

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

STANOVENÍ CYTOKINŮ V SUPERNATANTU HOMOGENÁTU
JATER U POTKANŮ S JATERNÍ STEATÓZOU

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Školitel specialista: Doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.

Hradec Králové 2010

Jaroslava Burešová Nedvídková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Děkuji doc. MUDr. Pavlu Živnému, CSc. za jeho odborné vedení, pomoc a vstřícnost při vypracování této diplomové práce.

Děkuji všem řešitelům programového projektu IGA NR/8500-3 za poskytnutí potřebných informací.

Děkuji také prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., přednostovi Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové, za vytvoření podmínek a podporu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Jaroslava Burešová Nedvídková

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.

Název diplomové práce: Stanovení cytokinů v supernatantu homogenátu jater u potkanů s jaterní steatózou

Zaměřením této práce bylo stanovení cytokinů, a to IL-6, TNF-alfa a leptinu v supernatantu homogenátu jater u potkanů s jaterní steatózou. Tato vyšetření byla vykonána v rámci rozsáhlé experimentální práce orientované na schopnost jater regenerovat po indukci steatózy. Stanovení byla provedena pomocí enzymové imunoanalýzy na imunosorbentech. Výsledky byly porovnávány s koncentracemi cytokinů kontrolních skupin potkanů kmene Wistar a kmene PHHP, kteří byli krmeni standardní laboratorní dietou.

U kontrolní skupiny potkanů kmene Wistar byly koncentrace IL-6, leptinu i TNF-alfa v supernatantu jaterní tkáně vyšší než u kontrolní skupiny potkanů kmene PHHP. Příjem steatogenních diet vedl spíše k poklesu IL-6 u všech souborů potkanů. U pokusné skupiny kmene Wistar byly koncentrace leptinu signifikantně nižší oproti kontrolám téhož kmene. U kmene PHHP podávání orotové kyseliny vedlo ke statisticky významnému zvýšení koncentrace leptinu. Přijímání diet vyvolávajících steatózu vedlo u obou kmenů potkanů k poklesu koncentrací TNF-alfa v jaterní tkáni, výrazněji u potkanů kmene PHHP.

Stanovení v homogenátu jaterní tkáně není obvyklé. Předpoklad, že cytokiny v supernatantu homogenátu jater u potkanů s jaterní steatózou budou při zvolené metodě zpracování vzorků pro ELISA stanovení v dostatečných koncentracích, byl také potvrzen, naměřené hodnoty se nacházely v kalibračních rozmezech.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Jaroslava Burešová Nedvídková

Supervisor: Doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.

Title of diploma thesis: Cytokine estimation in liver homogenate supernatant in rats with liver steatosis

The aim of this work was the determination of cytokines - interleukin 6, tumor necrosis factor-alpha and leptin levels in liver homogenate supernatant in rats with hepatic steatosis. These tests were performed within extensive experimental work intended on the ability of liver regeneration after induction of steatosis. The determination was performed using enzyme-linked immunosorbent assay. The results were compared with cytokine concentrations of Wistar and PHHP control groups, who were fed a standard laboratory diet.

The concentrations of IL-6, leptin and TNF-alpha in liver tissue supernatant were higher in the control group of Wistar rats than in PHHP rats control group. Receiving steatosis diets led to a decrease in IL-6 for all rat files. Leptin concentrations were significant lower in Wistar rats than Wistar rats controls were. Orotic acid administration statistically significant increased leptin level in rats PHHP. The consumption of diets causing steatosis reduced TNF-alpha concentrations in liver tissue for both types of rats, especially in PHHP rats.

Determination in homogenate of liver tissue is not usual. Presumption that cytokines in liver homogenate supernatant in rats with liver steatosis will be in sufficient concentrations, was also confirmed, the obtained values were in calibration ranges.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1 Charakteristika cytokinů.....	9
2.1.1 Historický úvod.....	9
2.1.2 Fyzikálně chemická struktura cytokinů.....	10
2.1.3 Receptory cytokinů.....	11
2.1.4 Účinky cytokinů.....	12
2.1.5 Zdroj cytokinů.....	13
2.1.6 Role cytokinů v mezibuněčné komunikaci.....	13
2.2 Klasifikace cytokinů.....	14
2.2.1 Rozdělení podle skupinových názvů.....	14
2.2.2 Rozdělení podle funkce.....	15
2.2.3 Rozdělení cytokinů secernovaných T _H -lymfocyty.....	16
2.2.3.1 Typ T1.....	16
2.2.3.2 Typ T2.....	16
2.2.4 Rozdělení podle struktury.....	16
2.3 Studium cytokinů.....	17
2.4 Charakteristika vybraných cytokinů.....	18
2.4.1 Faktor nekrotizující tumory.....	18
2.4.2 Interleukin-6.....	19
2.4.3 Leptin.....	20
2.5 Stanovení cytokinů.....	21
2.5.1 Preanalytická fáze.....	21
2.5.2 Možnosti stanovení.....	21
2.5.3 Imunochemické metody.....	22
2.5.3.1 RIA – radioimunoanalýza.....	22
2.5.3.2 IRMA – imunoradiometrická analýza.....	22
2.5.3.3 ELISA – enzymová imunoanalýza na imunosorbentech.....	23
2.6 Jaterní steatóza.....	24
2.7 Regenerace jater po hepatektomii.....	25
2.8 Experimentální práce.....	26
2.8.1 Navození steatózy.....	26

2.8.2	Laboratorní potkání.....	27
2.8.3	Zpracování jaterní tkáně.....	28
3.	Cíl práce.....	29
4.	Metodická část.....	30
4.1	Přístroje.....	30
4.2	Stanovení TNF-alfa.....	30
4.2.1	Princip.....	30
4.2.2	Obsah kitu.....	31
4.2.3	Pomůcky.....	31
4.2.4	Uchovávání a příprava vzorků.....	31
4.2.5	Příprava reagensí.....	32
4.2.6	Vlastní provedení.....	32
4.2.7	Vyhodnocení.....	34
4.3	Stanovení interleukinu-6.....	34
4.3.1	Princip.....	34
4.3.2	Obsah kitu.....	34
4.3.3	Pomůcky.....	35
4.3.4	Uchovávání a příprava vzorků.....	35
4.3.5	Příprava reagensí.....	36
4.3.6	Vlastní provedení.....	36
4.3.7	Vyhodnocení.....	38
4.4	Stanovení leptinu.....	38
4.4.1	Princip.....	38
4.4.2	Obsah kitu.....	38
4.4.3	Pomůcky.....	39
4.4.4	Uchovávání a příprava vzorků.....	39
4.4.5	Příprava reagensí.....	40
4.4.6	Vlastní provedení.....	40
4.4.7	Vyhodnocení.....	41
5.	Výsledky.....	42
5.1	Stanovení cytokinů.....	42
5.2	Stanovení obsahu a syntézy jaterních DNA.....	49
5.3	Histologické vyšetření jaterní tkáně.....	50
6.	Diskuse.....	52

7. Závěr.....	55
8. Zkratky.....	56
9. Literatura.....	58

1. Úvod

Soudržnost buněk a jejich vzájemnou informovanost zajišťují různé buněčné interakce. Mezi nejdůležitější patří uvolňování a přenášení informačních molekul. Signály polypeptidové povahy lze zahrnout do široké rodiny cytokinů. Cytokiny můžeme definovat jako humorální faktory, které zajišťují mezibuněčnou komunikaci v rámci imunitního systému i komunikaci mezi imunitním systémem a dalšími tělními soustavami. Hrají také významnou regulační úlohu v průběhu embryogeneze. Cytokinová signální síť udržuje tělní homeostázu. Studium jednotlivých cytokinů je důležité pro pochopení jejich fyziologické role, ale také významně přispívá k poznání patologických pochodů v různých orgánových systémech i k odhalení patogeneze některých onemocnění.

Cytokiny lze stanovit ve všech biologických tekutinách a tkáních. Stanovené koncentrace jsou výrazně závislé na metodě stanovení a na důsledném dodržení preanalytické přípravy vzorku. Interpretace vyšetření cytokinů je mimořádně obtížná pro jejich biologickou variabilitu.

Cílem diplomové práce bylo výhradně stanovení cytokinů v supernatantu homogenátu jaterní tkáně u potkanů s jaterní steatózou. Tato vyšetření byla prováděna v rámci programového projektu IGA NR/8500-3. Jednalo se o rozsáhlou experimentální práci zaměřenou na schopnost jater regenerovat po indukci steatózy. Pro zasazení výsledků cytokinů do kontextu experimentů jsme použili některé získané parametry od řešitelů projektu s jejich souhlasem, což je v dalším textu jasně vymezeno.

2. Teoretická část

2.1 Charakteristika cytokinů

Cytokiny představují rozsáhlou řadu informačních molekul polypeptidové struktury. Mohou být definovány jako solubilní mediátory obranné odpovědi organismu. V širším smyslu tento termín zahrnuje i růstové faktory krevních řad (hemopoetické růstové faktory) a růstové faktory epitelových a mezenchymových buněk (Zima 2007).

Cytokiny jsou tedy početnou skupinou proteinových mediátorů, které jsou secerovány většinou T-lymfocyty a makrofágy, ale i jinými buňkami. Cytokiny produkované leukocyty se nazývají interleukiny (leukocyty se jimi ovlivňují navzájem). Lymfocyty produkují lymfokiny a makrofágy a monocyty monokiny (Masopust a Průša 2003).

Cytokiny mohou být nazvány tkáňovými hormony, které působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj. Existují také membránové formy některých cytokinů, které jsou na rozdíl od sekretovaných forem zakotveny v cytoplazmatické membráně hydrofobní sekvencí asi 20 aminokyselin (transmembránové proteiny). Výhodou membránových cytokinů je zajištění jejich výrazně lokálního působení, kdy nedochází k zředování difúzí a k odplavování (Hořejší a Bartůňková 2005).

2.1.1 Historický úvod

Již v roce 1957 Issacs a Lindenmann objevili interferon jako solubilní faktor produkovaný buňkami po expozici inaktivovaným virem chřipky (Jabor 2008). Vedle klasických hormonů produkovaných endokrinními žlázami, cirkulujících v krvi a působících na vzdálené orgány, byly od 60. let postupně izolovány látky, jejichž produkce často nebyla omezena na jeden orgán nebo na jednu buněčnou populaci a jejich působení na nejbližší okolí produkující buňky. Takovými látkami byly některé růstové faktory, např. epidermální růstový faktor, nervový růstový faktor (Klener 1997).

Na základě svých biologických účinků byla identifikována řada peptidů produkovaných různými subpopulacemi lymfocytů (lymfokiny) a monocytů (monokiny), které hrají roli ve vzájemné komunikaci buněk imunitního systému.

Od roku 1979 byla postupně identifikována primární struktura rostoucího počtu těchto peptidových makromolekul, které byly označeny jako interleukiny a číslovány podle pořadí, v jakém byla jejich struktura poznána. Bylo zjištěno, že lymfokiny či monokiny jsou také produkovány i jinými buňkami než lymfocyty nebo monocyty (např. fibroblasty, endoteliálními i epiteliálními buňkami). Termín interleukiny nebyl také aplikován na některé makromolekuly, u nichž byl z různých důvodů ponechán jejich tradiční název např. TNF - tumor necrosis factor, TGF- β – transformující růstový faktor β , interferony, faktor stimuluje kolonie – CSF, aj. (Klener 1997).

V posledních třech desetiletích dochází k prudkému nárůstu poznatků o cytokinech, a to jak z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností, tak i jejich receptorů a účinků.

2.1.2 Fyzikálně chemická struktura cytokinů

Dříve byly cytokiny popisovány podle svých účinků v živočišných modelech nebo in vitro pokusech. Nyní jsou poznávány podrobněji na molekulové úrovni. Je zjištěno aminokyselinové složení a struktura, je lokalizován gen odpovědný za jeho produkci. Gen může být klonován a cytokin lze využít v jeho rekombinantní podobě (Krejsek a Kopecký 2004).

Společnou charakteristikou cytokinů je nízká molekulová hmotnost. Jedná se většinou o glykosylované lineární polypeptidy, které působí již v koncentracích 10^{-12} až 10^{-16} mol/mg cílové tkáně (Zima 2007).

Jsou sestaveny ze 100 až 200 aminokyselinových zbytků a to včetně signální sekvence, která ovlivňuje jejich sekreci do extracelulárního prostoru. Molekulová hmotnost se pohybuje od 6 kDa (TGF- α – transformující růstový faktor α) po 140 kDa (MIS - Mullerian-inhibiting substance). Jsou složeny z jednoho nebo dvou aminokyselinových řetězců, výjimkou je tumor necrosis factor (TNF), který je trimer. Většina cytokinů má poměrně vysoký obsah struktury alfa-helixu (40 - 60 %), v ostatních strukturních charakteristikách se liší. Stabilitu molekuly cytokinů zvyšují disulfidické můstky. Ve většině případů jsou cytokiny glykoproteiny, obsahující cukernou složku vázanou přes N nebo O. Glykosylace ovlivňuje v mnoha směrech také jejich biologickou aktivitu. S nárůstem znalostí cytokinů je již známa krystalická podoba mnoha z nich. Řada cytokinů vykazuje strukturu α -helixu, méně častá je struktura β -skládaného listu se strukturou trojlístku nebo β -skládaného listu se

strukturou rolky (jellyroll) nebo struktura β -skládaného listu s tzv. cystinovými uzly. Odlišné vlastnosti cytokinů souvisejí s různými doménami na molekule (Jabor 2008).

Sekrece cytokinu z buňky je většinou zajišťována přítomností tzv. signální sekvence v příslušném genu. Další genové domény jsou spojeny se specifickými, často velmi odlišnými funkcemi cytokinů. I nízká shodnost v primární struktuře není na překážku obdobného účinku různých cytokinů. Cytokiny, jakožto činitelé mezibuněčné komunikace, se vážou na specifické buněčné membránové receptory (Zima 2007).

2.1.3 Receptory cytokinů

Působení cytokinů, kterým ovlivňují růst a diferenciaci, závisí na jejich rozpoznání a vazbě na specifické vysokoafinitní receptory cílových buněk. Tyto receptory lokalizované na buněčné membráně převádějí příslušný signál do nitra buňky, kde spouštějí signální kaskádu. Vazbou s příslušným ligandem vzniká aktivní vícesložkový komplex, což často spočívá v oligomerizaci ligand-vázajících podjednotek s následnou transdukcí signálu až do buněčného jádra (Masopust a Průša 2003).

Hustota cytokinových receptorů je od 10 po 10 000 na jediné buňce. Některé cytokiny i s velmi rozdílnou chemickou strukturou sdílejí společné povrchové receptory na buňkách. Většinou se cytokinový receptor skládá z jednoho polypeptidového řetězce s extracelulární, transmembránovou a intracelulární doménou. U některých cytokinů je receptor složen z více než jednoho polypeptidového řetězce (Jabor 2008).

Jedna tato podjednotka zodpovídá za specifickou vazbu cytokinu a další zajišťují spojení se signalizačními intracelulárními molekulami. Cytokinové receptory lze podle strukturních podobností rozdělit do několika skupin (Hořejší a Bartůňková 2005).

- Nadrodina IL-1 receptorů
- Třída I (pro hematopoetiny): obsahuje ustálené motivy složení fragmentů řetězce tj. CCCC a Trp-Ser-X-Trp-Ser
- Třída II (pro interferony): obsahují ustálený motiv CCCC
- Nadrodina TNF-receptorů (TNF-R): obsahují opakující se sledy C1, C3, C2

(Masopust a Průša 2003, Jabor 2008).

Aktivita cytokinů je částečně regulována ovlivněním jejich receptorů. Cytokinové receptory mohou být formovány i jinými cytokiny nebo různými působky (Jabor 2008).

Výsledky signalizace přes cytokinové receptory závisí na typu buňky, typu signálu (povaze receptoru) a spolupůsobení jiných signálů. Konečným důsledkem může být cokoli od stimulace buněčného dělení a diferenciaci, spouštění efektorových mechanismů (degranulace, sekrece cytokinů a jiných mediátorů, aktivace membránových enzymů, buněčný pohyb – chemotaxe) až po zablokování buněčného cyklu a indukci apoptózy (Hořejší a Bartůňková 2005).

2.1.4 Účinky cytokinů

Cytokiny vyvolávají a řídí průběh vrozené i specifické imunity, ovládají vývoj a funkci buněk imunitního systému, ale i jiných buněk. Cytokiny ovlivňují proliferaci, diferenciaci a migraci řady buněk (Jabor 2008).

Účinky cytokinů se překrývají, doplňují a vzájemně se ovlivňují jednoduchými i složitými zpětnými vazbami na různých úrovních. Stejně cytokiny jsou produkovány různými typy buněk. Naopak jeden typ buněk (monocyty, lymfocyty apod.) tvoří řadu cytokinů s rozličnými účinky (Zima 2007).

Účinek jednotlivého cytokinu je často obtížné definovat. Většinou působí společně s jinými cytokiny nebo dalšími molekulami, a to jak synergicky tak antagonisticky. Cytokiny obvykle vyvolávají kaskádu produkce dalších cytokinů, v které následující cytokin může ovlivňovat předcházející. Cytokinové receptory, které jsou exprimovány na povrchu buněk aktivovaných antigenem, realizují antigen-specifickou imunitní odpověď, i když cytokiny nemají antigenovou specifitu. Cytokiny produkované primárně z leukocytů podněcují humorální a buněčnou imunitní odpověď, stejnou jako po aktivaci fagocytů antigenem. Jsou většinou tvořeny velmi krátkou dobu po stimulaci buňky např. při imunitní nebo zánětlivé (Jabor 2008). Cytokiny nejsou uchovány v intracelulárních kompartmentech, ale nově syntetizovány při příslušných aktivačních podnětech (Zima 2007).

Většina cytokinů je ve svém účinku pleiotropní (ovlivňuje několik různých druhů buněk), působí stupňovitě (jeden cytokin vyvolává tvorbu druhého) a redundantně (více cytokinů má stejný efekt). Cytokiny účinkují:

- autokrinně (působí na buňku, která je produkuje)
- parakrinně (působí na buňky v těsné blízkosti)
- endokrinně (po transportu cévním řečištěm působí na vzdálené tkáně)

Při spolupůsobení několika různých cytokinů dochází k synergistickým a antagonistickým interakcím (indukují nebo inhibují syntézu dalších cytokinů), které se označují jako cytokinová síť (Hořejší a Bartůňková 2005).

Typ určité cytokinové sítě je specifický pro odlišné fyziologické nebo patofyziologické procesy. Tato síť je ovlivněna rozdílnou produkcí cytokinů, ale i sdílenými rodinami receptorů, které mohou být společné i pro některé hormony. Cytokiny po navázání na membránové receptory spouštějí signalizační kaskády, tím ovlivňují metabolismus cílové buňky a její genovou expresi (Zima 2007).

Aktivitu cytokinů lze rozdělit do pěti větších okruhů:

- vývoj a udržování humorální a buněčné imunitní odpovědi,
- navození zánětlivé reakce,
- regulace hematopoeze,
- kontrola buněčné proliferace a diferenciaci,
- indukce hojení poranění (Masopust a Průša 2003).

2.1.5 Zdroj cytokinů

Zdrojem cytokinů jsou především imunokompetentní buňky (T-lymfocyty, makrofágy), ale schopnost tvořit cytokiny mají skoro všechny somatické buňky. Podílí se tak na meziorgánové komunikaci a homeostáze. Jejich významná a dlouhotrvající nerovnováha vede k poškození hlavně endoteliálních funkcí, mikrocirkulace a k projevům syndromu systémové zánětlivé odpovědi a syndromu multiorgánové dysfunkce (Zima 2007).

2.1.6 Role cytokinů v mezibuněčné komunikaci

Existují dva mechanismy interakce buňka-buňka. První komunikační systém jde cestou přímého kontaktu (ligand-receptor) pomocí adhezních molekul na povrchu buňky. Druhý je realizován solubilními mediátory jako jsou cytokiny. Cytokiny, růstové faktory a hormony představují chemické posly, které zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami. Regulace buněčných nukleárních funkcí se začíná aktivací receptorů na buňce. Tyto receptory se skládají ze dvou složek:

- doménu vázající ligand, zajišťující specifitu vazby s příslušným ligandem,

- efektorovou doménu, která zahajuje vznik biologické odpovědi po vazbě ligandu.

Aktivovaný receptor může vstoupit do reakce s dalšími buněčnými komponentami a uskutečnit signální transdukční proces. Signální transdukce má řadu funkcí:

- přenáší informace mezi buňkami a orgány,
- zesiluje přenášený signál jeho amplifikací,
- startuje signální kaskády zahrnující transkripční faktory s cílem regulace exprese genu,
- mění a ovlivňuje genetickou expresi genu jako odpověď na zevní podnět (Masopust a Průša 2003).

2.2 Klasifikace cytokinů

2.2.1 Rozdělení podle skupinových názvů

- Interferony (INF- α , β , γ): cytokiny s antivirovými a antiproliferačními schopnostmi.
- Interleukiny (IL-1 až IL-26): zánětlivé mediátory s prozánětlivým i protizánětlivým působením.
- Faktory stimulující kolonie (CSF): růstové faktory hemopoetických kmenových buněk. Cytokiny stimulující v kostní dřeni diferenciaci granulocytů (G-CSF), monocytů (M-CSF), obou typů myeloidních buněk (GM-CSF).
- Chemokiny: molekuly s chemotaktickým působením na granulocyty, makrofágy a další skupiny leukocytů. Dosud 14 popsanych chemokinů se podle strukturální podobnosti a účinků dělí na 2 podtřídy:
 - α -chemokiny, např. IL-8
 - β -chemokiny, např. RANTES – regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (Zima 2007).
- Faktory nekrotizující nádory (TNF- α , TNF- β): cytokiny s cytotoxickým a regulačním působením.
- Jiné růstové faktory: růstový faktor kmenových buněk (SCF), erythropoetin (EPO), růstový faktor fibroblastů (FGF), nervový růstový faktor (NGF), faktor inhibující leukémii (LIF) a další (Hořejší a Bartůňková 2005).

2.2.2 Rozdělení podle funkce

Cytokiny lze rozdělit podle převažující funkce, avšak překrývající se účinky současně zařazují některé do několika skupin.

- Cytokiny prozánětlivé podporující zánětlivou reakci včetně chemotaktických faktorů (chemokinů). Typickým představitelem chemokinů je IL-8, je chemoatraktantem pro všechny známé migrující imunokompetentní buňky. Chemokiny vytvářejí jakousi síť nad endoteliemi a jsou potřebné pro vznik adhezních molekul na povrchu leukocytů, vytvářejí též chemotaktický gradient pro pohyb zánětlivých buněk.
Prozánětlivé cytokiny (např. TNF, IL-1, IL-6) zahajují a stimulují zánětlivou odpověď. Jsou produkovány mnoha buňkami již v počáteční fázi zánětu. Navozují změny v místě zánětlivého postižení, mobilizují antigen prezentující buňky a endotelové buňky k expresi adhezních molekul. Výsledkem je aktivace, diferenciaci a proliferace zánětlivých buněk (leukocytů a monocytů, makrofágů). IL-1 a TNF působí také systémově vyvoláním tzv. reakce akutní fáze včetně ovlivnění syntézy proteinů akutní fáze v játrech a vzniku horečky.
- Cytokiny protizánětlivé s převážně inhibičním účinkem na zánětlivé a imunitní reakce (např. IL-10, TGF- β).
- Cytokiny s aktivitou růstových faktorů hematopoetických buněk - faktory stimulující kolonie (G-CSF, M-CSF, GM-CSF) a některé cytokiny (např. IL-3) hrají klíčovou úlohu pro vývoj zánětlivých buněk z progenitorů v kostní dřeni. Některé cytokiny indukují též specifickou diferenciaci hematopoetických kmenových buněk.
- Imunomodulační cytokiny - uplatňují se v humorální (protilátkové) imunitě (T_H2) a v buněčně zprostředkované imunitě (T_H1). Patří k nim především IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ a další. Jsou důležité zejména pro rozvoj T a B lymfocytů po jejich stimulaci. Svým efektem vedou k aktivaci příslušných buněk, a tím současně určují typ imunitní odpovědi.
- Cytokiny s antivirovým účinkem – interferony (Hořejší a Bartůňková 2005, Masopust a Průša 2003).

2.2.3 Rozdělení cytokinů secernovaných T_H-lymfocyty

2.2.3.1 Typ T1

Do tohoto typu patří IL-2, IL-12 a IFN- γ . Je produkovaný T_H1-lymfocyty a hraje významnou roli v celulární imunitě (Masopust a Průša 2003).

Makrofágy produkující IL-12 výrazně ovlivňují diferenciaci T_H0-lymfocytů na efektorové T_H1-buňky. Tyto tvoří IFN- γ , který stimuluje makrofágy k přeměně na aktivovanou formu. Další hlavní cytokin T_H1-buněk IL-2 je důležitý pro jejich dělení a proliferaci (Hořejší a Bartůňková 2005).

2.2.3.2 Typ T2

Do tohoto typu patří IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13. Je produkovaný T_H2-lymfocyty a uplatňuje se v humorální imunitě (Masopust a Průša 2003).

Mikroprostředí obsahující IL-4 (vytvářejí bazofily a mastocyty) určuje vyžívání T_H0-lymfocytů na T_H2-buňky, které regulují syntézu protilátek a diferenciaci eozinofilních granulocytů. T_H1 a T_H2-lymfocyty jsou ve vzájemném antagonistickém vztahu určovaném cytokiny. T_H1-lymfocyty tlumí T_H2-lymfocyty prostřednictvím IFN- γ . T_H2-lymfocyty tlumí T_H1-lymfocyty prostřednictvím IL-4 (Krejsek a Kopecký 2004).

2.2.4 Rozdělení podle struktury

Strukturálně jsou cytokiny velmi různorodé molekuly. Primární struktura je známa u dosud popsaných, u mnoha je známa i sekundární, většinou i struktura jejich receptorů. Cytokiny lze rozdělit do několika strukturních skupin – rodin. Členové ve skupině mají určitou podobnost v sekvenci aminoskupin a v prostorové struktuře molekul (Hořejší a Bartůňková 2005).

Např. základní strukturní skupiny cytokinů jsou:

- Hemopoetiny – charakteristickým strukturním rysem je přítomnost čtyř α -helikálních úseků.
- Interferony a rodina IL-10 – obsahují pět α -helikálních úseků, strukturně se vzdáleně podobají hemopoetinům.

- Skupina IL-12 – nekovalentní heterodimery dvou strukturně odlišných podjednotek, menší je podobná hemopoetinům a větší podobná receptorovému fragmentu.
- Skupina TNF – tvar kompaktního „soudečku“ tvořeného antiparalelními úseky polypeptidového řetězce (β -struktura), cytokiny této skupiny se většinou vyskytují v trimerní formě, mnohé z nich jsou membránové molekuly.
- Skupina TGF- β – dimerní cytokiny s charakteristickým tzv. cystinovým uzlem kovalentně stabilizujícím jejich tvar.
- Chemokiny – malé molekuly (8-10 kDa), podle struktury a uspořádání stabilizujících cystinových můstků lze rozdělit do dvou hlavních podskupin zvaných CCL a CXCL.
- Ostatní – struktury nepodobné jiným cytokinům .
(Hořejší a Bartůňková 2005).

Cytokiny ve většině byly původně objeveny na základě svých biologických aktivit a teprve později se prokázala jejich identická chemická struktura, proto se klasifikace cytokinů opakovaně přepracovávala. V jednotlivých klasifikačních systémech byly zohledňovány různé aspekty. Podrobnější dělení cytokinů zahrnuje šestnáct cytokinových rodin, jednu cytokinovou rodinu unikátní a čtyři chemokinové rodiny - rodinu CC-beta, rodinu CCX, rodinu C a rodinu CX3C (Jabor 2008).

2.3 Studium cytokinů

Důkladné poznání jednotlivých cytokinů a jejich vzájemných interakcí je velmi obtížné, avšak má velký praktický význam. Funkce cytokinů jsou studovány na zvířecích modelech nebo na tkáňových kulturách. Mnohočetnost jejich účinků způsobilo, že některé cytokiny byly popsány podle určitého výsledku in vitro, který se v pozdějších studiích ukázal jako méně podstatný (například INF- γ byl objeven na základě přímého antivirového efektu, jeho hlavní účinek je však imunoregulační). In vivo je možno studovat funkce cytokinů přechodným vyrušením jeho vlivu aplikací příslušných inhibitorů. Velkým přínosem je konstrukce tzv. knock-out myši, kterým je experimentálně vyřazen gen kódující určitý cytokin. Naopak u myši transgenních je vnesen gen pro jistý cytokin, ten je pak exprimován a příslušný cytokin je produkován ve zvýšeném množství. (Hořejší a Bartůňková 2005).

Další poznatky o funkci cytokinů představují vrozené či získané poruchy jednotlivých cytokinů nebo jejich receptorů. Klinická aplikace rekombinantních cytokinů při různých indikacích u lidí přináší také poznatky o jejich funkci. Aplikovaný cytokin není však ideální modelový případ pro studium, neboť pleiotropní efekt se obvykle projeví jako nežádoucí reakce. Podání cytokinů je obvykle systémové s vysokými dávkami, zatímco funkce většiny cytokinů spočívá v jejich lokálním působení s účinnou minimální koncentrací. Proto nejsou (až na některé výjimky) obvykle používány jako substituční léčba při prokázaném defektu určitého cytokinu (Klener 1997).

2.4 Charakteristika vybraných cytokinů

2.4.1 Faktor nekrotizující tumory

Faktor nekrotizující tumory (TNF – tumor necrosis factor) je produkován aktivovanými lymfocyty, makrofágy, granulocyty a fibroblasty. Má dvě formy, α a β , které soutěží ve vazbě na společný specifický membránový receptor.

- TNF-alfa (kachektin): je mediátorem zánětlivé reakce, působí uvolnění dalších mediátorů (leukotrienů, prostaglandinu E_2), indukuje expresi některých genů, má cytotoxické účinky a lokálně působí nekrózu nádorových buněk. Jedním z mechanismů cytotoxických účinků může být tvorba kyslíkových radikálů vyvolaná TNF. Má silný katabolický účinek a je odpovědný za nádorovou kachexii. Inhibuje lipoproteinové lipázy a potlačuje diferenciaci adipocytů. Působí zvýšení tělesné teploty. Přisuzuje se mu role v patogenezi roztroušené sklerózy a některých autoimunních onemocnění. Má silné angiogenní účinky (Klener 1997).

Primárně je TNF-alfa produkován aktivovanými buňkami monocytomakrofágové řady jako odpověď na různé stimuly (viry, parazity, bakterie, cytokiny a mitogeny) a má pleiotropní účinek. Je schopen aktivace mnoha cest a stimulovat nebo tlumit expresi velkého počtu genů. V roztoku vytváří trimerickou molekulu. Transmembránová a secernovaná solubilní forma TNF-alfa je biologicky aktivní. Vysoká koncentrace TNF-alfa bývá nalézána u septického šoku. Přetrvávání jeho vysokých koncentrací indikuje špatnou prognózu (Jabor 2008). Pro hodnocení prognózy je třeba trvale monitorovat

plazmatické hodnoty, jednotlivé měření nemá výpovědní hodnotu. Fyziologické koncentrace (v plazmě pod limitem detekce) jsou nutné k apoptóze a remodelaci tkání a k normální aktivaci imunitního systému (Zima 2007).

- TNF-beta (lymfotoxin): má některé obdobné funkce jako TNF-alfa. Indukuje expresi cytokinů a adhezních molekul, stimuluje proliferaci a diferenciaci mnoha buněčných typů (lymfocytů, endotelií, nervových buněk). Jeho hlavní účinky jsou však cytotoxické a cytolytické. S TNF-alfa soutěží ve vazbě na společné membránové receptory, které se nacházejí na většině buněk, s výjimkou erytrocytů (Klener 1997).

2.4.2 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) je cytokin s mnoha funkcemi a širokou působností. Je produkován normálními i transformovanými buňkami (aktivované T-lymfocyty, aktivované monocyty, makrofágy, fibroblasty, hepatocyty, keratinocyty, astrocyty, cévními endoteliemi a různými nádorovými buňkami). Produkce IL-6 je navozena vlivem různých cytokinů. IL-6 se účastní regulace zánětu a imunitní odpovědi, stimuluje B-lymfocyty, hematopoézu, podporuje syntézu erythropoetinu, ovlivňuje reparační děje a angiogenezi. Je přímo zapojen do odpovědi na infekci a poranění včetně zvýšení tělesné teploty. IL-6 je hlavním induktorem syntézy proteinů akutní fáze v hepatocytu, kde spolupůsobí s IL-1 a glukokortikoidy (Zima 2007, Jabor 2008).

Má vliv na různé buňky, včetně fibroblastů, progenitorové myeloidní buňky, navozuje diferenciaci T a B buněk, makrofágů. IL-6 má mnohočetné efekty, podle kterých získal množství synonym (Jabor 2008). Např. BCFS (B cell stimulatory factor), protože indukuje diferenciaci B-lymfocytů v plazmatické buňky nebo HPGF (Hybridoma plasmocytoma growth factor), neboť se uplatňuje jako autokrinní růstový faktor u mnohočetného myelomu. Aktivuje osteoklasty a účastní se na vzniku postmenopauzální osteoporózy. Autokrinním mechanismem podněcuje mezangiální buňky v ledvinách a podílí se na genezi mezangioproliferativní glomerulonefritidy. Spolu s TNF působí vznik anorexie a kachexie při nádorových onemocněních (Klener 1997).

IL-6 indukuje expresi IL-2 a receptoru pro IL-2, interaguje s IL-2 na proliferaci T-lymfocytů, působí synergně s IL-3 na multipotentní hematopoetické progenitory (i megakaryocyty). Inhibuje růst linií buněk myeloidní leukémie (Jabor 2008).

Z hlediska klinického využití je nejdůležitějším cytokinem. Stanovení v mozkomíšním moku rozliší bakteriální etiologii meningitidy od ostatních příčin. V moči lze využít časnou detekci rejekce štěpu při transplantaci. O několik hodin předchází vzestup CRP – proteinu akutní fáze, který se nejčastěji využívá k odhalení časně např. pooperační infekce. Diagnostická úloha IL-6 je ještě důležitější v diagnostice neonatální infekce a sepse, kdy dosud nemusí být plně rozvinuta odpověď proteinů akutní fáze. Poměr IL-6 a protizánětlivého IL-10 se považuje podobně jako TNF- α za nejlepší ukazatel závažnosti a prognózy syndromu systémové zánětlivé odpovědi. Trvale zvýšené koncentrace IL-6 zároveň s klesající syntézou IL-10 (tedy stoupající poměr IL-6/IL-10) předurčují rozvoj syndromu multiorgánové dysfunkce a značí špatnou prognózu vzhledem k přežití. Mimo stanovení IL-6 pomocí ELISA byly vyvinuty automatizované imunoanalýzy s chemiluminiscenční detekcí (Zima 2007).

2.4.3 Leptin

Leptin (OB) je cytokin tvořený adipocyty a podílí se na regulaci příjmu potravy. Hladina leptinu koreluje s množstvím tukové hmoty. Klesá v případě kalorické malnutrice a vzrůstá po obnově příjmu potravy. Místem jeho regulačního působení je mozek. Byla nalezena silná vzájemná souvislost mezi plazmatickou hladinou leptinu a hladinou dopaminu v mozkomíšním moku (Krejsek a Kopecký 2004).

Leptin je produktem *ob* genu. Mutace *ob* genu blokuje syntézu leptinu vede k obezitě, diabetu mellitus, redukci motorické aktivity, k poklesu metabolismu a tělesné teploty. Exprese mRNA je omezena na tukovou tkáň. Evolučně se jedná o velice konzervativní cytokin (Jabor 2008).

Leptin je senzorem uchovávané energie v tukové tkáni schopný zprostředkovat zpětnou vazbu do míst zapojených v regulaci energetické homeostázy. Leptin se pevně váže na receptory v hypotalamu a snižuje chuť k jídlu, obecně vzato snižuje tělesnou hmotnost. Má podstatný vliv na celkový metabolismus tuků. Při nadbytku tuků dává signál k jejich degradaci a k zástavě příjmu. Avšak bylo zjištěno, že u obézních lidí, ačkoliv je u nich produkce leptinu vysoká, jeho účinnost je skoro nulová, neboť trvalý vysoký přívod potravních tuků oslabil citlivost leptinových receptorů. Proto užití leptinu k snižování tělesné hmotnosti je zatím problematické, protože dochází k mnohým nežádoucím účinkům, např. v reprodukčním systému (Ledvina 2005).

2.5 Stanovení cytokinů

Cytokiny lze stanovovat ve všech biologických tekutinách a tkáních. Nejčastěji jsou měřeny v plazmě. Výsledná koncentrace značně závisí na vybrané metodě stanovení a na správném dodržování preanalytické přípravy vzorku (Zima 2007).

2.5.1 Preanalytická fáze

K odběru krve i dalších biologických vzorků je doporučeno používat speciální odběrový materiál, který neobsahuje endotoxin a pyrogeny. Je třeba co nejdříve po odběru separovat plazmu a uchovávat ji při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, neboť velmi snadno dochází k tvorbě cytokinů *in vitro*. Vzorky lze skladovat hluboko zmrazené maximálně jeden rok (Jabor 2008).

2.5.2 Možnosti stanovení

Dříve převažovaly biologické testy s tkáňovými kulturami určitých buněčných linií. Tyto metody byly však velmi pracné, nákladné a obtížně reprodukovatelné, často i nespecifické. V současné době se používají pouze ve výzkumu. Zavedení imunochemických metod usnadnilo také vyšetřování cytokinů. Nejčastěji jsou využívány techniky imunoanalýz na principu ELISA, RIA a IRMA. Komerční sety od různých výrobců se často liší mezi sebou z hlediska použitých protilátek, rozsahem kalibrační křivky, limitem detekce apod. U mnoha souprav není k dispozici kontrolní sérum, normální hodnoty jsou udávány jako doporučené nebo nejsou uvedeny vůbec. Je výhodné využívat kity od jednoho osvědčeného výrobce a stanovit si vlastní rozmezí plazmatických normálních hodnot. Obtížné je stanovení normálních hladin u jiného biologického materiálu, než je plazma a sérum. Izolované jednorázové stanovení cytokinu má omezený diagnostický přínos. Prakticky významnější je vyšetření více cytokinů současně spolu se sledováním jejich dynamiky (Zima 2007).

Pro stanovení cytokinů jsou využívány i metody polymerázové řetězové reakce a blottingu. Molekulárně biologické postupy umožňují stanovit genotypické rozdíly nebo expresi genů pro cytokiny - kvantitu mRNA jednotlivých cytokinů (Jabor 2008).

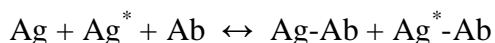
2.5.3 Imunochemické metody

Podstatou imunochemických analytických metod je reakce antigen – protilátka. Tvorba imunokomplexů je využita jako východisko k vysoce senzitivním reakcím s použitím značených antigenů nebo protilátek. Citlivost těchto metod je velká, tudíž je možné stanovit i malé koncentrace látek (Bartůňková a Paulík 2005).

2.5.3.1 RIA – radioimunoanalýza

Radioizotopové metody náleží k historicky nejstarším. Ke stanovení antigenu se využívá protilátka značená radioaktivním prvkem. K výhodám těchto metod patří jejich velká citlivost a reprodukovatelnost. Nevýhodou je protilátka značená radioizotopem, oddělené izotopové pracoviště, speciální měřicí technika a produkce izotopového odpadu (Bartůňková a Paulík 2005).

Radioimunoanalýza je metoda založená na principu kompetitivní reakce stanovovaného analytu – antigenu (Ag) a vhodného radioindikátoru (Ag^*) o vazebná místa specifické protilátky (Ab), která je přítomna v omezeném množství. Výsledkem reakce je vznik dvou komplexů antigen-protilátka, a to s nezačteným a začteným antigenem. Množství začteného komplexu je nepřímě úměrné původnímu množství stanovovaného antigenu (čím je vyšší koncentrace analytu ve stanovovaném vzorku, tím menší množství vznikne začteného komplexu [Ag^*-Ab]).



Kvantitativní vyhodnocení reakce je založena na detekci radioaktivity. Celková radioaktivita, která byla do reakce dodána, se rozdělí do dvou frakcí – vázané a volné. Na základě rozdělení obou frakcí separací je možno změřit radioaktivitu jedné z nich a analýzu kvantitativně vyhodnotit. Nejčastěji používanými radionuklidy jsou ^{125}I , ^{57}Co a 3H (Jabor 2008).

2.5.3.2 IRMA – imunoradiometrická analýza

Jedná se o nekompetitivní imunoanalytickou metodu stanovení analytu - antigenu (Ag) pomocí protilátky, která je značena radioizotopem a je v nadbytku (Ab^*).



Množství komplexu je úměrné množství stanoveného antigenu, tedy se vzrůstající koncentrací stanovované látky vzrůstá také radioaktivita vytvořeného komplexu (pokud je měřena vázaná frakce indikátoru).

Frekventovanou modifikací je sendvičová IRMA, kdy do reakce se stanovovaným antigenem vstupují v nadbytku dvě specifické protilátky (Jabor 2008).

2.5.3.3 ELISA – enzymová imunoanalýza na imunosorbentech

ELISA je speciálním druhem enzymové imunoanalýzy (EIA). ELISA metody jsou vhodné ke stanovování látek, které se vyskytují v séru v nízkých koncentracích, pod detekční mez nefelometrických metod. Indikátorem je enzymový konjugát. Podle povahy substrátu reakce může být detekována spektrofotometricky, fluorometricky a luminometricky. ELISA může být heterogenní nekompetitivní EIA (tzv. sandwich) nebo heterogenní kompetitivní EIA. Provádí se pomocí mikrotitračních destiček o 96 jamkách. Vyžaduje separaci volné a vázané frakce indikátoru. Základním vybavením je ELISA-reader. Je to modifikovaný spektrofotometr umožňující měření barevné reakce při různých vlnových délkách a je upravený na odečítání z mikrotitračních destiček (Bartůňková a Paulík 2005).

Nejčastější formou je zakotvení jednoho z členů reakce (antigenu nebo protilátky) na pevné fázi (sorbentu) a následné oddělování zreagované a nezreagované značené reagensie promytím. Pevnou fázi představuje povrch jamky umělohmotné destičky. Metoda se používá ke kvantifikaci řady antigenů, protilátek a dalších produktů (Budayová 2003).

- Heterogenní nekompetitivní enzymoimunoanalýza

Na pevné fázi je navázaná protilátka, která po přidání vzorku vyváže antigen v něm obsažený. Po promytí se na navázaný antigen váže na jinou antigenní determinantu opět protilátka značená enzymem (nejčastěji křenuv peroxidasa, alkalická fosfatasa, β -D-galaktosidasa a glukosaoxidasa). Po opětovném promytí je přidán substrát, následuje enzymová reakce. Výsledkem je barevný komplex, jehož absorbance je změřena na spektrofotometru. Z kalibrační křivky sestavené z hodnot standardních vzorků se odečte koncentrace daného analytu v neznámém vzorku (Budayová 2003).

- Heterogenní kompetitivní enzymoimunoanalýza

Neznačený antigen ze vzorku soutěží se standardním množstvím značeného antigenu o vazebné místo na protilátce zakotvené na pevné fázi. Čím více antigenu obsahuje

analyzovaný vzorek, tím méně značeného antigenu se naváže na zakotvenou protilátku. Po přidání enzymového substrátu je výsledná intenzita zbarvení měřena spektrofotometricky. Pomocí sestrojené kalibrační křivky ze standardních vzorků se odečítají příslušné hodnoty v neznámém vzorku (Budayová 2003).

2.6 Jaterní steatóza

Játra mají ústřední roli v metabolismu tuků. Jaterní steatóza (ztukovatění jater) je nejčastější metabolickou poruchou jater. Dochází při ní k hromadění tuků, především triacylglycerolů, v hepatocytech. Normální obsah tuků v játrech je nízký (4-8%). Při steatóze se obsah tuků zvyšuje na 10-15, ale i 50%. Hlavní příčinou v civilizovaných zemích je přejídání. Jaterní steatóza koreluje s obezitou. Dalšími příčinami je alkoholismus, diabetes 2. typu, malabsorpce, malnutrice nebo toxické změny. Čistá jaterní steatóza je reverzibilní proces, který se upraví při odstranění příčiny. Při přidružení další např. zánětlivé, virové nebo toxické složky může přejít v jaterní cirhózu (Klener 2002).

Jaterní steatóza nemusí být výsledkem závažných onemocnění nebo chronického alkoholismu, na jejím vývoji se podílí i nevhodná výživa. Ve vyspělých státech se nejedná o nedostatek potravy, ale naopak o její nadbytek, případně o špatnou skladbu potravin. Běžně se konzumují potraviny s vyšším obsahem tuků a cholesterolu, živočišné bílkoviny s nadbytkem methioninu (Zavoral 2007).

Makrovezikulární steatóza (velkokapénková) vyplývá z kombinace poruch, které zahrnují vyšší přísun tuků, jejich nedostatečnou oxidaci nebo poruchu sekrece různých forem tuků v játrech. Prevalence v populaci je až 20%. U abúzu alkoholu je steatóza součástí diagnózy alkoholické choroby jater. Není-li přítomen abúzus alkoholu, jedná se o nealkoholické ztukovatění jater (Zavoral 2007).

Nealkoholické ztukovatění jater (NAFL) je hlavní příčinou nemocí souvisejících s játry a je často spojováno s obezitou a metabolickým syndromem (Pagano 2005). Je také spojené se zvýšenou úmrtností a nemocností po resekci jater (Picard 2002).

Nealkoholická steatohepatitida (NASH) je klinický syndrom steatózy a zánětlivé infiltrace jater, který může postupovat až v 20% do cirhózy včetně komplikací (Zavoral 2007). Patogeneze NASH není příliš známá. Je spojována s obezitou, diabetem mellitus II. typu a poruchou metabolismu tuků. Je důsledkem několika stupňovitého poškození. Nejprve dochází ke vzniku inzulínové rezistence a hyperglykémii, výsledkem je

steatóza jater. V dalším stupni se tvoří oxidativní stres, apoptóza hepatocytů a tím spuštění zánětlivých reakcí s postupnou fibrotizací. Leptin, cirkulující adipogenní hormon, je prokazatelně spojen s aktivitou jaterních hvězdicových buněk a fibrogenézí. Leptin je i silným mitogenem jaterních hvězdicových buněk a má na ně také antiapoptický účinek. Jaterní hvězdicové buňky jsou hlavním zdrojem nadměrného množství patologické extracelulární matrix, řady mediátorů, proteáz a jejich inhibitorů (Špičák 2008).

Mikrovezikulární steatóza (malokapénková) je většinou provázena těžší dysfunkcí jater. Jedná se o vrozené nebo získané choroby s poruchou beta-oxidace mastných kyselin např. akutní steatóza jater v těhotenství, Reyův syndrom, poruchy metabolismu urey nebo reakce na léky (Zavoral 2007).

2.7 Regenerace jater po hepatektomii

Regenerace jaterní tkáně jsou velice složité a komplikované procesy. Jedná se vlastně o kompenzační hyperplazii jater, kdy odstraněná část strukturálně nedoroste do podoby před zákrokem, ale zbylý jaterní parenchym expanduje z důvodu náhrady ztracené funkce. Nové hepatocyty pocházejí z replikujících se zbylých hepatocytů. Zdravé hepatocyty jsou většinou v klidovém stavu, nereplikují. Po částečné hepatektomii se aktivují, vstupují do mitotického cyklu a do několika dní doplní chybějící tkáň. Regenerace je řízena vzájemně se ovlivňujícími pochody cytokinů, růstových faktorů a metabolických cest (Špičák 2008).

Význam cytokinů je především v zahájení regenerace. Cytokinová kaskáda začíná vazbou TNF-alfa na receptor TNFR 1 v Kupfferových buňkách. Dochází k aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NF-kappa B) a následně tvorbě interleukinu 6. IL-6 se uvolní do okolí buňky a váže se na vlastní receptor v hepatocytech. Intracelulárně aktivuje STAT-3, který se přesune do jádra hepatocytu a zde působí na řadu genů odpovědných za regeneraci. Cytokiny jsou plně aktivní již 30 minut po resekci. Počáteční tvorba TNF-alfa je ovlivněna lipopolysacharidem a jeho vazbou na Toll-like receptor 4. TNF-alfa také aktivuje tkáňové matrix metaloproteinázy, které jsou schopny degradovat součásti extracelulární matrix a tím umožní proliferaci hepatocytů (Špičák 2008).

Steatóza sama o sobě nenarušuje regeneraci jater. Snížená regenerace jater byla pozorována u obézních potkanů, avšak samotná tuková infiltrace nemusela být příčinou.

Na snížené regeneraci mohly mít podíl i jiné faktory jako dysfunkce leptinových receptorů (Picard 2002).

2.8 Experimentální práce

Experimentální práce se zabývala otázkou, jak závažná a riziková je jaterní steatóza pro organismus, zda může vést ke zpomalení a oddálení jaterní regenerace. Toto zjištění má význam v klinické medicíně pro posouzení rizika rozsáhlé resekce jater u pacientů s jaterní steatózou určité etiologie. Problém také nepřímo souvisí s rozhodováním o vhodnosti použití steatotických jater k transplantaci. Cílem pokusu bylo navodit steatózu jater u dvou různých druhů potkanů podáváním speciálních diet a zhodnotit schopnost jater regenerovat po částečné hepatektomii (Hrubá 2007).

2.8.1 Navození steatózy

Schopnost jater regenerovat po částečné hepatektomii byla určována u potkanů kmene Wistar a Pražských hereditárních hypercholesterolemických potkanů živených dietami, které způsobují steatózu. Jako kontrolní dieta byla užitá standardní laboratorní dieta. Jako steatózu indukující diety byly užitý:

- standardní laboratorní dieta se zvýšeným obsahem cholesterolu (4% cholesterolu) - steatóza se vytváří převážně z cholesterolu. Tato dieta demonstruje změny jaterní tkáně při nadbytku cholesterolu podobně jako u lidí (Hrubá 2007).
- methionin cholin deficitní dieta – tato dieta demonstruje stav malnutrice, kdy do organismu není doplňován cholin a pouze v omezené míře methionin. Cholin je jedním ze stavebních kamenů buněčných a organelových stěn. Je nutný pro tvorbu fosfatidylcholinu, který je esenciální pro produkci VLDL. Absence cholinu v dietě působí, že hepatocyty netvoří VLDL a tím je poškozena exocytóza triacylglycerolů, což vede k jejich hromadění (Nakano 1997).
- dieta s vyšším obsahem kyseliny orotové (4%) – kyselina orotová způsobuje poškození mitochondriální beta oxidace mastných kyselin a je příčinou mikrovezikulární steatózy u potkanů (Rifai 1994). Zabraňuje exportu nově syntetizovaných jaterních lipoproteinů z jater (Hebbachi 1997). To vede

ke značnému ukládání jaterních triacylglycerolů a volných mastných kyselin (Su 2005).

Diety měly stejný obsah tuků (5,5% kukuřičného oleje) a byl sledován efekt nadbytku nebo nedostatku jednotlivých komponentů. V rámci celé studie byla provedena laboratorní vyšetření zaměřená na metabolismus cholesterolu, triacylglycerolů a funkce jaterní tkáně. Intenzita jaterní regenerace byla hodnocena na základě inkorporace ³H-thimidinu. Ze vzorků jaterní tkáně byla provedena také histologická vyšetření (Hrubá 2007).

Steatóza navozená dietními vlivy může vést k zásadnímu zpomalení a oddálení jaterní regenerace, zejména u kmene Pražských hereditárně hypercholesterolemických potkanů, u kterých se nepředpokládá porucha receptoru pro leptin a jejich metabolismus lipidů je bližší metabolismu lidí ve srovnání s potkany kmene Wistar (Hrubá 2007).

2.8.2 Laboratorní potkani

Pokusy byly provedeny na potkanech – na samcích kmene Wistar a kmene Pražských hereditárních hypercholesterolemických potkanů. Potkani byli chováni a všechny zákroky na nich byly vykonány na pracovišti Radioizotopové laboratoře a vivárium Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Bylo použito celkem 8 skupin po 16 zvířatech. Potkani byli ustájeni za standardních podmínek v plastických klecích po pěti kusech. Byli chováni v klimatizovaných prostorech za standardní teploty 22±2°C, 12 hodin světla a 12 hodin tmy, vzdušné vlhkosti 30-70 %. Krmeni byli dietami *ad libitum* po dobu 29 dní. Přístup k pitné vodě měli také *ad libitum*. Během pokusu byly sledovány tělesné hmotnosti potkanů a spotřeba stravy. V 25. dnu byly provedeny kontrolní odběry séra. Částečná hepatektomie byla vykonána po 28. dni experimentu. Jednu hodinu před usmrcením byl aplikován i.v. ³H-thymidin. Potkani byli usmrceni vykrvácením z bifurkace břišní aorty s odběrem systémové krve a následně všech orgánů za 18 a 24 hodin po částečné hepatektomii. Veškeré operační zákroky na potkanech byly provedeny ve funkční digestoři v etherové anestézii (Hrubá 2007).

2.8.3 Zpracování jaterní tkáně

- Z jater potkana odvážen 1g, který byl homogenizován ve dvojnásobném množství fyziologického roztoku.
- Jaterní tkáň pro histopatologické vyšetření byla odebírána z jednoho standardního místa a fixována v 10% formalinu. Zhotovené 3 μm parafinové řezy obarveny v hematoxylin-eozinu (Hrubá 2007).

3. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo stanovení cytokinů TNF-alfa, IL-6 a leptinu pomocí ELISA testů v supernatantu homogenátu jaterní tkáně u potkanů před provedením částečné hepatektomie. Tato stanovení byla prováděna v rámci rozsáhlých pokusů zaměřených na schopnost jater regenerovat po indukci steatózy. Pro zasazení výsledků vyšetření do kontextu experimentů jsme použili některé výsledky řešitelů programového projektu IGA NR/8500-3 s jejich souhlasem, což je v dalším textu jasně vymezeno.

4. Metodická část

Stanovení cytokinů TNF-alfa, IL-6 a leptinu v supernatantu homogenátu jaterní tkáně potkanů před částečnou hepatektomií bylo provedeno na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové.

4.1 Přístroje

Centrifuga (Heraeus Labofuge)

ELISA reader Power Wave XS (Bio-Tek)

4.2 Stanovení TNF-alfa

Na stanovení TNF-alfa v homogenátu jater z potkana byl použit TNF- α , Rat, Biotrak ELISA system (RPN2744) pro 96 vyšetření prováděných na mikrotitrační destičce.

Výrobce: GE Healthcare UK Limited

Amersham Place

Little Chalfont, Buckinghamshire

HP7 9NA, UK

4.2.1 Princip

Standardy nebo vzorky obsahující TNF- α reagují s protilátkou zachycenou na mikrotitrační destičce. Po inkubaci a promytí jamek je následně přidána biotinylovaná protilátka. Po inkubaci je mikrotitrační destička opět promyta. Pak je přidán streptavidin s peroxidázou, po inkubaci je destička opět promyta. Po přidavku substrátu a inkubaci se vytvoří barevná reakce. Reakce je zastavena stop činidlem a mikrotitrační destička je pak proměřena při příslušné vlnové délce. Množství změněného substrátu je zjištěno změřením absorbance. Přesná hodnota koncentrace TNF- α ve vzorku se odečte z kalibrační křivky.

4.2.2 Obsah kitu

- Protilátka Anti-Rat TNF- α navázaná v 96 jamkách mikrodestičky
- Standard Rat TNF- α : 2 lahvičky s lyofilizovaným materiálem
- Standard Diluent: 1 lahvička s 25 ml dilačního roztoku standardu
- Pre-Treatment Buffer: 1 lahvička s 6 ml roztoku přípravného pufru
- Biotinylated Antibody Reagent: 1 lahvička s 6 ml činidla biotinylované protilátky
- Streptavidin-HRP Reagent: 1 lahvička s 14 ml roztoku streptavidin-peroxidázou
- TMB Substrate Solution: 1 lahvička s 13 ml substrátu tetramethylbenzidinu (TMB)
- 30xWash Buffer: 1 lahvička s 30x koncentrovaným promývacím pufrem
- Stop Solution: 1 lahvička s 13 ml zastavovacího roztoku (0,18 M kyselina sírová)
- 6 ks přilnavých fólií

Stabilita: do doby expirace při 2-8 °C.

4.2.3 Pomůcky

- přesné pipety pro objemy 5 – 1000 μ l
- pipety pro objemy 5 – 15 ml
- deionizovaná voda
- skleněná nebo plastová dvoulitrová nádoba pro přípravu promývacího pufru
- 1,5 ml polypropylenové zkumavky pro přípravu standard
- ELISA reader pro měření absorbance při 450 nm a 550 nm

4.2.4 Uchovávání a příprava vzorků

Před stanovením mohou být vzorky uchovávány při 2-8 °C jen 2 hodiny, pro delší skladování je nutné jejich zamražení na -70 °C. Vzorky nesmí být vícenásobně rozmrazovány. Před analýzou se vzorky nechají postupně rozmrazit při pokojové teplotě.

Homogenáty byly centrifugovány do stavu vhodného k pipetování při 3000 otáčkách po dobu 10 minut. Centrifuga byla předem vychlazena na 10 °C.

Vzorky před analýzou nejprve 1:1 naředěny. Do zkumavky napipetováno 100 µl dilučního roztoku standard a přidáno 100 µl supernatantu a dobře promícháno.

4.2.5 Příprava reagensí

- Promývací roztok

Obsah lahvičky s koncentrovaným promývacím roztokem byl beze ztrát převeden do označené lahve s 1500 µl deionizované vody a pečlivě promíchán.

- Příprava standard

Standard rozpuštěn v deionizované vodě. Objem uveden na štítku lahvičky. Po rozpuštění přibližně za 1 minutu obsah lahvičky jemně promíchán. Pro naředění kalibrační křivky označeno 6 zkumavek pro každý bod kalibrace:

2500 pg/ml, 833 pg/ml, 278 pg/ml, 93 pg/ml, 31 pg/ml a 0 pg/ml.

Ředění pro kalibrační křivku provedeno takto: do každé označené zkumavky napipetováno 600 µl dilučního roztoku. Do první zkumavky 120 µl rozpuštěného standardu a promícháno, získaná koncentrace byla 2500 pg/ml. Z této zkumavky do další zkumavky v řadě napipetováno 300 µl, získaná koncentrace byla 833 pg/ml, totéž opakováno i do dalších třech zkumavek, získané koncentrace byly 278, 93, 31 pg/ml. V poslední zkumavce byl jen pufr (0 pg/ml).

4.2.6 Vlastní provedení

- Veškeré potřebné materiály 30 minut před analýzou temperovány na pokojovou teplotu.
- Všechny standardy a vzorky provedeny v duplikátech.
- Napipetováno 50 µl přípravného pufru do každé jamky.
- Napipetováno 50 µl naředěného kalibračního bodu do příslušných jamek.
- Napipetováno 50 µl naředěného vzorku do určených jamek.
- Několikrát zamícháno poklepnutím na destičku.
- Napipetováno 50 µl dilučního roztoku do jamek na pozici A1 a A2.
- Destička přikryta folií, utěsněna a inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě.

- Opatrně odkryta fólie. Po inkubaci odstraněn obsah v jamkách, následuje promytí 3x promývacím roztokem: každá jamka zcela naplněna promývacím roztokem, poté obsah odsát. Případný zbylý promývací roztok po posledním odsátí odstraněn opatrným otočením a přitisknutím desky na savý papír.
- Napipetováno 50 μ l činidla s biotinylovou protilátkou do každé jamky.
- Destičku přikryta novou folií, utěsněna a inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě.
- Opatrně odkryta fólie. Po inkubaci odstraněn obsah v jamkách, následuje promytí 3x promývacím roztokem: každá jamka zcela naplněna promývacím roztokem, poté obsah odsát. Po třetím promytí a odsátí zbylá tekutina odstraněna otočením desky a přitisknutím na adsorpční papír.
- Přidáno 100 μ l roztoku streptavidin-HRP do každé jamky.
- Destičku přikryta novou folií, utěsněna a inkubována 30 minut při pokojové teplotě.
- Opatrně odkryta fólie. Po inkubaci odstraněn obsah v jamkách, následuje promytí 3x promývacím roztokem: každá jamka zcela naplněna promývacím roztokem, poté obsah odsát. Po třetím promytí a odsátí zbylá tekutina odstraněna otočením desky a přitisknutím na adsorpční papír.
- Přidáno 100 μ l TMB substrátu do každé jamky. Dochází k vývinu modře zbarveného komplexu.
- Následovala 10 minutová inkubace ve tmě při pokojové teplotě.
- Přidáno 100 μ l zastavovacího roztoku do každé jamky. Modré zbarvení přechází do žluté.
- Do 30 minut po přidání zastavovacího roztoku nutno změřit absorbance při 450 nm a 550 nm.
- Hodnoty změřené při 550 nm odečteny od hodnot změřených při 450 nm. Toto odečítání při dvou vlnových je vhodné pro eliminaci optických nedokonalostí mikrodestiček. Jestliže vlnová délka 550 nm není k dispozici, odečtení absorbance se provádí jen při 450 nm.

4.2.7 Vyhodnocení

Měření intenzity výsledných absorbancí, hodnocení a výpočet výsledků z kalibrační křivky provedeno ELISA readrem. Udělána korekce $A_{450} - A_{550}$.

Výsledky u vzorků vynásobeny 2x (počáteční ředění 1:1).

Minimální detekční mez: 15 pg/ml.

Rozsah stanovení: 31 – 2500 pg/ml.

4.3 Stanovení interleukinu-6

Na stanovení interleukiny-6 v homogenátu jater z potkana byl použit IL-6, Rat, Biotrak ELISA system (RPN2742) pro 96 vyšetření prováděných na mikrotitrační destičce.

Výrobce: GE Healthcare UK Limited

Amersham Place

Little Chalfont, Buckinghamshire

HP7 9NA, UK

4.3.1 Princip stanovení

Standardy nebo vzorky obsahující IL-6 reagují s protilátkou zachycenou na mikrotitrační destičce. Po inkubaci a vymytí jamek je následně přidána biotinylovaná protilátka. Po inkubaci je mikrotitrační destička opět promyta. Pak je přidán streptavidin s peroxidázou, po inkubaci je destička opět promyta. Po přidavku substrátu a inkubaci se vytvoří barevná reakce. Reakce je zastavena stop činidlem a mikrotitrační destička je pak proměřena při příslušné vlnové délce. Množství změněného substrátu je zjištěno změřením absorpance. Přesná hodnota koncentrace IL-6 ve vzorku se odečte z kalibrační křivky.

4.3.2 Obsah kitu

- Protilátka Anti-Rat IL-6 navázaná v 96 jamkách mikrodestičky
- Recombinant Rat IL-6 Standard: 2 lahvičky s lyofilizovaným materiálem

- Sample Diluent: 1 lahvička s 12 ml dilučního roztoku vzorků
- Biotinylated Antibody Reagent: 1 lahvička s 12 ml činidla biotinylované protilátky
- Streptavidin-HRP Concentrate: 1 lahvička s 0,075 ml roztoku streptavidin-peroxidázou
- Streptavidin-HRP Dilution Buffer: 1 lahvička s 13 ml pufru pro ředění koncentráту streptavidinu
- TMB Substrate Solution: 1 lahvička s 12 ml roztoku tetramethylbenzidinu (TMB)
- 30xWash Buffer: 1 lahvička s 50 ml 30x koncentrovaného promývacího pufru
- Stop Solution: 1 lahvička s 13 ml zastavovacího roztoku (0,18 M kyselina sírová)
- 6 ks přilnavých fólií

Stabilita: do doby expirace při 2-8 °C.

4.3.3 Pomůcky

- přesné pipety pro objemy 5 – 1000 μ l
- pipety pro objemy 5 – 15 ml
- deionizovaná voda pro přípravu promývacího roztoku a rozpuštění lyofilizátu standardu
- skleněná nebo plastová dvoulitrová nádoba pro přípravu promývacího roztoku
- 1,5 ml polypropylenové zkumavky pro přípravu standard
- 15 ml plastová zkumavka pro přípravu pracovního roztoku streptavidinu-HRP
- ELISA reader pro měření absorbance při 450 nm a 550 nm

4.3.4 Uchovávání a příprava vzorků

Před stanovením mohou být vzorky uchovávány při 2-8 °C 24 hodin, pro delší skladování je nutné jejich zamražení na -70 °C. Vzorky nesmí být vícenásobně rozmrazovány. Před analýzou se vzorky nechají postupně rozmrazit při pokojové teplotě.

Homogenáty byly centrifugovány do stavu vhodného k pipetování při 3000 otáčkách po dobu 10 minut. Centrifuga byla předem vychlazená na 10 °C.

4.3.5 Příprava reagensů

- Promývací roztok

Obsah lahvičky s koncentrovaným promývacím roztokem byl beze ztrát převeden do označené lahve s 1500 µl deionizované vody a pečlivě promíchán.

- Příprava standard

Standard byl rozpuštěn v deionizované vodě. Objem rozpouštědla uveden na štítku lahvičky, obsah lahvičky jemně promíchán do jeho kompletního rozpuštění. Pro geometrické ředění kalibrační řady použit diluční roztok vzorků.

Označeno 8 zkumavek pro každý kalibrační bod:

2000, 1000, 500, 250, 125, 62, 31 a 0 pg/ml.

Kalibrační řada byla připravena podle následujícího ředění: napipetováno do každé označené zkumavky 150 µl dilučního roztoku vzorků. Do první zkumavky napipetováno 150 µl rozpuštěného standardu a dobře promícháno, získaná koncentrace byla 2000 pg/ml. Pak z této zkumavky přeneseno 150 µl do sousední zkumavky a promícháno, získaná koncentrace byla 1000 pg/ml a stejným způsobem a pokračováno až k předposlední zkumavce označené 31 pg/ml, v poslední 0 pg/ml byl jen diluční roztok.

- Příprava streptavidin-HRP roztoku

Tento roztok se nepřipravuje dříve než 15 minut před použitím. Odpipetováno 30 µl streptavidinového koncentrátu do plastové zkumavky a přidáno 12 ml dilučního pufru pro streptavidin a důkladně, ale jemně promícháno.

4.3.6 Vlastní provedení

- Veškeré potřebné materiály 30 minut před analýzou temperovány na pokojovou teplotu.
- Všechny standardy a vzorky provedeny v duplikátech.

- Do každé jamky napipetováno 50 μ l dilučního roztoku vzorků, do příslušných jamek přidáno 50 μ l standardu nebo 50 μ l vzorku. Mikrodestička promíchána opatrným potřepáním.
- Destička pečlivě přikryta folií a inkubováno 2 hodiny při pokojové teplotě.
- Na konci inkubační doby opatrně sundána folie z desky a odsátím odstraněna tekutina z jamek destičky. Následovalo třikrát promytí promývacím roztokem a odsáto. Pro odstranění zbytku tekutiny byla destička po posledním odsátí opatrně otočena na savý papír.
- Do každé jamky přidáno 100 μ l roztoku biotinylované protilátky.
- Mikrodestička opět zakryta čistou folií a inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě.
- Na konci inkubační doby opatrně sundána folie z desky a odsátím odstraněna tekutina z jamek destičky. Následovalo třikrát promytí promývacím roztokem a odsáto. Pro odstranění zbytku tekutiny byla destička po posledním odsátí opatrně otočena na savý papír.
- Do každé jamky napipetováno 100 μ l předem připraveného roztoku streptavidin-HRP.
- Destička pečlivě přikryta novou folií a inkubována 30 minut při pokojové teplotě.
- Na konci inkubační doby opatrně sundána folie z desky a odsátím odstraněna tekutina z jamek destičky. Následovalo třikrát promytí promývacím roztokem a odsáto. Pro odstranění zbytku tekutiny byla destička po posledním odsátí opatrně otočena na savý papír.
- Do každé jamky pipetováno 100 μ l TMB substrátu.
- Po dobu 30 minutové inkubace při pokojové teplotě se vyvíjela barevná – modrá enzymatická reakce.
- Po 30 minutách reakce zastavena přidávkem 100 μ l stop činidla do každé jamky, modré zbarvení se změnilo ve žluté.
- Do 30 minut po přidání zastavovacího roztoku nutno změřit absorbance při 450 nm a 550 nm.
- Hodnoty změřené při 550 nm odečteny od hodnot změřených při 450 nm. Toto odečítání při dvou vlnových je vhodné pro eliminaci optických nedokonalostí

mikrodestiček. Jestliže vlnová délka 550 nm není k dispozici, odečtení absorbance se provádí jen při 450 nm.

4.3.7 Vyhodnocení

Měření intenzity výsledných absorbancí, hodnocení a výpočet výsledků z kalibrační křivky provedeno ELISA readrem. Udělána korekce $A_{450} - A_{550}$.

Detekční limit: 16 pg/ml.

Rozsah stanovení: 31 – 2000 pg/ml.

4.4 Stanovení leptinu

Na stanovení leptinu v homogenátu jater z potkana byl použit Rat Leptin EIA Kit (900-015) pro 96 vyšetření prováděných na mikrotitrační destičce.

Výrobce: Assay Designs, Inc.

800 Technology Drive

Ann Arbor, MI 48108

USA

4.4.1 Princip

Na destičce je zachycena polyklonální protilátka proti leptinu, která váže leptin ze standard nebo ze vzorku. Po krátké inkubaci je přebytek standard a vzorku odstraněn promytím, je přidána polyklonální protilátka proti leptinu označená křenovou peroxidázou. Tato značená protilátka se naváže na komplex leptin-protilátka uchycený na destičce. Po krátké inkubaci a dalším promytím je odstraněn přebytek nenavázané, značené protilátky. Po přidavku substrátu dochází k vývinu barevného komplexu s enzymem, kterým je značena protilátka. Intenzita zbarvení je změřena po 30 minutové inkubaci a je přímo úměrná koncentraci leptinu v měřených vzorcích.

4.4.2 Obsah kitu

- Mikrotitrační destička s navázanou protilátkou specifickou pro potkaní leptin

- Koncentrát protilátky značené křenovou peroxidázou, 0,4 ml
- Fosfátový pufr, 30 ml
- Ředící roztok pro značenou protilátku, 12 ml
- Koncentrát promývacího roztoku, 50 ml
- Standard, 2 lahvičky každá obsahující 3600 pg rekombinantního lyofilizátu potkaního leptinu.
- Roztok tetramethylbenzylidinu (TMB), 15 ml
- Zastavovací roztok - 1 N kyselina sírová, 10 ml
- Folie, 2 ks
- Rozpis pro ředění kalibračních bodů a orientační postup stanovení

Stabilita: do doby expirace při 4 °C.

4.4.3 Pomůcky

Potřebný materiál, který není součástí kitu

- Deionizovaná voda
- Přesné pipety 100 až 1000 µl
- Dispenszor pro dávkování 100 µl
- Nádoba pro ředění pufru
- Odměrný válec
- Inkubátor 37 °C
- ELISA reader pro proměření mikrotitračních destiček při 450 nm

4.4.4 Uchovávání a příprava vzorků

Pokud jsou vzorky analyzovány do 24 hodin, uchovávají se při 4 °C, pro delší archivaci se zamrazují na -70 °C. Vzorky nesmí být vícenásobně rozmrazovány. Před analýzou se vzorky nechají postupně rozmrazit při pokojové teplotě.

Homogenáty byly centrifugovány do stavu vhodného k pipetování při 3000 otáčkách po dobu 10 minut. Centrifuga byla předem vychlazená na 10 °C.

4.4.5 Příprava reagensí

- Promývací roztok

25 ml koncentrátu promývacího pufru naředěno přídavkem 975 ml deionizované vody.

- Rat Leptin Standard

Do lahvičky přidáno 1000 μ l deionizované vody, 5 minut ponecháno při pokojové teplotě a obsah byl opatrně promíchán. Tento roztok obsahoval 3600 pg/ml potkaního leptinu. Do 7 skleněných zkumavek napipetováno po 220 μ l fosfátového pufru. Do první 220 μ l standardu, promícháno a do další zkumavky přeneseno 220 μ l, promícháno, a takto pokračováno geometrickou řadou až k poslední zkumavce.

Získané koncentrace standard Rat Leptin (pg/ml):

1800, 900, 450, 225, 113, 56 a 28.

- Značená protilátka

Tento roztok byl připravován těsně před použitím. Obsah lahvičky s koncentrátem (400 μ l) byl beze ztrát smíchán s 11,6 ml ředícího roztoku.

4.4.6 Vlastní provedení

- Veškeré potřebné materiály 30 minut před analýzou temperovány na pokojovou teplotu.
- Všechny standardy a vzorky provedeny v duplikátech.
- Napipetováno 100 μ l fosfátového pufru do jamky pro nulový standard.
- Do příslušných jamek napipetováno 100 μ l standardy.
- Do příslušných jamek napipetováno 100 μ l vzorku.
- Jemným poklepem na destičku byl promíchán obsah jamek.
- Deska přikryta folií a inkubována 1 hodinu při 37 °C.
- Obsah jamek odstraněn a promyt přídavkem 400 μ l promývacího roztoku, toto opakováno 6x. Po posledním promytí jamky vyprázdněny, pro důkladné odstranění promývacího roztoku byla rychlým pohybem deska otočena nad savým papírem.
- Kromě blankové jamky napipetováno do všech jamek po 100 μ l připraveného roztoku značené protilátky.
- Deska přikryta a inkubována 30 minut při 37 °C.

- Obsah jamek odstraněn a promyt přidavkem 400 μ l promývacího roztoku, toto bylo opakováno 8x. Po posledním promytí jamky vyprázdněny, pro důkladné odstranění promývacího roztoku byla rychlým pohybem deska otočena nad savým papírem.
- Do každé jamky napipetováno 100 μ l TMB substrátu.
- Inkubováno 30 minut ve tmě a při pokojové teplotě.
- Pak přidáno do každé jamky 100 μ l zastavovacího roztoku.
- Absorbance změřena při 450 nm.

4.4.7 Vyhodnocení

Měření intenzity výsledných absorbancí, hodnocení a výpočet výsledků z kalibrační křivky provedeno ELISA Readrem.

Detekční limit: 15 pg/ml.

Rozsah stanovení: 28 – 1800 pg/ml.

5. Výsledky

5.1 Stanovení cytokinů

Bylo provedeno 64 stanovení TNF-alfa, IL-6 a leptinu. Všechny vzorky byly vyšetřeny duplicitně, výsledná hodnota je průměrem. Výsledky byly rozděleny podle příslušných krmných diet a podle kmene potkanů. V každé skupině byly stanoveny hodnoty od osmi potkanů.

Tab. 1 Stanovení cytokinů v supernatantu jaterních homogenátů při standardní laboratorní dietě před provedením částečné hepatektomie

Standardní laboratorní dieta					
Potkani kmene Wistar			Potkani kmene PHHC		
IL-6 pg/ml	leptin pg/ml	TNF-alfa pg/ml	IL-6 pg/ml	leptin pg/ml	TNF-alfa pg/ml
1480	140	870	285	49	472
1060	278	700	981	49	302
939	290	508	360	44	432
1300	211	880	348	76	592
994	199	888	495	49	1082
945	39	668	550	49	904
845	101	1160	353	27	878
842	162	550	473	24	604

Tab. 2 Stanovení cytokinů v supernatantu jaterních homogenátů při dietě s vyšším obsahem cholesterolu před provedením částečné hepatektomie

Dieta s vyšším obsahem cholesterolu					
Potkani kmene Wistar			Potkani kmene PHHC		
IL-6 pg/ml	leptin pg/ml	TNF-alfa pg/ml	IL-6 pg/ml	leptin pg/ml	TNF-alfa pg/ml
1140	79	734	300	32	324
628	0	744	293	37	328
1020	123	1136	134	49	332
687	39	888	191	34	356
1210	69	794	326	59	360
849	54	626	210	24	364
975	64	584	488	47	368
674	44	686	204	74	372

Tab. 3 Stanovení cytokinů v supernatantu jaterních homogenátů při methionin cholin deficitní dietě před provedením částečné hepatektomie

Methionin cholin deficitní dieta					
Potkani kmene Wistar			Potkani kmene PHHC		
IL-6 pg/ml	leptin pg/ml	TNF-alfa pg/ml	IL-6 pg/ml	leptin pg/ml	TNF-alfa pg/ml
1040	123	958	598	56	388
386	66	410	415	27	392
702	76	778	364	44	396
498	125	514	443	61	400
502	64	752	482	37	420
505	49	688	500	108	424
578	86	878	514	182	428
555	34	674	368	34	432

Tab. 4 Stanovení cytokinů v supernatantu jaterních homogenátů při dietě s vyšším obsahem kyseliny orotové před provedením částečné hepatektomie

Dieta s vyšším obsahem kyseliny orotové					
Potkani kmene Wistar			Potkani kmene PHHC		
IL-6 pg/ml	leptin pg/ml	TNF-alfa pg/ml	IL-6 pg/ml	leptin pg/ml	TNF-alfa pg/ml
368	24	920	135	44	452
236	42	576	131	17	456
148	27	322	344	71	460
157	17	270	58	101	464
110	61	166	680	512	484
322	184	488	257	461	488
355	130	488	440	647	492
219	76	524	55	467	496

Vysvětlivky k následujícím grafům:

W – kmen Wistar

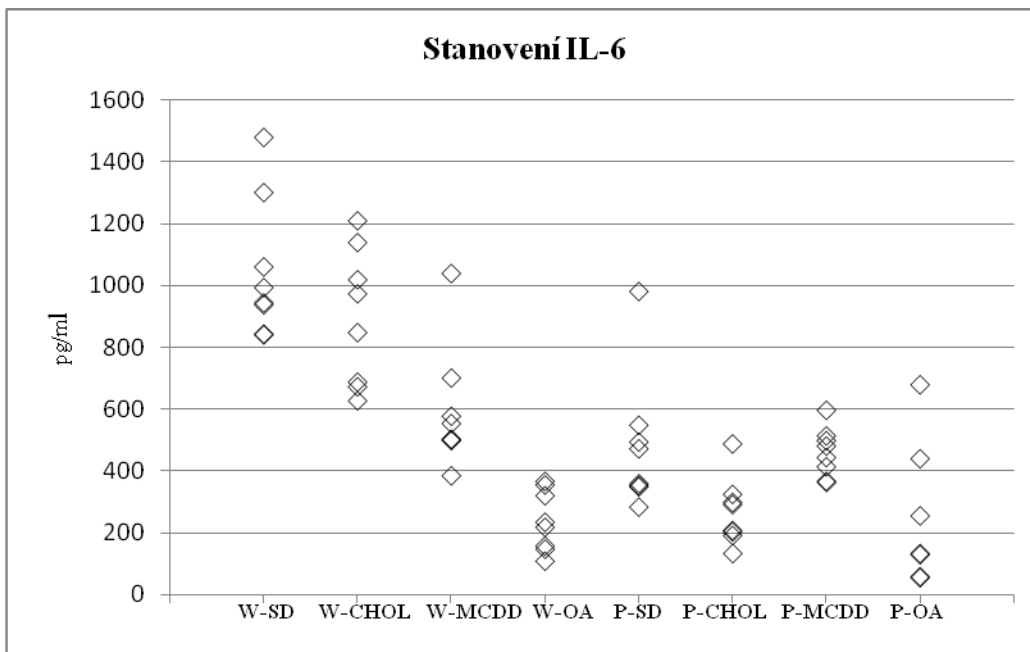
P – kmen Pražský hereditární hypercholesterolemický potkan

SD – standardní laboratorní dieta

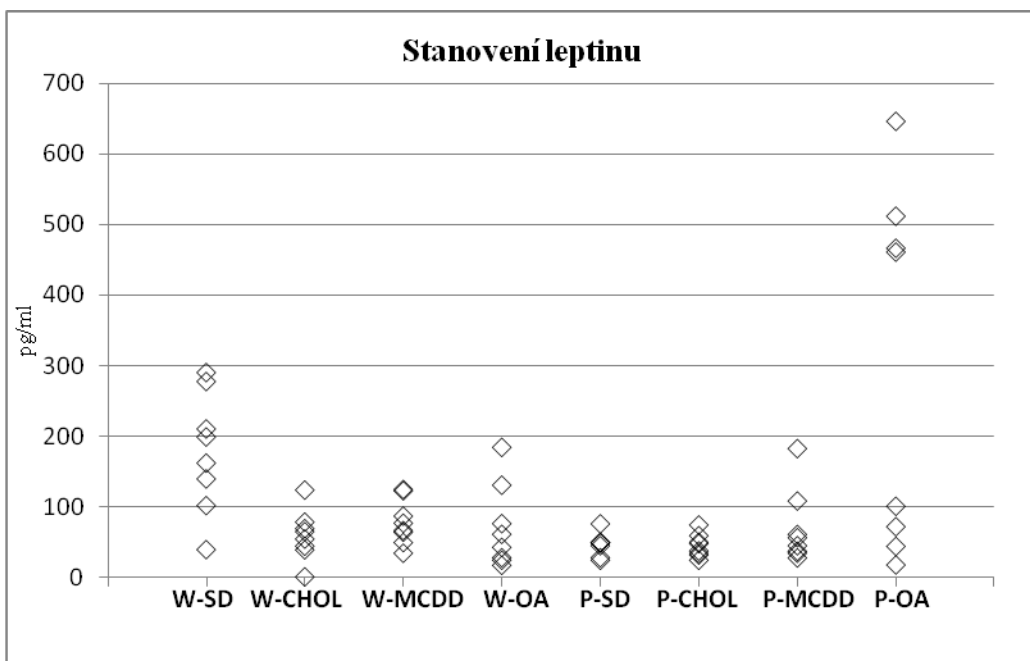
CHOL – dieta obohacená o cholesterol

OA – dieta s obsahem kyseliny orotové

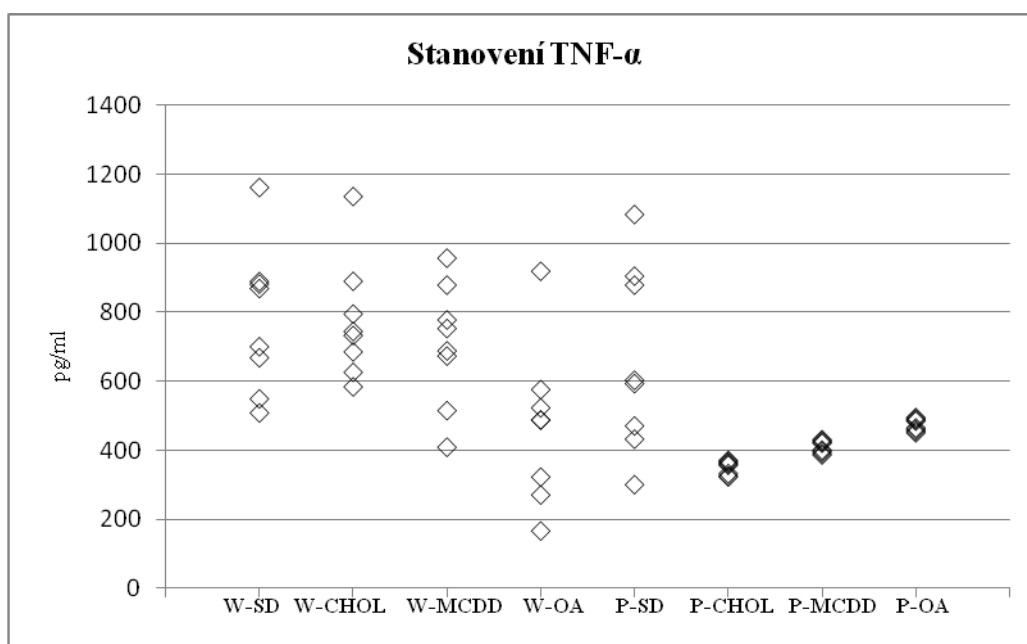
MCDD – methionin a cholin deficitní dieta



Obr. 1 Naměřené hodnoty IL-6 v supernatantu homogenátu jater před provedením částečné hepatektomie



Obr. 2 Naměřené hodnoty leptinu v supernatantu homogenátu jater před provedením částečné hepatektomie



Obr. 3 Naměřené hodnoty TNF-alfa v supernatantu homogenátu jater před provedením částečné hepatektomie

Na statistickou analýzu byl použit softwaru SigmaStat 3.1 Jandel Scientific® (San Rafael, CA, USA). Byl proveden nepárový t-test. Získané výsledky byly porovnávány s koncentracemi cytokinů kontrolních skupin potkanů kmene Wistar a kmene PHHP, kteří byli krmeni standardní laboratorní dietou. Hodnota $P < 0,05$ vyjadřuje statistickou významnost rozdílů srovnávaných skupin.

Tab. 5 Statistické zpracování naměřených koncentrací IL-6

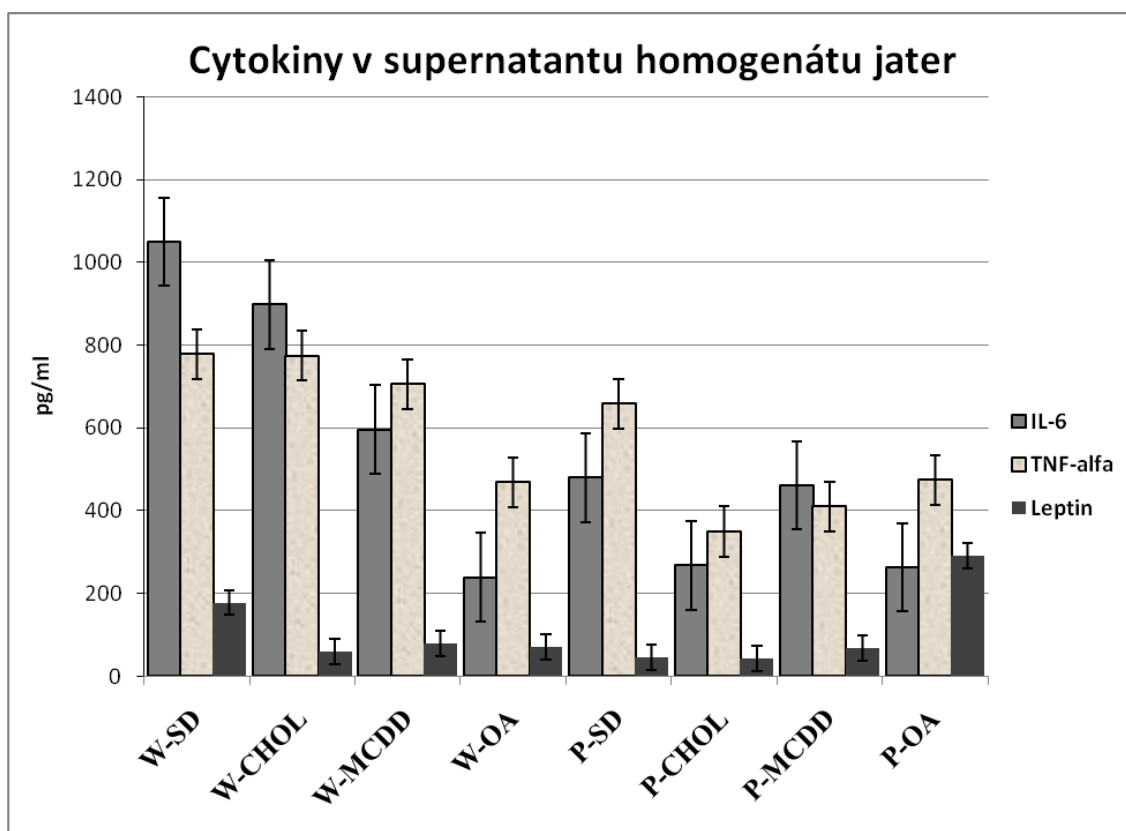
IL-6	Průměr	Směrodatná odchylna	Standardní deviace	Hodnota P
W-SD	1050	212	227	
W-CHOL	898	208	223	0,195
W-MCDD	596	187	200	< 0,001
W-OA	239	93	99	< 0,001
P-SD	480	207	221	
P-CHOL	268	103	110	0,029
P-MCDD	461	74	79	0,812
P-OA	263	20	217	0,067

Tab. 6 Statistické zpracování naměřených koncentrací TNF-alfa

TNF-α	Průměr	Směrodatná odchylna	Standardní deviace	Hodnota P
W-SD	778	200	214	
W-CHOL	774	163	174	0,968
W-MCDD	706	168	180	0,481
W-OA	469	216	230	0,015
P-SD	658	252	269	
P-CHOL	350	18	19	0,006
P-MCDD	410	17	18	0,021
P-OA	474	17	18	0,074

Tab. 7 Statistické zpracování naměřených koncentrací leptinu

Leptin	Průměr	Směrodatná odchylna	Standardní deviace	Hodnota P
W-SD	178	80	85	
W-CHOL	59	33	35	0,003
W-MCDD	78	30	32	0,008
W-OA	70	55	59	0,011
P-SD	46	15	16	
P-CHOL	44	15	16	0,853
P-MCDD	69	49	52	0,258
P-OA	290	239	255	0,017



Obr. 4 Průměrné hodnoty cytokinů v supernatantu homogenátu jater před provedením částečné hepatektomie

Získané výsledky byly porovnávány s koncentracemi cytokinů kontrolních skupin potkanů kmene Wistar a kmene PHHP, kteří byli krmeni standardní laboratorní dietou. U kontrolní skupiny potkanů kmene Wistar byly koncentrace IL-6, leptinu i TNF-alfa v supernatantu homogenátu jaterní tkáně vyšší oproti kontrolní skupině potkanů kmene PHHP.

Příjem steatogenních diet vedl spíše k poklesu IL-6 u všech souborů potkanů. Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán u kmene Wistar s dietou methionin cholin deficitní a u diety s kyselinou orotovou. U kmene PHHP bylo statisticky významné snížení pouze u cholesterolové diety.

Koncentrace leptinu byly signifikantně nižší u všech diet potkanů kmene Wistar oproti kontrolám. U kmene PHHP podávání orotové kyseliny vedlo statisticky významně ke zvýšení hodnoty leptinu.

Přijímání diet vyvolávajících steatózu vedlo k poklesu koncentrací TNF-alfa v jaterní tkáni vzhledem ke kontrolním skupinám. Signifikantní rozdíl byl u kmene Wistar pouze při dietě s kyselinou orotovou. U potkanů kmene PHHP vedla ke statisticky významnému snížení cholesterolová a methionin cholin deficitní dieta (u skupin P-CHOL, P-MCDD a P-OA byly naměřené hodnoty velmi homogenní).

5.2 Stanovení obsahu a syntézy jaterních DNA

Stanovení obsahu a syntézy jaterních DNA i histologické vyšetření jaterní tkáně prováděla jiná výzkumná skupina. Výsledky jsou přesto zde uváděny, aby bylo možno posoudit stupeň steatózy, koncentrace stanovovaných cytokinů před částečnou hepatektomií a schopnost jater regenerovat.

U všech experimentálních diet byla vyšší syntéza jaterních DNA v intaktních játrech, což nasvědčuje jejich poškozování a stále probíhající reparaci až regeneraci jaterní tkáně. Nižší celkový obsah jaterních DNA svědčí o zvětšení objemu hepatocytů, což bylo zjištěno především u potkanů s dietou OA a CHOL. Naopak vyšší celkový obsah jaterních DNA u potkanů MCCD svědčí o dystrofických změnách v jaterní tkáni (Hrubá 2007).

Tab. 5 Obsah a syntéza jaterních DNA (Bq/mg DNA, mg DNA/g tkáně) - výsledky vyšetření jsou se souhlasem řešitelů převzaty ze závěrečné zprávy (Hrubá 2007).

	SD	CHOL	MCDD	OA
specifická aktivita DNA	0,170±0,031	0,325±0,021	0,363±0,098	0,255±0,026
celkový obsah DNA	1,680±0,036	1,480±0,130	1,880±0,071	1,460±0,140

5.3 Histologické vyšetření jaterní tkáně

Vyhodnocení histologického vyšetření jaterní tkáně

Výsledky histologických vyšetření jsou se souhlasem řešitelů převzaty ze závěrečné zprávy (Hrubá 2007).

1. skupina: Wistar potkani na standardní laboratorní dietě (W-SD)

Játra před PH - bez patologického nálezu, bez mitóz, zcela oj. hyalinní Malloryho hyalin, periportálně minimálně mikrokapénková steatóza < 10 %.

18 hodin po PH - bez patologického nálezu, bez mitóz, oj. hyalinní globulky, oj. histiocytární resorptivní uzlíky, steatóza periportálně pod 20 %.

24 hodin po PH – difúzní mikrokapénková steatóza více než 80 %, objemné eozinofilní globule intracelulárně v hepatocytech (lipoprotein?).

2. skupina: Wistar potkani na dietě obohacené o cholesterol (W-CHOL)

Játra před PH – lobulárně mikrokapénková steatóza 30 - 60 %, četné mitózy (40 v deseti zorných polích).

18 hodin po PH – ojedinělé resorptivní histiocytární uzlíky, difúzní mikrokapénková steatóza nad 80 % a velkokapénková ojediněle, 2 mitózy hepatocytů na 10 zorných polí.

24 hodin po PH – difúzní mikrokapénková steatóza hepatocytů nad 90 %, oj. eozinofilní globule, velkokapénková steatóza chybí.

3. skupina: Wistar potkani na dietě bez cholinu a methioninu (W-MCDD)

Játra před PH – eozinofilie cytoplazmy hepatocytů.

18 hodin po PH – eozinofilie cytoplazmy hepatocytů a četné resorptivní histiocytární uzlíky, mikrokapénková steatóza hepatocytů pod 60 % periportálně.

24 hodin po PH – eozinofilie cytoplazmy hepatocytů, mikrokapénková steatóza hepatocytů nad 70 % periportálně.

4. skupina: Wistar potkani na dietě obohacené o kyselinu orotovou (W-OA)

Játra před PH – difúzní mikrokapénková steatóza hepatocytů nad 70 % a zachovalé hepatocyty kolem centrální žíly.

18 hodin po PH – difúzní mikrokapénková steatóza hepatocytů nad 70 %, hojné eozinofilní globule.

24 hodin po PH – mikrokapénková steatóza nad 90 % a zánik jader hepatocytů, globule.

5. skupina: PHHP potkani na standardní laboratorní dietě (P-SD)

Játra před PH - eozinofilie cytoplazmy hepatocytů, oj. velkokapénková steatóza pod 5%.

18 hodin po PH – ojediněle velkokapénková steatóza, ojediněle eozinofilní globule.

24 hodin po PH – mikrokapénková steatóza a eozinofilní globule ojediněle.

6. skupina: PHHP potkani na dietě obohacené o cholesterol (P-CHOL)

Játra před PH – známky venostázy, bez patologických změn.

18 hodin po PH – ojediněle fokální steatóza < 5 % a oj. eozinofilní globule.

24 hodin po PH – ojediněle mikrokapénková steatóza nad 60 % a oj. eozinofilní globule.

7. skupina: PHHP potkani na dietě bez cholinu a methioninu (P-MCDD)

Játra před PH – není steatóza, dystrofické změny.

18 hodin po PH – bez steatózy a ojediněle eozinofilní globule.

24 hodin po PH – mikrokapénková steatóza pod 5 % a ojediněle eozinofilní globule.

8. skupina: PHHP potkani na dietě obohacené o kyselinu orotovou (P-OA)

Játra před PH – mikrokapénková steatóza nad 80 % hepatocytů.

18 hodin po PH – mikrokapénková steatóza nad 90 % a ojediněle eozinofilní globule, velkokapénková steatóza.

24 hodin po PH – mikrokapénková a velkokapénková steatóza nad 90 % a eozinofilní globule.

6. Diskuse

Cytokiny v supernatantu homogenátu jaterní tkáně potkanů s jaterní steatózou byly stanoveny v rámci rozsáhlého experimentu programového projektu IGA NR/8500-3, proto v této části diskutujeme získané výsledky v souvislostech celého experimentu.

Homogenizace jaterní tkáně nečiní problémy a po důkladné centrifugaci byl získán supernatant vhodný pro stanovení. Na vyšetření cytokinů byly použity komerční ELISA sety. Každý výrobce může mít rozdílné kalibrační rozmezí, některé varianty souprav jsou vysoce citlivé pro stanovení velmi nízkých koncentrací. Proto při výběru kitu musí být zohledněna volba biologického materiálu, z kterého bude měření provedeno. Na rozdíl od jiných typů biologického materiálu (sérum, plasma, moč) jsou cytokiny v homogenátech přítomny v dostatečných koncentracích, tudíž lze očekávat vyšší výsledné hodnoty a high senzitivity set by byl pro tato stanovení nevhodný. Vlastní provedení ELISA testu není složité, avšak časově i z hlediska přesnosti pipetování náročné, vyžadující pečlivé dodržení všech pokynů uvedených v příbalových letácích příslušného setu. Pokud je vše správně provedeno, kalibrace vychází bez problémů. Interference jsou nepravděpodobné, výrobce setu uvádí případné zkřížené reakce.

Diskuse vztahu cytokinů v supernatantu homogenátu jaterní tkáně a jaterní regenerace u jater potkanů s indukovanou steatózou:

- Podávání cholesterolové diety vedlo k navození jaterní steatózy, která se projevila nárůstem hmotnosti jater i změnou histologického obrazu. Potkani kmene Wistar měli zpožděný nástup jaterní syntézy DNA po částečné hepatektomii ve srovnání s potkany PHHC. Potkani živení dietou obohacenou o cholesterol měli větší spotřebu diety a zároveň nejvyšší hmotnostní přírůstky. Byla u nich zjištěna vyšší syntéza jaterních DNA, přičemž celkový obsah jaterních DNA byl nižší ve srovnání s kontrolami. Lze se domnívat, že jaterní tkáň byla vysokocholesterolovou dietou poškozována a nucena trvale k reparaci, stav byl dále provázen hepatosplenomegálií a jaterní steatózou cholesterolového typu (Hrubá 2007).

Potkani, jejichž hypercholesterolémie vznikla nadměrným příjmem cholesterolu v dietě, odpověděli na tento stav okamžitou změnou metabolismu. Došlo k poklesu syntézy v hepatocytu a nárůstu fekální exkrece žlučových kyselin (Sakono 1996), hlavně Kupfferovými buňkami (Hoekstra 2005).

Hodnoty koncentrací IL-6 u obou kmenů poklesly proti hodnotám u potkanů živených standardní laboratorní dietou, statisticky významně u kmene PHHP. Hladina leptinu byla význačně nižší pouze u kmene Wistar. U kmene PHHP zůstala na stejné úrovni. Koncentrace TNF-alfa v pokusné i kontrolní skupině u kmene Wistar se nelišila. U kmene PHHP jsme u pokusných skupin potkanů zaznamenali oproti kontrolám hodnotu TNF-alfa sníženou, rozdíl byl statisticky významný.

- Potkani živení dietou s nedostatkem methioninu a cholinu měli nejvyšší spotřebu diety. To však nebylo provázeno odpovídajícím nárůstkem tělesné hmotnosti (Hrubá 2007). Potkani s touto dietou měli nižší tělesnou hmotnost a redukci obezity, významné snížení viscerálního tuku a souběžné snížení koncentrací bazálního inzulínu, glukózy a leptinu (Malloy 2006). V našem případě byla statisticky významně nižší hodnota leptinu u kmene Wistar, avšak u kmene PHHP byla nevýznamně zvýšená oproti hodnotám leptinu u potkanů živených standardní laboratorní dietou.

V literatuře je uváděno, že podávání leptinu vedlo ke značnému poklesu viscerálního tuku a výrazně lepšímu působení inzulínu. Leptin má vliv na expresi genů důležitých jaterních enzymů, které se účastní obrany proti nadměrnému ukládání energie do tukových zásob (Barzilai 1997). Změny jaterní tkáně zjištěné u potkanů s MCCD dietou budou podpořeny efektem leptinu, který hraje roli zprostředkovatele v patofyziologii cholelithiázy a jaterní steatózy s přidruženými zánětlivými procesy (Mendez-Sanchez 2005).

Pod vlivem diety došlo ke zvýšení jaterní syntézy DNA. Intaktní játra byla tedy mírně poškozována dietou, neboť cholin deficiencie způsobuje nejenom ztukovatění jater, ale také vzestup hladiny 1,2-diacylglycerolu v játrech a jaterní poškození (Da Costa 1993).

Koncentrace IL-6 u kmene Wistar byly statisticky významně sníženy, u kmene PHHP zůstaly na stejné úrovni jako hodnoty u potkanů živených standardní laboratorní dietou. Hladina TNF-alfa byla u kmene Wistar nevýznamně nižší, avšak u kmene PHHP bylo oproti kontrolní skupině snížení statisticky významné.

- U potkanů živených dietou obohacenou o kyselinu orotovou byla nejnižší spotřeba diety provázená také nejmenším nárůstkem tělesné hmotnosti (Hrubá 2007). Během hromadění lipidů v játrech vyvolané dietou klesá transport

triacylglycerolů s VLDL lipoproteiny z jater do séra (Hebbachi 1997). V experimentu se tento stav projevil nálezem nižšího celkového obsahu DNA v játrech. Dieta s kyselinou orotovou významně zvyšuje enzymy, které mají vliv na rychlost syntézy triacylglycerolů (Buang 2005), způsobuje lipidovou infiltraci stimulací intrahepatální syntézy lipidů a zabránění transportu lipoproteinů přes Golgiho aparát. To vede k rozsáhlému ukládání jaterních triacylglycerolů a volných mastných kyselin (Su 2005). Další účinek kyseliny orotové je zvyšování úrovně superoxidového aniontu v játrech a pokles jaterní superoxid dismutasy provázené jaterním poškozením (Aoyama 2001). U *in vitro* hepatocytů z potkanů krmených dietou s kyselinou orotovou byla výrazně nižší TAG lipolýza, reesterifikace a sekrece VLDL (Hebbachi 1997). Z literatury tedy vyplývá, že kyselina orotová poškozuje jaterní tkáň, která reaguje zvýšenou mitotickou aktivitou, vyšší syntézou jaterních DNA.

Koncentrace IL-6 u obou kmenů potkanů byly sníženy, zvláště u kmene Wistar byl rozdíl statisticky významný oproti hodnotám u potkanů živěných standardní laboratorní dietou. Hladina TNF-alfa byla u kmene Wistar významně nižší avšak u kmene PHHP bylo snížení nevýznačné vůči kontrolním skupinám potkanů. Koncentrace leptinu byla u kmene Wistar také významně nižší a naopak u kmene PHHP došlo ke statisticky významnému zvýšení vzhledem ke kontrolám.

Dietně navozená jaterní steatóza vede k oddálení iniciace jaterní regenerace po částečné hepatektomii u obou kmenů potkanů, v pozdějších fázích však regenerace uspokojivě probíhá. Chirurgické zákroky na steatotických játrech nebo užití takto postižených jater k transplantaci však bude vždy spojeno s větším rizikem pro pacienty (Hrubá 2007).

7. Závěr

Hlavním cílem práce bylo stanovit koncentrace interleukiny-6, TNF-alfa a leptinu v supernatantu homogenátu jaterní tkáně u potkanů s jaterní steatózou před částečnou hepatektomií. Nejčastěji jsou měřeny hladiny cytokinů v plazmě, proto stanovení v homogenátu jaterní tkáně není obvyklé. Výsledky jsou značně závislé na podmínkách preanalytické přípravy vzorku, výběru vhodného kitu a na provedení příslušného stanovení. Preanalytické zpracování je složitější než u plazmy. S výběrem patřičného setu souvisí určení rozmezí očekávaných hodnot, což může být někdy obtížné. Avšak předpokládali jsme, že cytokiny v supernatantu homogenátu jater potkanů budou v dostatečných koncentracích, což bylo také potvrzeno. Naměřené hodnoty se nacházely v kalibračních rozmezích. Získané výsledky byly porovnávány s koncentracemi cytokinů kontrolních skupin potkanů kmene Wistar a kmene PHHP, kteří byli krmeni standardní laboratorní dietou.

8. Zkratky

Ab	protilátka
Ag	antigen
BCFS	B buňky stimulující faktor
CRP	C-reaktivní protein
CSF	faktor stimulující kolonie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	enzymová imunoanalýza na imunosorbentech
EPO	erytropoetin
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů
HPGF	Hybridoma plasmocytoma growth factor
CHOL	dieta obohacená o cholesterol
IL	interleukin
INF	interferon
IRMA	imunoradiometrická analýza
LIF	faktor inhibující leukémii
MCDD	methionin a cholin deficitní dieta
M-CSF	faktor stimulující kolonie monocytů
MIS	Mullerian-inhibiting substance
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAFL	nealkoholické ztukovatění jater
NASH	nealkoholická steatohepatitida
NF-kappa B	nukleární faktor kappa B
NGF	nervový růstový faktor
OA	dieta s obsahem kyseliny orotové
PH	částečná hepatektomie
PHHP	kmen Pražský hereditární hypercholesterolemický potkan
RANTES	regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
RIA	radioimunoanalýza
SD	standardní laboratorní dieta

SCF	růstový faktor kmenových buněk
Ser	serin
STAT-3	Signal transducer and activator 3
TAG	triacylglycerol
TGF	transformující růstový faktor
TMB	tetramethylbenzidinu
TNF	tumor nekrotizující faktor
TNFR	receptor pro tumor nekrotizující faktor alfa
Trp	tryptofan
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
W	kmen potkanů Wistar

9. Literatura

- 1) Alessenko A.V., Platonova L.V., Sakevarashvili G.R., Khrenov A.V., Shingarova L.N., Shono N.I., Galperin E.I. (1999) Role of endogenous TNF-alpha and sphingosine in induced DNA synthesis in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochemistry*. 64(8), 890-895.
- 2) Ambrosino G., Naso A., Feltracco P., Carraro P., Basso S.M., Varotto S., Cillo U., Zanus G., Boccagni P., Brolese A., Plebani M., Giron G., D'Amico D.F. (2003) Cytokines and liver failure: modification of TNF- and IL-6 in patients with acute on chronic liver decompensation treated with Molecular Adsorbent Recycling System (MARS). *Acta Biomed*. 2, 7-9.
- 3) Aoyama Y., Wada M., Morifuji M. (2001) Orotic acid addend to casein, but not to egg protein, or wheat gluten diets increases 1,2-diacylglycerol levels and lowers superoxide dismutase activities in rat liver. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 65, 2166-2173.
- 4) Bartůňková J., Paulík M. a kol. (2005) *Vyšetřovací metody v imunologii*. Grada Publishing, Praha, str. 53 – 56.
- 5) Barzilai N., Wang J., Massillon D., Vuguin P., Hawkins M., Rossetti L. (1997) Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J. Clin. Invest.*, 100(12), 3105-3110.
- 6) Befekadu G., Kovar J., Poledne R. (1992) High sensitivity of PHHP rat to dietary cholesterol. *Physiol. Res*. 41(4), 263-266.
- 7) Buang Y., Wang Y.M., Cha J.Y. et al. (2005) Dietary phosphatidylcholine alleviates fatty liver in mice by orotic acid. *Nutrition*. 21, 867- 873.
- 8) Budayová E., Buchta V., Drahošová M., Förstl M., Krejsek J., Medňanský M., Plíšková L. (2004) *Vyšetřovací metody v klinické mikrobiologii a klinické imunologii*. SZŠ a VZŠ, Hradec Králové, str. 56 – 57.
- 9) Cohen B., Novick D. and Rubinstein M. (1996) Modulation of insulin activities by leptin. *Science*. 274, 1185-1188.
- 10) Compton S.R., Ball-Goodrich L.J., Zeiss C.J., Johnson L.K., Johnson E.A., Macy J.D. (2003) Pathogenesis of mouse hepatitis virus infection in gamma interferon-deficient mice is modulated by co-infection with *Helicobacter hepaticus*. *Comp. Med*. 53(2), 197-206.

- 11) Da Costa K.A., Cochary E.F., Blusztajn J.K., Garner S.C., Zeisel S.H. (1993) Accumulation of 1,2-diacylglycerol with increased membrane-associated protein kinase C may be the mechanism for spontaneous hepatocarcinogenesis in choline deficient rats. *J. Biol. Chem.* 268(3), 2100-2105.
- 12) Diehl A.M., Rai R. (1996) Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 11(5), 466-470.
- 13) Galun E., Zeira E., Pappo O., Peters M, Rose-John S. (2000) Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *FASEB. J.* 14(13), 1979-1987.
- 14) Gurlich R., Maruna P., Owen K. (2002) Cytokines in pathogenesis of serious post-surgical conditions. *Karolinum*, 57 stran
- 15) Hamann A., Matthaei S. (1996) Regulation of energy balance by leptin. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 104, 293-300.
- 16) Hayashi H., Nagaki M., Imose M., Osawa Y., Kimura K., Takai S., Imao M., Naiki T., Kato T., Moriwaki H. (2005) Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Liver Int.* 25(1), 162-170.
- 17) Hebbachi A.M., Seelaender M.C., Baker B.W., Gibbons G.F. (1997) Decreased secretion of very-low-density lipoprotein triacylglycerol and apolipoprotein B is associated with decreased intracellular triacylglycerol lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n-3 fatty acids. *Biochem. J.* 325, 711-719.
- 18) Hoekstra M., Out R., Kruijt J.K., Van Eck M., Van Berkel T.J. (2005) Diet induced regulation of genes involved in cholesterol metabolism in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J. Hepatol.* 42, 400-407.
- 19) Hořejší V., Bartůňková J. (2005) *Základy imunologie*. Triton, Praha, str. 95-138.
- 20) Hrubá P., Živný P., Živná H., Feřtek D., Palička V. (2007) Vliv steatózy jater na jejich regenerační schopnost po provedení částečné hepatektomie. Experimentální studie. Závěrečná zpráva. Fakultní nemocnice, Hradec Králové, str. 2-25.
- 21) Cheung A.T., Wang J., Ree D., Kolls J.K., Bryer-Ash M. (2000) Tumor necrosis factor-alpha induces hepatic insulin resistance in obese Zucker (fa/fa) rats via interaction of leukocyte antigen-related tyrosine phosphatase with focal

- adhesion kinase. *Diabetes*.49(5), 810-819.
- 22) Isidori A.M., Caprio M., Strollo F. et al. (1999) Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 84, 3673-3680.
- 23) Jabor A. (2008) *Encyklopedie 8 laboratorní medicíny pro klinickou praxi*. Sekk, Katedra klinické biochemie IPVZ, Praha, CD
- 24) Kahn D., Robson S.C., Hickman R. (1994) The effect of a tumour necrosis factor antibody on the regenerative response after partial hepatectomy in rats. *Transpl. Int.* 1, 181-182.
- 25) Kimura T., Sakaida I., Terai S., Matsumura Y., Uchida K., Okita K. (1997) Inhibition of tumor necrosis factor-alpha production retards liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 231(3), 557-560.
- 26) Klener P. a spol. (1997) *Cytokiny ve vnitřním lékařství*. Grada Publishing, Praha, str. 19 – 68.
- 27) Klener P. et al. (2002) *Vnitřní lékařství Svazek IV*. Galén, Karolinum, Praha, str. 221-222.
- 28) Krejsek J., Kopecký O. (2004) *Klinická imunologie*. Nucleus, Hradec Králové, str. 55-70.
- 29) Lamosova D., Zeman M. (2001) Effect of leptin and insulin on chick embryonic muscle cells and hepatocytes. *Physiol. Res.* 50, 183-189.
- 30) Ledda-Columbano G.M., Curto M., Piga R., Zedda A.I., Menegazzi M., Sartori C., Shinozuka H., Bluethmann H., Poli V., Ciliberto G., Columbano A. (1998) In vivo hepatocyte proliferation is inducible through a TNF and IL-6 independent pathway. *Oncogene.* 17(8), 1039-1044.
- 31) Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J. (2005) *Biochemie pro studující medicíny*. Karolinum, Praha, str. 175-206.
- 32) Liska V., Treska V., Skalicky T., Mirka H., Kobr J., Sykora R., Sutnar A., Bruha J., Fiala O., Vycital O., Chlumska A., Holubec L. Jr., Matejovic M. (2009) Cytokines and liver regeneration after partial portal vein ligation in porcine experimental model. *Bratisl. Lek. Listy.* 110(8), 447-453.
- 33) Maloy V.A., Krajcik R.A., Bailey S.J., Hristopoulos G., Plummer J.D., Orentreich N. (2006) Methionine restriction decreases visceral fat mass and

- preserves insulin action in aging male Fisher 344 rats independent of energy restriction. *Aging. Cell.* 5(4), 305-314.
- 34) Mari M., Caballero F., Colell A. et al. (2006) Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas mediated steatohepatitis. *Cell. Metab.* 4, 185-198.
- 35) Masopust J., Průša R. (2003) *Patobiochemie buňky*. Univerzita Karlova, Praha, str. 184-186.
- 36) Mendez-Sanchez N., Ponciano-Rodriguez G., Chavez-Tapia N.C., Uribe M. (2005) Leptine participation in the development of liver steatosis and biliar Lithiasis. *Gac. Med. Mex.* 141(6), 495-499.
- 37) Muoio D.M., Dohm G.L., Fiedorek F.T. jr et al. (1997) Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes.* 46, 1360-1363.
- 38) Picard C., Lambotte L., Starkel P., Sempoux C., Saliez A., Van den Berge V., Horsmans Y. (2002) Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J. Hepatol.* 36, 645-652.
- 39) Reidy S.P., Weber J. (2000) Leptin: an essentials regulator of lipid metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 125, 285-298.
- 40) Rosseti L., Massillon d., Barzilai N. et al. (1997) Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *J. Biol. Chem.* 272, 27758-27763
- 41) Sakono M., Mori H., Nagao K., Sato M., Ikeda I., Yamamoto K., Imaizumi K. (1996) Exogenous hypercholesterolemic rats, compared with their progenitor, Sprague-Dawley rats, promptly alter cholesterol metabolism in the liver and secrete cholesterol-rich particles in response to dietary cholesterol. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 113, 803-808.
- 42) Su G.M., Fiala-Ber E., Weber J. et al. (2005) Pretranslational upregulation of microsomal CYP4A in rat liver by intake of a high-sucrose, lipid-devoid diet containing orotic acid. *Biochem. Pharmacol.* 69, 709-717.
- 43) Sudo K., Yamada Y., Saito K., Shimizu S., Ohashi H., Kato T., Moriwaki H., Ito H., Seihima M. (2008) TNF-alpha and IL-6 signals from the bone marrow derived cells are necessary for normal murine liver regeneration. *Biochem. Biophys. Acta.* 1782(11), 671-679.

- 44) Sugimura K., Goto T., Tsuchida K., Takemoto Y., Kim T., Kishimoto T. (2001) Production and activation of hepatocyte growth factor in acute renal failure. *Ren. Fail.* 23(3-4), 597-603.
- 45) Špičák J. a kol. (2008) *Novinky v gastroenterologii a hematologii*. Grada Publishing, Praha, str. 7-27.
- 46) Takeuchi S., Goto T., Mikami K., Miura K., Ohshima S., Yoneyama K., Sato M., Shibuya T., Watanabe D., Kataoka E., Segawa D., Endo A., Sato W., Yoshino R., Watanabe S. (2005) Genipin prevents fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality through the suppression of TNF-alpha production. *Hepatology Res.* 33(4), 298-305.
- 47) Woodruff T.M., Arumugam T.V., Shiels I.A., Reid R.C., Fairlie D.P., Taylor S.M. (2004) Protective effects of a potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia-reperfusion in rats. *J. Surg. Res.* 116(1), 81-90.
- 48) Yuceturk H., Yagmurdur M.C., Gur G., Demirbilek M., Bilezikci B., Turan M., Karakayali H., Haberal M. (2007) Role of heparin on TNF-alpha and IL-6 in liver regeneration after partial hepatic resection. *Eur. Surg. Res.* 39(4), 219-221.
- 49) Zavoral M., Venerová J. a kol. (2007) *Gastroenterologie a hematologie*. Triton, Praha, str. 92-93.
- 50) Zhang H.Y., Han D.W., Wang X.G., Zhao Y.C., Zhou X., Zhao H.Z. (2005) Experimental study on the role of endotoxin in the development of hepatopulmonary syndrome. *World J. Gastroenterol.* 11(4), 567-572.
- 51) Zima T. (2007) *Laboratorní diagnostika*. Galén, Karolinum, Praha, str. 549-561.