

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**Regenerace jater po částečné hepatektomii u potkanů s nealkoholovým
ztukovatěním jater**

Tomáš Garnol

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program
Fyziologie a patologická fyziologie

Hradec Králové

2016

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

Autor: MUDr. Tomáš Garnol
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitelka: prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel konzultant: doc. MUDr. Otto Kučera, Ph.D.
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Oponenti: doc. MUDr. Jiří Šiller, Ph.D.
Přednosta Chirurgické kliniky Nemocnice Pardubického kraje, a.s.
Kyjevská 44, 53203 Pardubice a FZS Univerzity Pardubice

MUDr. Tomáš Pantoflíček, Ph.D.
Klinika Transplantační Chirurgie, Institut Klinické a Experimentální Chirurgie (IKEM), Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby disertačních prací OR Fyziologie a patologická fyziologie dne 19. 9. 2016 od 11:00 hodin v Zasedací místnosti děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové

Tato práce vznikla za podpory grantů GAUK 126109; Univerzity Karlovy SVV-2011-262901 a SVV-2013-266901; PRVOUK P37/02.

S disertační 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.
Předsedkyně komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Fyziologie a patologická fyziologie

OBSAH

OBSAH	3
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
1. SOUHRN	5
2. SUMMARY	6
3. ÚVOD	7
4. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
4.1 Regenerace jater	8
4.1.1 Zvířecí modely jaterní regenerace	8
4.1.2 Toxické modely jaterní regenerace	8
4.1.3 Chirurgické modely jaterní regenerace	9
4.1.4 Metody hodnocení intenzity regenerace	11
4.2 Nealkoholové ztukovatění jater	11
4.2.1 Etiopatogeneze nealkoholového ztukovatění jater	11
4.2.2 Modely nealkoholového ztukovatění jater u potkanů	12
4.2.3 Regenerace jater postižených nealkoholovým ztukovatěním	12
5. CÍLE PRÁCE	14
6. METODIKY	15
6.1 Metodiky pokusů <i>in vivo</i>	15
6.2 Metodiky pokusů <i>in vitro</i>	15
6.3 Statistické vyhodnocení výsledků	15
7. VÝSLEDKY	17
7.1 Výsledky pokusů <i>in vivo</i>	17
7.1.1 Zavedení modelu nealkoholového ztukovatění jater potkana <i>in vivo</i>	17
7.1.2 Vliv prosté jaterní steatózy u potkana na regeneraci jater po parciální hepatektomii	18
7.2 Výsledky pokusů <i>in vitro</i>	20
7.2.1 Porovnání účinku terciárního-butylhydroperoxidu na steatotické a nesteatotické hepatocyty <i>in vitro</i>	20
8. DISKUSE	22
8.1 Zavedení modelu nealkoholové steatózy na potkanech	22
8.2 Vliv steatózy na jaterní regeneraci po parciální hepatektomii u potkanů	23
8.3 Vliv oxidačního stresu indukovaného terciárním-butylhydroperoxidem na steatotické hepatocyty potkana v podmínkách <i>in vitro</i>	24
9. ZÁVĚRY	26
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	27
11. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA	32

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
BrdU	bromdeoxyuridin
CT	počítačová tomografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FFAs	volné mastné kyseliny
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion, glutathiondisulfid
HFD	vysokotuková dieta, <i>high-fat diet</i>
IL-6	interleukin 6
LDH	laktátdehydrogenáza
MDA	malondialdehyd
MFD	dieta se středním obsahem tuků, <i>medium-fat diet</i>
MPT	<i>mitochondrial permeability transition</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAFLD	nealkoholové ztukovatění jater, <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	nealkoholová steatohepatitida, <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PHx	parciální hepatektomie
ROS	reaktivní formy kyslíku, <i>reactive oxygen species</i>
ST-1	standardní laboratorní dieta
TAG	triacylglycerol
tBHP	terciární butylhydroperoxid
TGF- β 1	transformující růstový faktor β 1
WST-1	tetrazoliová sůl používaná k určování aktivity buněčných
UCP-2	<i>uncoupling protein 2</i>

1. SOUHRN

Regenerace jater po částečné hepatektomii u potkanů s nealkoholovým ztukováním jater

Nealkoholové ztukování jater (NAFLD – *non-alcoholic fatty liver disease*) je v současnosti nejčastějším chronickým onemocněním jater v ekonomicky vyspělých zemích s prevalencí kolem 30 %. Resekce jater z různých příčin je nyní běžnou součástí klinické praxe. Úspěšné zotavení a obnova jaterních funkcí závisí na regenerační schopnosti zbytku jater. Průběh regenerace jater může být velmi významně ovlivněn současným postižením jater patologickým procesem včetně NAFLD.

Cílem této práce bylo studium časné fáze regenerace jater po částečné hepatektomii (PHx) u potkanů s nutričně navozenou prostou steatózou. Nejprve jsme zavedli model NAFLD podáváním diety s vysokým obsahem tuků po dobu 3 resp. 6 týdnů potkanům kmene Wistar a Sprague-Dawley. U obou kmenů došlo k rozvoji steatózy bez známek zánětu, nekrózy nebo fibrotických změn.

V druhé části naší studie jsme se sledovali, zda regenerace jater po PHx je u potkanů s NAFLD alterována. Regeneraci jater jsme posuzovali především ze změn inkorporace bromdeoxyuridinu do DNA hepatocytů. Regenerace jater postižených prostou steatózou navozená 2/3 PHx není signifikantně ovlivněna v porovnání s neztukovatělými játry. Jedinou změnou v regenerační odpovědi, kterou jsme pozorovali u steatotických jater, je možné zpoždění nástupu proliferace v centrilobulárních zónách jaterního acinu.

V další části práce jsme se snažili zjistit, zda hepatocyty izolované ze ztukovatělých jater vykazují změněnou citlivost vůči oxidačnímu stresu v podmínkách *in vitro*. Neovlivněné steatotické hepatocyty v podmínkách *in vitro* v porovnání s neztukovatělými kontrolami vykazují vyšší produkci reaktivních forem kyslíku, vyšší stupeň lipoperoxidace, nižší redoxní stav glutathionu a sníženou respiraci ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I. Steatotické hepatocyty jsou zvýšeně citlivé k oxidačnímu poškození navozenému terciárním butylhydroperoxidem, což podporuje široce uznávanou hypotézu, že steatóza zvyšuje náchylnost hepatocytů k dalším inzultům.

2. SUMMARY

Liver regeneration after partial hepatectomy in rats suffering from non-alcoholic fatty liver disease

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is currently the most frequent chronic liver disease in economically developed countries with prevalence of about 30 %. Liver resection from different reasons is nowadays common surgical procedure. Successful recovery and renewal of liver functions depend on regenerative capacity of liver remnant. The course of liver regeneration could be profoundly influenced by concomitant liver pathological processes including NAFLD.

The aim of this work has been study of early phase of liver regeneration after partial hepatectomy (PHx) in rats with nutritionally induced simple steatosis. At the beginning we introduced a model of NAFLD by a high-fat diet giving to Wistar or Sprague-Dawley rats for 3 and 6 weeks, resp. This regimen induced simple steatosis without signs of inflammation, necrosis or fibrotic changes in both strains.

In the second part of our study we followed if liver regeneration after PHx in rats with NAFLD is altered. Liver regeneration was assessed by bromodeoxyuridin incorporation into DNA of hepatocytes. Regeneration of liver with simple steatosis induced by 2/3 PHx was not significantly influenced in comparison to non-steatotic liver. The only difference in regenerative response we have observed in steatotic liver was delay in proliferation onset in centrilobular zones of liver acinus.

In the last part of our work we tried to find out, if the hepatocytes isolated from steatotic liver show changes in sensitivity towards oxidative stress in *in vitro* conditions. Non-treated steatotic hepatocytes *in vitro* have higher production of reactive oxygen species, higher degree of lipoperoxidation, lower redox level of glutathione, and decreased state 3 respiration in presence of Complex I substrates in comparison to non-fatty control group. Steatotic hepatocytes are more sensitive towards oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxid. This supports widely accepted hypothesis that steatosis increases susceptibility of hepatocytes to other insults.

3. ÚVOD

Játra jsou, pravděpodobně v důsledku časté expozici látkám s toxickým účinkem, vybavena ohromující, evolučně dobře konzervovanou schopností obnovit původní populaci jaterních buněk po jejich redukci nebo poškození různé etiologie. Tato schopnost je tradičně nazývána jaterní regenerací, i když se v pravém slova smyslu o regeneraci orgánu nejedná, nedochází k rekonstrukci původních jaterních laloků. Na obnově funkce i populace jaterních buněk se podílí jak hypertrofie zbylých jaterních buněk, tak také jaterní hyperplasie (Bucher 1991).

Nealkoholové ztukovatění jater (NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease) je v současné době jedním z nejčastějších chronických onemocnění jater v ekonomicky vyspělých zemích, prevalence činí u západní populace kolem 30 % (Bellentani *et al.* 2010). Předpokládá se, a existuje pro to řada důkazů, že NAFLD je jaterním komponentem metabolického syndromu (Vernon *et al.* 2011). Jako NAFLD označujeme stav, kdy je více než 5 % hepatocytů postiženo steatózou (Brunt *et al.* 2011).

Resekce jater z různých příčin (primární nebo metastatické tumory jater, štěpy jater od živých dárců pro transplantaci, aj.) je v současnosti běžnou součástí klinické praxe. Úspěšné zotavení a obnova jaterních funkcí závisí na regenerační schopnosti zbytku jater. Průběh regenerace jater může být velmi významně ovlivněn současným postižením jater patologickým procesem, přičemž vzhledem k častému výskytu NAFLD je steatotické poškození jater jednou z nejčastějších příčin, která může negativně ovlivnit průběh regenerace jater po parciální resekci nebo regeneraci steatotického štěpu po transplantaci (Behrns *et al.* 1998, McCormack *et al.* 2007). V literatuře je popsáno několik studií zaměřených na sledování regenerace jater postižených steatózou se značně rozporupnými výsledky. Někteří dokladují snížení regenerační odpovědi a funkční obnovy tkáně u jater postižených NAFLD v experimentu i v klinické praxi (Vetelainen *et al.* 2007a, Kele *et al.* 2013), zatímco jiní autoři nezaznamenali signifikantní postižení regenerační odpovědi steatotických jater u potkanů po částečné hepatektomii (Picard *et al.* 2002, Sydor *et al.* 2013). Obdobně, Cho a spoluautoři tvrdí, že mírná steatóza není zásadním rizikovým faktorem pro částečnou hepatektomii a nesnižuje regenerační odpověď štěpu živých dárců (Cho *et al.* 2006). Příčinou této nejednotnosti výsledků jsou bezpochyby různé experimentální podmínky v pokusech na zvířeti i rozdílný klinický stav pacientů. Významnou roli jistě hraje míra i způsob navození jaterní steatózy, experimentální model indukující regenerační odpověď, přidružené choroby a další faktory. Cílem této práce bylo studium časných fází regenerace jater po částečné hepatektomii u potkanů s nutričně navozenou prostou steatózou.

4. LITERÁRNÍ PŘEHLED

4.1 Regenerace jater

Ačkoliv se nepoškozené hepatocyty dospělého jedince dělí jen výjimečně, na 20 000 hepatocytů v klidové G₀ fázi připadá 1 buňka nacházející se v mitotickém dělení (Steer 1995), v odpovědi na redukci jaterní tkáně parciální hepatektomií nebo v důsledku toxického nebo virového postižení jater dochází k masivní proliferaci jaterních buněk a následné obnově funkční jaterní tkáně (Michalopoulos and DeFrances 1997, Fausto and Riehle 2005). V játrech se nacházejí různé typy buněk. Jsou to vlastní parenchymové buňky - hepatocyty, které tvoří asi 80 % celkové hmotnosti jater a představují cca 70 % buněčné populace jaterní tkáně. V játrech jsou však také neparenchymové buňky, mezi které řadíme endotelové buňky jaterních sinusoid, endotelové buňky krevních cév, epitelové buňky žlučových cest (cholangiocyty), Kupfferovy buňky, Itovy buňky (hvězdicové buňky) a Pit buňky (velké granulární lymfocyty) (Si-Tayeb *et al.* 2010). Regenerační odpověď je do značné míry závislá na typu inzultu, který vedl k redukci funkční jaterní tkáně a který následně indukoval reparační procesy.

4.1.1 Zvířecí modely jaterní regenerace

Studium regenerace jater u člověka významně omezují etické důvody, ale také značně heterogenní etiologie jaterních lézí, které regeneraci mohou indukovat. Proto je nezbytné studovat proces jaterní regenerace na standardizovaných experimentálních modelech. *In vitro* modely jsou vhodné pro zkoumání jednotlivých signálů v regulačních dráhách, např. pro studium signálních molekul s mitogenním účinkem na hepatocyty. Vzhledem ke komplexní souhře mezi jednotlivými populacemi jaterních buněk v průběhu regenerace je nutné výsledky pokusů *in vitro* vždy validovat v podmínkách *in vivo* na celém zvířeti. Velká rozmanitost je i ve volbě pokusných zvířat, a to od malých hlodavců až po velké savce jako je prase. Volba pokusného zvířete závisí především na výzkumném problému, který chceme řešit. Nejčastěji se ke studiu používají laboratorní potkani a myši s ohledem na finanční, logistické a do určité míry i etické důvody. Díky dostupnosti geneticky modifikovaných zvířat a dobré dostupnosti velkého množství metodických postupů lze na malých laboratorních zvířatech studovat jednotlivé patogenetické procesy podílející se na regeneraci jater. Nicméně, použitelnost výsledků získaných na malých laboratorních zvířatech u člověka je značně diskutabilní. Velká zvířata, jako jsou prasata, ovce popř. psi jsou vhodná pokusná zvířata v situaci, kdy řešíme otázky důležité pro klinickou praxi. Jejich širšímu využití pro studium regenerace jater brání jejich finanční náročnost, metodické limity a v neposlední řadě i etické problémy.

4.1.2 Toxické modely jaterní regenerace

Poškození jater lze indukovat celou řadou toxických látek. Na rozdíl od částečné hepatektomie, kdy zůstávají zbylé hepatocyty nepoškozené, použitím modelových hepatotoxinů lze navodit selektivní poškození jater v centrilobulární nebo periportální oblasti, případně postižení difuzní, což umožňuje napodobit některá jaterní onemocnění.

Úskalí tohoto přístupu spočívá v nižší reprodukovatelnosti a standardizaci modelu, protože výsledné toxické poškození je závislé na řadě faktorů, jako je pohlaví, věk, způsob podání toxické látky, nutriční stav a další. Navíc, hepatotoxické látky mohou přímo interferovat s buněčnými a molekulárními mechanismy regenerace jater, jako je: poškození buněčných membrán (vede k narušení interakce mezi růstovými faktory a membránovými receptory), změny v genové expresi a následné syntézy proteinů, zánětlivá reakce v odpovědi na zvýšenou tvorbu cytokinů a kyslíkových radikálů nebo aktivace neparenchymových buněk. Nejčastěji se využívají tyto modelové hepatotoxiny – tetrachlormetan, D-galaktosamin, thioacetamid a acetaminofen.

4.1.3 Chirurgické modely jaterní regenerace

K nejdůležitějším chirurgickým modelům jaterní regenerace patří podvaz větve *v. portae* a parciální hepatektomie. Právě parciální hepatektomie (chirurgické odstranění části jater) je obvykle používaným modelem pro studium regenerace jater. Průkopníky v této oblasti byli Higgins a Anderson, kteří již v roce 1931 zavedli model 2/3 parciální hepatektomie (PHx) u potkana spočívající v odstranění středního a levého laterálního laloku, jejichž hmotnost představuje cca 68 % jaterní tkáně (Higgins and Anderson 1931). Na rozdíl od toxických modelů regenerace jater provázených různou mírou poškození reziduálních hepatocytů, po PHx zbylé hepatocyty nepodléhají nekróze (Michalopoulos 2010). Při vlastním chirurgickém zákroku je nutné dbát na to, aby při odstřížení jaterních laloků zůstal v dutině břišní co nejmenší pahýl, přítomnost většího množství nekrotické tkáně může významně ovlivnit průběh regenerační odpovědi (Bucher 1991). Další výhodou je přesné určení doby působení regeneračního stimulu, odstranění části jater je chvilé, od kdy dochází k iniciaci regenerační odpovědi (Michalopoulos 2007).

Laločnaté uspořádání savčích jater umožňuje provedení částečné hepatektomie různého rozsahu. Nejčastěji se využívá model 2/3 PHx, odstranění menší části jaterní tkáně (30 % popř. 50 %) je u potkana nebo myši méně vydatným stimulem a následná proliferace jaterních buněk je méně intenzivní (Bucher and Swaffield 1964, Fausto 2001). Subtotální hepatektomie, představující odstranění 90 % jaterní tkáně je natolik závažným zásahem, že může vést k akutnímu jaternímu selhání (Lehmann *et al.* 2012). Na patogenezi akutního jaterního selhání a omezení regenerační odpovědi u rozsáhlé PHx se podílí významný vzestup průtoku portální krve játry, to vede ke zvýšení smykového napětí (*shear stress*) s následným poškozením endoteliálních buněk jaterních sinusoid a aktivací Kupfferových buněk (Martins *et al.* 2008).

Regenerace jater po 2/3 hepatektomii

Nejčastějším modelem pro studium regenerace jater je 2/3 PHx, nejčastěji používaným experimentálním zvířetem jsou malí laboratorní hlodavci. Zatímco většina studií, které následovaly po zavedení modelu PHx Higginsem a Andersonem, byla provedena na laboratorních potkanech, v současnosti je řada prací, které využívají myši ke studiu regenerace jater. Důvodem je mnohem širší nabídka geneticky modifikovaných myši a dostupnost většího množství metodických postupů (Cressman *et al.* 1996, Jia 2011).

Po 2/3 PHx u potkana začíná replikace DNA za 12-16 hodin po chirurgickém zákroku. Hmotnost jaterního zbytku se zvyšuje, a to tak, že za 24 hodin po PHx dosahuje přibližně 45 % a za 48 hodin 70 % původní hmotnosti jater. Mezi 7. a 14. dnem po operaci dosahuje objem jater 93% původní hodnoty a uvádí se, že ke kompletní obnově dochází kolem 20. dne po PHx (Higgins and Anderson 1931), i když naše vlastní zkušenosti ukazují, že ani za 3 týdny po 2/3 PHx u potkana játra nedosáhnou původní relativní hmotnosti. Zajímavá data, týkající se velikosti regenerujících jater, poskytla studie na skupině 109 lidských živých donorů jaterního štěpu. Průběh regenerace byl hodnocen CT volumetrií a bylo zjištěno, že pouze 26 dárců dosáhlo za 6 měsíců po operaci původního objemu, průměrná hodnota činila 91 %. Zajímavé je, že byl signifikantní rozdíl v závislosti na pohlaví, zatímco u mužů dosáhla hodnota za 6 měsíců po operaci 92 %, u žen tato hodnota činila pouze 89 % (Ibrahim *et al.* 2005).

Přestože studiu regenerace jater po PHx je kontinuálně od 30. let minulého století věnována značná pozornost a v biomedicínských databázích lze dohledat více než 7 000 prací, nejsou dosud plně objasněny přesné mechanismy tohoto procesu. Plně diferencované hepatocyty, které se nacházejí v klidové G₀ fázi, vstupují synchronně do buněčného cyklu a dělí se v průměru 1,6 x. Teorie o mechanismech řídicích regeneraci jater se vyvíjely. Hemodynamická teorie klade velký důraz na zvýšení průtoku krve játry a zvýšení krevního tlaku po PHx. Humorální teorie předpokládaly existenci látek jaterního i extrahepatálního původu, které endokrinně, parakrinně, popř. autokrinně stimulují nebo inhibují proliferační procesy. V současné době je obecně přijímána teorie, že regenerace jater je regulována vzájemnou souhrou 3 systémů – cytokiny, růstové faktory a metabolické změny provázející redukcí jaterní tkáně (Fausto *et al.* 2006).

Na regeneraci jater se podílejí všechny typy jaterních buněk, hepatocyty jsou však první z jaterních buněk, které proliferují. Řada faktorů, jako je diurnální rytmus, nutrice, a další, ovlivňuje trvání intervalu mezi PHx a iniciací syntézy DNA v hepatocytech, průměrná doba u potkana činí kolem 12 hodin. První vrchol syntézy DNA v hepatocytech je za 24 hodin po PHx, další mnohem menší vrchol lze detegovat mezi 36 a 48 hodinou po PHx (Michalopoulos and DeFrances 1997), mitóza následuje syntézu DNA za 6-8 hodin. Proliferace hepatocytů začíná v periportální oblasti (v první zóně jaterního acinu), proliferace v pericentrální části lobulu je opožděná s maximem za 36 – 48 hodin po PHx. U ostatních jaterních buněk dochází ke stimulaci syntézy DNA s přibližně 24 hodinovým zpožděním, u některých i déle (Michalopoulos and DeFrances 1997) .

Děje v průběhu buněčného cyklu po PHx dělíme na 3 fáze:

Iniciace (*priming*) – období, kdy většina hepatocytů opouští klidový stav buněčného cyklu G₀, vstupuje do fáze G₁ a přejde přes G₁/S *checkpoint*. U potkana trvá tato fáze 12-18 hodin. Je nejkratší ze všech fází, ale je nejvíce studovanou ve snaze identifikovat primární podněty, které spouštějí regeneraci jater. Studie ukázaly rychlé a významné změny četných signálních drah a dalších tkáňových funkcí, žádná z dosud identifikovaných změn však není určující pro zdárný průběh regenerace (Michalopoulos 2010).

Proliferace (*progrese*) – hepatocyty syntetizují DNA, proběhne buněčné dělení a hepatocyty se vracejí do G₀ fáze, část hepatocytů vstupuje do dalšího mitotického cyklu. Dochází k remodelaci extracelulární matrix a dochází k dělení dalších jaterních buněk –

cholangiocyty a endoteliálních buněk jaterních sinusoid. Tato fáze trvá u potkana až 4 dny (Michalopoulos and DeFrances 2005).

Terminace – tato fáze trvající od 4 do 7 dne, popřípadě déle je charakterizována poklesem prorůstových podnětů a přítomností inhibičních signálů.

4.1.4 Metody hodnocení intenzity regenerace

Míru regenerační odpovědi lze kvantifikovat různými metodami (Assy and Minuk 1997, Jia 2011, Wei *et al.* 2015). Patří mezi ně hodnocení absolutní a relativní hmotnosti jater, změn objemu jaterní tkáně různými zobrazovacími metodami, mitotického indexu hepatocytů na histologických preparátech, syntézy DNA pomocí inkorporace značeného tymidinu (³H-tymidin) a bromdeoxyuridinu (BrdU) do DNA, imunohistochemické značení proteinů asociovaných s buněčným cyklem (např. Ki-67 nebo PCNA).

4.2 Nealkoholové ztukovatění jater

Nealkoholové ztukovatění jater (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) je považováno za nejčastější chronické onemocnění jater ve vyspělých zemích Evropy a v USA (Vernon *et al.* 2011). Jde o metabolické onemocnění jater charakterizované přítomností jaterní steatózy vzniklé na podkladě inzulinorezistence u geneticky predisponovaných jedinců. Současně musí být vyloučeny jiné důvody jaterní steatózy (příjem alkoholu, léky, hladovění, parenterální výživa, virová hepatitida C, dědičná onemocnění jater aj.) (Chalasan *et al.* 2012). Při histologickém vyšetření nalézáme alespoň 5 % steatotických hepatocytů (Kleiner *et al.* 2005). NAFLD zahrnuje škálu patologických stavů od prosté malokapénkové, smíšené nebo velkokapénkové steatózy, přes nealkoholovou steatohepatitidu (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) po jaterní cirhózu ev. hepatocelulární karcinom (obr. 13). Právě histologický typ NAFLD dále určuje prognózu pacienta.

Podle recentní metaanalýzy je globální prevalence NAFLD 25,24 % s největší prevalencí na středním východě a v severní Americe a nejnižší v Africe (Younossi *et al.* 2016). V Evropě je pak prevalence na základě „*random effects model*“ odhadována na 23,71 %. Prevalence NASH u pacientů s NAFLD je u pacientů bez indikace k jaterní biopsii v Asii 6,67 % a 29,85 % v severní Americe (Younossi *et al.* 2016). Informace o NAFLD v České Republice jsou sporé, studie Dvořáka a spol. uvádí, že u českých diabetiků typu II byly ultrazvukově zjištěny v 79 % změny na játrech (u 66 % se jednalo o jaterní steatózu, u 9 % o fibrózu a u 4 % o cirhózu) (Dvorak *et al.* 2014).

Je velmi dobře známá asociace NAFLD s dalšími metabolickými onemocněními. Jedná se především o obezitu, *diabetes mellitus* typu II, dyslipidemii a hypertenzi, což jsou hlavní součásti metabolického syndromu.

4.2.1 Etiopatogeneze nealkoholového ztukovatění jater

NAFLD je multifaktoriální metabolické onemocnění jater charakterizované přítomností jaterní steatózy. V etiopatogenezi NAFLD hrají roli vlivy prostředí (nadměrný energetický příjem, nevhodné složení potravy, sedavý způsob života s nedostatkem pohybu

aj.), genetické faktory i vnitřní vlivy (inzulinová rezistence aj.). Některými autory je pak NAFLD označováno za jaterní manifestaci metabolického syndromu (Machado and Cortez-Pinto 2006). Právě inzulinorezistence zaujímá ústřední úlohu v komplexní etiopatogenezi NAFLD.

K hromadění tuků v játrech vede jednak zvýšený příjem triacylglycerolů (TAG) potravou, zvýšená nabídka volných mastných kyselin (FFAs) např. při lipolýze, zvýšená lipogeneze v játrech, snížená utilizace tuků v játrech anebo snížený výdej TAG z jater. Tyto faktory vedou ke vzniku a rozvoji prosté jaterní steatózy (*non-alcoholic fatty liver*), která tvoří podklad pro možnou progresi do nealkoholové steatohepatitidy. V roce 1998 popsali Day a James teorii dvou zásahů, která popisuje vznik steatohepatitidy na podkladě jaterní steatózy (Day and James 1998). Hepatocyty senzitivované zvýšeným obsahem TAG jsou pak náchylnější k dalším inzultům, mezi které patří mitochondriální dysfunkce, zvýšený oxidační stres, lipotoxicita FFAs, aktivace nespecifické imunity v játrech či nerovnováha v produkci různých cytokinů (Day 2006).

4.2.2 Modely nealkoholového ztukovatění jater u potkanů

Nejčastěji používaná zvířata k vytvoření modelu NAFLD jsou myši a potkani. V experimentu se využívají zejména nutriční modely, genetické modely, příp. kombinace obou těchto přístupů (Kucera and Cervinkova 2014). Pro indukci NAFLD u zvířat se obvykle využívá krmení steatogenními dietami. Těmito dietami může být strava s vyšším obsahem tuků, fruktózy, sacharózy, cholesterolu, případně jejich vzájemná kombinace nebo strava bez obsahu či se sníženým obsahem esenciálních látek (např. methionin, cholin-deficientní dieta) (Kucera and Cervinkova 2014). V současnosti nejčastěji využívané jsou vysokotukové ev. kombinované diety.

4.2.3 Regenerace jater postižených nealkoholovým ztukovatěním

Steatóza je průvodním jevem prereplikativní fáze regenerace jater. U pokusných zvířat dochází k akumulaci tuků, především triacylglycerolů a esterů cholesterolu, ve zbytku jaterní tkáně po PHx, tento fenomén je znám desítky let (Murray *et al.* 1981). Co je důvodem této přechodné steatózy je stále předmětem studia, ale již v polovině 60. let minulého století jako první popsali Šimek a Sedláček pokles respiračního kvocientu v řízcích jaterní tkáně potkanů po částečné hepatektomii, což svědčí pro nutriční preferenci lipidů v regenerujících játrech (Simek and Sedlacek 1965, Simek and Sedlacek 1966).

S významně stoupající prevalencí tukového postižení jater v ekonomicky vyspělých zemích se dostala do popředí otázka, zda jsou játra postižená NAFLD schopná normální regenerační odpovědi. Tento zájem je kromě výzkumných důvodů motivován především klinickou potřebou. V současné době jsou rozsáhlé chirurgické zákroky na játrech běžnou praxí, ať už se jedná o parciální resekce jater pro ložisková postižení, nebo zákroky spojené s transplantací jater. Je třeba rozhodnout, zda steatóza, popř. jaká míra tukového postižení, je riziková z hlediska požadované regenerační odpovědi. Jak experimentální, tak i klinické výsledky dosavadních studií jsou rozporuplné.

Řada experimentálních prací dokladuje, že akumulace tuků v játrech inhibuje normální regenerační odpověď. Regeneraci jater po PHx u potkana s NAFLD indukovaném methionin, cholin-deficientní dietou studovala Vetelainenová a spolupracovníci. U potkanů s prostou steatózou sice nezaznamenali pokles proliferační aktivity hepatocytů, ale pozorovali zpomalení obnovy funkčních parametrů, především tvorby ATP (Vetelainen *et al.* 2007a). Pokud stejnou dietou indukovali steatózu provázenou zánětlivou reakcí, došlo k signifikantní inhibici regenerace provázené zvýšenou lipoperoxidací a Kupfferovými buňkami zprostředkovaným hepatocelulárním poškozením (Vetelainen *et al.* 2007b). DeAngelis a spolupracovníci použili model steatózy indukovaný výhradně vysokotukovou dietou (DeAngelis *et al.* 2005), přičemž zjistili snížení regenerační odpovědi po PHx. Zcela protichůdné výsledky zaznamenali Zhang a kol. na modelu methionin, cholin-deficientní diety, kdy nepozorovali žádný rozdíl v regenerační odpovědi ve srovnání s kontrolními potkany (Zhang *et al.* 1999). K obdobným výsledkům dospěli i další studie (Picard *et al.* 2002). Nejednotné jsou i zkušenosti z klinické praxe. Studie sledující 54 živých donorů jaterního štěpu s mírnou nebo střední steatózou neprokázala významný rozdíl v regeneraci jater u donorů se steatotickými játry ve srovnání s kontrolami (Cho *et al.* 2006). V jiné práci však bylo zjištěno, že mírná a závažná steatóza je provázena vyšší perioperační morbiditou (Behrs *et al.* 1998). Tito autoři považují steatózu jater za varovný faktor, který je vždy třeba pečlivě zvážit u pacienta před jaterní resekci.

5. CÍLE PRÁCE

- 1) Vzhledem k tomu, že na ústavu fyziologie nebyl k dispozici model NAFLD, mým prvním úkolem bylo tento model zavést.
- 2) Zjistit, zda regenerace jater po parciální hepatektomii je u potkanů s NAFLD alterována.
- 3) Zjistit, zda steatotické hepatocyty izolované ze ztukovatělých jater vykazují změněnou citlivost vůči oxidačnímu stresu v podmínkách *in vitro*.

6. METODIKY

6.1 Metodiky pokusů *in vivo*

K pokusům *in vivo* byli použiti samci potkanů kmene Wistar a Spargue-Dawley. Potkani byli použiti jednak pro zavedení modelu nealkoholového ztukovatění jater v podmínkách *in vivo*. Celkem 73 potkanů bylo krmeno standardní dietou (ST-1, 10 % energie ve formě tuků), dietou se středním (MFD, 35 % energie ve formě tuků) a vysokým obsahem tuku (HFD, 71 % energie ve formě tuků) pro dobu 3 resp. 6 týdnů. Dieta MFD a HFD byla vytvořena na našem pracovišti podle modelu publikovaného prof. Lieberem (Lieber *et al.* 2004).

Na základě výsledků získaných při zavádění modelu NAFLD na potkanech jsme pro studium regenerace jater po 2/3 PHx zvolili kmen Sprague-Dawley. Celkem 72 potkanů bylo krmeno ST-1 resp. HFD po dobu 6 týdnů a poté část potkanů podstoupila 2/3 PHx resp. horní střední laparotomii a za 24, 48 a 72 hodiny po operaci byli potkani usmrceni.

U pokusů *in vivo* jsme sledovali sérové koncentrace glukózy, celkového bilirubinu a triacylglycerolů (TAG) a aktivity alaninaminotransferázy (ALT), aspartátaminotransferázy (AST) a alkalické fosfatázy (ALP).

V izolovaných mitochondriích, resp. v jaterním homogenátu jsme měřili spotřebu kyslíku mitochondriemi pomocí vysokoúčinné respirometrie (stav 4, stavu 3) a vypočítali index respirační kontroly.

V jaterní tkáni jsme dále stanovovali obsah redukovaného (GSH) a oxidovaného (GSSG) glutathionu, obsah DNA, TAG a cholesterolu, koncentraci cytokinů (IL-6 a TGF- β 1), malondialdehydu (MDA) a celkových proteinů. V jaterních vzorcích jsme rovněž měřili expresi mRNA uncoupling proteinu 2.

Histologické vzorky jater byly použity pro stanovení jaterní steatózy, nekrózy resp. zánětu. Imunohistochemicky jsme pak sledovali regenerační odpověď jater pomocí inkorporace bromdeoxyuridin do DNA hepatocytů.

6.2 Metodiky pokusů *in vitro*

K pokusům *in vitro* byli použiti samci potkanů kmene Wistar krmení dietami ST-1 a HFD po dobu 6 týdnů. Hepatocyty izolované z intaktních a steatotických jater byly použity pro porovnání vlivu oxidačního stresu indukovaného terciárním butylhydroperoxidem (tBHP) na ztukovatělé a nesteatotické hepatocyty v podmínkách *in vitro*.

V médiu kultur jsme sledovali aktivitu laktátdehydrogenázy (LDH), produkci MDA a albuminu. V hepatocytech jsme pak určovali aktivitu buněčných dehydrogenáz (WST-1), obsah GSH a GSSG a produkci ROS. Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme zobrazili mitochondriální membránový potenciál (JC-1) a pomocí vysokoúčinné respirometrie jsme hodnotili konzumpci kyslíku permeabilizovanými hepatocyty.

6.3 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Všechny statistické testy byly provedeny pomocí statistického softwaru *Graph-Pad Prism 4.03* (Graph Pad Software, USA). Po zhodnocení normality rozložení dat jsme použili buď parametrickou

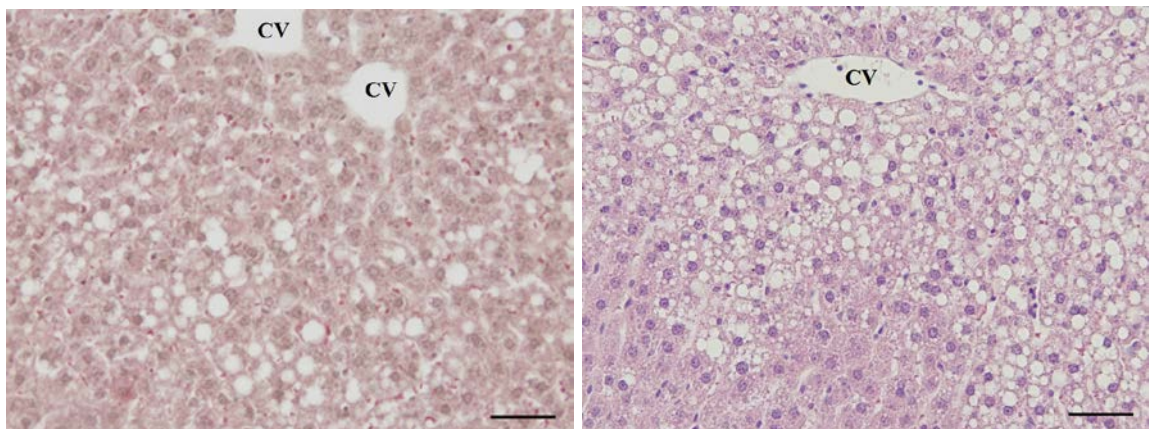
1-faktorovou ANOVA následovanou Tukey-Kramerovým post testem nebo neparametrický Kruskal-Wallisův test následovaný Dunnovým post testem. Hladina významnosti byla stanovena pro $p < 0,05$.

7. VÝSLEDKY

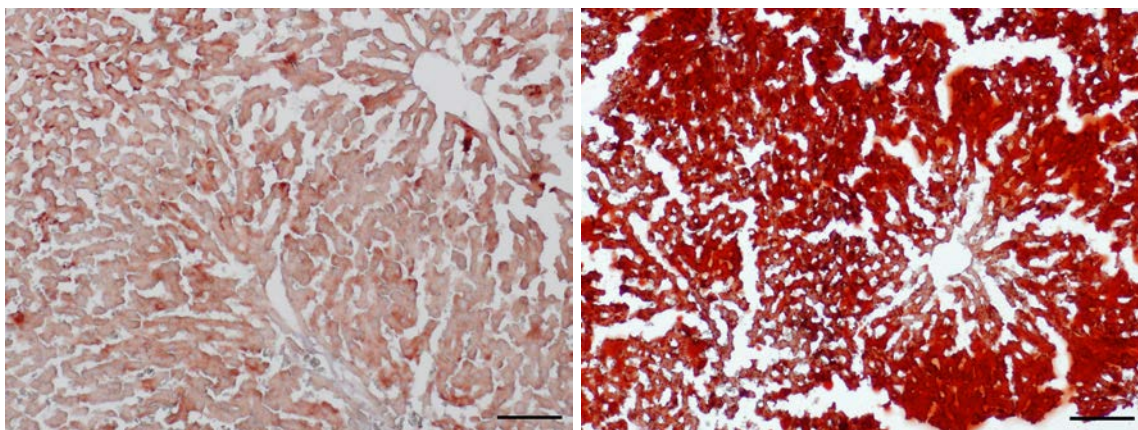
7.1 Výsledky pokusů *in vivo*

7.1.1 Zavedení modelu nealkoholového ztukovatění jater potkana *in vivo*

Podávání MFD and HFD u potkanů kmene Wistar, resp. HFD u potkanů kmene Sprague-Dawley navodilo prostou jaterní steatózu bez známek zánětu či nekrózy (obr. 1). Jaterní steatóza byla potvrzena i stanovením obsahu TAG v játrech těchto potkanů a rovněž pomocí speciálního histologického barvení na tuky ve zmražených preparátech (obr. 2). Mimo nižší koncentrace sérových TAG jsme u HFD a MFD skupin jsme nezaznamenali žádné rozdíly v sérových parametrech. U potkanů krmených HFD po dobu 3 týdnů jsme pozorovali signifikantní snížení obsahu GSH v játrech, nicméně tento pokles nebyl patrný po 6týdením krmení. Obsah jaterního MDA byl zvýšen po 3 týdnech krmení dietami s vyšším obsahem tuků u potkanů kmene Sprague-Dawley a po 6 týdnech krmení HFD u obou kmenů potkanů. Signifikantní pokles respirace izolovaných mitochondrií ve stavu 3 při použití substrátů pro komplex I jsme pozorovali u Sprague-Dawley potkanů krmených HFD po dobu 3 týdnů. Respirace mitochondrií při použití substrátů komplexu II ve stavu 3 nebyla ovlivněna v žádné z pokusných skupin. Exprese mRNA pro *uncoupling protein 2* byla signifikantně zvýšena pouze při 6týdením krmení dietami s vyšším obsahem tuku.



Obrázek 1 – Histologické preparáty jater z potkanů kmene Wistar (vlevo) a Sprague-Dawley (vpravo) krmených HFD po dobu 6 týdnů. (CV – centrální žíla, barvení hematoxylin-eosinem, měřítko - 50 μ m).



Obrázek 2 – Histologické preparáty zamražených jater obarvené olejovou červení. Potkani kmene Wistar krmení ST-1 (vlevo) a HFD (vpravo) po dobu 6 týdnů. (zvětšení objektivu 10x)

7.1.2 Vliv prosté jaterní steatózy u potkana na regeneraci jater po parciální hepatektomii

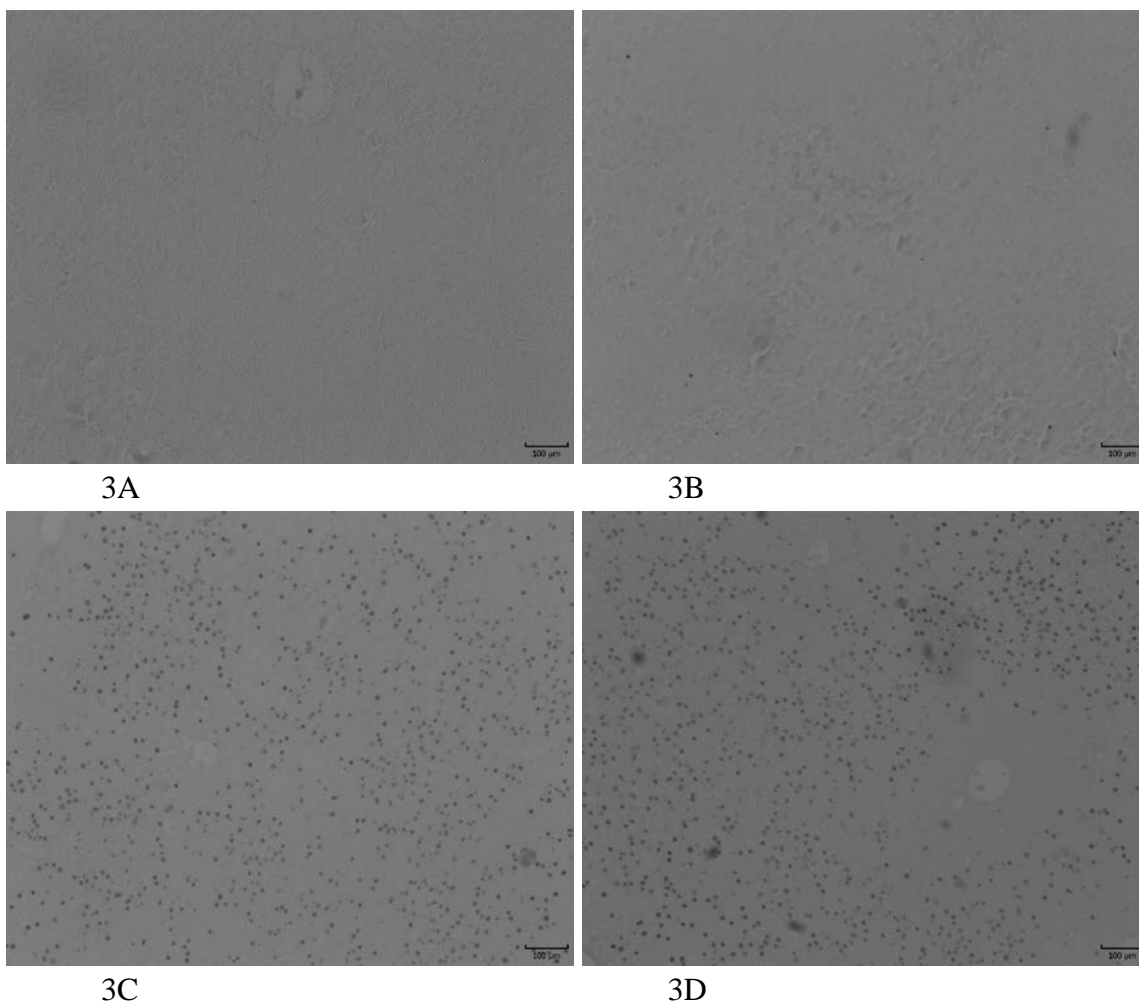
Nezjistili jsme žádné rozdíly mezi kontrolními skupinami zvířat krměných ST-1 resp. HFD a příslušnými laparotomovanými skupinami, proto uvádíme pouze výsledky PHx vůči příslušné kontrolní skupině krměné ST-1 nebo HFD.

PHx navodila mírné poškození jater potkanů na obou typech diet, což se projevilo nárůstem sérových aktivit transamináz a ALP a koncentrace celkového bilirubinu. U zvířat krměných ST-1 dietou jsme pozorovali časnější zvýšení markerů jaterního poškození oproti potkanům na HFD.

Parciální hepatektomie indukovala snížení absolutní i relativní váhy jater a absolutního a relativního obsahu DNA v játrech za 24 h u obou experimentálních diet. PHx u ST-1 krměných zvířat vedla po 24 hodinách k signifikantnímu zvýšení obsahu jaterních TAG ($p < 0,05$), zatímco u HFD nevedla PHx k signifikantním změnám v obsahu TAG. Proces regenerace navozený resekci jater vedl u obou typů diet ke zvýšení obsahu GSH a poměru GSH/GSSG v játrech a ke snížení obsahu MDA, zatímco obsah jaterních cytokinů neovlivnil.

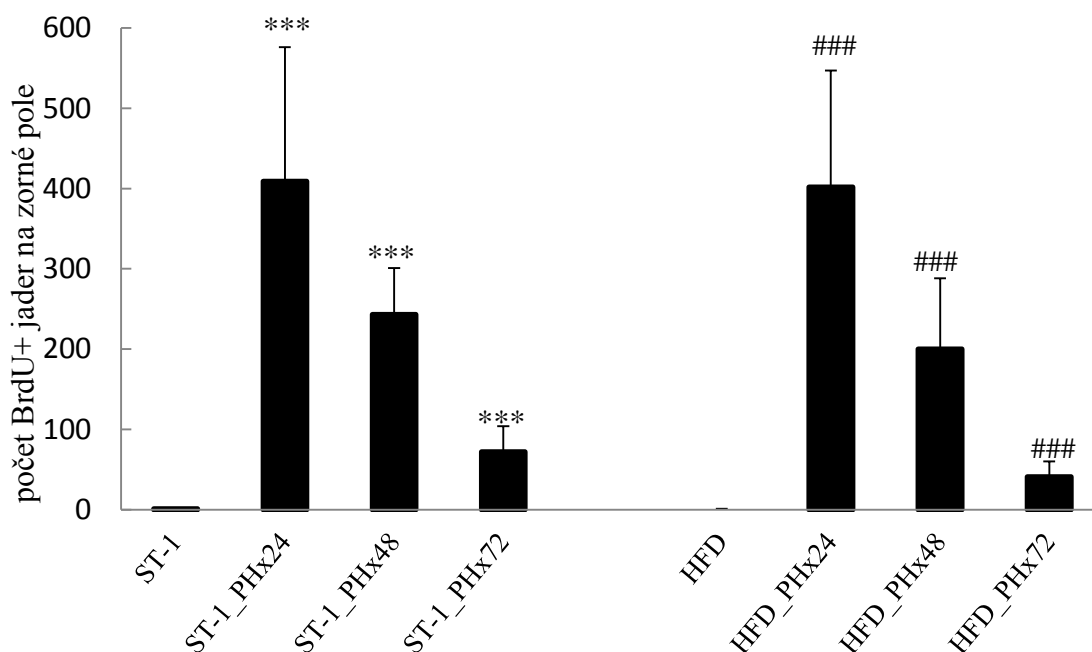
Kontrolní vzorky nesteatotických a steatotických jater obsahovaly ojediněle značená jádra (obr. 3A, B, graf 1), naproti tomu maxima syntézy DNA jsme pozorovali u obou skupin (ST-1 i HFD, $p < 0,001$) 24 h po PHx (obr. 3C, D, graf 1). V dalších časových intervalech docházelo postupně ke snižování počtu BrdU-pozitivních jader u obou skupin. Mezi ST-1 a HFD skupinami po PHx jsme nepozorovali signifikantní rozdíly v počtu BrdU⁺ jader v odpovídajících časových intervalech, nicméně u HFD skupiny 24 h po PHx jsme zaznamenali daleko zřetelnější zonální uspořádání syntézy DNA s absencí BrdU⁺ jader v centrilobulárních zónách (obr. 3D).

Pravděpodobně díky malému počtu vzorků ve skupině ($n=3-4$) jsme pozorovali pouze nesignifikantní zvýšení respirace ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I 24 a 48 h po parciální hepatektomii u obou typů diet. Při použití substrátů komplexu II jsme tento trend nepozorovali. Index respirační kontroly pro komplex II se zvýšil pouze nesignifikantně, a to za 24 h po PHx u obou skupin.



Obrázek 3A - D – Imunohistochemické barvení DNA s inkorporovaným BrdU. Preparáty jater kontrolních potkanů (A, B) a potkanů 24 hodiny po PHx (C, D) krmných ST-1 (A, C), resp. HFD (B, D) po dobu 6 týdnů (měřítko - 100 µm).

Inkorporace BrdU do DNA hepatocytů



Graf 1 – Semikvantitativní hodnocení BrdU+ jader hepatocytů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. (***) $p < 0,001$ vs. ST-1 skupina; (###) $p < 0,001$ vs. HFD skupina)

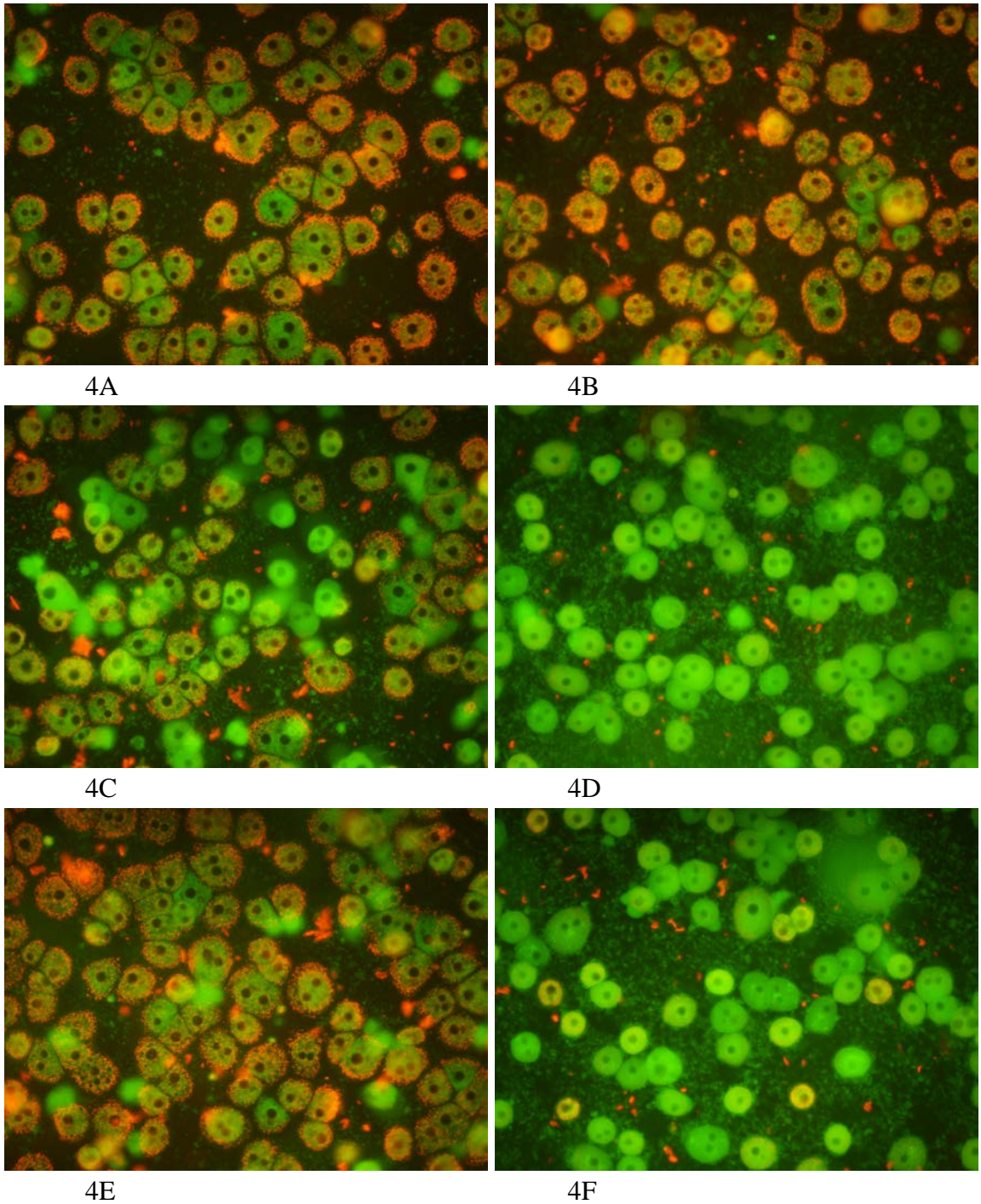
7.2 Výsledky pokusů *in vitro*

7.2.1 Porovnání účinku terciárního-butyldihydroperoxidu na steatotické a nesteatotické hepatocyty *in vitro*

Hepatocyty izolované ze steatotických jater (oproti neztukovatělým hepatocytům) vykazovaly nižší aktivity buněčných dehydrogenáz, vyšší produkci ROS, zvýšenou lipoperoxidaci, změněný redoxní stav glutathionu a sníženou ADP-stimulovanou respiraci při použití substrátů komplexu I.

tBHP indukoval na dávce a čase závislé poškození hepatocytů. Steatotické hepatocyty vystavené účinku tBHP pak vykazovaly časnější a závažnější poškození, více snížený poměr GSH ku celkový glutathion, vyšší tvorbu ROS a MDA, a byly více náchylné ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu (obr. 4A-F). Index respirační kontroly pro komplex I byl signifikantně snížen u steatotických i neztukovatělých hepatocytů exponovaných tBHP, nicméně pokles respirace ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I byl výraznější u ztukovatělých buněk.

Preinkubace hepatocytů s trifluoperazinem před jejich expozicí tBHP vedla k redukci poškození buněk tBHP, ke snížení tvorby ROS, ke zvýšení poměru GSH/celkový glutathion a ke zvýšení procenta hepatocytů s energizovanými mitochondriemi (obr. 4E, F).



Obrázek 4A-F – Zobrazení mitochondriálního membránového potenciálu u kultivovaných hepatocytů pomocí JC-1. Fluorescenční mikrofotografie nesteatotických (A, C, E) a steatotických (B, D, F) hepatocytů inkubovaných bez tBHP (A, B), s 0,375 mM tBHP (C, D) po dobu 30 min., resp. preinkubovaných s 5 μ M trifluoperazinem po dobu 30 min. a následně inkubovaných s 0,375 mM tBHP (E, F) pro dobu dalších 30 min. Zvětšení objektivu 40x.

8. DISKUSE

8.1 Zavedení modelu nealkoholové steatózy na potkanech

Po podrobné literární rešerši jsme se rozhodli, že pro naše účely bude nejvhodnější model využívající vysokotukovou dietu. Při volbě nás pak zaujal model, ve kterém 3týdení podávání vysokotukové diety (71 % energie ve formě lipidů, převážně kukuřičný olej) vede k rychlé progresi steatózy do NASH (Lieber *et al.* 2004). Vzhledem k detailnímu popisu tohoto modelu jsme se v prvním kroku pokusili tento model reprodukovat v našich podmínkách. Nicméně při použití stejného typu diety se nám nepodařilo po 3 ani po 6 týdnech indukovat steatohepatitidu, pouze prostou steatózu bez známek zánětu, hepatocelulárních nekróz či fibrotických změn. Naše výsledky nicméně dobře korelují s nálezy jiných autorů, kteří u vysokotukových diet obvykle nacházejí pouze známky steatózy bez zánětlivých změn (Buettner *et al.* 2006, Romestaing *et al.* 2007).

V patogenezi NAFLD se významně uplatňuje i zvýšený oxidační stres. V našem modelu jsme sledovali vliv MFD a HFD na obsah GSH v jaterní tkáni a produkci MDA. Zajímavým nálezem byl transientní pokles GSH v průběhu experimentu. Podávání HFD potkanům kmene Wistar resp. MFD a HFD potkanům kmene Sprague-Dawley po dobu 3 týdnů vedlo k signifikantnímu poklesu obsahu jaterního GSH, který však již po 6 týdnech u těchto skupin nebyl patrný. Změny v obsahu GSH mohou být důsledkem metabolické adaptace jater na zvýšený příjem tuků a korespondují se zvýšením exprese *uncoupling* proteinu 2 (UCP-2) v játrech. UCP-2 snižuje mitochondriální produkci ROS za cenu možného omezení tvorby ATP mitochondriemi (Serviddio *et al.* 2008). Nárůst lipoperoxidace v játrech je dalším důsledkem probíhajícího oxidačního stresu. Zvýšená lipoperoxidace může vést k přímému poškození hepatocytů nebo k indukci zánětlivé odpovědi (Lee *et al.* 2007) či se podílet na zvýšené fibrogenězi (George *et al.* 2003). Koncentrace MDA v jaterním homogenátu poměrně dobře korespondovala s jaterním obsahem TAG, cholesterolu resp. IL-6.

Mitochondriální dysfunkce je považována za jeden z klíčových faktorů etiopatogeneze NAFLD (Vendemiale *et al.* 2001). Tvorba ROS v mitochondriích může navozovat či zhoršovat dysfunkci mitochondrií, což může dále vést ke zvyšování tvorby ROS (Feillet-Coudray *et al.* 2009). V našem modelu NAFLD jsme našli signifikantní snížení respirace izolovaných mitochondrií ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I (glutamát + malát) u potkanů kmene Sprague-Dawley krměných HFD po dobu 3 týdnů. Podobné, leč nesignifikantní, snížení jsme pozorovali i potkanů kmene Wistar krměných HFD po dobu 3 týdnů (resp. i u potkanů obou kmenů krměných MFD po 3 týdny). Po 6 týdnech na experimentálních dietách byly rozdíly daleko menší (Sprague-Dawley) resp. rozdíly jsme nepozorovali vůbec (Wistar). Tento trend respirace komplexu I ve stavu 3 odpovídal změnám v obsahu GSH a lze alespoň z části přisoudit metabolické adaptaci jater na zvýšený přívod tuků a zvýšený oxidační stres. Při použití substrátu komplexu II (sukcinát) ve stavu 3 jsme nepozorovali žádné rozdíly mezi skupinami. Tento rozdíl v citlivosti komplexu I a komplexu II lze vysvětlit vyšší citlivostí komplexu I k oxidačnímu stresu (Drahota *et al.* 2005). Snížení aktivity mitochondriálního komplexu I

bylo prokázáno i u ob/ob myší (García-Ruiz *et al.* 2006), které jsou rovněž využívány jako jeden z modelů jaterní steatózy.

8.2 Vliv steatózy na jaterní regeneraci po parciální hepatektomii u potkanů

Jedním z rizikových faktorů selhání jater (van den Broek *et al.* 2008) a závažných pooperačních komplikací u pacientů po resekci jater (McCormack *et al.* 2007) je i jaterní steatóza. Rizikovost jaterního ztukovatění pro komplikace po resekci jater byla prokázána i v experimentálních podmínkách (Vetelainen *et al.* 2007b). Přesto však experimentální data týkající se průběhu regenerace jater při steatóze jsou kontroverzní. Zatímco někteří autoři poukazují na zhoršení regenerace při NAFLD (DeAngelis *et al.* 2005, Murata *et al.* 2007), v jiných pracích změny v průběhu regenerace nezaznamenali (Rao *et al.* 2001, Picard *et al.* 2002).

Vzhledem k těmto inkonzistentním výsledkům jsme se rozhodli pro “čistý” model jaterní regenerace navozený 2/3 parciální hepatektomií na játrech postižených prostou steatózou bez nekroinflamačních změn a fibrózy. Pro přirozený průběh jaterní regenerace je důležitá přechodná akumulace tuků v časně fázi regenerace (Rudnick and Davidson 2012). To potvrzují i naše výsledky u nesteatotických jater (ST-1 dieta), kdy za 24 h po PHx došlo k signifikantnímu nárůstu obsahu tuků v játrech. Přestože u těchto potkanů došlo k indukci přechodné steatózy, u potkanů krmených HFD jsme zvýšenou akumulaci TAG po PHx oproti kontrolním steatotickým potkanům nepozorovali.

Pro zhodnocení vlastní regenerace jater po PHx jsme použili imunohistochemické barvení inkorporovaného BrdU do DNA hepatocytů. Absence hepatocytů s inkorporovaným BrdU u kontrolních nesteatotických a ztukovatělých jater v našem experimentu dokládá velmi nízký stupeň obnovy hepatocytů za klidového stavu. Oproti tomu po indukci jaterní regenerace dochází k velmi masivnímu nástupu syntézy DNA, a to nejprve v periportálních oblastech (Grisham 1962, Fabrikant 1968). Oproti tomu syntéza DNA v centrilobulárních oblastech je zpožděna asi o 10 hodin. Naše výsledky u ST-1 skupiny 24 h po PHx ukazují vysoký stupeň syntézy DNA a odpovídají dřívějším pracím (Grisham 1962, Fabrikant 1968). Při porovnání počtu hepatocytů s inkorporovaným BrdU po PHx mezi ST-1 a HFD jsme neodhalili žádný rozdíl. Nicméně při podrobnějším histologickém zkoumání jsme našli významné zonální uspořádání BrdU-značených hepatocytů s absencí syntézy DNA v centrilobulárních zónách u potkanů krmených HFD. Vzhledem k tomu, že proliferační odpověď hepatocytů po PHx probíhá od periportální zóny směrem k centrilobulární zóně, můžeme vysvětlit absenci syntézy DNA v centrilobulární zóně opožděním nástupu jaterní regenerace u steatotických jater v porovnání s nesteatotickými játry.

Pro průběh jaterní regenerace jsou důležité i změny v redoxním stavu hepatocytů. Huang a kol. zjistili, že zvýšení obsahu GSH v regenerujících játrech je nezbytné pro vstup do S fáze buněčného cyklu (Huang *et al.* 1998). Změny v obsahu GSH po resekci jater jsme pozorovali rovněž v našem pokusu. PHx vedla ke zvýšení obsahu GSH u nesteatotických i ztukovatělých jater, nicméně u potkanů krmených HFD bylo zvýšení z nižších hodnot. Rovněž poměr GSH/GSSG se signifikantně zvýšil u obou skupin po PHx. Změny v redoxním stavu po PHx (nárůst GSH) doprovází pokles stupně lipoperoxidace,

který je daleko patrnější u potkanů krmených HFD. Nižší výchozí hodnoty GSH u kontrolních steatotických potkanů, oproti ST-1 kontrolám, mohou být z části zodpovědné za opoždění nástupu S fáze v centrilobulární zóně jater 24 h po PHx. Přesto si však steatotická játra udržují schopnost zvýšení obsahu GSH i poměru GSH/GSSG po PHx. To může vysvětlovat nepřítomnost rozdílu v celkovém počtu hepatocytů s probíhající syntézou DNA mezi steatotickými a neztukovatělymi játry po PHx.

Jaterní regenerace je provázena i změnami ve funkci mitochondrií. Tyto změny jsou závislé na časovém odstupu od PHx a často vykazují bifázický průběh. Dochází ke změnám ve stavu 3 i stavu 4 respirace a rovněž index respirační kontroly se mění (Svatkova *et al.* 1996, Grattagliano *et al.* 2003, Yang *et al.* 2004). Pravděpodobně díky malému počtu vzorků ve skupině (n = 3 - 4) jsme nezjistili signifikantní změny v respiraci izolovaných mitochondrií v žádné z experimentálních skupin. Nicméně konzumpce kyslíku ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I vykazovala trend přechodného zvýšení za 24 a 48 h po PHx u obou skupin potkanů (ST-1 i HFD). Tento trend zvýšení respirace ve stavu 3 jsme však nepozorovali při použití substrátů komplexu II, což koresponduje s dřívějšími nálezy Yanga a kol. (Yang *et al.* 2004). Rovněž jsme zaznamenali trend přechodného zvýšení RCI při použití sukcinátu (substrát komplexu II) 24 h po PHx u potkanů krmených ST-1 i HFD. To je rovněž v souladu s výše zmiňovanou prací (Yang *et al.* 2004).

8.3 Vliv oxidačního stresu indukovaného terciárním-butyldydroperoxidem na steatotické hepatocyty potkana v podmínkách *in vitro*

Posledním cílem této disertační práce bylo zjistit, zda steatotické hepatocyty izolované ze ztukovatělých jater vykazují změněnou citlivost vůči indukovanému oxidačnímu stresu v podmínkách *in vitro*. Pro navození peroxidativního poškození jsme použili prooxidační látku terciární butyldydroperoxid.

Naše předchozí výsledky na potkanech a výsledky jiných experimentálních i klinických studií (Videla *et al.* 2004) ukazují narušení redoxní rovnováhy v játrech postižených NAFLD. Rovněž práce používající steatotické hepatocyty v *in vitro* podmínkách (Anavi *et al.* 2012, Kučera *et al.* 2012) dokumentují narušení redoxní rovnováhy a pokles obsahu GSH. Vzhledem k tomu, že tBHP je v buňce z části metabolizován glutathionperoxidázou využívající GSH jako kofaktoru reakce (Crane *et al.* 1983), snížený obsah GSH ve steatotických hepatocytech, který jsme v *in vitro* modelu popsali, predisponuje steatotické hepatocyty ke zvýšené náchylnosti k oxidačnímu poškození vč. tBHP.

Snížený poměr GSH/celkový glutathion v kontrolních steatotických hepatocytech dobře koreluje s nálezem zvýšené produkce ROS a zvýšené tvorby MDA v těchto buňkách. tBHP navozuje na dávce a čase závislou produkci ROS v nesteatotických i ztukovatělých hepatocytech, nicméně produkce ROS je významně vyšší ve steatotických buňkách. ROS (Halestrap *et al.* 2002) a stejně tak i tBHP (Imberti *et al.* 1993) mohou indukovat fenomén *mitochondrial permeability transition* (MPT). Pro průkaz podílu MPT na poškození tBHP svědčí ochranný účinek trifluoperazinu, inhibitoru MPT, před poškozením hepatocytů, tvorbou ROS a snížením obsahu GSH.

V našem pokusu jsme zjistili, že u kontrolních ztukovatělých buněk při použití substrátů komplexu I dochází k signifikantnímu snížení spotřeby kyslíku ve stavu 3 a k nesignifikantnímu trendu snížení RCI. Zdá se, že komplex I nedokáže plně saturovat respirační řetězec, neboť po přidání substrátu komplexu II k substrátům komplexu I dále zvýšilo konzumpci kyslíku u všech experimentálních skupin. Substráty komplexů I a II dohromady pak plně kompenzovaly respiraci dýchacího řetězce při snížené aktivitě komplexu I u ztukovatělých hepatocytů.

Komplex I je ve steatotických hepatocytech více citlivý vůči účinku tBHP ve srovnání s neztukovatělými buňkami. Snížená aktivita komplexu I pak zhoršuje mitochondriální funkci a může vést ke snížení produkce ATP a zvýšení tvorby ROS (Kushnareva *et al.* 2002). Expozice tBHP v našem experimentu vedla k nesignifikantnímu zvýšení respirace za přítomnosti substrátů komplexu I ve stavu 4 u nesteatotických i ztukovatělých hepatocytů. Vyšší spotřeba kyslíku ve stavu 4 pak může být způsobena poškozením vnitřní mitochondriální membrány a její zvýšenou permeabilitou pro protony (Rolfe *et al.* 1994). Pokles respirace ve stavu 3 a zvýšení spotřeby kyslíku ve stavu 4 pak vedou k redukci RCI po expozici tBHP u obou experimentálních skupin. Při použití tBHP však již nedošlo k plné kompenzaci snížené respirace ve stavu 3 přidáním sukcinátu. Kombinace vysokotukové diety a induktoru oxidačního stresu může synergickým účinkem vést ke snížení aktivity i komplexu II.

9. ZÁVĚRY

1. Použitím vysokotukové diety po dobu 3 a 6 týdnů se nám podařilo navodit nealkoholové ztukovatění jater u potkanů kmenů Wistar a Sprague-Dawley. U obou kmenů potkanů se jedná o prostou steatózu bez známek zánětu, nekrózy či fibrotických změn. Tento nutriční model nenavodil stav podobný lidské NASH, což je obvyklé u většiny modelů u potkanů založených na podávání vysokotukové diety. Tato zdánlivá nevýhoda však pravděpodobně odpovídá více situaci u lidí než spontánní progresi prosté steatózy do NASH u všech pokusných zvířat, neboť i u lidí progreduje do NASH pouze menší část pacientů se steatózou jater (Younossi *et al.* 2016).
2. Regenerace jater postižených prostou steatózou navozená 2/3 parciální hepatektomií není signifikantně ovlivněna v porovnání s neztukovatělymi játry. Jedinou změnou v regenerační odpovědi, kterou jsme pozorovali u steatotických jater, je možné zpoždění nástupu proliferace v centrilobulárních zónách jaterního acinu.
3. Neovlivněné steatotické hepatocyty v podmínkách *in vitro* v porovnání s neztukovatělymi kontrolami vykazují vyšší produkci reaktivních forem kyslíku, vyšší stupeň lipoperoxidace, nižší redoxní stav glutathionu a sníženou respiraci ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I. Steatotické hepatocyty jsou zvýšeně citlivé k oxidačnímu poškození navozenému terciárním butylhydroperoxidem, což podporuje široce uznávanou hypotézu, že steatóza zvyšuje náchylnost hepatocytů k dalším inzultům.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ANAVI S, HARMELIN NB, MADAR Z, TIROSH O: Oxidative stress impairs HIF1 α activation: a novel mechanism for increased vulnerability of steatotic hepatocytes to hypoxic stress. *Free Radic Biol Med* **52**: 1531-1542, 2012.
- ASSY N, MINUK GY: Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* **26**: 945-952, 1997.
- BEHRNS KE, TSIOTOS GG, DESOUZA NF, KRISHNA MK, LUDWIG J, NAGORNEY DM: Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* **2**: 292-298, 1998.
- BELLENTANI S, SCAGLIONI F, MARINO M, BEDOGNI G: Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* **28**: 155-161, 2010.
- BRUNT EM, KLEINER DE, WILSON LA, BELT P, NEUSCHWANDER-TETRI BA: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* **53**: 810-820, 2011.
- BUETTNER R, PARHOFER KG, WOENCKHAUS M, WREDE CE, KUNZ-SCHUGHART LA, SCHOLMERICH J, BOLLHEIMER LC: Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* **36**: 485-501, 2006.
- BUCHER NL: Liver regeneration: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* **6**: 615-624, 1991.
- BUCHER NL, SWAFFIELD MN: The rate of incorporation of labelled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Res* **24**: 1611-1625, 1964.
- CRANE D, HAUSSINGER D, GRAF P, SIES H: Decreased flux through pyruvate dehydrogenase by thiol oxidation during t-butyl hydroperoxide metabolism in perfused rat liver. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **364**: 977-987, 1983.
- CRESSMAN DE, GREENBAUM LE, DEANGELIS RA, CILIBERTO G, FURTH EE, POLI V, TAUB R: Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**: 1379-1383, 1996.
- DAY CP: From fat to inflammation. *Gastroenterology* **130**: 207-210, 2006.
- DAY CP, JAMES OF: Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* **114**: 842-845, 1998.
- DEANGELIS RA, MARKIEWSKI MM, TAUB R, LAMBRIS JD: A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaB α . *Hepatology* **42**: 1148-1157, 2005.
- DRAHOTA Z, KRIVÁKOVÁ P, CERVINKOVÁ Z, KMONÍCKOVÁ E, LOTKOVÁ H, KUCERA O, HOUSTEK J: Tert-butyl hydroperoxide selectively inhibits mitochondrial respiratory-chain enzymes in isolated rat hepatocytes. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **54**: 67-72, 2005.
- DVORAK K, HAINER R, PETR TYL J, ZEMAN M, VAREKA T, ZAK A, SROUBKOVA R, SVESTKA T, VITEK L, BRUHA R: The prevalence of nonalcoholic liver steatosis in patients with type 2 diabetes mellitus in the Czech Republic. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*: 2014.
- FABRIKANT JI: The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol* **36**: 551-565, 1968.
- FAUSTO N: Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl* **7**: 835-844, 2001.
- FAUSTO N, CAMPBELL JS, RIEHLE KJ: Liver regeneration. *Hepatology* **43**: S45-53, 2006.

- FAUSTO N, RIEHLE KJ: Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **12**: 181-189, 2005.
- FEILLET-COUDRAY C, SUTRA T, FOURET G, RAMOS J, WRUTNIAK-CABELLO C, CABELLO G, CRISTOL JP, COUDRAY C: Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radic Biol Med* **46**: 624-632, 2009.
- GARCÍA-RUIZ I, RODRÍGUEZ-JUAN C, DÍAZ-SANJUAN T, DEL HOYO P, COLINA F, MUÑOZ-YAGÜE T, SOLÍS-HERRUZO JA: Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **44**: 581-591, 2006.
- GEORGE J, PERA N, PHUNG N, LECLERCQ I, YUN HOU J, FARRELL G: Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *Journal of hepatology* **39**: 756-764, 2003.
- GRATTAGLIANO I, LAUTERBURG BH, PORTINCASA P, CARUSO ML, VENDEMIALE G, VALENTINI AM, PALMIERI VO, PALASCIANO G: Mitochondrial glutathione content determines the rate of liver regeneration after partial hepatectomy in eu- and hypothyroid rats. *J Hepatol* **39**: 571-579, 2003.
- GRISHAM JW: A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* **22**: 842-849, 1962.
- HALESTRAP AP, MCSTAY GP, CLARKE SJ: The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**: 153-166, 2002.
- HIGGINS G, ANDERSON R: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archives of pathology (Chic)* **12**: 186 - 202, 1931.
- HUANG ZZ, LI H, CAI J, KUHNENKAMP J, KAPLOWITZ N, LU SC: Changes in glutathione homeostasis during liver regeneration in the rat. *Hepatology* **27**: 147-153, 1998.
- CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE JE, DIEHL AM, BRUNT EM, CUSI K, CHARLTON M, SANYAL AJ: The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* **55**: 2005-2023, 2012.
- CHO JY, SUH KS, KWON CH, YI NJ, LEE KU: Mild hepatic steatosis is not a major risk factor for hepatectomy and regenerative power is not impaired. *Surgery* **139**: 508-515, 2006.
- IBRAHIM S, CHEN CL, WANG CC, WANG SH, LIN CC, LIU YW, YANG CH, YONG CC, CONCEJERO A, CHENG YF: Liver regeneration and splenic enlargement in donors after living-donor liver transplantation. *World J Surg* **29**: 1658-1666, 2005.
- IMBERTI R, NIEMINEN AL, HERMAN B, LEMASTERS JJ: Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *J Pharmacol Exp Ther* **265**: 392-400, 1993.
- JIA C: Advances in the regulation of liver regeneration. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **5**: 105-121, 2011.
- KELE PG, VAN DER JAGT EJ, GOUW AS, LISMAN T, PORTE RJ, DE BOER MT: The impact of hepatic steatosis on liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver Int* **33**: 469-475, 2013.

- KLEINER DE, BRUNT EM, VAN NATTA M, BEHLING C, CONTOS MJ, CUMMINGS OW, FERRELL LD, LIU Y-C, TORBENSON MS, UNALP-ARIDA A, YEH M, MCCULLOUGH AJ, SANYAL AJ: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **41**: 1313-1321, 2005.
- KUCERA O, CERVINKOVA Z: Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* **20**: 8364-8376, 2014.
- KUČERA O, AL-DURY S, LOTKOVÁ H, ROUŠAR T, RYCHTRMOC D, ČERVINKOVÁ Z: Steatotic rat hepatocytes in primary culture are more susceptible to the acute toxic effect of acetaminophen. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **61 Suppl 2**: S93-101, 2012.
- KUSHNAREVA Y, MURPHY AN, ANDREYEV A: Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* **368**: 545-553, 2002.
- LEE GS, YAN JS, NG RK, KAKAR S, MAHER JJ: Polyunsaturated fat in the methionine-choline-deficient diet influences hepatic inflammation but not hepatocellular injury. *Journal of lipid research* **48**: 1885-1896, 2007.
- LEHMANN K, TSCHUOR C, RICKENBACHER A, JANG JH, OBERKOFER CE, TSCHOPP O, SCHULTZE SM, RAPTIS DA, WEBER A, GRAF R, HUMAR B, CLAVIEN PA: Liver failure after extended hepatectomy in mice is mediated by a p21-dependent barrier to liver regeneration. *Gastroenterology* **143**: 1609-1619 e1604, 2012.
- LIEBER CS, LEO MA, MAK KM, XU Y, CAO Q, REN C, PONOMARENKO A, DECARLI LM: Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* **79**: 502-509, 2004.
- MACHADO M, CORTEZ-PINTO H: Non-alcoholic steatohepatitis and metabolic syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**: 637-642, 2006.
- MARTINS PN, THERUVATH TP, NEUHAUS P: Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* **28**: 3-11, 2008.
- MCCORMACK L, PETROWSKY H, JOCHUM W, FURRER K, CLAVIEN PA: Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg* **245**: 923-930, 2007.
- MICHALOPOULOS GK: Liver regeneration. *J Cell Physiol* **213**: 286-300, 2007.
- MICHALOPOULOS GK: Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* **176**: 2-13, 2010.
- MICHALOPOULOS GK, DEFRANCES M: Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **93**: 101-134, 2005.
- MICHALOPOULOS GK, DEFRANCES MC: Liver regeneration. *Science* **276**: 60-66, 1997.
- MURATA H, YAGI T, IWAGAKI H, OGINO T, SADAMORI H, MATSUKAWA H, UMEDA Y, HAGA S, TAKAKA N, OZAKI M: Mechanism of impaired regeneration of fatty liver in mouse partial hepatectomy model. *J Gastroenterol Hepatol* **22**: 2173-2180, 2007.
- MURRAY AB, STRECKER W, SILZ S: Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results. *J Cell Sci* **50**: 433-448, 1981.
- PICARD C, LAMBOTTE L, STARKEL P, SEMPOUX C, SALIEZ A, VAN DEN BERGE V, HORSMANS Y: Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* **36**: 645-652, 2002.

- RAO MS, PAPREDDY K, ABECASSIS M, HASHIMOTO T: Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* **46**: 1821-1826, 2001.
- ROLFE DF, HULBERT AJ, BRAND MD: Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* **1188**: 405-416, 1994.
- ROMESTAING C, PIQUET MA, BEDU E, ROULEAU V, DAUTRESME M, HOURMAND-OLLIVIER I, FILIPPI C, DUCHAMP C, SIBILLE B: Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats. *Nutr Metab (Lond)* **4**: 4, 2007.
- RUDNICK DA, DAVIDSON NO: Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *Int J Hepatol* **2012**: 549241, 2012.
- SERVIDDIO G, BELLANTI F, TAMBORRA R, ROLLO T, ROMANO AD, GIUDETTI AM, CAPITANIO N, PETRELLA A, VENDEMIALE G, ALTOMARE E: Alterations of hepatic ATP homeostasis and respiratory chain during development of non-alcoholic steatohepatitis in a rodent model. *Eur J Clin Invest* **38**: 245-252, 2008.
- SI-TAYEB K, LEMAIGRE FP, DUNCAN SA: Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* **18**: 175-189, 2010.
- SIMEK J, SEDLACEK J: Effect of glucose administered in vivo or in vitro on the respiratory quotient of rat liver tissue after partial hepatectomy. *Nature* **207**: 761-762, 1965.
- SIMEK J, SEDLACEK J: [The respiratory quotient of rat liver tissue following partial hepatectomy]. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove* **9**: 405-411, 1966.
- STEER CJ: Liver regeneration. *FASEB J* **9**: 1396-1400, 1995.
- SVATKOVA R, CERVINKOVA Z, KALOUS M, RAUCHOVA H, DRAHOTA Z: Respiratory control index of mitochondria isolated from regenerating rat liver. *Physiol Res* **45**: 249-252, 1996.
- SYDOR S, GU Y, SCHLATTJAN M, BECHMANN LP, RAUEN U, BEST J, PAUL A, BABA HA, SOWA JP, GERKEN G, CANBAY A: Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy. *Lab Invest* **93**: 20-30, 2013.
- VAN DEN BROEK MA, OLDE DAMINK SW, DEJONG CH, LANG H, MALAGO M, JALAN R, SANER FH: Liver failure after partial hepatic resection: definition, pathophysiology, risk factors and treatment. *Liver Int* **28**: 767-780, 2008.
- VENDEMIALE G, GRATTAGLIANO I, CARACENI P, CARACCIO G, DOMENICALI M, DALL'AGATA M, TREVISANI F, GUERRIERI F, BERNARDI M, ALTOMARE E: Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* **33**: 808-815, 2001.
- VERNON G, BARANOVA A, YOUNOSSI ZM: Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* **34**: 274-285, 2011.
- VETELAINEN R, BENNINK RJ, VAN VLIET AK, VAN GULIK TM: Mild steatosis impairs functional recovery after liver resection in an experimental model. *Br J Surg* **94**: 1002-1008, 2007a.
- VETELAINEN R, VAN VLIET AK, VAN GULIK TM: Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg* **245**: 44-50, 2007b.

- VIDELA LA, RODRIGO R, ORELLANA M, FERNANDEZ V, TAPIA G, QUINONES L, VARELA N, CONTRERAS J, LAZARTE R, CSENDES A, ROJAS J, MALUENDA F, BURDILES P, DIAZ JC, SMOK G, THIELEMANN L, PONIACHIK J: Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)* **106**: 261-268, 2004.
- WEI W, DIRSCH O, MCLEAN AL, ZAFARNIA S, SCHWIER M, DAHMEN U: Rodent models and imaging techniques to study liver regeneration. *Eur Surg Res* **54**: 97-113, 2015.
- YANG S, TAN TM, WEE A, LEOW CK: Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy. *Cell Mol Life Sci* **61**: 220-229, 2004.
- YOUNOSSI ZM, KOENIG AB, ABDELATIF D, FAZEL Y, HENRY L, WYMER M: Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**: 73-84, 2016.
- ZHANG BH, WELTMAN M, FARRELL GC: Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* **14**: 133-137, 1999.

11. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

Původní práce

1. RYCHTRMOC, D., LIBRA, A., BUNČEK, M., **GARNOL, T.**, ČERVINKOVÁ, Z.: Studying liver regeneration by means of molecular biology: How far we are in interpreting the findings?
ACTA MEDICA (Hradec Králové). 2009; 52 (3): 91-99.
2. LOTKOVÁ, H., KUČERA, O., ROUŠAR, T., ENDLICHER, R., KŘIVÁKOVÁ, P., **GARNOL, T.**, ČERVINKOVÁ, Z.: Effect of S-adenosylmethionine on acetaminophen-induced toxic injury of rat hepatocytes in vitro.
ACTA VET. Brno. 2009; 78: 603-613. **IF = 0,403**
3. KOHOUTEK, L., ČERVINKOVÁ, Z., KUČERA, O., ROUŠAR, T., **GARNOL, T.**, ŠILLER, J., LOTKOVÁ, H.: Effect of S-adenosylmethionine on liver regeneration induced by partial hepatectomy.
General Physiology and Biophysics. 2010; 29: 72-78. **IF = 1,146.**
4. 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 diseases in rats.
Physiol. Res. 60 (2): 317-328, 2011 **IF = 1,646**
5. **GARNOL, T.**, ENDLICHER, R., KUČERA, O., DRAHOTA, Z., ČERVINKOVÁ, Z.: Impairment of Mitochondrial Function of Rat Hepatocytes by High Fat Diet and Oxidative Stress.
Physiol. Res. 63(2): 271-274, 2014 **IF = 1,531**
6. KUČERA, O., ENDLICHER, R., ROUŠAR, T., LOTKOVÁ, H., **GARNOL, T.**, DRAHOTA, Z., ČERVINKOVÁ, Z.: The Effect of *tert*-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes *In Vitro*.
Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Volume 2014, Article ID 752506, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/752506>. **IF = 3,393**
7. **GARNOL, T.**, KUČERA O., STAŇKOVÁ P., LOTKOVÁ H., ČERVINKOVÁ Z.: Does simple steatosis affect liver regeneration after partial hepatectomy in rats?
ACTA MEDICA (Hradec Králové). 2016; 59 (2): 35-42.

Statě ve sbornících

1. KUČERA, O., LOTKOVÁ, H., KŘIVÁKOVÁ, P., KOTRAŠ, T., **GARNOL, T.**, ENDLICHER, R., MAZUROVÁ, Y., ROUŠAR, T., ČERVINKOVÁ, Z.: Zavedení modelu nealkoholického ztukovatění jater na potkanech.
Čes. a slov. gastroenterologie a hepatologie. 2008; 62 (2): 123.
2. KUČERA, O., ROUŠAR, T., LOTKOVÁ, H., KŘIVÁKOVÁ, P., **GARNOL, T.**, GUNČOVÁ, I., ČERVINKOVÁ, Z.: Comparison of high-fat nutritional models of non-alcoholic fatty liver disease in rats.
Čes. a slov. gastroenterologie a hepatologie. 2008; 62 Suppl. 2: 101-102.
3. **GARNOL, T.**, KUČERA, O., STAŇKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., ČERVINKOVÁ, Z.: Liver regeneration after partial hepatectomy in the liver affected by non-alcoholic fatty liver disease.
Clinical and Experimental Medical Journal, 2009; 3: 607-608.
4. KUČERA, O., STAŇKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., **GARNOL, T.**, ČERVINKOVÁ, Z.: Is the liver affected by non-alcoholic steatosis more susceptible to toxic effect of thioacetamide?
Clinical and Experimental Medical Journal, 2009; 3: 607-608.
5. KUČERA, O., STAŇKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., **GARNOL, T.**, ČERVINKOVÁ, Z.: Citlivost jater potkana postižených nealkoholovým ztukovatěním k akutnímu toxickému účinku D-galaktosaminu.
Čes. a slov. gastroenterologie a hepatologie (Suppl.). 2010; 64 (S1): S23-24.
6. KUČERA, O., STAŇKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., **GARNOL, T.**, ČERVINKOVÁ, Z.: Rat liver affected by non-alcoholic steatosis is more susceptible to acute toxic injury of acetaminophen.
Book of abstracts – Prague hepatology meeting 2010 (ISBN 978-80-254-7885-1), 2010; 101-102.

Sdělení na odborných setkáních

1. KUČERA, O., LOTKOVÁ, H., KŘIVÁKOVÁ, P., KOTRAŠ, T., **GARNOL, T.**, ENDLICHER, R., MAZUROVÁ, Y., ROUŠAR, T., ČERVINKOVÁ, Z.: Zavedení modelu nealkoholického ztukovatění jater na potkanech
XXXVI. Májové hepatologické dny, 16. 5. 2008, Karlovy Vary.
2. KUČERA, O., ROUŠAR, T., LOTKOVÁ, H., KŘIVÁKOVÁ, P., **GARNOL, T.**, GUNČOVÁ, I., ČERVINKOVÁ, Z.: Comparison of high-fat nutritional models of non-alcoholic fatty liver disease in rats.
Prague Hepatology Meeting, 18. -20. 9. 2008, Prague
3. KUČERA, O., LOTKOVÁ, H., **GARNOL, T.**, KŘIVÁKOVÁ, P., GUNČOVÁ, I., ROUŠAR, T., ČERVINKOVÁ, Z.: The development of model of non-alcoholic fatty liver disease in Wistar and Sprague-Dawley rats.
Falk Workshop Translational Research in Chronic Liver Diseases, 29. – 30. 1. 2009, Heidelberg, SRN
4. **GARNOL, T.**, KUČERA, O., KŘIVÁKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., ČERVINKOVÁ, Z.: Liver regeneration after partial hepatectomy in the liver affected by non-alcoholic fatty liver disease.
85. Fyziologické dny, 4. 2. 2009, Praha
5. KUČERA, O., KŘIVÁKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., ENDLICHER, R., **GARNOL, T.**, MAZUROVÁ, Y., ČERVINKOVÁ, Z.: Is the liver affected by steatosis more susceptible to toxic effect of thioacetamide?
85. Fyziologické dny, 4. 2. 2009, Praha
6. **GARNOL, T.**, KUČERA, O., KŘIVÁKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., ČERVINKOVÁ, Z.: Regenerace jater po parciální hepatektomii v játrech postižených nealkoholovým ztukovatěním u potkana.
XXXVII. Hepatologické dny, 15. 5. 2009, Karlovy Vary – cena za nejlepší přednášku
7. KUČERA, O., KŘIVÁKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., **GARNOL, T.**, TYČOVÁ, V., ČERVINKOVÁ, Z.: Jsou játra postižená steatózou citlivější k akutnímu toxickému poškození thioacetamidem?
XXXVII. Hepatologické dny, 13. 5. 2009, Karlovy Vary
8. **GARNOL, T.**, KUČERA, O., KŘIVÁKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., ČERVINKOVÁ, Z.: Liver regeneration after partial hepatectomy in the liver affected by non-alcoholic fatty liver disease.
1st Congress of Fatty Liver and Metabolic Syndrome, 12.-14. 11. 2009, Budapest, Hungary
9. KUČERA, O., KŘIVÁKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., **GARNOL, T.**, ČERVINKOVÁ, Z.: Is the liver affected by non-alcoholic steatosis more susceptible to toxic effect of thioacetamide?
1st Congress of Fatty Liver and Metabolic Syndrome, 12.-14. 11. 2009, Budapest, Hungary

10. KUČERA, O., STAŇKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., **GARNOL, T.**, ČERVINKOVÁ, Z.: Jsou játra potkana postižená nealkoholovým ztukovatěním citlivější vůči akutnímu toxickému účinku D-galaktosaminu?
86. Fyziologické dny, 10. 2. 2010, Praha
11. KUČERA, O., STAŇKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., **GARNOL, T.**, ČERVINKOVÁ, Z.: Citlivost jater potkana postižených nealkoholovým ztukovatěním k akutnímu toxickému účinku D-galaktosaminu.
XXXVIII. Hepatologické dny, 12. 5. 2009, Karlovy Vary– cena za nejlepší přednášku
12. ČERVINKOVÁ, Z., **GARNOL, T.**, KUČERA, O., STAŇKOVÁ, P., ROUŠAR, T., ČERVINKA, M.: Does non-alcoholic fatty liver disease affect early stage of liver regeneration after partial hepatectomy in rats?
Summer Research Conferences FASEB: Liver Growth, Indry & Metabolism, Basic & Applied biology, 15. – 20. 8, 2010, Snowmass Village, Colorado, USA
13. KUČERA, O., STAŇKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., **GARNOL, T.**, ČERVINKOVÁ, Z.: Rat liver affected by non-alcoholic steatosis is more susceptible to acute toxic effect of acetaminophen.
Prague Hepatology Meeting 2010, 16. – 18. 9. 2010, Praha
14. ČERVINKOVÁ, Z., **GARNOL, T.**, LOTKOVÁ, H. KUČERA, O.: Non-alcoholic fatty liver disease does not affect early stage of liver regeneration after partial hepatectomy in rats.
Falk Workshop Inflammation & Cancer, 26. – 27. 1. 2012, Hamburg-Eppendorf.
15. ČERVINKOVÁ, Z., KUČERA, O., LOTKOVÁ, H., **GARNOL, T.**, ENDLICHER, R.: Rat hepatocytes isolated from fatty liver are more sensitive to tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress.
Falk Symposium 191 Liver Diseases in 2013: Advances in Pathogenesis and Treatment, 4. – 5. 10. 2013, London, Velká Británie.