jeho degradace. Ta spočívá v úplné dejodaci trijodtyroninu a v inaktivaci deaminací a dekarboxylací. Poté jaterní glukuronidace a sulfatace dává vznik hydrofilnějším molekulám, které se vylučují do žluče, reabsorbují ve střevě a vylučují močí jako konjugáty s kyselinou glukuronovou (54). V séru tedy dochází k rychlé degradaci hormonu, ačkoliv účinek trijodtyroninu na expresi mGPDH a UCP2 nevyrazil. To je dáno pravděpodobně

prodlevou, během níž dochází k vazbě hormonu a specifického receptoru, následně vazbě vzniklého komplexu na specifickou oblast DNA a aktivaci transkripce mRNA (55). Ta má za následek zvýšení mGPDH a UCP2 transkriptu.

V poslední fázi naší studie jsme zkoumali změnu exprese mRNA UCP2 po parciální 2/3 hepatektomii v různých časových intervalech. Při parciální hepatektomii u potkanů je poměr maximální DNA syntézy v hepatocytech 24 hodin po operaci a počáteční velikost orgánu je obnovena po 7 až 10 dnech (56). Proliferace hepatocytů po parciální hepatektomii začíná přechodem zralých, plně diferencovaných hepatocytů z klidového G_0 stavu do prereplikativní G_1 fáze buněčného cyklu, což trvá 12 až 24 hodin. Po této fázi následuje DNA syntéza, která vrcholí 22 až 24 hodin po hepatektomii, a mitóza o dalších 6 až 8 hodin později. Během prereplikativní fáze jaterní regenerace je mitochondriální funkce a struktura jater změněná (57).

Expresе genů při regeneraci jater se může rozdělit do několika fází, během prvních 4 hodin dochází k expresi bezprostředních časných genů jako c-fos, c-jun atd., dochází také k aktivaci JNK kináz, TNF. Během této fáze klidové hepatocyty vstupují do buněčného cyklu, resp. do G_1 fáze, která je u potkanů kratší než u myši. Mezi 4 a 8 hodinou následuje exprese tzv. zpožděných genů (bclx), mezi 8 a 20 hodinou exprese genů buněčného cyklu (p53, p21, mdm2) a od 20 hodiny po parciální hepatektomii dochází k expresi genů důležitých pro DNA replikaci a mitózu (cyclin D1, cyclin E, C, B, ras) (58).

Při našich pokusech jsme zjistili, že již 3 hodiny po provedení parciální hepatektomie dochází k maximální (téměř 5-násobné) indukci UCP2 transkriptu, což znamená, že UCP2 gen se bude řadit spíše mezi bezprostřední časné geny. Během dalších 9 hodin docházelo k mírnému poklesu UCP2 transkriptu až na 3-násobek hladiny mRNA UCP2 u kontrolních potkanů. Poté jsme však pozorovali během následujících 12 hodin výraznější pokles na 1,59-násobek oproti kontrole. Podobné pokusy prováděli také Lee a spol. (14), kteří u kontrolních myši pozorovali stejně jako my u potkanů nízké hladiny mRNA UCP2. Po více než třech hodinách po hepatektomii pozorovali vzestup hladiny mRNA UCP2 až na téměř 3-násobek původní hodnoty 6 hodin po operaci. Poté sledovali pokles, kdy ve 12 hodině byla exprese UCP2 přibližně 2,5-násobná a ve 24. hodině více než 2-násobná. Během dalších 12 hodin došlo k poklesu UCP2 transkriptu téměř až na původní hodnoty, aby poté opět stoupala na více než 2-násobek mezi 48 až 96 hodinou po parciální hepatektomii. Lee a spol. (14) tedy prokázali, že parciální hepatektomie způsobuje přechodnou bifazickou indukci exprese UCP2. Počáteční velmi výrazná indukce UCP2 transkriptu začíná krátce po časném zvýšení produkce mitochondriálních oxidantů v játrech a shoduje se s poklesem tvorby oxidantů. Poté, 36 hodin po parciální hepatektomii, se exprese snižuje téměř až na bazální hodnoty. Rozdíl mezi maximem exprese UCP2 v našich pokusech (3. hodina) a pokusech, které provedli Lee a spol. (6. hodina), může být způsoben právě rozdílnou dobou G_1 fáze, která je u myši delší. Lee a spol. (14) ve své studii také zjistili, že produkce oxidantů a exprese UCP2 jsou signifikantně inhibovány injekcí protilátek proti TNF myším před parciální hepatektomií. UCP2 je mitochondriálním membránovým proteinem, který snižuje produkci oxidantů. V regenerujících játrech se vyskytuje zvýšená produkce ROS díky TNF, která je během několika hodin blokována díky UCP2 (14). UCP2 je proto důležitý pro udržení rovnováhy mezi syntézou ATP potřebnou při regeneraci jater a množstvím vznikajících reaktivních kyslíkových radikálů, neboť v případě nedostatku UCP2 dochází ke snížení buněčné proliferace a ke zpomalení až zastavení regenerace jater (59). Indukce exprese UCP2 je v hepatocytech potřebná zejména v podmínkách jejich dediferenciace.

9. Závěr

Hormony štítné žlázy, zejména trijodtyronin zvyšuje mitochondriální respiraci a podporuje odpřažení oxidační fosforylace v mitochondriích. Efekt trijodtyroninu se uskutečňuje přímo nebo prostřednictvím ovlivnění transkripce genů kódujících mitochondriální proteiny.

Dřívější studie ukazovaly možnost indukce exprese UCP2 pomocí trijodtyroninu, ale žádná z nich se nezabývala kinetikou této exprese. Proto jsme se rozhodli zjistit změny exprese mRNA UCP2 zejména v časných intervalech po aplikaci hormonu. V našich pokusech jsme nejprve sledovali indukci mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázy (mGPDH) pomocí trijodtyroninu. Aktivace mGPDH v játrech pomocí tyroidních hormonů představuje užitečný modelový systém pro studium mechanismu zapojeného v hormonální regulaci biogeneze mitochondriálních enzymů a proteinů. Sledovali jsme aktivitu mGPDH, množství tohoto proteinu a mRNA během prvních 72 hodin po aplikaci jedné nebo tří dávek trijodtyroninu. Na základě výsledků tohoto modelového systému jsme poté vytvořili schéma experimentálních podmínek pro sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 po indukci pomocí trijodtyroninu.

Pro zjištění exprese RNA UCP2 jsme úspěšně zavedli metodu reverzní transkripce a následně real-time polymerázové řetězové reakce s nově navrženými primery a hydrolytickou sondou. Tato metoda nám umožnila dobře sledovat změny exprese UCP2 v prvních 24 hodinách po aplikaci jedné nebo tří dávek trijodtyroninu. Zjistili jsme, že po aplikaci jedné dávky dochází k téměř dvojnásobnému zvýšení mRNA UCP2, ale po aplikaci tří dávek hormonu jsme indukci exprese UCP2 nepozorovali. Ve stejných časových intervalech jsme rovněž stanovovali koncentrace volného a celkového trijodtyroninu v séru. Po aplikaci jedné dávky hormonu jsme pozorovali výraznější změny koncentrace volného i celkového trijodtyroninu oproti výsledkům po podání tří dávek. Získané výsledky naznačují, že vysoké koncentrace hormonu v séru jsou nezbytné pro možnost stimulace genové exprese UCP2 u potkanů.

V další části práce jsme ověřovali expresi mRNA UCP2 v jaterní tkáni potkana po parciální (2/3) hepatektomii v časových intervalech 1, 3, 6, 12 a 24 hodin. U potkanů po provedení hepatektomie jsme pozorovali již po 3 hodinách téměř 4-násobné zvýšení exprese RNA UCP2, které bylo výraznější než po aplikaci trijodtyroninu.

Závěrem lze říci, že zvýšení mRNA UCP2 v jaterní tkáni může být vysvětleno zvýšením energetické spotřeby a metabolismu, které jsou indukovány a regulovány tyroidními hormony prostřednictvím odpražení oxidační fosforylace. Zvýšený metabolismus a spotřeba energie vedou ke zvýšení produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které mohou být signálem pro up-regulaci RNA UCP2 a proteinu v hepatocytech. Parciální hepatektomie je proliferací děj, který spotřebovává značné množství energie, ale na druhou stranu je provázen zvýšenou tvorbou ROS. Rovněž trijodtyronin zvyšuje mitochondriální produkci kyslíkových radikálů. To podporuje předpoklad, že indukce UCP2 v játrech je fyziologickým antioxidačním ochranným mechanismem proti zvýšené produkci ROS.

10. Použitá literatura

1. JEŽEK, P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins—UCPn. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002, vol. 34, s. 1190-1206.
2. RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 2000A, vol. 345, s. 161-179.
3. ERLANSON-ALBERTSSON, C. Uncoupling proteins - a new family of proteins with unknown function. *Nutr. Neurosci.* 2002, vol. 5, s. 1-11.
4. FLEURY, C.; SANCHIS, D. The mitochondrial uncoupling protein-2: current status. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999, vol. 31, s. 1261-1278.
5. STUART, J.A.; CADENAS, S.; JEKABSON, M.B.; ROUSSEL, D.; BRAND, M.D. Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001, vol. 1504, s. 144-158.
6. HODNÝ, Z.; KOLÁŘOVÁ, P.; ROSSMEISL, M.; HORÁKOVÁ, M.; NIBBELINK, M.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L.; KOPECKÝ, J. High expression of uncoupling protein 2 in foetal liver. *FEBS Lett.* 1998, vol. 425, s. 185-190.

7. LARROUY, D.; LAHARRAGUE, P.; CARRERA, G.; VIGUERIE-BASCANDS, N.; LEVI-MEYRUEIS, C.; FLEURY, C.; PECQUEUR, C.; NIBBELINK, M.; ANDRÉ, M.; CASTEILLA, L.; RICQUIER, D. Kupffer Cells Are a Dominant Site of Uncoupling Protein 2 Expression in Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, vol. 235, s. 760-764.
8. ESTERBAUER, H.; SCHNEITLER, C.; OBERKOFER, H.; EBENBICHLER, C.; PAULWEBER, B.; SANDHOFER, F.; LADURNER, G.; HELL, E.; STROSBERG, A.D.; PATSCH, J.R.; KREMPLER, F.; PATSCH, W. A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat. Genet.* 2001, vol. 28, no. 2, s. 178-83.
9. MACKOWIAK, P.A.; BARTLETT, J.G.; BORDEN, E.C.; GOLDBLUM, S.E.; HASDAY, J.D.; MUNFORD, R.S.; NASRAWAY, S.A.; STOLLEY, P.D.; WOODWARD, T.E. Concepts of fever: recent advances and lingering dogma. *Clin. Infect. Dis.* 1997, vol. 25, no. 1, s. 119-38.
10. SKULACHEV, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998, vol. 1363, s. 100-124.
11. ECHTAY, K.S.; MURPHY, M.P.; SMITH, R.A.J.; TALBOT, D.A.; BRAND, M.D. Superoxide Activates Mitochondrial Uncoupling Protein 2 from the Matrix Side. *J. Biol. Chem.* 2002, vol. 277, no. 49, s. 47129-47135.
12. MATTIASSON, G.; SULLIVAN, P.G. The Emerging Functions of UCP in Health, Disease, and Therapeutics. *Antioxid. Redox Signal.* 2006, vol. 8, s. 1-38.
13. NÜBEL, T.; RICQUIER, D. Respiration under Control of Uncoupling Proteins: Clinical Perspective. *Horm. Res.* 2006, vol. 65, s. 300-310.
14. LEE, F.Y.J.; LI, Y.; ZHU, H.; YANG, S.; LIN, H.Z.; TRUSH, M.; DIEHL, A.M. Tumor Necrosis Factor Increases Mitochondrial Oxidant Production and Induces Expression of Uncoupling Protein-2 in the Regenerating Rat Liver. *Hepatology.* 1999, vol. 29, s. 677-687.
15. CORTEZ-PINTO, H.; YANG, S.Q.; LIN, H.Z.; COSTA, S.; HWANG, C.S.; LANE, M.D.; BAGDY, G.; DIEHL, A.M. Bacterial Lipopolysaccharide Induces Uncoupling Protein-2 Expression in Hepatocytes by a Tumor Necrosis Factor- α -Dependent Mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, vol. 251, no. 1, s. 313-319.
16. FAGGIONI, R.; SHIGENAGA, J.; MOSER, A.; FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Induction of UCP2 Gene Expression by LPS: A Potential Mechanism for Increased Thermogenesis during Infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, vol. 244, s. 75-78.
17. CARRETERO, M.V.; TORRES, L.; LATASA, M.U.; GARCÍA-TREVIJANO, E.R.; PRIETO, J.; MATO, J.M.; AVILA, M.A. Transformed but not normal hepatocytes express UCP2. *FEBS Lett.* 1998, vol. 439, s. 55-58.
18. SCHNEIDER, W.C.; HOGEBOM, G.H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 1950, vol. 183, s. 123-128.
19. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, vol. 193, s. 265-275.
20. UEDA, K.; TANIZAWA, Y.; ISHIHARA, H.; KIZUKI, N.; OHTA, Y.; MATSUTANI, A.; OKA, Y. Overexpression of mitochondrial FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase does not correct glucose-stimulated insulin secretion from diabetic GK rat pancreatic islets. *Diabetologia.* 1998, vol. 41, no. 6, s. 649-653.
21. CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, vol. 162, no. 1, s. 156-159.
22. HWANG, S.; BENJAMIN, L.E.; OH, B.; ROTHSTEIN, J.L.; ACKERMAN, S.L.; BEDDINGTON, R.S.; SOLTER, D.; KNOWLES, B.B. Genetic mapping and embryonic expression of a novel, maternally transcribed gene Mem3. *Mamm. Genome.* 1996, vol. 7, no. 8, s. 586-590.

23. SAITO, K.; NISHIKAWA, J.I.; IMAGAWA, M.; NISHAHARA, T.; MATSUO, M. Molecular evidence of complex tissue- and sex-specific mRNA expression of the rat α_{2u} -globulin multigene family. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2000, vol. 272, s. 337-344.
24. ČERVINKOVÁ, Z.; LOTKOVÁ, H.; KŘIVÁKOVÁ, P.; ROUŠAR, T.; KUČERA, O.; TICHÝ, L.; ČERVINKA, M.; DRAHOTA, Z. Evaluation of Mitochondrial Function in Isolated Rat Hepatocytes and Mitochondria during Oxidative Stress. *ATLA*. 2007, vol. 35, s. 353-361.
25. LANNI, A.; DE FELICE, M.; LOMBARDI, A.; MORENO, M.; FLEURY, C.; RICQUIER, D.; GOGLIA, F. Induction of UCP₂ mRNA by thyroid hormones in rat heart. *FEBS Lett.* 1997, vol. 418, s. 171-174.
26. BROWN, L.J.; MACDONALD, M.J.; LEHN, D.A.; MORAN, S.M. Sequence of rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase cDNA. *J. Biol. Chem.* 1994, vol. 269, s. 14363-14366.
27. KOZA, R.A.; KOZAK, U.C.; BROWN, L.J.; LEITER, E.H.; MACDONALD, M.J.; KOZAK, L.P. Sequence and tissue-dependent RNA expression of mouse FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, vol. 336, s.97-104.
28. WEITZEL, J.M.; GROTT, S.; RADTKE, C.; KUTZ, S.; SEITZ, H.J. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 2000, vol. 381, s. 611-614.
29. HOUSTEK, J.; CANNON, B.; LINDBERG, O. Glycerol-3-phosphate shuttle and its function in intermediary metabolism of hamster brown adipose tissue. *Eur. J. Biochem.* 1975, vol. 54, s. 11-18.
30. SWIERCZYNSKI, J.; SCISLOWSKI, P.; ALEKSANDROWICZ, Z. High activity of alpha-glycerophosphate oxidation by human placental mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1976, vol. 429, s. 46-54.
31. MACDONALD, M.J.; BROWN, L.J. Calcium activation of mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase restudied. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, vol. 326, s. 79-84.
32. CHOWDHURY, S.K.; DRAHOTA, Z.; FLORYK, D.; CALDA, P.; HOUSTEK, J. Activities of mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes in cultured aminocytes. *Clin. Chim. Acta.* 2000, vol. 298, s. 157-173.
33. DÜMMLER, K.; MÜLLER, S.; SEITZ, H.J. Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues. *Biochem. J.* 1996, vol. 317, s. 913-918.
34. OPPENHEIMER, J.H.; SILVA, E.; SCHWARTZ, H.L.; SURKS, M.I. Stimulation of hepatic mitochondrial alpha-glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme by l-triiodothyronine. Characteristics of the response with specific nuclear thyroid hormone binding sites fully saturated. *J. Clin. Invest.* 1977, vol. 59, s. 517-527.
35. CLAY, V.J.; RAGAN, C.I. Biosynthesis and import into the mitochondrion of l-3-glycerophosphate dehydrogenase, and the effect of thyroid hormone deficiency on gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989, vol. 975, s. 112-118.
36. LANNI, A.; CIMMINO, M.; MORENO, M.; DELLI GATTI, A.; GINESTRA, A.; GOGLIA, F. Relationship between dose, mode of administration and effects of triiodothyronine on two hepatic responsive enzymes. *Horm. Metab. Res.* 1995, vol. 27, s. 314-317.
37. MÜLLER, S.; SEITZ, H.J. Cloning of a cDNA for the FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase from rat liver and its regulation by thyroid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, vol. 91, s. 10581-10585.
38. YEN, P.M.; CHIN, W.W. New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.* 1994, vol. 5, s. 65– 72.
39. WEITZEL, J.M.; KUTZ, S.; RADTKE, C.; GROTT, S.; SEITZ, H.J. Hormonal regulation of multiple promoters of the rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene:

- identification of a complex hormoneresponse element in the ubiquitous promoter B. *Eur. J. Biochem.* 2001, vol. 268, s. 4095– 4103.
40. WEITZEL, J.M.; IWEN, K.A.; SEITZ, H.J. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp. Physiol.* 2003, vol. 88, s. 121-128.
 41. LANNI, A.; MORENO, M.; LOMBARDI, A.; GOGLIA, F. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 2003, vol. 543, s. 5-10.
 42. COSTANTINO, P.; ATTARDI, G. Identification of discrete electrophoretic components among the products of mitochondrial protein synthesis in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* 1975, vol. 96, s. 291–306.
 43. HARE, J.F.; HODGES, R. Turnover of mitochondrial matrix polypeptides in hepatoma monolayer cultures. *J. Biol. Chem.* 1982, vol. 257, s. 12950– 12953.
 44. GRISOLIA, S.; HERNANDEZ-YAGO, J.; KNECHT, E. Regulation of mitochondrial protein concentration: a plausible model which may permit assessing protein turnover. *Curr. Top. Cell. Regul.* 1985, vol. 27, s. 387– 396.
 45. HARE, J.F. Mechanisms of membrane protein turnover. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990, vol. 1031, s. 71– 90.
 46. TANNER, A.J.; DICE, J.F. Batten disease and mitochondrial pathways of proteolysis. *Biochem. Mol. Med.* 1996, vol. 57, s. 1 –9.
 47. KASER, M.; LANGER, T. Protein degradation in mitochondria. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2000, vol. 11, s. 181– 190.
 48. NÉGRE-SALVAYRE, A.; HIRTZ, C.; CARRERA, G.; CAZENAVE, R.; TROLY, M.; SALVAYRE, R.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA, L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 1997, vol. 11, s. 809-815.
 49. ALÁN, L.; SMOLKOVÁ, K.; KRONUSOVÁ, E.; ŠANTOROVÁ, J.; JEŽEK, P. Absolute levels of transcripts for mitochondrial uncoupling proteins UCP2, UCP3, UCP4, and UCP5 show different patterns in rat and mice tissues. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2009, vol. 41, s. 71-78.
 50. VOICI, A.; DEMORI, I.; FRANZI, A.T.; FUGASSA, E.; GOGLIA, F.; LANNI, A. Uncoupling protein 2 mRNA expression and respiratory parameters in Kupffer cells isolated from euthyroid and hyperthyroid rat livers. *Eur. J. Endocrinol.* 2001, vol. 145, s. 317-322.
 51. ROUSSET, S.; MOZO, J.; DUJARDIN, G.; EMRE, Y.; MASSCHELEYN, S.; RICQUIER, D.; CASSARD-DOULCIER, A.M. UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Lett.* 2007, vol. 581, s. 479-482.
 52. CORTEZ-PINTO, H.; LIN, H.Z.; YANG, S.Q.; DA COSTA, S.O.; DIEHL, A.M. Lipids Up-regulate Uncoupling Protein 2 Expression in Rat Hepatocytes. *Gastroenterology.* 1999, vol. 116, s. 1184-1193.
 53. BARBE, P.; LARROUY, D.; BOULANGER, C.; CHEVILLOTTE, E.; VIGUERIE, N.; THALAMAS, C.; TRASTOY, M.O.; ROQUES, M.; VIDAL, H.; LANGIN, D. Triiodothyronine-mediated up-regulation of UCP2 and UCP3 mRNA expression in human skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes. *FASEB J.* 2001, vol. 15, no. 1, s. 13-15.
 54. KELLY, G. Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones: A Review. *Altern. Med. Rev.* 2000, vol. 5, no. 4, s. 306-333.
 55. RABELO, R.; REYES, C.; SCHIFMAN, A.; SILVA, J.E. Interactions Among Receptors, Thyroid Hormone Response Elements, and Ligands in the Regulation of the Rat Uncoupling Protein Gene Expression by Thyroid Hormone. *Endocrinology.* 1996, vol. 137, no. 8, s. 3478-3487.
 56. ČERVINKOVÁ, Z.; SVÁTKOVÁ, R.; KALOUS, M.; RAUCHOVÁ, H; ČERVINKA, M.; DRAHOTA, Z. Effect of Triiodothyronine Administration on the Recovery of Liver Oxidative Capacity after Partial Hepatectomy. *Eur. Surg. Res.* 1998, vol. 30, s. 371-377.

57. MORO, L.; MARRA, E.; CAPUANO, F.; GRECO, M. Thyroid Hormone Treatment of Hypothyroid Rats Restores the Regenerative Capacity and the Mitochondrial Membrane Permeability Properties of the Liver after Partial Hepatectomy. *Endocrinology*. 2004, vol. 145, no. 11, s. 5121 – 5128.
58. FAUSTO, N. Liver regeneration. *J. Hepatol.* 2000, vol. 32, suppl. 1, s. 19-31.
59. WU, Q.; GONG, D.; TIAN, N.; ZHU, L.; GUAN, L.; YANG, M.; YUAN, B.; QIU, Q.; LV, H.; ZOU, Y. Protection of Regenerating Liver After Partial Hepatectomy from Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity in Rats: Roles of Mitochondrial Uncoupling Protein 2 and ATP Stores. *Dig. Dis. Sci.* 2009, vol. 54, s. 1918-1925.

11. Přehled publikační činnosti autora

Monografie a kapitoly v monografiích

Autorka zatím žádnou monografií ani kapitolu v monografií nemá.

Původní články s impakt faktorem

1. JEŠINA, P.; KHOLOVÁ, D.; BOLEHOVSKÁ, R.; ČERVINKOVÁ, Z.; DRAHOTA, Z.; HOUŠTĚK, J. Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by rat liver mitochondria. *Physiol. Res.*, 2004, vol. 53, s. 305 – 310. **IF 1,140**
2. MRÁČEK, T.; JEŠINA, P.; KŘIVÁKOVÁ, P.; BOLEHOVSKÁ, R.; ČERVINKOVÁ, Z.; DRAHOTA, Z.; HOUŠTĚK, J. Time-course of hormonal induction of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase biogenesis in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, vol. 1726, no.2, s. 217 - 223. **IF 2,418**
3. RACLAVSKÝ, V.; TRTKOVÁ, J.; RUSKOVÁ, L.; BUCHTA, V.; BOLEHOVSKÁ, R.; VACKOVÁ, M.; HAMAL, P. Primer R108 performs best in the RAPD strain typing of three *Aspergillus* species frequently isolated from patients. *Folia Microbiol.* 2006, vol. 51, no. 2, s. 136 - 140. **IF 0,963**
4. JIROUTOVÁ, A.; SLAVKOVSKÝ, R.; ČERMÁKOVÁ, M.; MAJDIÁKOVÁ, L.; HANOVCOVÁ, I.; BOLEHOVSKÁ, R.; HAJZLEROVÁ, M.; RADILOVÁ, H.; RUSZOVÁ, E.; KANTA, J. Expression of mRNAs related to connective tissue metabolism in rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2007, vol. 58, no. 4, s. 263 - 273. **IF 1,311**
5. KACEROVSKY, M.; DRAHOSOVA, M.; HORNYCHOVA, H.; PLISKOVA, L.; BOLEHOVSKA, R.; FÖRSTL, M.; TOSNER, J.; ANDRYS, C. Value of amniotic fluid interleukin-8 for the prediction of histological chorioamnionitis in preterm premature rupture of membranes. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2009, vol. 30, no. 6, s. 733-738. **IF 1,047**
6. KUČERA, O.; GARNOL, T.; LOTKOVÁ, H.; STAŇKOVÁ, P.; MAZUROVÁ, Y.; HROCH, M.; BOLEHOVSKÁ, R.; ROUŠAR, T.; ČERVINKOVÁ, Z. The effect of rat strain, diet composition and feeding period on the development of a nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Physiol. Res.* 2011, vol. 60, no. 2, s. 317-328. **IF 1,646**
7. KACEROVSKY, M.; PLISKOVA, L.; BOLEHOVSKA, R.; MUSILOVA, I.; HORNYCHOVA, H.; TAMBOR, V.; JACOBSSON, B. The microbial load with genital mycoplasmas correlates with the degree of histologic chorioamnionitis in preterm PROM. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011, vol. 205, no. 3, s. 213.e1-7. (v tisku) **IF 3,313**
8. KACEROVSKY, M.; ANDRYS, C.; HORNYCHOVA, H.; PLISKOVA, L.; LANCZ, K.; MUSILOVA, I.; DRAHOSOVA, M.; BOLEHOVSKA, R.; TAMBOR, V.; JACOBSSON, B. Amniotic fluid soluble Toll-like receptor 4 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of the membranes. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2011. (v tisku) **IF 2,071**

9. KACEROVSKY, M.; PLISKOVA, L.; BOLEHOVSKA, R.; SKOGSTRAND, K.; HOUGAARD, D.M.; TSIARTAS, P.; JACOBSSON, B. The impact of the microbial load of genital mycoplasmas and gestational age on the intensity of intraamniotic inflammation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012, vol. 206, no.4, s. 342.e1-8. (v tisku) **IF 3,313**
10. **BOLEHOVSKÁ, R.**; POSPÍŠILOVÁ, M.; RYCHTRMOC, D.; HUBÁLKOVÁ, L.; ČERVINKOVÁ, Z. Induction of uncoupling protein-2 mRNA by triiodothyronine in rat liver. *Acta Vet. Brno* 2012, vol. 81. (přijato k publikaci) **IF 0,534**

Původní články

1. **BOLEHOVSKÁ, R.**; PLÍŠKOVÁ, L.; BUCHTA, V.; CERMAN, J.; HAMAL, P. Detection of Aspergillus spp. in biological samples by real-time PCR. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006, vol. 150, no. 2, s. 245 - 248.
2. ŠTĚPÁNOVÁ, V.; PLÍŠKOVÁ, L.; KOSINA, P.; ŠPLIŇO, M.; FÖRSTL, M.; BOLEHOVSKÁ, R.; DLHÝ, J.; CHRZOVÁ, M. Příušnice – znovu se vracející infekce? Současná situace ve výskytu příušnic ve východočeském regionu. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2006, vol. 55, no. 4, s. 127 - 135.
3. **BOLEHOVSKÁ, R.**; PLÍŠKOVÁ, L.; PLÍŠEK, S.; HYPÍUSOVÁ, V.; MAŇÁK, J.; HAVEL, E.; CERMAN, J.; ŽÁK, P.; SOLAŘ, M. Naše zkušenosti s testem SeptiFast. *FONS* 2007 no. 3, s. 18 - 21.
4. **BOLEHOVSKÁ, R.**; PLÍŠKOVÁ, L.; PLÍŠEK, S.; ČERMÁKOVÁ, Z.; HONEGR, K.; PALIČKA, V. Detekce DNA Borrelia burgdorferi sensu lato pomocí real-time PCR. *Klin. Biochem. Metab.* 2009, vol. 17, no. 38 (1), s. 29-33.
5. KACEROVSKÝ, M.; DRAHOŠOVÁ, M.; HORNYCHOVÁ, H.; PLÍŠKOVÁ, L.; BOLEHOVSKÁ, R.; FÖRSTL, M.; TOŠNER, J.; LEŠKO, D.; ANDRÝS, C. Interleukin 6 v plodové vodě pacientek s předčasným odtokem plodové vody. *Česká gynekologie* 2009, vol. 74, no. 6, s. 403-409.
6. ŠTĚPÁNOVÁ, V.; PLÍŠKOVÁ, L.; PLÍŠEK, S.; BOLEHOVSKÁ, R. Program Externího hodnocení kvality pro průkaz DNA lidského cytomegaloviru v České republice. *Klin. mikrobiol. inf. lék.* 2010, vol. 16, no. 3, s. 103-107.
7. PLÍŠEK, S.; PLÍŠKOVÁ, L.; BOLEHOVSKÁ, R.; KAPLA, J.; ŠTĚPÁNOVÁ, V. Predikce úspěšnosti léčby chronické hepatitidy C pomocí ROC analýzy. *Klin. Biochem. Metab.* 2010, vol. 18, no. 39 (4), s. 219-224.
8. ŠTĚPÁNOVÁ, V.; PLÍŠKOVÁ, L.; KUBIŠOVÁ, M.; ŠTĚPÁNOVÁ, E.; BOLEHOVSKÁ, R.; BOŠTÍKOVÁ, V.; SVOBODOVÁ, M. Využití testů avidity IgG protilátek v diagnostice cytomegalovirové infekce. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2011, vol. 60, no. 3, s. 115-120.

Statě ve sbornících

1. **BOLEHOVSKÁ, R.**; PLÍŠKOVÁ, L.; ŽIVNÝ, P.; VOBORNÍKOVÁ, J.; PALIČKA, V. Stanovení mRNA pro interleukin-6 a tumor necrosis faktor v jaterní tkáni a v krvi. *Pokroky v klinické biochemii 2003.* 2003, s. 172.
2. ŽIVNÝ, P.; ŽIVNÁ, H.; HROCHOVÁ, K.; BUREŠ, J.; PLÍŠKOVÁ, L.; FEŘTEK, D.; BOLEHOVSKÁ, R.; PALIČKA, V. Kvantitativní vyhodnocení exprese genu pro interleukin-6 a tumor necrosis factor-alfa v lidské jaterní tkáni. *Pokroky v klinické biochemii 2003.* 2003, s. 176.
3. BERÁNEK, M.; DULÍČEK, P.; VÁVROVÁ, J.; BOLEHOVSKÁ, R.; PALIČKA, V. Přínos genotypizace MTHFR pro diagnostiku trombofilních stavů. *Trombóza a hemostáza 2003.* 2003, s. 89.
4. PAVLÍKOVÁ, L.; HRUBÁ, P.; ŽIVNÝ, P.; BOLEHOVSKÁ, R.; PALIČKA, V. Vztah mezi IL-6 a TNF- α v supernatantu z jaterní tkáně u pacientů s fibrózou či cirhózou jater. *Biomarkers and Environment Supplement 1, Sborník abstrakt 2004*, s. 6.

5. **BOLEHOVSKÁ, R.**; PLÍŠKOVÁ, L. Detekce DNA *Aspergillus* species metodou real-time PCR. *Pokroky v klinické biochemii 2005. Sborník přednášek a posterů.* 2005, s. 22-23.
6. BUCHTA, V.; BOLEHOVSKÁ, R.; DRAHOŠOVÁ, M.; PLÍŠKOVÁ, L.; HAMAL, P.; RACLAVSKÝ, V. *Aspergilové infekce – molekulární, mikrobiologické a imunologické aspekty.* *Pokroky v klinické biochemii 2005. Sborník přednášek a posterů.* 2005, s. 24.
7. PLÍŠKOVÁ, L.; ČERMÁKOVÁ, Z.; BLAŽKOVÁ, J.; BOLEHOVSKÁ, R. Využití PCR v diagnostice leptospirózy. *Pokroky v klinické biochemii 2005. Sborník přednášek a posterů.* 2005, s. 57-58.
8. PLÍŠKOVÁ, L.; BOLEHOVSKÁ, R.; ŠTĚPÁNOVÁ, V. Detekce parvovirových infekcí metodou PCR. *Správy klinické mikrobiologie 2006, vol. VI, no. SC/2006,* s. 18.
9. ŠTĚPÁNOVÁ, V.; PLÍŠKOVÁ, L.; KOSINA, P.; ŠPLIŇO, M.; BOLEHOVSKÁ, R. Příušnice znovu aktuální – současná situace ve výskytu příušnic ve východních Čechách. *Správy klinické mikrobiologie 2006, vol. VI, no. SC/2006,* s. 39.
10. STEPANOVA, V.; PLISKOVA, L.; KOSINA, P.; SPLINO, M.; FÖRSTL, M.; PLISEK, S.; BOLEHOVSKÁ, R. Mumps outbreak in Eastern Bohemian region of Czech Republic. *J. Clin. Virol.* 2006, vol. 36, no. suppl. 3, s. 22. **IF 2,630**
11. PLISKOVA, L.; BOLEHOVSKA, R.; STEPANOVA, V. Detection of parvovirus B19 infection by nested PCR assays. *J. Clin. Virol.* 2006, vol. 36, no. suppl. 3, s. 22-23. **IF 2,630**
12. **BOLEHOVSKÁ, R.**; PLÍŠKOVÁ, L.; HYPIUSOVÁ, V.; ČERMÁK, P.; RAŠKOVÁ, K. SeptiFast – diagnostika původců krevních sepsí. *Správy klinické mikrobiologie 2007, vol. VII, no. SB/2007,* s. 50.
13. PLÍŠKOVÁ, L.; HYPIUSOVÁ, V.; BOLEHOVSKÁ, R.; ČERMÁK, P.; ŠPRÝCHALOVÁ J. Kvantifikace DNA CoNS metodou real-time PCR u katérových sepsí. *Správy klinické mikrobiologie 2007, vol. VII, no. SB/2007,* s. 47.
14. ČERMÁKOVÁ, Z.; PLÍŠKOVÁ, L.; VOXOVÁ, B.; BOLEHOVSKÁ, R. Možnosti laboratorní diagnostiky infekce *Entamoeba histolytica* ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. *Správy klinické mikrobiologie 2007, vol. VII, no. SB/2007,* s. 72.
15. **BOLEHOVSKÁ, R.**; PLÍŠKOVÁ, L.; DEBNÁROVÁ, L. Možnosti a úskalí detekce DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *RANK 2009, Sborník sdělení.* 2009.
16. **BOLEHOVSKÁ, R.**; PLÍŠKOVÁ, L.; FRIEDECKÝ, B. Postanalytické aspekty EHK v molekulární biologii. *Klin. Biochem. Metab.* 2009, vol. 17, no.38 (3), s. 181.
17. STEPANOVA, V.; PLISKOVA, L.; KUBISOVA, M.; ZAK, P.; SVOBODOVA, M.; PLISEK, S.; BOLEHOVSKA, R.; STEPANOVA, E.; DUSILOVA-SULKOVA, S. Parvovirus B19 infection in kidney transplant recipient. *J. Clin. Virol.* 2009, vol. 46, no. suppl. 1, s. S44. **IF 3,124**
18. PLISKOVA, L.; BOLEHOVSKA, R.; STEPANOVA, V et al. Quality control and standardization processes in real-time PCR - the systems used in our laboratory. *J. Clin. Virol.* 2009, vol. 46, no. suppl. 1, s. S51. **IF 3,124**
19. PLÍŠKOVÁ, L.; BOLEHOVSKÁ, R.; FRIEDECKÝ, B. Možnosti kontroly a standardizace molekulárně biologických metod. *RANK 2009, Sborník sdělení.* 2009.

Přehledové články

1. PLÍŠKOVÁ, L.; BOLEHOVSKÁ, R.; HYPIUSOVÁ, V. SeptiFast – test pro detekci původců sepse. *FONS 2007, no. 3,* s. 14 - 17.
2. FRIEDECKÝ, B.; PLÍŠKOVÁ, L.; BOLEHOVSKÁ, R.; PALIČKA, V. Externí hodnocení kvality v molekulární biologii. *Klin. Biochem. Metab.* 2008, vol. 16, no. 37 (1), s. 40 – 42.
3. ČERMÁKOVÁ, Z.; VOXOVÁ, B.; RYŠKOVÁ, O.; VALENTA, Z.; PLÍŠKOVÁ, L.; LESNÁ, J.; FÖRSTL, M.; BUCHTA, V.; PLÍŠEK, S.; PRÁŠIL, P.; BOLEHOVSKÁ, R. *Giardia intestinalis* – zajímavý střevní prvok. *Folia Gastroenterol. Hepatol.* 2008, vol. 6, no.1, s. 24 – 30.

4. ČERMÁKOVÁ, Z.; VALENTA, Z.; VOXOVÁ, B.; BUCHTA, V.; FÖRSTL, M.; ROUČKOVÁ, V.; PLÍŠKOVÁ, L.; BOLEHOVSKÁ, R.; PRÁŠIL, P.; PLÍŠEK, S. Entamoeba histolytica - nebezpečný střevní prvok (III. část: odběr biologického materiálu a laboratorní diagnostika patogenní améby). *Folia Gastroenterol. Hepatol.* 2008, vol. 6, no. 4, s. 2-4.
5. LENGEROVÁ, M.; BOLEHOVSKÁ, R.; HRNČÍŘOVÁ, K.; ŽÁK, P.; RÁČIL, Z.; KOČMANOVÁ, I.; MAYER, J. Úloha PCR v diagnostice invazivní aspergilózy. *Postgraduální medicína, příloha k č. 9 2009*, vol. 11, no. 9, s. 43-47.
6. VOXOVÁ, B.; ČERMÁKOVÁ, Z.; PRÁŠIL, P.; PLÍŠKOVÁ, L.; BOLEHOVSKÁ, R.; FÖRSTL, M.; PLÍŠEK, S. Úskalí laboratorní diagnostiky mozkové toxoplasmózy. *Klin. mikrobiol. inf. lék.* 2009, vol. 15, no. 3, s. 91-94.
7. ČERMÁKOVÁ, Z.; PRÁŠIL, P.; VALENTA, Z.; FÖRSTL, M.; PLÍŠKOVÁ, L.; BOLEHOVSKÁ, R. Zamyšlení nad "postavením" metody PCR v rutinní diagnostice toxoplasmózy při vyšetření periferní krve u imunokompetentních nemocných. *Klin. mikrobiol. inf. lék.* 2009, vol. 15, no. 4, s. 138-142.
8. BOLEHOVSKÁ, R.; PLÍŠEK, S.; PLÍŠKOVÁ, L.; ČERMÁKOVÁ, Z.; PALIČKA, V. Lymeská borelióza. *Klin. Biochem. Metab.* 2009, vol. 17, no. 38 (1), s. 24-28.
9. BOLEHOVSKÁ, R.; ČERVINKOVÁ, Z.; POSPÍŠILOVÁ, M.; LOTKOVÁ, H.; PLÍŠKOVÁ, L.; PALIČKA, V. Uncoupling protein 2. *Klin. Biochem. Metab.* 2009, vol. 17, no. 38 (4), s. 227-232.
10. BOLEHOVSKÁ, R.; PLÍŠKOVÁ, L.; FRIEDECKÝ, B.; PALIČKA, V. Postanalytické aspekty EHK v molekulární biologii extrahumánního genomu. *Klin. Biochem. Metab.* 2010, vol. 18, no. 39 (1), s. 12-17.

Přednášky na odborných setkáních

1. Bolehovská R., Pospíšilová M., Červinková Z.: Zavedení PCR metody pro zjištění exprese uncoupling protein-2 RNA v jaterní tkáni po aplikaci trijodthyroninu. XXXIII. Májové hepatologické dny 2005, Karlovy Vary, 4. – 6. 5. 2005.
2. Bolehovská R., Plíšková L.: Real-Time PCR – principy a její využití pro kvantifikaci HBV DNA a HCV RNA. Hradecké virologické dny (10. setkání virologů), Hradec Králové, 14. – 15. 4. 2005.
3. Bolehovská R., Plíšková L.: PCR diagnostika a dětské infekce. Kongres pediatriů a dětských sester, Olomouc, 18. - 19. 5. 2006.
4. Bolehovská R., Plíšková L.: Diagnostika aspergilózy. Rutinní analýza nukleových kyselin molekulárně biologickými technikami 2006, Pardubice, 25. - 26. 1. 2006.
5. Bolehovská R., Plíšková L., Štěpánová V., Förstl M.: Využití PCR diagnostiky u onemocnění způsobených parvovirem B19. Hradecké virologické dny (11. konference virologů), Hradec Králové, 20. – 21. 4. 2006.
6. Bolehovská R., Plíšková V., Štěpánová V.: Průkaz RNA viru parotitidy z likvoru metodou PCR. Hradecké virologické dny (12. setkání virologů), Hradec Králové, 3. – 4. 5. 2007.
7. Bolehovská R., Plíšková L., Hypiusová V., Čermák P., Rašková K.: SeptiFast – diagnostika původců krevních sepsí. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny, 17. - 19. 9. 2007, Ostravice.
8. Bolehovská R., Plíšková L., Hypiusová V.: Validace in-house PCR pro průkaz DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Rutinní analýza nukleových kyselin molekulárně biologickými technikami 2008, Pardubice, 23. - 24. 1. 2008.
9. Bolehovská R., Plíšková L., Hypiusová V.: Molekulárně biologická diagnostika DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato. XXVI. Mezikrajské setkání biochemiků Jihočeského, Královéhradeckého a pardubického regionu, Tábor- Sezimovo Ústí, 18. - 20. 6. 2008.

10. **Bolehovská R.**, Plíšková L., Debnárová L.: Možnosti a úskalí detekce DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato. RANK 2009, Rutinní analýza nukleových kyselin molekulárně biologickými technikami 2009, Pardubice, 28.-29. 1. 2009.
11. **Bolehovská R.**, Plíšková L., Žák P., Drahošová M.: PCR diagnostika aspergilových infekcí – naše zkušenosti. 3. Workshop CELL - Antimykotická profylaxe u nemocných s hematologickými malignitami & molekulárně biologická diagnostika invazivních mykotických infekcí, Brno, 6. 3. 2009.
12. **Bolehovská R.**, Plíšková L.: Možnosti a úskalí detekce DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato. VIII. Den laboratorní diagnostiky - nejen lymeské boreliózy, Brno, 1. - 2. 4. 2009.
13. **Bolehovská R.**, Plíšková L., Plíšek S., Hypišová V.: Postanalytické aspekty PCR výsledků hepatitidy B a C. Pracovní konference sekce biochemických laborantů, Praha, 16. 4. 2009.
14. **Bolehovská R.**, Plíšková L., Plíšek S., Hypišová V.: Postanalytické aspekty PCR výsledků hepatitidy B a C. Pracovní konference sekce biochemických laborantů, Jindřichův Hradec, 14. 5. 2009.
15. **Bolehovská R.**, Plíšková L., Friedecký B.: Postanalytické aspekty EHK v molekulární biologii. Klin. Biochem. Metab.; 17 (38), 3, 181, 2009, IX. Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie, Praha, 20. - 22. 9. 2009.
16. **Bolehovská R.**, Plíšková L., Žák P., Drahošová M.: Problém aspergilových infekcí u imunosuprimovaných pacientů. Regionální seminář v oboru klinické biochemie, Hradec Králové, 15. 12. 2009.
17. **Bolehovská R.**, Plíšková L., Ryšková L.: Postavení sekvenační analýzy v diagnostice infekčních onemocnění. FONS 2010 (Symposium klinické biochemie), Pardubice, 20. -21. 9. 2010.

Spoluautorka dalších 23 přednášek.