

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Vilém Charvát

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Možnosti indukce lipotoxicity v primární kultuře hepatocytů

Bc. Vilém Charvát

Diplomová práce

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vilém Charvát**  
Osobní číslo: **C17440**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Možnosti indukce lipotoxicity v primární kultuře hepatocytů**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

#### Teoretická část:

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na nealkoholové ztukovatění jater (definice, prevalence, etiopatogeneze, histologický obraz a velmi stručně i diagnostika a léčba). Důraz má být kladen na vznik a progresi tohoto onemocnění a na roli lipotoxicity v patogenezi nealkoholového ztukovatění jater.
2. V literární rešerši se rovněž věnujte *in vitro* modelům jaterní lipotoxicity.
3. Ke zpracování tohoto přehledu využijte přednostně elektronické databáze (NCBI PubMed, ScienceDirect, apod.).

#### Experimentální část:

1. Naučte se pracovat s primárními kulturami hepatocytů potkana (hodnocení viability, stanovení density buněk, příprava primárních kultur hepatocytů v *monolayeru*, teoreticky izolace hepatocytů potkana metodou dvoustupňové kolagenázové perfúze).
2. Naučte se připravovat a zpracovávat biologické vzorky získané z primárních kultur hepatocytů potkana a následně u těchto vzorků stanovovat základní parametry poškození hepatocytů v podmínkách *in vitro* (aktivita laktátdehydrogenázy, resp. LDH *leakage*, aktivita celulózních dehydrogenáz (WST-1 test), aktivita kaspázy-3, mikroskopické hodnocení s pomocí fázového kontrastu).
3. Nosnou částí práce je indukce lipotoxicity lysofosfatidylcholinem v hepatocytech potkana v podmínkách *in vitro* a optimalizace dávky lysofosfatidylcholinu pro tento účel.
4. Získaná experimentální data statisticky zpracujte a diskutujte. Své výsledky následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

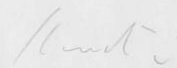
Vedoucí diplomové práce: **MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **doc. MUDr. Otto Kučera, Ph.D.**  
Lékařská fakulta UK Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

## **Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 6. 5. 2019

.....

Bc. Vilém Charvát

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval panu doc. MUDr. Ottovi Kučerovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, vstřícnost při konzultacích, cenné rady a připomínky, paní MUDr. Vladimíře Novákové Mužákové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a paním laborantkám za příjemnou atmosféru, která díky nim na pracovišti panovala. Dík patří také rodině a přátelům za podporu během studia.

## ANOTACE

Tato práce je zaměřena na indukci lipotoxicity v primárních kulturách hepatocytů potkana. Působení lysofosfatidylcholinu o zvolených koncentracích na primární kultury hepatocytů potkana bylo hodnoceno pomocí aktivity buněčných dehydrogenáz (WST-1 test), LDH *leakage*, aktivity kaspázy 3 a mikroskopického pozorování morfologických změn buněk ve fázovém kontrastu. Po vyhodnocení těchto parametrů byla optimalizována dávka lysofosfatidylcholinu indukující lipotoxicitu.

**Klíčová slova:** hepatocyty, primární kultury, lipotoxicita, lysofosfatidylcholin, NAFLD

## ANNOTATION

This work is focused on the induction of lipotoxicity in primary rat hepatocyte cultures. The effects of lysophosphatidylcholine in given concentrations on primary rat hepatocyte cultures was assessed by the cellular dehydrogenase activity (WST-1 assay), LDH *leakage*, caspase 3 activity and evaluation of cell morphological changes by phase contrast microscopy. Dose of lysophosphatidylcholine was optimized after evaluating these parameters.

**Keywords:** hepatocytes, primary cultures, lipotoxicity, lysophosphatidylcholine, NAFLD

# OBSAH

ÚVOD .....	9
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST - NEALKOHOLOVÉ ZTUKOVATĚNÍ JATER</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1. DEFINICE</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2. PREVALENCE</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3. PATOGENEZE</b> .....	<b>12</b>
1.3.1. <i>Metabolický syndrom</i> .....	12
1.3.2. <i>Inzulinová rezistence</i> .....	13
1.3.3. <i>Inzulinová rezistence a tuková tkáň</i> .....	14
1.3.4. <i>Inzulinová rezistence a játra</i> .....	15
1.3.5. <i>Mechanismus rozvoje NAFLD vlivem inzulinové rezistence</i> .....	17
1.3.6. <i>Jiné příčiny rozvoje NAFLD</i> .....	17
1.3.7. <i>Syndrom lipotoxicity</i> .....	19
1.3.8. <i>Lipotoxicky působící lipidy</i> .....	20
1.3.10. <i>Ochranná role některých lipidů</i> .....	25
<b>1.4. DIAGNOSTIKA A LÉČBA NAFLD</b> .....	<b>27</b>
1.4.1. <i>Klinický obraz</i> .....	27
1.4.2. <i>Diagnostika</i> .....	27
1.4.3. <i>Histologický obraz</i> .....	29
1.4.4. <i>Léčba</i> .....	33
<b>2. MODELOVÉ SYSTÉMY PRO STUDIUM LIPOTOXICITY IN VITRO</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1. POUŽÍVANÉ IN VITRO MODELY JATER</b> .....	<b>34</b>
2.1.1. <i>Primární kultury hepatocytů</i> .....	35
2.1.2. <i>Jaterní řezy</i> .....	35
2.1.3. <i>Jaterní buněčné linie</i> .....	35
2.1.4. <i>Kokultivace</i> .....	36
2.1.5. <i>Sféroidy</i> .....	37
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>38</b>
<b>4. METODICKÁ ČÁST</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1. POUŽITÉ ROZTOKY</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2. PRÁCE S PRIMÁRNÍMI KULTURAMI HEPATOCYTŮ</b> .....	<b>41</b>
4.2.1. <i>Izolace hepatocytů</i> .....	41
4.2.2. <i>Viabilita</i> .....	41
4.2.3. <i>Denzita</i> .....	41
4.2.4. <i>Monovrstva hepatocytů</i> .....	42
4.2.5. <i>Příprava ředění lysofosfatidyleholinu</i> .....	42
<b>4.3. SPEKTROFOTOMETRICKÉ MĚŘENÍ A MIKROSKOPIE</b> .....	<b>44</b>
4.3.1. <i>Test WST-1</i> .....	44
4.3.2. <i>Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu</i> .....	44
4.3.3. <i>Aktivita laktátdehydrogenázy v buněčném lyzátu</i> .....	45



4.3.4. Aktivita kaspáz v kultivačním médiu.....	46
4.3.5. Aktivita kaspáz v buněčném lyzátu .....	46
4.3.6. Mikroskopie .....	46
4.3.7. Statistika .....	46
<b>5. VÝSLEDKOVÁ ČÁST .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1. STANOVENÍ VIABILITY HEPATOCYTŮ (TEST WST-1) .....</b>	<b>47</b>
5.1.1. Aktivita buněčných dehydrogenáz hepatocytů potkana vystavených LPC po dobu 24 hod, rozdíl absorbancí v čase 60 a 0 min. ....	47
5.1.2. Aktivita buněčných dehydrogenáz hepatocytů potkana vystavených LPC po dobu 24 hod, rozdíl absorbancí v čase 120 a 0 min. ....	48
<b>5.2. AKTIVITA LAKTÁTDEHYDROGENÁZY .....</b>	<b>49</b>
5.2.1. LDH leakage hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 12 WP. ....	49
5.2.2. LDH leakage hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 24 WP. ....	50
5.2.3. Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 12 WP. ....	51
<b>5.3. AKTIVITA KASPÁZY 3.....</b>	<b>52</b>
5.3.1. Aktivita kaspázy 3 v buněčném lyzátu hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 12 WP, rozdíl výsledků v čase 0 a 30 min. ....	52
5.3.2. Aktivita kaspázy 3 v buněčném lyzátu hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 24 WP, rozdíl v čase 0 a 90 min. ....	53
5.3.3. Aktivita kaspázy 3 v kultivačním médiu hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 12 WP, rozdíl v čase 0 a 30 min. ....	54
5.3.4. Aktivita kaspázy 3 v kultivačním médiu hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 24 WP, rozdíl v čase 0 a 30 min. ....	55
<b>5.4. MORFOLOGICKÉ ZMĚNY .....</b>	<b>56</b>
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>58</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>63</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>64</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>74</b>
<b>SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....</b>	<b>78</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>80</b>

## Úvod

Nealkoholové ztukovatění jater (NAFLD – *non-alcoholic fatty liver disease*) je nejčastější příčinou chronického onemocnění jater v západních zemích. Odhaduje se, že asi třetina dospělé populace trpí tímto onemocněním, což představuje asi 1 miliardu lidí na celém světě. Toto onemocnění je silně asociováno s metabolickým syndromem, resp. s obezitou a diabetem 2. typu. Prevalence metabolického syndromu přitom celosvětově neustále narůstá v důsledku nevhodného životního stylu, nadměrného příjmu kalorické stravy a sedavého způsobu života.

Hlavním patogenetickým mechanismem NAFLD jako jaterního projevu metabolického syndromu je inzulinová rezistence. K patogenezi NAFLD přispívá také zmnožená metabolicky aktivní viscerální tuková tkáň při obezitě, která do krevního oběhu vylučuje řadu cytokinů a dalších látek ovlivňujících metabolismus sacharidů a lipidů.

Tato práce se v teoretické části zabývá problematikou nealkoholového ztukovatění jater s důrazem na patogenezi tohoto onemocnění a molekulárními mechanismy vedoucími k tzv. syndromu lipotoxicity. Cílem praktické části diplomové práce byla indukce lipotoxicity v primární kultuře hepatocytů s následnou optimalizací dávky lysofosfatidylcholinu, který byl pro tento účel použit.

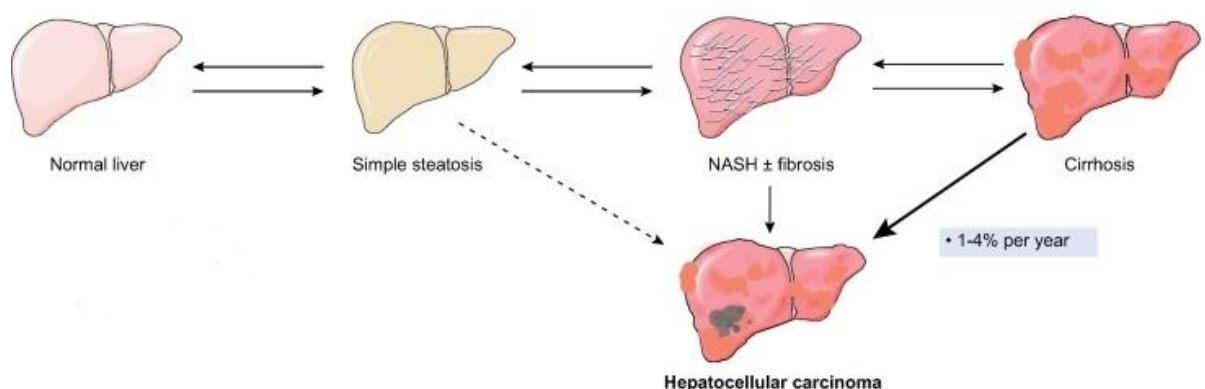
Práce vznikla za finanční podpory grantu Progres Q40/02.

# 1. Teoretická část - Nealkoholové ztukovatění jater

## 1.1. Definice

NAFLD je metabolické onemocnění jater, které je charakterizované jaterní steatózou, jež vznikla na podkladě inzulínové rezistence. Je však důležité vyloučit ostatní známé příčiny jaterní steatózy např. nadměrný příjem alkoholu, vliv léků, virová onemocnění aj. (Byrne, 2015). Za NAFLD je považována akumulace tuků v jaterních buňkách přesahující 5-10 % hmotnosti jater (Ehrmann, 2010). NAFLD bývá rozděleno do dvou stupňů – prostá jaterní steatóza a nealkoholová steatohepatitida (NASH – *non-alcoholic steatohepatitis*), přičemž u řady pacientů dochází k vývoji z jednoho stupně do druhého (obr. č. 1). Prostá jaterní steatóza, kterou lze dále rozdělit na malokapénkovou, smíšenou a velkokapénkovou, je ve většině případů benigní, reverzibilní postižení a nezpůsobuje poškození jaterního parenchymu. Pokud se k prosté jaterní steatóze přidá zánětlivá složka, jedná se o NASH, kdy dochází k poškození hepatocytů, fibróze a zjizvení jaterní tkáně. NASH může vyústit v cirhózu jater nebo hepatocelulární karcinom. Jaterní cirhóza související s NASH je v současné době celosvětově druhou nejčastější indikací k transplantaci jater (Masuoka, 2013).

NAFLD je úzce spjato s metabolickým syndromem. Ukázalo se, že metabolický syndrom je multisystémové onemocnění, způsobující nejenom jaterní postižení, ale ovlivňuje činnost i dalších orgánů. Tito pacienti jsou tak ohroženi rozvojem kardiovaskulárních onemocnění nebo chronickým onemocněním ledvin. Rovněž může docházet k ovlivnění regulačních systémů organismu (Byrne, 2015).

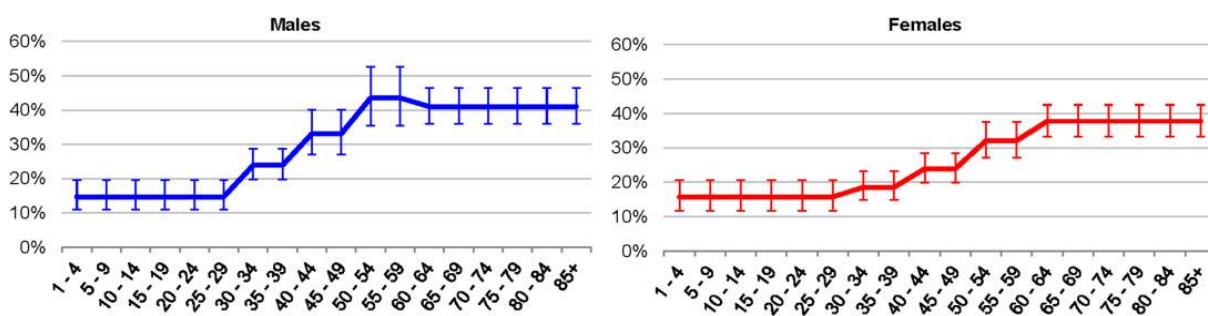


Obr. 1: Progrese NAFLD (Fan, 2017).

## 1.2. Prevalence

K dispozici jsou různé odhady o prevalenci u celkové populace. Odhaduje se, že celosvětově přibližně 17 - 50% dospělých osob trpí NAFLD (obr. č. 2) (Estes, 2018). Celková prevalence NAFLD v Severní Americe je asi 27 - 34%, u jednotlivých etnik se však prevalence liší. Nejvyšší prevalence, 45%, mají Hispanoameričané, naopak nejnižší prevalence je zaznamenána u Afroameričanů – 24%. Rovněž v Evropě je vysoká prevalence NAFLD, přibližně čtvrtina evropské populace má toto onemocnění. Nižší prevalence je hlášena z asijských zemí, kde se jedná asi o 20%.

U morbidně obézních osob se NAFLD vyskytuje asi – v 75% až 92% případů, u osob s diabetem 2. typu je prevalence přibližně 70%. Okolo 20% případů NAFLD dále progreduje do NASH (Fazel, 2016).



Obr. 2: Prevalence NAFLD podle věkové skupiny a pohlaví (Estes, 2018).

NAFLD úzce souvisí s obezitou a diabetem 2. typu, přičemž výskyt obezity i diabetu se celosvětově neustále zvyšuje, z tohoto důvodu lze očekávat také rostoucí trend výskytu NAFLD. V roce 2015 bylo v USA odhadnuto 83,1 milionů případů NAFLD v celkovém počtu obyvatel, s prevalencí 30% u lidí nad 15 let a 25,8% u všech věkových kategorií. Odhaduje se, že se do roku 2030 zvýší počet osob s NAFLD v USA o 21% na počet 100,9 milionu případů. Průměrný věk populace byl v roce 2015 odhadován na 50 let, zatímco v roce 2030 se pravděpodobně zvýší na 55 let. Lze předpokládat, že se množství případů NAFLD klasifikovaného jako NASH zvýší do roku 2030 na 27%, což je odrazem jak progresu onemocnění, tak stárnutí populace (Estes, 2018).

## 1.3. Patogeneze

### 1.3.1. Metabolický syndrom

NAFLD se tradičně považuje za jaterní projev metabolického syndromu, a to kvůli úzkému propojení mezi NAFLD a různými složkami metabolického syndromu (Wainwright, 2016). Dle současné definice hovoříme o metabolickém syndromu, pokud jsou u pacienta prokázány alespoň 3 z následujících 5 kritérií:

- obvod pasu u žen > 88 cm, u mužů > 102 cm
- HDL-cholesterol < 1,25 mmol/l u žen, u mužů < 1,0 mmol/l
- triacylglyceroly > 1,7 mmol/l
- glykémie > 6,0 mmol/l
- krevní tlak > 130/85 mm Hg (Svačina, 2011).

Předpokládá se, že prvotní příčinou rozvoje metabolického syndromu je inulinová rezistence, prokázán byl však i významný vliv obezity. Lidé s metabolickým syndromem mají velmi často BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>, ovšem více riziková bývají lidé s obezitou v horní polovině těla (tzv. typ jablko) než lidé s obezitou v dolní části těla (typ hruška). Tuk v horní polovině těla lze rozdělit na tuk podkožní a tuk viscerální, který je metabolicky aktivnější (Grundy, 2016). Kromě rizika rozvoje NAFLD hrozí osobám s metabolickým syndromem další zdravotní komplikace. Mají sníženou fibrinolytickou aktivitu, jsou ohroženy prozánětlivými, proaterogenními a prokoagulačními stavy, dochází ke zvyšování prozánětlivých markerů a markerů systémového zánětu. S rostoucím počtem složek metabolického syndromu také narůstá riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění a na základě inzulínové rezistence taktéž pravděpodobnost vzniku diabetu 2. typu (Guo, 2014).

Existuje množství úvah o časovém vztahu NAFLD a metabolického syndromu bez jasného výsledku, co bylo dříve. Nedávná studie, zabývající se kauzalitou mezi NAFLD a metabolickým syndromem u čínské populace zjistila, že metabolický syndrom má větší vliv na incidenci NAFLD, pokud jde o příčinnou souvislost, nežli naopak, což podporuje tvrzení, že NAFLD je jaterní komponentou metabolického syndromu (Zhang, 2015).

NAFLD se však může objevit i u jedinců, jejichž BMI je v normě, nicméně dvě třetiny lidí s obezitou a diabetem 2. typu vykazují jaterní steatózu. Jedna ze studií, která se věnovala diagnostice NAFLD pomocí ultrasonografie potvrdila jaterní steatózu u 50% pacientů s dyslipidemií. NAFLD bývá také spojováno s hypertenzí, kdy studie zabývající se touto problematikou prokázaly, že rovněž asi 50% osob s esenciální hypertenzí trpí NAFLD (Lopez-

Suarez, 2011). Je důležité poukázat na to, že se pacientům s NAFLD, u kterých se zároveň vyskytuje několik parametrů metabolického syndromu najednou, mnohonásobně zvyšuje pravděpodobnost progresu k NASH a jaterní cirhóze (Wainwright, 2016).

### 1.3.2. Inzulinová rezistence

Inzulinová rezistence je stav, kdy dochází k nedostatečné odpovědi na fyziologickou hladinu inzulínu v cílových tkáních. Jedná se pravděpodobně o prvotní patogenetický jev metabolického syndromu a ostatních komplikací s ním spojených. Inzulinová rezistence nejvíce ovlivňuje kosterní svaly, játra a tukovou tkáň, ovšem ve výsledku působí na všechny buňky organismu (Liu, 2010).

Příčin rozvoje inzulinové rezistence je několik. Mohou být rozděleny na vrozené a získané. U vrozených příčin se může jednat o stavy, kdy je abnormální samotná molekula inzulínu, případně se v těle tvoří autoprotilátky namířené proti molekule inzulínu. Může také docházet k poruchám inzulinového receptoru nebo k defektům v transdukcii signálu po navázání inzulínu na svůj receptor. Získanou příčinou inzulinové rezistence je především nevhodný životní styl vedoucí k obezitě (Perušičová, 2012).

Některé studie předpokládají, že akumulace tuku v játrech je důsledek, nikoliv příčina, periferní inzulinové rezistence při obezitě. V kosterním svalu dochází k nedokonalému vstupu glukózy do buněk, zatímco v tukové tkáni inzulinová rezistence narušuje anti-lipolytický účinek inzulínu, čímž se zvyšuje uvolňování volných mastných kyselin do krevního oběhu. Vyšší plazmatické koncentrace glukózy a volných mastných kyselin dále podporují vychytávání a syntézu triacylglycerolů (TAG) v játrech (Liu, 2010). Poté dochází k mitochondriálnímu přetížení, jelikož množství produktů  $\beta$ -oxidace nekoreluje s následným Krebsovým cyklem, a proto se v mitochondriích začnou hromadit produkty nedokonalého odbourávání mastných kyselin – acylkarnitin a volné kyslíkové radikály. Akumulace triacylglycerolů v játrech vede ke steatóze jater (Szedroedi, 2014).

Při studiích vztahu mezi inzulinovou rezistencí a NAFLD byla navržena tzv. hypotéza dvou zásahů. Prvním zásahem je zvýšená akumulace TAG v důsledku inzulinové rezistence a zvýšeného dodávání volných mastných kyselin do jater. Druhým zásahem je vyvolaný oxidační stres v játrech, což způsobuje zvýšenou peroxidaci lipidů vedoucí k poškození hepatocytů, zánětu a fibróze a dalším komplikacím (Tilg, 2010).

### 1.3.3. Inzulinová rezistence a tuková tkáň

Tuková tkáň v lidském organismu neslouží pouze jako zásobárna energie nebo mechanická ochrana vnitřních orgánů, významné jsou rovněž její endokrinní funkce (Hainer, 2011).

Inzulinová signalizace je v tukové tkáni pravděpodobně porušena tím, že dochází k inaktivaci proteinkinázy B. Tím, že není hormon-senzitivní lipáza inzulinem inhibována, dochází lipolytickou aktivitou tohoto enzymu ke zvýšenému uvolňování volných mastných kyselin z adipocytů do krevního oběhu. Rozvíjí se hyperlipidémie a tuk se ektopicky ukládá do cévních stěn, jater a do dalších tkání. Akumulace tuku aktivuje zánětlivou reakci, která dále podporuje rozvoj inzulinové rezistence (obr. č. 3) (Guo, 2014).

Adipocyty jsou schopny produkovat řadu peptidových hormonů, které jsou známy jako adipokiny. Přes adipokiny se tuková tkáň podílí na regulaci metabolismu sacharidů a lipidů. Molekuly tvořené v tukové tkáni působí jak dálkově (endokrinně), tak lokálně, parakrinně a autokrinně na jednotlivé složky tukové tkáně. Tato opatření přispívají k regulaci velikosti periferních tukových tkání nebo a k distribuci lipidů v organismu (Paniagua, 2016). Inzulinovou rezistenci je schopna vyvolat celá řada adipokinů. Mohou inhibovat působení inzulinu v inzulin-senzitivních tkáních tím, že aktivují stresové kinázy, které brání fosforylaci substrátů inzulinového receptoru. Patří mezi ně např. proteinkináza C (PKC), serin/threoninová kináza (S6K), c-Jun N-terminální kináza (JNK1) nebo inhibitor kappa- $\beta$  kinázy (IKK $\beta$ ). V souvislosti s regulací metabolických dějů jsou nejpodrobněji zkoumány leptin, adiponektin, TNF- $\alpha$  a IL-6 (Glass, 2012).

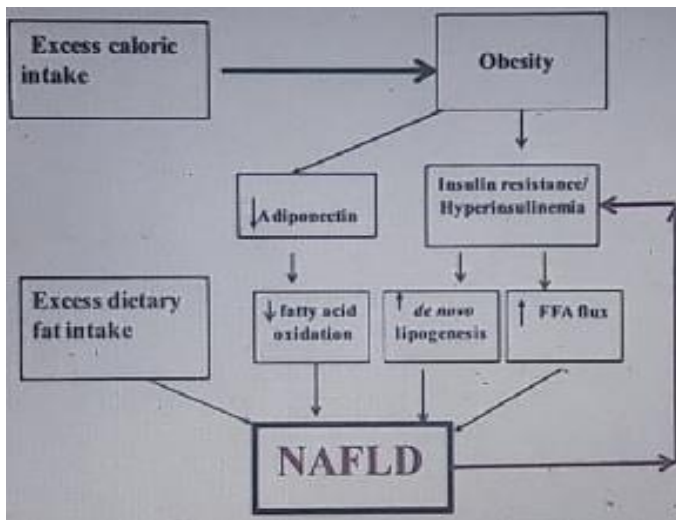
Leptin je hormon, který je produkován adipocyty, jehož hladina přímo koreluje s hodnotou BMI a množstvím tukových zásob v těle, slouží tedy jako periferní signál informující hypothalamus o stavu tuku v těle. Exprese a uvolňování leptinu je řízeno několika hormony a faktory, zdá se, že je stimulován inzulinem, glukokortikoidy, TNF- $\alpha$  a estrogeny naopak inhibičně působí androgeny,  $\beta$ 3-adrenergní aktivita, růstový faktor, volné mastné kyseliny a agonista PPAR- $\gamma$ . Leptinový signál stimuluje  $\beta$ -oxidaci a může snížit nadměrné množství uvolněných mastných kyselin. Pro energetický metabolismus je účinek leptinu nezbytný a souvisí s ochranou některých tkání před tzv. syndromem lipotoxicity (Paniagua, 2016).

Hladina adiponektinu v krvi negativně koreluje s BMI, u obézních jedinců je nižší koncentrace, zatímco u štíhlých jedinců je koncentrace adiponektinu vyšší. Adiponektin je

produkován výhradně adipocyty. Svým působením aktivuje lipoproteinovou lipázu, zvyšuje sekreci inzulinu z granulí  $\beta$ -buněk pankreatu, ale také stimuluje expresi genu pro inzulin. Zvyšuje inzulinovou senzitivitu, má protizánětlivé a anti-apoptické účinky. Vzhledem k jeho nižší hladině u obézních osob, se tak snadněji rozvíjí inzulinová rezistence (Fasshauer, 2015).

TNF- $\alpha$  je považován za adipokin, který se podílí na procesu lokálního a systémového zánětu a na proliferaci a diferenciaci buněk. Indukuje vznik inzulinové rezistence za předpokladu, že inhibuje inzulinovou signalizaci působením na substráty inzulinového receptoru. Rovněž aktivuje syntézu ceramidů *de novo*. Ceramidy jsou společně s diacylglyceroly (DAG) hlavními lipotoxicky působícími látkami (Asrih, 2013).

Přibližně třetina celkové koncentrace IL-6 v lidském těle je produkována v tukové tkáni, avšak exprese a uvolňování IL-6 je dvakrát až třikrát vyšší ve viscerální tukové tkáni. Bylo zjištěno, že cirkulující hladiny IL-6 jsou přímo spojeny s obezitou a inzulinovou rezistencí. IL-6 inhibuje aktivitu lipoproteinové lipázy a diferenciaci lidských preadipocytů ve zralé adipocyty.



Obr. 3: Zdroje a mechanismus akumulace tuku v játrech (Liu, 2010).

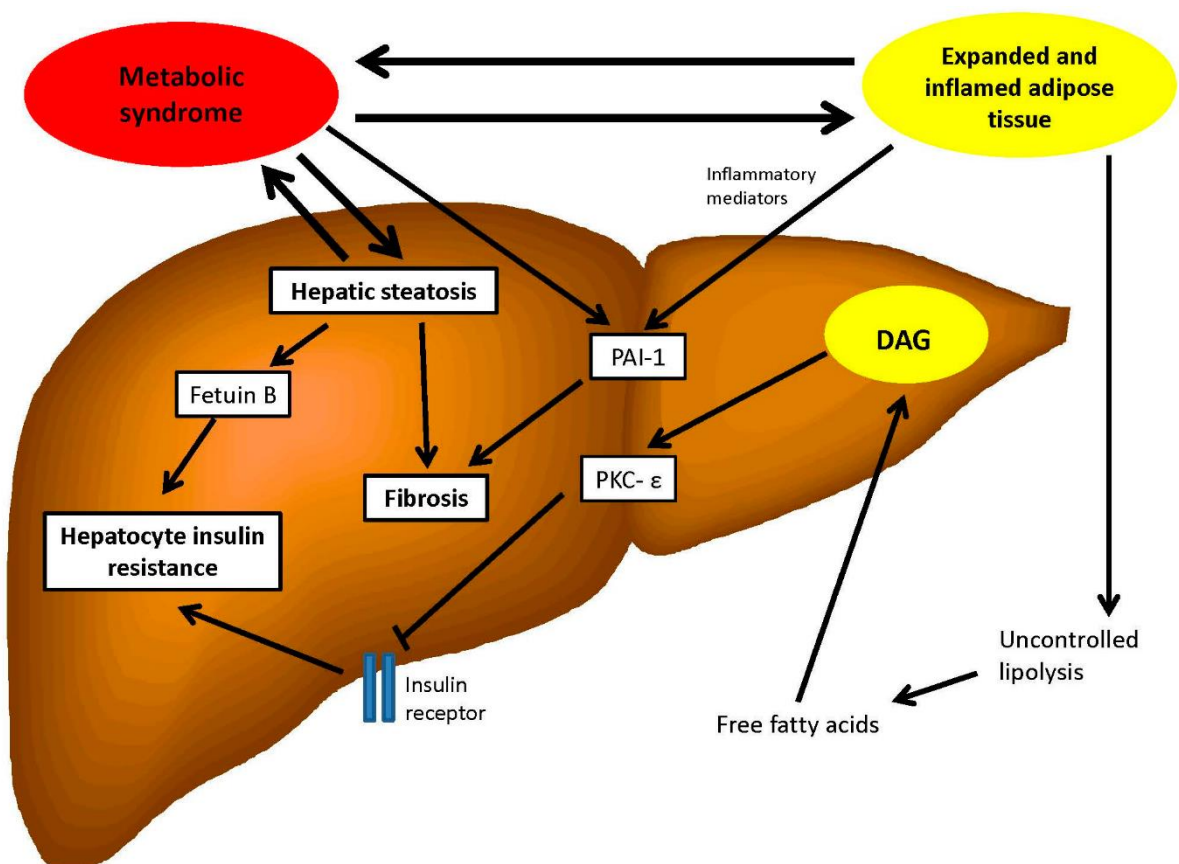
#### 1.3.4. Inzulinová rezistence a játra

Jak již bylo řečeno, inzulinová rezistence a NAFLD jsou dávány do souvislosti pomocí tzv. hypotézy dvou zásahů, kdy první zásah – akumulace TAG v játrech, příp. jaterní steatóza, zvyšuje náchylnost jater k poškození zprostředkovaném druhým zásahem, což je působení zánětlivých cytokinů/adipokinů, mitochondriální dysfunkce a oxidační stres, čímž se podporuje vývoj NASH a fibrózy (obr. č. 4). Je prokázáno, že obezita bez současných známek systémového zánětu nemá za následek periferní inzulinovou rezistenci stejně jako takto



vyvolaná steatóza nepovede k NASH. Během studie, která prováděla pokus s myšmi, jenž byly krmeny velmi tučnou potravou, docházelo k rozvoji obezity se současným zánětem, inzulinovou rezistencí a mírným diabetem 2. typu. Při použití chimérických myší, kterým chyběly buňky imunitního systému, však k rozvoji zánětu nedošlo. Tyto myši vykazovaly obezitu s nepřítomností inzulinové rezistence, komě toho jejich játra byla bez známek zánětu. Klíčovou molekulou se jeví TNF- $\alpha$ , nadměrně exprimován v tukové tkáni při obezitě (Liu, 2010).

Významný se zdá být rovněž hepatokin fetuin B. Ukázalo se, že koncentrace fetuinu B je u obézních hlodavců zvýšena. Nadměrný přísun energie u experimentálních myší vede ke steatóze jater, která mění profil sekrece proteinů z hepatocytů, přičemž sekrece fetuinu B se zvyšuje. V této studii byly dále zkoumány účinky fetuinu B *in vivo*, kdy bylo pozorováno, že intraperitoneálně aplikovaná injekce fetuinu B u myší významně narušila glukózovou toleranci (Meex, 2015).



Obr. č. 4: Interakce mezi jaterní steatózou a metabolickým syndromem (Wainwright, 2016).

### **1.3.5. Mechanismus rozvoje NAFLD vlivem inzulinové rezistence**

Inzulinová rezistence nepochybně přispívá k progresivnímu poškození jater. Významnou úlohu hraje inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1). PAI-1 patří mezi inhibitory serinových proteáz a působí jako klíčový mediátor fibrinolytického systému. Pokud je ve tkáni přítomna fibróza ve vyšším stupni, koncentrace PAI-1 je zvýšená, což vede k inhibici proteolytických aktivit tkáně, snížené míře degradace kolagenu a ke zvýšení tkáňové fibrogeneze. Zvýšené hladiny PAI-1 jsou nalézány u pacientů se znaky metabolického syndromu. Prokázalo se, že v lidské buněčné linii hepatocytů TNF- $\alpha$  indukuje expresi PAI-1, čímž se zvyšuje stupeň jaterní fibrózy (Ghosh, 2012).

Také adipokiny, produkované buňkami bílé tukové tkáně, hrají významnou roli v rozvoji jaterní fibrózy a zánětu. Tyto zánětlivé mediátory mohou stimulovat diferenciaci Itoových buněk v játrech do buněk podobným myofibroblastům ve fibrogenním prostředí. Předpokládá se, že nejvýznamnější roli v patogenezi NASH a asociované fibrózy mají TNF- $\alpha$  a IL-6 (Civiera, 2010). Další studie provádějící jaterní biopsie u pacientů s morbidní obezitou a vyšším stupněm inzulinové rezistence, prokázala, že tito pacienti mají vyšší apoptotickou aktivitu u hepatocytů, což může být zprostředkováno právě prozánětlivými cytokiny. Tato studie poskytuje důkazy o souvislosti mezi inzulinovou rezistencí a NAFLD zprostředkované endokrinně aktivní tukovou tkání (Wainwright, 2016).

### **1.3.6. Jiné příčiny rozvoje NAFLD**

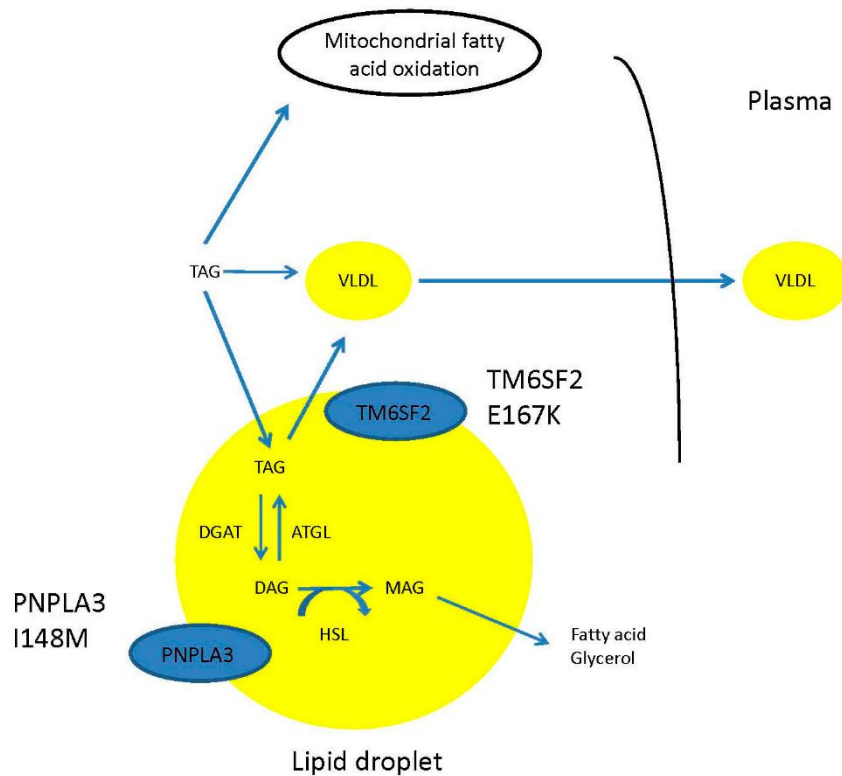
Navzdory obousměrným příčinným souvislostem mezi NAFLD a metabolickým syndromem existují určité situace, kdy tomu tak není. Jedna ze studií pracovala s myši, které nadměrně exprimovaly gen pro diacylglycerolacyltransferasu 2 (DGAT2), enzym, který působí jako katalyzátor konečného cyklu biosyntézy jaterních triacylglycerolů. U těchto myší bylo zjištěno, že vykazují značnou jaterní steatózu bez jakýchkoliv abnormalit v plazmatických hladinách glukózy a inzulinu. Autoři studie dále zkoumali variabilitu genu DGAT2, aby se zjistilo, zda tento vztah lze nalézt také u lidí a prokázalo se, že existují 2 jednobodové nukleotidové polymorfismy (SNP), které by mohly zapříčínovat rozvoj NAFLD bez vlivu inzulinové rezistence.

Velký zájem také vzbuzuje gen PNPLA3, který kóduje protein s názvem adiponutrin. Přesný význam tohoto proteinu není doposud znám, ví se však, že se jedná o membránově asociovaný protein, exprimovaný v jaterních a tukových tkáních, který má lipogenní a lipolytické účinky. Existují také důkazy o tom, že se tento protein nachází v lipidových

kapénkách a že může hrát roli při hydrolýze triacylglycerolů (obr. č. 5). Zvýšená exprese PNPLA3 je při postprandiálně vyšší hladině inzulínu, naopak snížená exprese tohoto genu je při hladovění (Romeo, 2010). Zjistilo se, že I148M, alela genu PNPLA3, je silně spojena s jaterní steatózou, přičemž homozygotní I148M jedinci vykazovali až dvojnásobně vyšší množství jaterních lipidů. Polymorfismy v I148M způsobují sníženou aktivitu TAG hydrolázy, čímž se narušuje hydrolýza TAG a tím i sekrece lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL) z jater (Anstee, 2015).

Významný se v této souvislosti zdá být také gen TM6SF2. Tento gen je výrazně exprimován v játrech a ve střevě a předpokládá se, že kóduje stejnojmenný membránový protein, který se podílí na intestinální absorpci, ovlivňuje regulaci metabolismu jaterního tuku a sekreci lipoproteinů bohatých na TAG. Protein, kódován TM6SF2 genem, je rovněž přítomen v tukových kapénkách (obr. č. 5). Mutovaný TM6SF2 obsahuje alelu E167K, četnost této alely je v evropské populaci asi 7,2% (Sookoian, 2015). Dále se studoval vliv TM6SF2 na lipoproteinový metabolismus. Za použití konfokální mikroskopie se sledoval TM6SF2 protein, značený zeleným fluorescenčním proteinem (GFP), lokalizovaný v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu ve dvou lidských buněčných liniích hepatomu. Zjistilo se, že klesající množství TM6SF2 snižuje sekreci lipoproteinů bohatých na TAG a apoprotein Apo-B. To vedlo ke zvýšení akumulace TAG v buňkách, což se na buněčné úrovni projevilo jako zvýšené množství a velikost tukových kapének. Naopak nadměrná exprese TM6SF2 způsobila, že tukových kapének bylo méně a měly menší průměrnou velikost (Anstee, 2015).

Další možností rozvoje jaterní steatózy je familiární hypobetalipoproteinémie (FHBL). Pacienti s FHBL mají velmi nízkou nebo dokonce nulovou hladinu Apo-B. Tím se narušuje export VLDL z jater a následně dochází k akumulaci TAG v játrech. Rovněž deficiencie adipózní triacylglycerol-lipázy (ATGL) způsobuje akumulaci lipidů v játrech. ATGL zahajuje hydrolýzu uloženého lipidu selektivně štěpením TAG postupně na DAG a MAG. V neposlední řadě se může jaterní steatóza rozvíjet, pokud je narušena vlastní  $\beta$ -oxidace mastných kyselin. K tomu může docházet při mnoha vrozených poruchách  $\beta$ -oxidace, jako je deficiencie acyl-CoA dehydrogenázy nebo nedostatek karnitin-palmitoyltransferázy II. Vliv mají také poruchy receptoru PPAR $\alpha$ , který stimuluje expresi mnoha genů, které jsou zapojeny do  $\beta$ -oxidace mastných kyselin (Wainwright, 2016).



Obr. č. 5: Interakce mutací *PNPLA3* a *TM6SF2* a metabolismus lipidů v jaterní tukové kapénce. *HSL* – hormon-senzitivní lipáza, *DGAT* – diglyceridacyltransferáza (Wainwright, 2016).

### 1.3.7. Syndrom lipotoxicity

Hepatocelulární poškození způsobené expozicí hepatocytů vysoké koncentraci lipidů se označuje jako lipotoxicita. Jedná se o metabolickou poruchu, která může být vyvolána rezistencí na inzulin ve tkáních (Mota, 2016).

Činnost tukové tkáně je nezbytná pro optimální mobilizaci a skladování lipidů. Klíčový je *PPAR-γ* – nukleární receptor, nacházející se v tukové tkáni, který je potřebný pro kontrolu lipolýzy. Souběžně s expanzí tuků v adipocytech se zvyšuje sekrece leptinu a předpokládá se, že tento mechanismus zabraňuje lipotoxicitě tím, že minimalizuje ektopickou akumulaci lipidů mimo adipocyty, protože leptinem indukovaná  $\beta$ -oxidace zvyšuje transkripci *PPAR-α*. Tímto přebytečné volné mastné kyseliny zvýší aktivaci *PPAR-α*, což je transkripční faktor lipolytických enzymů jako je karnitinpalmitoyltransferáza a acyl-CoA-oxidáza. Chronické zvyšování  $\beta$ -oxidace však způsobuje oxidační stres. Zjistilo se ovšem, že pacienti s inzulinovou rezistencí mají nižší hladinu leptinu, navíc u několika pacientů byl prokázána také rezistence na leptin. Jak již bylo řečeno, adiponektin se jeví jako významně inzulin-

senzitivizující adipokin, jehož vlivem se účinněji uvolňují volné mastné kyseliny z tukové tkáně a také zlepšuje míru reesterifikace volných mastných kyselin během postprandiálního stavu. Při narušení těchto mechanismů dochází k akumulaci mastných kyselin a jejich metabolitů ve tkáních. Kromě jater také ve svalech, v pankreatu, v srdci, v ledvinách aj. a zvyšují tak mortalitu buněk, které nejsou uzpůsobeny na tuto akumulaci lipidů (Buzzetti, 2016).

### 1.3.8. Lipotoxicky působící lipidy

Mezi lipidy, zprostředkovávající jaterní lipotoxicitu, patří volné mastné kyseliny (FFA), triacylglyceroly (TAG), lysofosfatidylcholin (LPC), ceramidy, volný cholesterol (FC) a žlučové kyseliny (BA) (Mota, 2016).

#### *Volné mastné kyseliny a triacylglyceroly*

Nejběžnější nasycenou mastnou kyselinou, která je přijímána potravou, je kyselina palmitová (PA). Může být rovněž produkována syntézou lipidů *de novo* při nadměrném příjmu sacharidů. Z nenasyčených mastných kyselin je potravou běžně přijímána kyselina olejová (OA).

Pokud jsou hepatocyty vystavené vysokým hladinám cirkulujících FFA, zvýší jejich vychytávání, aby se snížila plazmatická koncentrace FFA. FFA v játrech se lipolyticky uvolnily z TAG v tukové tkáni nebo pocházejí z lipogeneze *de novo*. Předpokládá se, že hepatická absorpce FFA využívá tetramerní komplex membránového proteinu, který obsahuje protein vázající se na mastnou kyselinu z plazmy (FABP), caveolin-1, translokázu mastných kyselin (FAT/CD36) a na vápníku nezávislou membránovou fosfolipázu A2 (iPLA2p). V játrech u jedinců s inzulinovou rezistencí, steatózou a NASH je CD36 nadměrně exprimován díky PPAR $\gamma$ . Hepatocyty vystavené PA a OA vykazují zvýšenou expresi FAT/CD36 a transportního proteinu mastných kyselin (FATP), což vede k akumulaci FFAs a následně diacylglycerolu (DAG) nebo ceramidů (Chabowski, 2013).

Studie prokázaly, že akumulace TAG v játrech je způsobena především zvýšeným dodáváním FFA z tukové tkáně a zvýšenou syntézou lipidů *de novo* v játrech (Mota, 2016). Rovněž nadměrný příjem sacharidů vede ke steatóze jater. Přijímání potravy bohaté na fruktózu způsobuje změnu v lipidovém profilu, kdy se zvyšují hladiny TAG, VLDL a lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) (Cambri, 2015). Při vystavení buněčných linií hepatocytů působení OA a PA se dále prokázalo, že zatímco OA generuje hepatocytární steatózu, PA je zodpovědná za vyšší míru apoptózy. PA aktivovala PPAR $\alpha$  a došlo k poškození inzulinové signalizace, apoptózu vyvolala prostřednictvím JNK-dependentní mitochondriální dysfunkce a aktivací

kaspáz. I když OA způsobila zvýšenou tvorbu TAG, prokázalo se, že TAG způsobují obranný systém proti proapoptickým účinkům velkého množství FFA v buňkách (Ricchi, 2009). Tento účinek byl potvrzen inhibicí diacylglycerolacyltransferázy 2 (DAGT2). DAGT2 je katalyzátor syntézy TAG v hepatocytech, jehož inhibice vedla k prozánětlivým stavům, zvýšené lipoperoxidaci a oxidačnímu stresu (Mota, 2016).

### ***Lysofosfatidylcholin***

LPC patří do třídy lipidů vznikajících po částečné hydrolýze fosfatidylcholinu prostřednictvím fosfolipázy A2 (PLA2). LPC se ve velkém množství nachází v oxidovaných LDL lipoproteinech. Stimuluje adhezi a aktivaci leukocytů, iniciuje chemotaxi makrofágů. Uvolňuje se sekundárně po aktivaci PLA2 nezávisle na vápníku vlivem kaspázy 3, když buňky procházejí apoptózou. U pacientů s NASH je zvýšená plazmatická hladina LPC, ale také expozice hepatocytů PA vede ke zvýšení intracelulární koncentrace LPC. Lipotoxicita indukovaná LPC vzniká tím, že dochází ke stresu endoplasmatického retikula, aktivaci c-Jun N-terminální kinázy (JNK), dále kinázy 3 glykogensyntázy (GSK3) a transkripčního faktoru CCAAT/enhancer vázajícího homologního proteinu (CHOP). Toto vše vede k aktivaci apoptotických proteinů např. p53 upregulovaného modulátoru apoptózy (PUMA). Lipotoxické mechanismy, které vznikly vlivem LPC jsou do značné míry totožné s PA-indukovanou lipotoxicitou, což naznačuje, že by FFA mohly cytotoxicky působit tím, že generují LPC (Kakisaka, 2012).

### ***Ceramidy***

Ceramidy a jejich deriváty sfingolipidy jsou komponenty buněčné membrány. Ceramidy mohou být tvořeny hydrolýzou sfingomyelinu buněčné membrány působením neutrální sfingomyelinázy (N-SMáza). N-SMáza je aktivována prozánětlivými cytokiny, jako je IL-6 u pacientů s NASH. Dále mohou být ceramidy produkovány *de novo* vlivem oxidačního stresu z palmitoyl-CoA a serinu, a to působením serinpalmitoyl-CoA transferázy (SPT). V játrech ceramidy interagují s dráhou TNF- $\alpha$  a podporují další uvolňování reaktivních forem kyslíku (ROS) z mitochondrií, což vede k apoptóze a zhoršení jaterního zánětu (Mota, 2016).

### ***Volný cholesterol a žlučové kyseliny***

U pacientů s NAFLD se v játrech akumuluje cholesterol vlivem zvýšené syntézy a zvýšené deesterifikace cholesterolu. Velké množství intracelulárního FC v játrech stimuluje Kupfferovy a Itovy buňky k rozvoji zánětu a fibrózy. Dále také způsobuje mitochondriální

dysfunkci s následnou zvýšenou produkcí ROS a aktivaci proteinů apoptózy. Narušená cholesterolová homeostáza v játrech přispívá k jeho akumulaci v jaterních buňkách a organelách. Klíčovým enzymem syntézy cholesterolu je hydroxymethylglutaryl-CoA (HMGCoA), jehož hlavním regulačním enzymem je sterolový vazebný protein pro regulační elementy (SREBP). U pacientů s NASH je zvýšená hladina SREBP, což koreluje se zvýšenou hladinou FC a mitochondriálního transportéru cholesterolu, kterým je steroidní akutní regulační protein (StAR) (Mota, 2016). Velké množství FC má za následek akumulaci toxických oxysterolů v játrech, které přispívají k mitochondriální dysfunkci. Akumulace mitochondriálních FC vede k apoptóze, stejně jako konečné produkty degradace cholesterolu – BA (Bellanti, 2014).

### **1.3.9. Molekulární mechanismy lipotoxicity**

Hlavním rysem NASH je nedostatečné odbourávání FFA v hepatocytech vedoucí k lipoapoptóze. Apoptóza může být u hepatocytů indukovaná intracelulárními mechanismy jako je oxidační stres nebo dysfunkce organel, ale také prostřednictvím extracelulárních mechanismů, pomocí tzv. smrtelných ligandů, které se naváží na svůj příslušný receptor a aktivují apoptózu (obr. č. 6) (Mota, 2016).

#### ***Stres endoplasmatického retikula***

Stres endoplasmatického retikula je charakteristický pro progresi jaterní steatózy do NASH. Reakce na stres endoplasmatického retikula je zpočátku zprostředkována kombinací několika signálních drah, které se nazývají UPR (z angl. *unfolded protein response*). Prodloužená aktivace UPR aktivuje apoptotické dráhy, způsobující buněčnou smrt. Stresové stavy může vyvolat např. zvýšené množství FC v lumen endoplasmatického retikula (Volmer, 2013). Významnou roli v takto vyvolané apoptóze jaterních buněk má transkripční faktor CHOP. U kultur hepatocytů, které byly vystaveny vlivu PA, docházelo k aktivaci PUMA pomocí JNK a CHOP. PUMA následně aktivuje protein Bax, jenž vyvolá mitochondriální dysfunkci, aktivaci kaspáz a smrt buněk (Cazanave, 2010).

#### ***c-Jun N-terminální kinázy***

Dráhy JNK mohou být stimulovány oxidačním stresem a stresem endoplasmatického retikula a řadí se ke klíčovým mediátorům hepatotoxicity vyvolané inzulínovou rezistencí a FFA. Apoptóza hepatocytů indukovaná nasycenými FFA se rozvíjí prostřednictvím mechanismu závislého na JNK, zahrnujícího aktivaci proteinů BIM a Bax a následné uvolnění

kaspáz (Cazanave, 2009). V hepatocytech jsou obsaženy dvě isoformy JNK, JNK1 a JNK2. JNK1 hraje důležitou roli v indukci apoptózy tím, že reguluje expresi pro-apoptotického proteinu Bcl-2 (protein B-buněčného lymfomu 2), dále také může fosforylovat c-Jun, který je integrován do proapoptotického AP-1 komplexu (aktivátorový protein 1). Nakonec bylo také prokázáno, že nasycené FFA prostřednictvím JNK1 stimulují PUMA a u buněk se rozvíjí apoptóza (Cazanave, 2010). Účinek JNK2 je odlišný. Prokázalo se, že inhibice JNK2 výrazně přispívá k jaternímu poškození a rozvoji apoptózy, jelikož isoforma JNK2 je schopna regulovat protein BIM (Singh, 2009).

### ***Bcl-2 proteiny***

Proteiny patřící do Bcl-2 rodiny jsou schopny regulovat permeabilitu mitochondriální membrány, což je důležitý krok v průběhu apoptózy. Tyto proteiny obecně zvyšují propustnost zevní mitochondriální membrány, což vede k uvolnění cytochromu c z mitochondrie, který je signálem pro další kroky apoptózy (Hikita, 2011). Bcl-2 proteiny obsahují ve své molekule podobné domény (označované BH1 až BH4) a podle toho se rozdělují do skupin. K těmto proteinům patří již zmíněný protein Bax, BIM a PUMA, u kterých dochází při lipotoxickém působení vybraných látek k aktivaci (Szegezdi, 2009). Naproti tomu do skupiny Bcl-2 proteinů patří i anti-apoptotické proteiny, např. protein Bcl-XL a Mcl-1, které jsou při FFA-indukované lipotoxicitě sníženy. Poté, co se aktivuje protein Bax, permeabilizující mitochondriální membránu, se aktivují proteiny, které se podílejí na vlastní fázi apoptózy, jako jsou kaspázy 3, 6 a 7, a způsobují fragmentaci DNA a buněčnou smrt (Eguchi, 2014).

### ***Oxidační stres***

Vlivem inzulínové rezistence a jaterní steatózy se výrazně zvyšuje  $\beta$ -oxidace mastných kyselin v mitochondriích a následným přetížením Krebsova cyklu vzniká oxidační stres. Pacienti s NASH vykazují vedle mitochondriální dysfunkce rovněž strukturální defekty mitochondrií (Mota, 2016).

Ukázalo se, že mitochondrie u pacientů s NASH mají vyšší hmotnost a nižší míru respirace. Ve studii, kde byly hepatocyty vystaveny působení OA docházelo k mitochondriálnímu otoku a ke snížení koncentrace mitochondriálního vápníku, což vede ke tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), změnám v buněčném cyklu a snížení životaschopnosti buněk (Koliaki, 2015). Jako jeden z prvních senzorů lipotoxického působení může sloužit aniontový kanál závislý na napětí (VDAC), který je umístěn na vnější membráně mitochondrií. Při expozici akumulovaných lipidů se VDAC méně fosforyluje, což umožňuje velký příliv vody



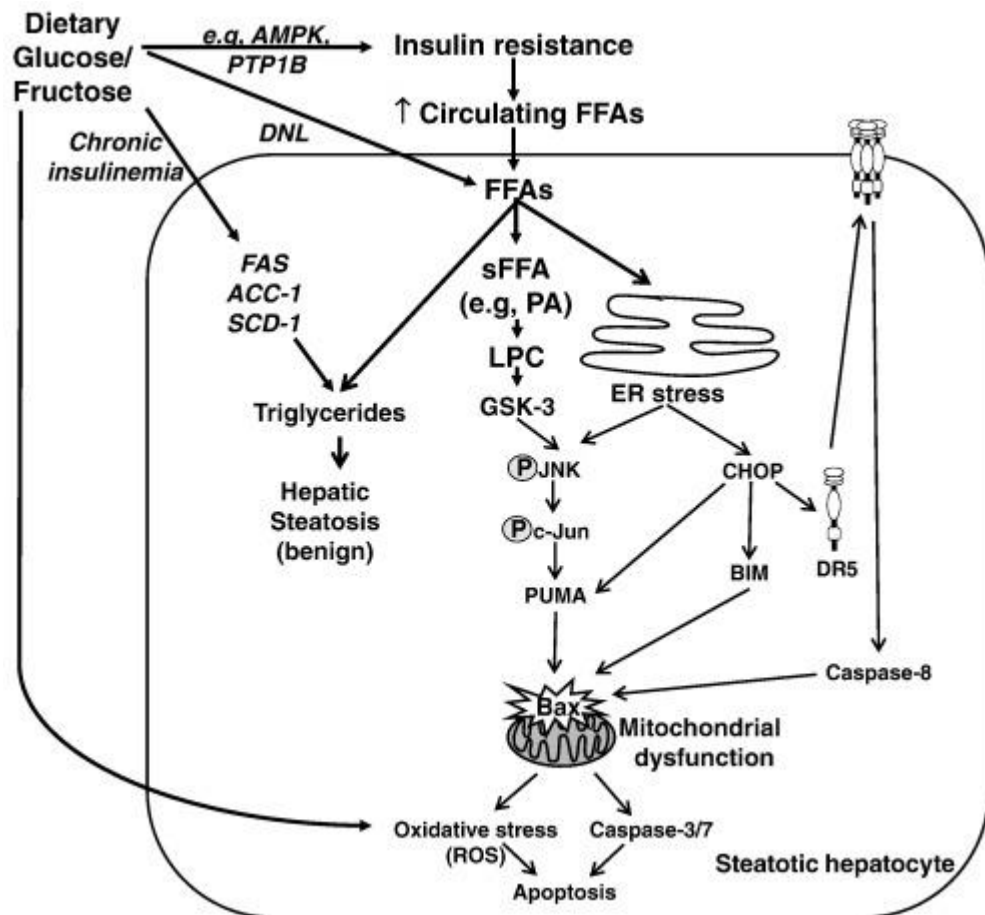
a vápníku do mitochondrií (Martel, 2013). Takto vzniklý edém vede k uvolnění cytochromu c a rozvoji apoptózy. Navíc volný cholesterol se při NASH akumuluje v plasmatické membráně hepatocytů a v membránách mitochondrií a endoplasmatického retikula. V mitochondriích to vede k otevření *transition pore*, vzniku oxidačního stresu a apoptózy mechanismem závislým na JNK1 (Win, 2015).

Hlavním markerem mitochondriální dysfunkce je však produkce ROS během oxidačního stresu. Na poškození hepatocytů a progresi NAFLD do NASH se významně podílí cytochrom P450 2E1 (CYP2E1). Podporuje oxidační stres, zánět, modifikaci proteinů a inzulinovou rezistenci. Velké množství CYP2E1 se nachází v mitochondriích, kde se podílí na hydrolýze různých nízkomolekulárních látek, např. ethanolu, za vzniku toxického superoxidového aniontu jako vedlejšího produktu, který narušuje mitochondriální respirační řetězec a ovlivňuje další mitochondriální funkce (Abdelmegeed, 2012). Pokud mitochondriální nebo peroxisomální funkce nezvládá zvýšený přísun lipidů, zhorší se lipidová homeostáza tvorbou toxických lipidových metabolitů a nadprodukcí ROS. Všechny tyto molekuly aktivují zánětlivé dráhy a zhoršují mitochondriální poškození. Dále ROS mohou společně s oxidovanými LDL lipoproteiny aktivovat Kupfferovy a Itovy buňky a tím dále podporovat vznik zánětu a fibrózy v játrech (Buzzetti, 2016).

### ***Zánětlivý stav***

Zvýšené hladiny FFA s následnou lipotoxicitou, inzulinová rezistence a dysfunkce periferní tukové tkáně aktivují a udržují produkci prozánětlivých cytokinů, a to jak lokálně v játrech, tak systémově. Dvěma hlavními zánětlivými drahami při NAFLD je JNK-AP-1 a skupina transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B (nukleární faktor kappa B). Trvalá aktivace těchto drah byla prokázána u zvířecích modelů NAFLD i u pacientů s NASH. Perzistentní aktivace NF- $\kappa$ B v hepatocytech vede k chronickému zánětlivému stavu a rezistenci na inzulin (Cai, 2005).

Studie na zvířecích modelech podporují klíčovou úlohu vlivu cytokinů na játra v průběhu progresu od jaterní steatózy k NASH. Tyto studie demonstrují, že jaterní expozice zvýšeným hladinám prozánětlivých cytokinů vede k histologickým změnám typickým pro NASH, jako je nekróza a apoptóza hepatocytů, chemotaxe neutrofilů, aktivace Itových buněk a vznik Malloryho tělísek. Zánět a aktivace NF- $\kappa$ B mohou navíc podporovat karcinogenezi, a proto chronický zánětlivý stav může hrát roli v rozvoji HCC (Buzzetti, 2016).



Obr. č. 6: Molekulární mechanismy lipotoxicity v hepatocytu

FFA – volné mastné kyseliny; sFFA – nadbytek nasycených FFA; ER – endoplasmatické retikulum; glykogen-syntázová kináza (GSK-3) aktivovaná pomocí LPC a dále aktivující JNK; DR5 – receptor smrti, jehož exprese je aktivována pomocí CHOP, který je shlukován na povrchu buňky, čímž se aktivuje kaspáza-8, která indukuje Bax; nadbytečné sacharidy mohou vést ke chronické hyperglykémii, ke zvýšení jaterní steatózy pomocí lipogeneze de novo, mohou vyvolávat jaterní toxicitu prostřednictvím aktivace oxidačních a ER stresových odpovědí anebo modulací aktivity AMP-aktivované proteinkinázy (AMPK) a protein-tyrosin fosfatázy 1B (PTP1B); chronická hyperinzulinémie je také spojena se zvýšenou expresí jaterních lipogenních genů (ACC, FAS, SCD-1) (Mota, 2016).

### 1.3.10. Ochranná role některých lipidů

Přestože většina lipidů vykazuje hepatotoxické účinky, několik studií prokázalo protektivní působení vybraných lipidů proti indukované lipotoxicitě u hepatocytů (Mota, 2016).

Během studie, která ve svých pokusech vystavovala myší hepatocyty působení mononenasycených mastných kyselin (MUFA), bylo pozorováno, že MUFA sice vedly k akumulaci lipidů v podobě tukových kapének, nedocházelo však k rozvoji apoptózy.

Nasyčené FFA jsou v hepatocytech převáděny na MUFA pomocí stearyl-CoA desturázy-1 (SCD-1), hepatocyty jsou tak chráněny před FFA-indukovanou lipotoxicitou, kdy jsou toxické FFA uskladněny ve formě TAG (Li, 2014). Další z nedávných studií prokázala ochrannou úlohu palmitooleátu (PO), což je MUFA působící jako lipokin v tukové tkáni, proti apoptóze u primárních kultur hepatocytů, nedokázal však ochránit buňky před steatózou. Zdá se, že PO blokuje odezvy na stres endoplasmatického retikula, a to blokováním BIM a PUMA, čímž ve výsledku chrání hepatocyty před aktivací dalšího mediátoru apoptózy, proteinu Bax (Akazawa, 2010).

Působení polyneenasycených mastných kyselin (PUFA) se jeví jako potenciální prevence proti rozvoji NASH. Pacienti s NASH mají sníženou hladinu  $\omega$ -3 PUFA, kyseliny eikosapentaenové a dokosahexaenové, což pravděpodobně přispívá k progresi steatózy ve steatohepatitidu. Příznivý účinek kyseliny eikosapentaenové byl prokázán u pacientů s NAFLD, u kterých při suplementaci této PUFA, docházelo ke zlepšení hlavních histologických rysů této nemoci (Nogueira, 2015). Podobné ochranné účinky PUFA byly prokázány rovněž v *in vitro* modelech s použitím buněčných linií Huh7. Zabránit PA-indukované apoptóze a zánětu jaterních buněk se může podáváním linoleátu ze skupiny  $\omega$ -6 PUFA. Tato PUFA inhibuje JNK a aktivaci nukleárního faktoru Kappa- $\beta$  (NF $\kappa$  $\beta$ ) a potlačuje produkci IL-8 (Maruyama, 2014). Protektivní roli u primárních kultur hepatocytů vůči působení kyseliny stearové hrála také kyselina  $\alpha$ -linolenová ze skupiny  $\omega$ -3 PUFA, která prokazatelně snižovala markery stresu endoplasmatického retikula (CHOP, HSP90B1, HSPA5) (Zhang, 2011).

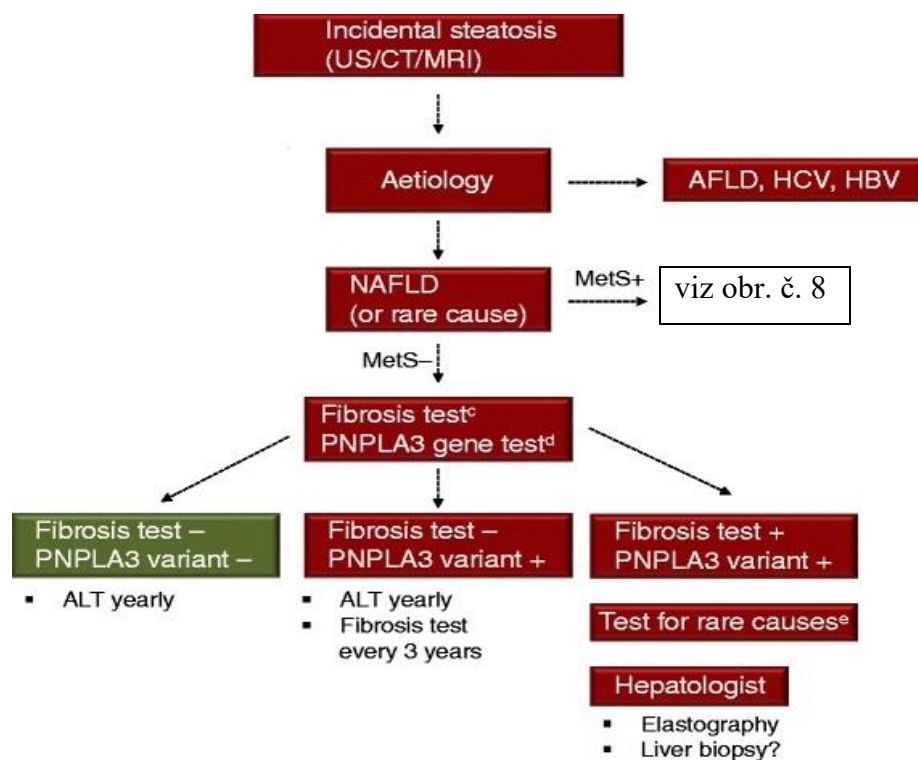
## 1.4. Diagnostika a léčba NAFLD

### 1.4.1. Klinický obraz

Velmi často má NAFLD asymptomatický průběh. Vlivem hepatomegalie, kdy jsou játra tuhá a kulovitá, může docházet ke tlakům v pravém podžebří nebo pocitům plnosti. Dále také mohou pacienti pociťovat celkovou únavu a slabost. Patrné bývají projevy metabolického syndromu jako je obezita androidního typu nebo hypertenze. Pacienti bývají většinou středního věku. Vzácně může dojít k jaternímu selhání (Příbramská, 2008).

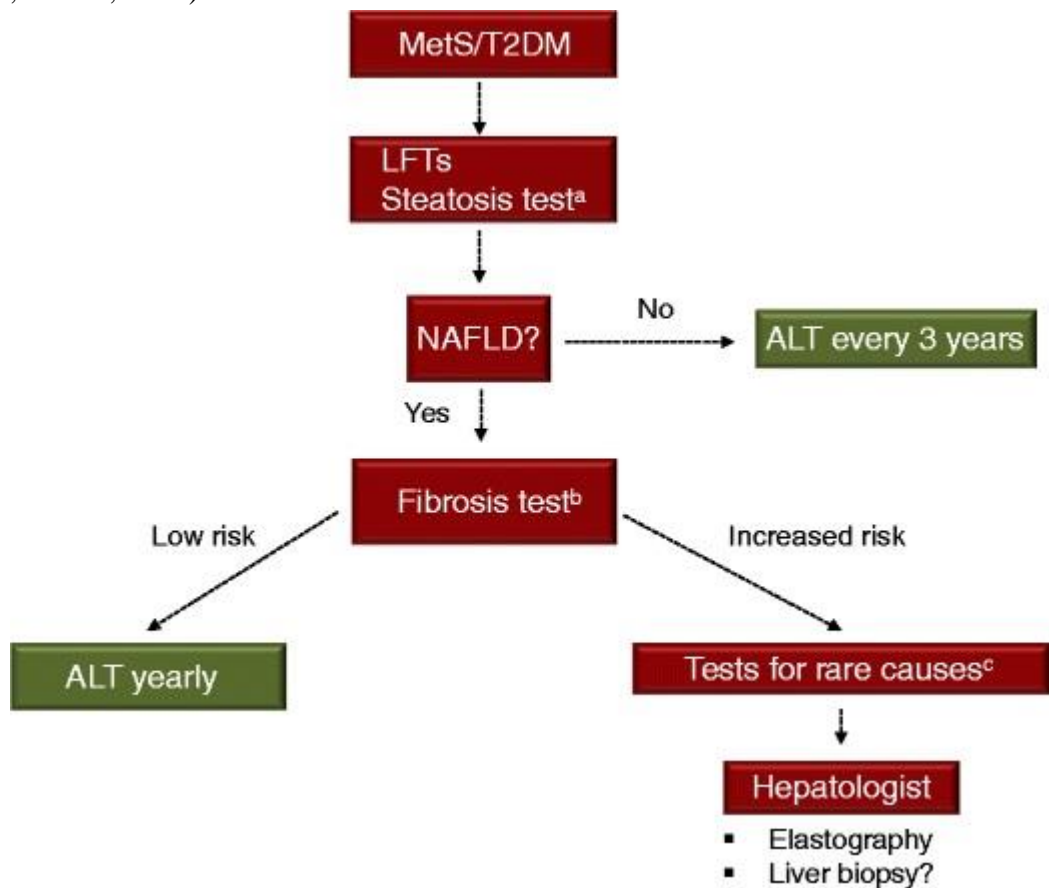
### 1.4.2. Diagnostika

Prostá jaterní steatóza může být diagnostikována několika způsoby. Biopsie jater patří mezi invazivní metody, kdy v případě NAFLD bývá pozorováno >5-10 % hepatocytů se steatózou. Další možností jsou zobrazovací metody jako je ultrazvuk (US), počítačová tomografie (CT) - semikvantitativní metoda hodnotící stupeň jasnosti jaterního parenchymu, nebo magnetická rezonance (MRI) (Zhou, 2016). Těmito zobrazovacími metodami však nelze vyloučit NASH, protože dochází pouze ke kvantifikaci steatózy. NASH lze diagnostikovat pouze jaterní biopsií. Zásadní význam má průkaz jaterní fibrózy, kterou lze prokázat vyšetřením biochemických markerů fibrózy jako je sérový hyaluronan, aminoterminální propeptid kolagenu III a 7S doména kolagenu VI (obr. č. 7 – fibrosis test).



Obr. č. 7: Postup při diagnostice NAFLD (Yki-Järvinen, 2016).

Pacienti s diagnostikovanou jaterní steatózou by měli být vedle vyšetření jaterních enzymů (ALT – alaninaminotransferáza, AST – aspartátaminotransferáza, bývá zvýšena hodnota ALT a poměr AST/ALT je spíše <1) dále vyšetřeni na parametry metabolického syndromu (Příbramská, 2008). Stanovuje se lipoproteinový profil, glykémie a hladina inzulínu v séru nalačno (obr. č. 8 – steatosis test). Důležité je rovněž vyloučit další možné příčiny jaterní steatózy, mezi než patří především alkohol, virová onemocnění nebo vliv léků. Vedle klinických markerů metabolického syndromu je nutné rovněž posoudit stravovací návyky a životní styl pacienta. Co se týče potravy, tak je kromě celkového energetického příjmu potřeba věnovat zvláštní pozornost spotřebě jednoduchých sacharidů a nasycených mastných kyselin, které jsou významné rizikové faktory pro rozvoj obezity, diabetu 2. typu a NAFLD (EASL, EASD, EASO, 2016).



Obr. č. 8: Postup při diagnostice NAFLD při potvrzení metabolického syndromu, LFT – funkční jaterní testy (Yki-Järvinen, 2016).

Pokud se prokáže, že NAFLD nevzniklo vlivem metabolického syndromu, stanovují se ostatní rizikové faktory, např. gen PNPLA3 (obr. č. 7) pomocí molekulárně biologických metod. Případně se provádějí další testy, kdy se vylučují různé vzácné příčiny jaterní steatózy

(obr. č. 8: tests for rare causes). Mezi možné příčiny jaterní steatózy, které se těmito testy vyšetřují patří např. autoimunitní onemocnění, celiakie, onemocnění štítné žlázy, Wilsonova choroba (Yki-Järvinen, 2015).

K posouzení potřeby jaterní biopsie a prokázání stupně fibrózy se používá vyšetření pomocí transientní elastografie (TE). TE je rychlá, neinvazivní technika měřící tuhost jaterní tkáně. Nad játry je umístěna sonda s ultrazvukovým převodníkem, která vytváří elastickou smykovou vlnu, jejíž rychlost se vztahuje na tuhost jater a stupeň fibrózy. TE je dostatečně specifická a citlivá pro průkaz pokročilé fibrózy, selhává přibližně u 20% případů, zejména v důsledku obezity (Ziol, 2005).

### **1.4.3. Histologický obraz**

Hlavním pilířem při diagnostice NAFLD ale i během klinických studiích tohoto onemocnění je histopatologické vyšetření jaterní tkáně. I když se jaterní biopsie řadí mezi invazivní metody, riziko morbidity či mortality způsobené biopsií jater je velice nízké. Biopsie jater bývá indikována v případě, že existuje podezření na více než jedno jaterní onemocnění. Řadou provedených jaterních biopsií bylo doloženo, že histologický obraz přibližně u 5 % pacientů, kterým byla indikována biopsie v rámci diagnostiky jiných jaterních onemocnění jako je např. chronická hepatitida typu C, vykazoval souběžně známky steatohepatitidy. U pacientů s různým stupněm NAFLD se histopatologicky diagnostikuje steatóza, lobulární zánět a perivenulární a portální fibróza (Bedossa, 2016). Na konferenci AASLD v Atlantě v USA v roce 2002 se z histologického pohledu NAFLD rozděluje podle toho, zda je přítomna:

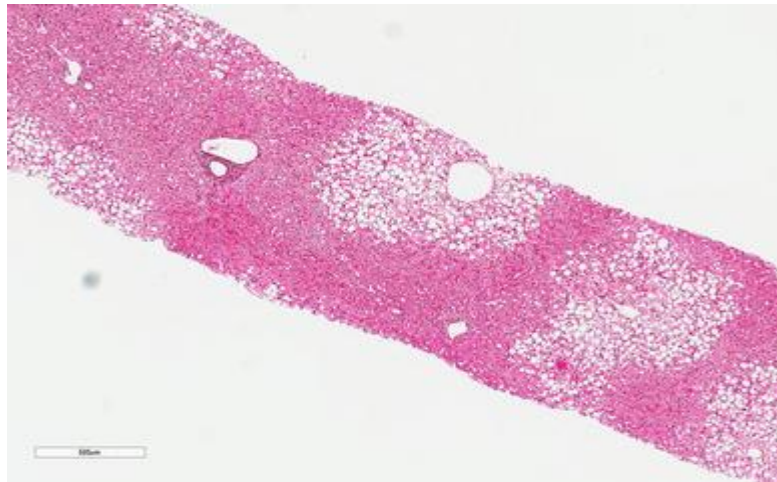
- prostá steatóza
- steatóza s lobulárním zánětem
- hepatocyty s regresivními změnami (balónová degenerace hepatocytů)
- fibróza nebo Malloryho tělíka (Příbramská, 2008).

#### ***Jaterní steatóza***

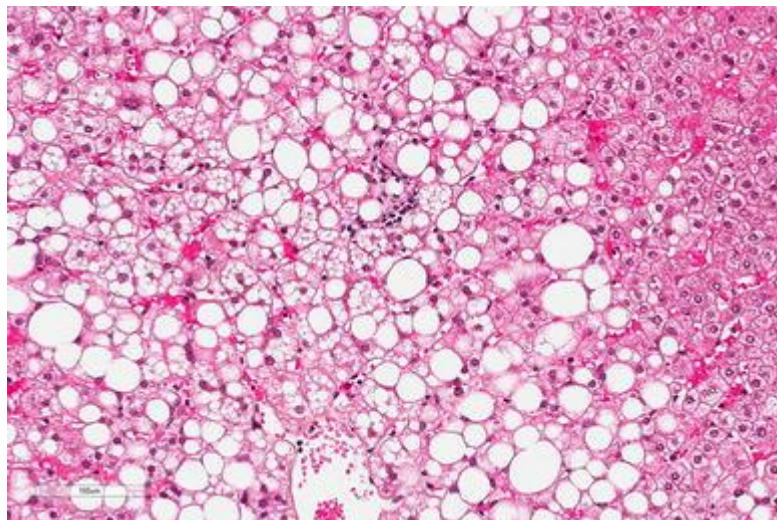
Na histologických řezech jaterní tkáně lze rozlišovat makrovezikulární steatózu (obr. č. 10) s jednou velkou tukovou kapénkou v hepatocytu nebo mediovezikulární steatózu, kdy je v hepatocytu přítomna směs různě velkých tukových kapének. Vzácnou formou je mikrovezikulární steatóza, při níž mají buňky pěnivý vzhled, což je způsobeno nespočtem malých tukových kapének v cytoplazmě hepatocytu. Při markovezikulární steatóze je téměř celý hepatocyt vyplněn tukovou kapénkou, jádro buňky je stlačeno ke straně a v extrémních případech může takto postižený hepatocyt vypadat jako adipocyt. Mediovezikulární steatóza je

charakteristická přítomností jedné nebo více menších kapének, které jsou však od sebe snadno odlišitelné a lze je dobře spočítat (Tiniakos, 2010). Typicky bývá steatóza rozdělena do tzv. centrovaného vzoru, při které jsou steatózou postiženy především hepatocyty v blízkosti *venae centralis* (obr. č. 9) (Kleiner, 2005).

Jaterní steatóza se dále klasifikuje do stupnice od 0 do 3. Hodnotí se procento hepatocytů se steatotickými vakuolami. Stupeň 0 značí zdravá játra s množstvím tukových kapének v hepatocytech do 5%, při <33% hepatocytů se steatózou hovoříme o stupni 1 a u steatózy stupně 2 a 3 je alespoň 33% resp. 66% hepatocytů steatotických (Bedossa, 2016).



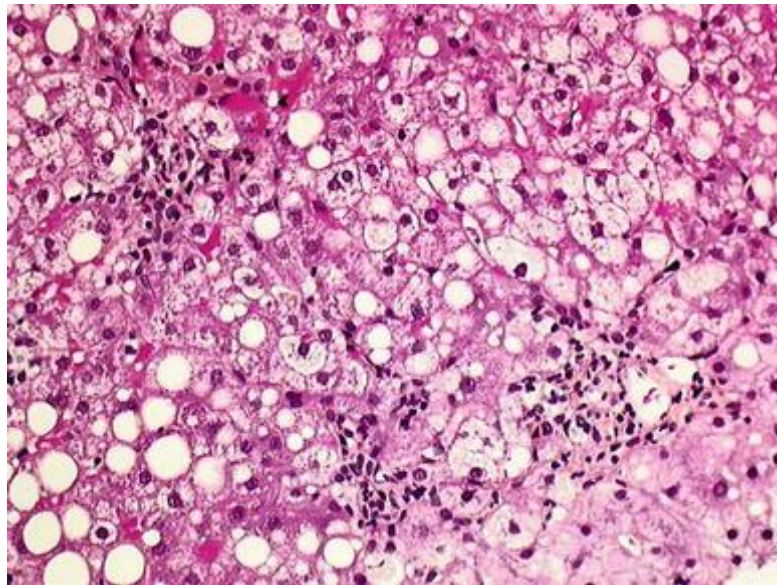
Obr. č. 9: Makrovezikulární steatóza v centrovaném vzoru (Bedossa, 2016).



Obr. č. 10: Detail makrovezikulární steatózy (Bedossa, 2016).

### ***Lobulární zánět***

V současné době neexistují žádné neinvazivní testy, které by byly schopny přesně odlišit pacienty s prostou steatózou od pacientů s NASH. V tomto případě je tedy jaterní biopsie nevyhnutelná. Aby mohla být diagnostikována NASH, musí vzorky obsahovat hlavní znaky tohoto onemocnění: balónovitou degeneraci hepatocytů a znaky lobulárního zánětu (obr. č. 11) (Sakhuja, 2016).



Obr. č. 11: Hepatocyty se steatózou, balónová degenerace hepatocytů a několik zánětlivých ložisek (Bedossa, 2016).

Lobulární zánětlivé ložisko bývá tvořeno seskupenými mononukleáry, Kupfferovými buňkami, mikrogranulomy, ale také hepatocyty v apoptóze. Obvykle se jedná o nižší stupeň zánětu, větší četnost zánětlivých ložisek naznačuje jiné příčiny zánětu, jako je alkoholová nebo léková toxicita. Vzácněji se také může objevit zánět *vena portae*, který bývá nalézán při závažnějších stavech a vyšším stupněm fibrózy. Portální zánět může tedy svědčit o horší prognóze onemocnění (Brunt, 2010).

### ***Balónová degenerace hepatocytů***

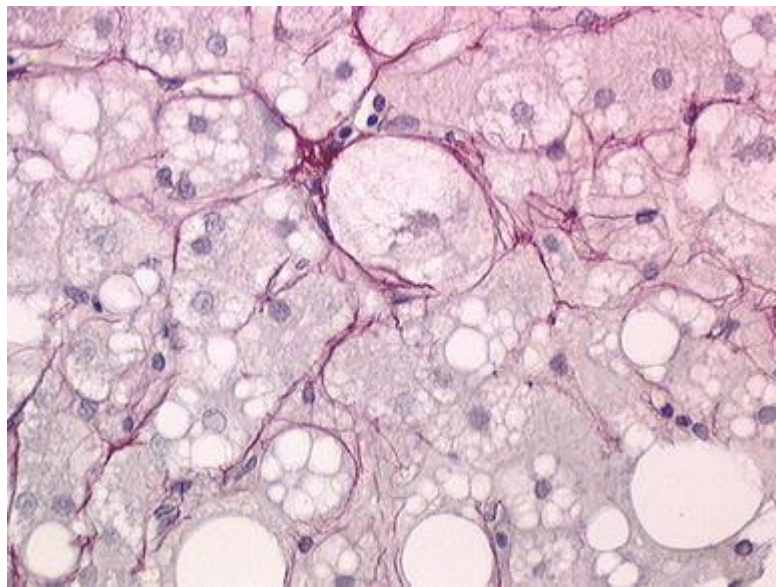
Druhým typickým histologickým nálezem u NASH je balónová degenerace hepatocytů. Tyto hepatocyty mají čirou, vločkovitou cytoplasmu bez vakuol a balónovitý tvar, díky němuž postrádají své typické úhly. Velikost buněk může, ale nemusí být zvětšena. Balónová degenerace hepatocytů bývá nejčastěji pozorována ve 3. zóně primárního jaterního acinu, kde bývají promíseny s perisinusoidálními kolagenovými vlákny (Kleiner, 2005). Příčina balónování cytoplasmy hepatocytů však není doposud známa.



Dalšími možnými znaky hepatocelulárního poškození jsou apoptotická tělíska hepatocytů, mikrogranulomy, lipogranulomy, zvětšené mitochondrie nebo přítomnost železa v hepatocytech (Bedossa, 2016).

### ***Malloryho tělíska***

Malloryho tělíska jsou mikroskopická hyalinní, acidofilní klubka nacházející se v cytoplasmě hepatocytů (obr. č. 12). Množství hepatocytů s Malloryho tělisky koreluje se závažností NASH. Velké množství těchto tělísek bývá při alkoholovém poškození jater, při NASH bývají hůře rozpoznatelné a mnohdy jsou detekovány pouze pomocí imunohistochemických metod za použití specifických protilátek (Guy, 2012).



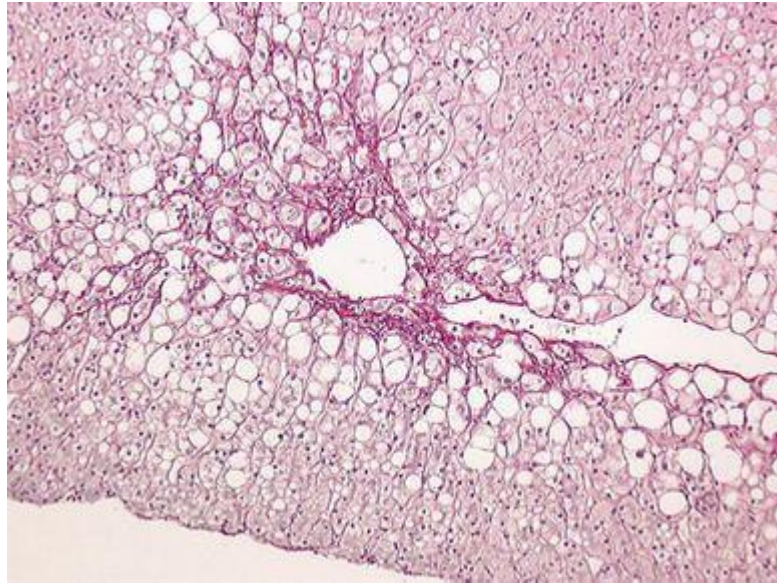
*Obr. č. 12: Balónovitý hepatocyt s Malloryho tělískem, obklopen vlákny perisinusoidního kolagenu (Bedossa, 2016)*

### ***Fibróza***

Jaterní fibróza je hlavním rysem, který má vliv na celkovou mortalitu související s poškozením jater, a to bez ohledu na závažnost ostatních histologických rysů NAFLD (Younossi, 2011). Kupfferovy buňky jsou aktivovány prozánětlivými cytokiny a uvolňují řadu dalších cytokinů stimulující Itovy buňky. Tyto buňky se následně transformují v myofibroblasty, které produkují extracelulární matrix, profibrogenní cytokiny a zahajují proces fibrogenese. Ke zmnožení vaziva v jaterní tkáni nemusí docházet pouze na podkladě zánětlivých mediátorů, fibrogenezi mohou spouštět např. také ROS (Ekstedt, 2015).

Počáteční fáze fibrogenese v játrech je charakteristická perisinusoidálním ukládáním kolagenových vláken (obr. č. 13). V další fázi začnou kolagenová vlákna obklopovat

hepatocyty. Tato fibróza může v tomto stavu setrvat po delší dobu, často se však dále vyvíjí do fibrózy periportální. V nejpokročilejším stádiu fibrózy se už hovoří o jaterní cirhóze (Younossi, 2011).



Obr. č. 13: Perisinusoidová fibróza. Počáteční fáze fibrózy, kolagenová vlákna se zachycenými balónovitými hepatocyty (Bedossa, 2016).

#### 1.4.4. Léčba

Terapie NAFLD by se měla zaměřovat na zlepšení parametrů metabolického syndromu, který s rozvojem jaterní steatózy ve většině případů úzce souvisí. Léčba metabolického syndromu navíc může působit preventivně proti rozvoji dalších komplikací jako je diabetes 2. typu nebo ateroskleróza (Ballestri, 2016).

Zásadním bodem terapie NAFLD je změna životního stylu. Pozitivní výsledky přináší 7-10% úbytek hmotnosti pacienta, a to vlivem jak zvýšené fyzické aktivity, tak vhodnými stravovacími návyky. Je obecně známo, že je vhodné omezit vedle celkového příjmu kalorií také příjem nasycených mastných kyselin, sacharidů a nápojů bohatých na fruktózu, naopak zvýšit by se měl příjem MUFA a PUFA s dlouhým řetězcem (Tapper, 2015).

Indikovanými léčivy mohou být látky ovlivňující lipidový a lipoproteinový metabolismus. Statiny svým mechanismem účinku snižují LDL-lipoproteiny, fibráty aktivují lipoproteinovou lipázu a blokují intracelulární lipolýzu (Nascimbeni, 2016). Z důvodu častého výskytu diabetu 2. typu a hypertenze u pacientů s NAFLD bývají aplikována antidiabetika a antihypertenziva. Významné je rovněž užívání látek s antioxidačními vlastnosti jako ochrana před oxidačním stresem a samozřejmě také léčiv, které chrání před vznikem fibrózy a progresu NAFLD (Ballestri, 2016).

## 2. Modelové systémy pro studium lipotoxicity *in vitro*

Játra jsou parenchymový orgán s celou řadou životně důležitých funkcí. Podílí se na energetickém metabolismu, biotransformaci xenobiotik, detoxikaci látek, významně se zapojují do funkce imunitního systému, dále se v játrech tvoří žluč, probíhá zde syntéza sérových proteinů (Bell, 2016). Játra mají také skladovací funkci a to např. při skladování energie ve formě jaterního glykogenu. Hlavní jaterní buňkou je hepatocyt, který tvoří až 80% jaterní hmoty a podílí se na většině výše uvedených funkcích. Mezi zbylé neparenchymové buňky patří Kupfferovy buňky, cholangiocyty, Itovy (hvězdnicovité) buňky a buňky imunitního systému včetně lymfocytů a neutrofilů. Pro studium biologie a funkce jater, hepatotoxicity a onemocnění jater *in vitro* se využívá celá řada modelových systémů (Kyffin, 2018).

### 2.1. Používané *in vitro* modely jater

Současné modelové systémy *in vitro* využívané obecně pro studium hepatotoxicity mají však řadu omezení. Není možné zachytit složitost multicelularity a interakce buňka-buňka nebo buňka-tkáň pomocí současných, běžně používaných 2D modelů. *In vitro* modely mají omezenou životnost, to se jeví jako problém především při studiu dlouhodobých účinků různých látek. Izolace lidských jaterních buněk je z řady důvodů komplikovaný postup (Kyffin, 2018).

Globální praxí je využití zvířecích modelů pro *in vivo* i *in vitro* pokusy. Z důvodu mezidruhových rozdílů je však obtížné hodnotit výsledky pokusu na zvířatech a předpovídat podle nich *in vivo* reakce u lidí. Rovněž z etických úvah je kladen důraz na vývoj relevantních a reprezentativních lidských *in vitro* modelů (Taylor, 2008).

Mezi běžně využívané 2D *in vitro* modely patří izolované primární hepatocyty, buněčné linie pocházející z jaterní tkáně a jaterní řezy. Tyto systémy však mohou být méně reprezentativní pro představu mechanismů v játrech *in vivo*. Komplexnější modely se získávají pomocí 3D kultivace, kdy se za pomoci nejrůznějších hydrogelů vytvoří nosné lešení, ve kterém pak buňky mohou růst ve 3D prostoru. Složitost systému může být dále zvýšena přidáním jiných neparenchymových buněk nebo přidáním toku kapaliny pomocí mikrofluidního zařízení (Kyffin, 2018).

### **2.1.1. Primární kultury hepatocytů**

Primární buněčné kultury jsou buňky, které se izolují ze živého organismu přímo z dané tkáně. Vzhledem k obtížné izolaci jsou lidské primární kultury hepatocytů méně často využívány. Za zlatý standart *in vitro* modelu metabolických a hepatotoxických studií jsou považovány primární kultury myších nebo potkaních hepatocytů, které jsou kultivovány přichycené v jedné vrstvě na povrchu kultivační nádoby v tzv. monolayeru (Kyffin, 2018). Při úspěšné izolaci a vhodných kultivačních podmínkách si primární kultury hepatocytů zachovávají své důležité vlastnosti jako je: metabolická enzymová aktivita, exprese jaterních transportérů, metabolismus glukózy, detoxikace amoniaku, sekrece močoviny a tvorba albuminu (Knobeloch, 2012). Úskalím systému je ztráta těchto specifických jaterních funkcí po přibližně 72 hodinách, buňky dediferencují a ztrácí svou specializaci (Godoy, 2013).

### **2.1.2. Jaterní řezy**

Hlavní výhodou tohoto systému v porovnání s ostatními *in vitro* jaterními modely při studiích hepatotoxicity, je to, že zůstává zachována jaterní mikroarchitektura se všemi typy jaterních buněk se specifickou aktivitou CYP450. Lidská jaterní tkáň se získává z odstraněné tkáně během chirurgických výkonů jako je částečná hepatektomie nebo z netransplantované donorové tkáně (Elferink, 2011). Na rozdíl od izolací primárních kultur zde není nutná inkubace s proteolytickými enzymy, zůstávají proto zachovány interakce buňka-buňka a nenarušují se jiné složky tkáně. Podmínky izolace se navíc mezidruhově neliší. Životaschopnost jaterních řezů se pohybuje okolo 24 hodin, nejsou tak vhodné pro studie, které se zabývají toxicitou po opakované dávce dané látky (Godoy, 2013).

### **2.1.3. Jaterní buněčné linie**

Ve snaze překonat některá omezení primárních buněčných kultur se využívají také buněčné linie odvozené z imortalizovaných hepatocelulárních karcinomů. Jedná se o buněčné linie HepG2, C3A, HepaRG a Huh7. Tyto buněčné linie se vykazují relativně stabilní fenotyp, snadnou manipulaci v laboratoři a neomezeno životnost. Úskalím však bývá jejich snížená metabolická kompetence v důsledku nedostatečné exprese klíčových metabolizujících enzymů (Donato, 2015).

Buněčná linie HepG2 se využívá díky expresi nukleárního transkripčního faktoru (Nrf2), který se uplatňuje při metabolismu léčiv, dále je tato buněčná linie poměrně snadno dostupná, neexistují variability u těchto buněk mezi jednotlivými dárci a nevyžaduje náročné kultivační podmínky (Jennen, 2010). Bylo však prokázáno, že buňky HepG2 v porovnání

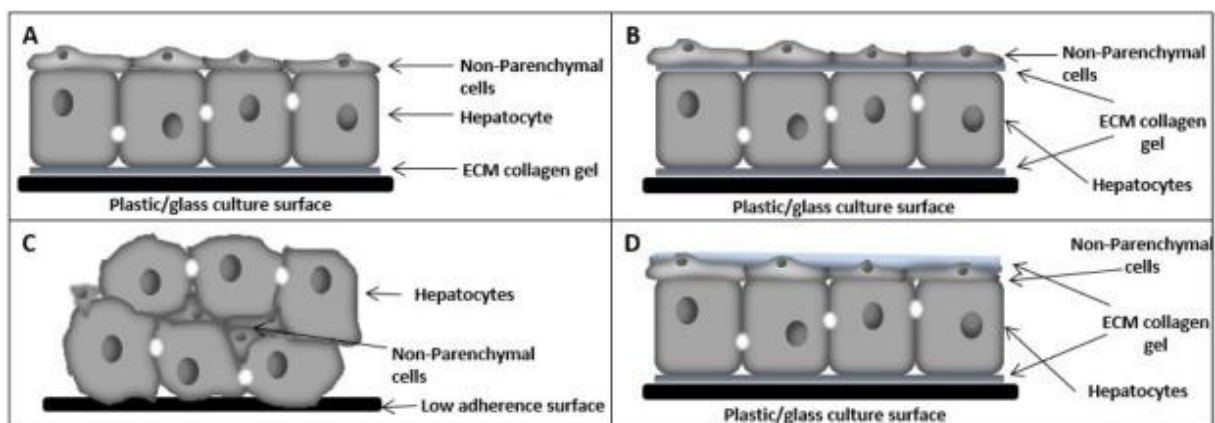
s primárními kulturami hepatocytů, nemají odpovídající hladinu exprese CYP, a proto plně neprezentují fenotyp hepatocytů *in vivo* (Atienzar, 2014).

Buňky C3A jsou subklonem buněk HepG2 a vykazují lepší vlastnosti než jejich mateřské buňky. Zvýšeně produkují albumin, alfa-fetoprotein a mají schopnost prospívat a proliferovat v kultivačních médiích s nedostatkem glukózy. Často se tento typ buněk využívá ve 3D kultivačních systémech (Sun, 2014).

Buněčná linie HepaRG exprimuje řadu biotransformačních enzymů a membránových transportérů ve srovnatelném množství s čerstvě izolovanými nebo kultivovanými primárními lidskými hepatocyty. HepaRG mají při nízké denzitě při nasazení prodlouženou dediferencovanou morfologii. Poté se aktivně rozdělí a po dosažení konfluence vytvoří typické kolonie připomínající hepatocyty obklopené buňkami, které jsou podobné epiteliálním buňkám. Většina literatury také uvádí jejich zvýšenou expresi CYP450 a také expresi specifických markerů pro dospělé hepatocyty (Kyffin, 2018). Pravděpodobně hlavním omezením této buněčné linie je jejich dlouhá kultivace. Buňky se nasazují při nízké denzitě a až po 14 dnech jsou buňky schopné diferencovat v buňky podobné hepatocytům. Rovněž jsou zapotřebí speciální kultivační média a proto mohou být náklady na kultivaci HepaRG buněk až 100krát dražší než běžně užívané linie (Aninat, 2006).

#### 2.1.4. Kokultivace

Prokázalo se, že kultivace hepatocytů společně s jinými typy buněk (obr. č. 14), především s neparenchymálními jaterními buňkami (NPC), zvyšuje jejich životnost a funkčnost.



Obr. č. 14: Kokultivační jaterní modely. A – kultura hepatocytů, pěstované na povrchu s vrstvou kolagenu, překryté vrstvou NPC. B – sendvičová kultivační metoda s dvěma vrstvami kolagenu a překryté vrstvou NPC. C – sférická kultivace hepatocytů s NPC. D – sendvičová metoda, kdy jsou hepatocyty v přímém kontaktu s NPC (Kyffin, 2018).

### 2.1.5. Sféroidy

Modelové systémy *in vitro* kultivované 3D metodami jsou v současné době rychle se rozvíjející a to především z důvodu zachycení složitosti daného mikroprostředí s cílem zlepšení funkčnosti, životnosti a relevance kultivovaných buněk (Bell, 2016). Základním principem pro vznik sféroidů je to, že buňky izolované ze tkání nebo z buněčných linií, pokud je zabráněno adhezi kultivovaných buněk, jsou schopny samovolné konformace do sférického útvaru v důsledku specifických lokálních interakcí mezi buňkami samotnými. Hlavní výhodou kultivace buněk ve formě sféroidu jsou zvýšené interakce mezi jednotlivými buňkami. Většina buněk je tak v těsném kontaktu mezi sebou, komunikují spolu a vytvářejí vlastní extracelulární matrix (ECM). Sféroidní konformace tak mnohem více napodobuje podmínky *in vivo*. K vytvoření sféroidu navíc stačí malý počet buněk (Kyffin, 2018).

Sféroidy se tvoří pomocí buněčného samouspořádání, zjistilo se však, že ne všechny buněčné linie jsou schopny tvořit sféroidy samovolně (Iles, 2016). Jednou z možností je kultivovat buňky opouzdřené pomocí hydrogelů se specifickou tuhostí a propustností. Jedná se o tzv. enkapsulované sféroidy (Lee, 2015). Dalším způsobem 3D kultivace hepatocytů jsou techniky využívající přírodní nebo syntetická lešení. Vybrané lešení napodobuje ECM a samozřejmě je zde nutná biokompatibilita s buňkami. Ideální alternativou ECM pro hepatocyty jsou decelularizovaná lidská játra, jejichž dostupnost je však značně omezená, lze proto také použít synteticky připravená lešení např. ze síťovaného a modifikovaného polystyrenu (Mattei, 2017; Kyffin, 2018).

### 3. Cíl práce

- 1) Práce s primárními kulturami hepatocytů, stanovení denzity a viability buněk, příprava primárních kultur hepatocytů v monolayeru.
- 2) Indukce lipotoxicity lysofosfatidylcholinem v primárních kulturách hepatocytů v podmínkách *in vitro*.
- 3) Příprava a zpracování vzorků získaných z primárních kultur hepatocytů pro stanovení základních parametrů poškození hepatocytů v podmínkách *in vitro*.
- 4) Stanovení LDH *leakage*, WST-1 test, stanovení aktivity kaspázy-3, mikroskopické hodnocení
- 5) Optimalizace dávky lysofosfatidylcholinu

## 4. Metodická část

### 4.1. Použité roztoky

- **Roztok A**

8 g NaCl; 2,188 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,4 g KCl; 0,19 g EGTA; 0,1206 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O; 0,0977 g MgSO<sub>4</sub>.xH<sub>2</sub>O; 0,06 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Vše bylo následně doplněno destilovanou vodou na objem 1000 ml.

- **Roztok B**

4,8 g NaCl; 1,314 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,3528 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,24 g KCl; 0,07236 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O; 0,05862 g MgSO<sub>4</sub>.xH<sub>2</sub>O; 0,036 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Vše bylo doplněno destilovanou vodou na objem 600 ml.

Pozn.: obvykle se používá 0,2 g surové kolagenázy do 200 ml recirkulačního roztoku, množství surové kolagenázy může být upraveno podle aktivity používané šarže.

- **Roztok C (Krebs – Henseleitovo médium)**

6,9 g NaCl; 2 g NaHCO<sub>3</sub>; 1,333 g albuminu; 0,9 g glukózy; 0,374 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,36 g KCl; 0,1441 g MgSO<sub>4</sub>.xH<sub>2</sub>O; 0,13 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Glukóza byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody pro infuze, albumin ve 100 ml C roztoku pro práci s izolovanými buňkami.

- **Kolagen** (Collagen from rat tail, Sigma – Aldrich)

2 mg kolagenu rozpuštěno v 6,66 ml kyseliny octové (20 mmol/l).

- **Williamsovo E médium kompletní**

Fetální bovinní sérum (FBS– 6%), penicilin (100 IU/ml), streptomycin (10 mg/ml), dexamethazon (4 mg/ml), glutamin (2 mmol/l), inzulin (0,08 IU/ml) a glukagon (0,008 µg/ml).

- **Williamsovo E médium inkompletní**

Neobsahuje FBS, jinak je složení stejné jako Williamsovo E médium kompletní.



- **Trypanová modř** (Trypan blue solution, Sigma – Aldrich)

Kat. č. 93595 – 0,4%, for microscopy.

- **LDH činidlo** (DiaSys)

Činidlo R1 – LDH FS DKGC, 800 ml.

Činidlo R2 – LDH FS DGKC, 200 ml.

Činidla ředěna v poměru 1:4.

- **WST-1 činidlo** (Cell proliferation reagent, Roche)

Činidlo bylo před použitím ředěno inkompletním Williamsovým E médiem v poměru 1:10.

- **Substrát pro kaspázu 3** (Caspase-3 substrate, Enzo)

Substrát rozpuštěn v DMSO, pH = 7,5. Před použitím byl substrát naředěn přidáním 66  $\mu$ l substrátu do 30 ml daného pufru. Složení tohoto pufru je následující. Ve 150 ml je obsaženo 715 mg HEPES, 150 mg CHAPS, 115 mg DTT a 87 mg EDTA. Je nutné upravit pH na 7,4 pomocí 5 M NaOH.

- **Lysofosfatidylcholin** (LPC)

Zásobní roztok o koncentraci 20 mmol/l. Rozpuštěno ve směsi DMSO a DMEM v poměru 1:1.

## **4.2. Práce s primárními kulturami hepatocytů**

### **4.2.1. Izolace hepatocytů**

Pro izolaci hepatocytů se používali potkaní samci kmene Wistar. Po otevření dutiny břišní byl do *vena cava inferior* aplikován heparin ve fyziologickém roztoku. Následovalo promývání jater, kdy přes portální žílu, která byla kovovou kanylou napojena na perfúzní aparaturu, byl připádně promývací roztok A. *Vena cava inferior* byla po začátku perfúze rozstříhnuta, aby nedošlo k poškození jater vlivem tlaku. Poskončení proplachu jater roztokem A byla játra vyjmuta a perfundována roztokem B (obsahujícím kolagenázu), která rozkládá kolagenová vlákna. Poté byla játra umístěna do kádinky s roztokem C, kde došlo k rozvolnění jaterních struktur. Jemným tlakem jater proti stěně kádinky byla získána suspenze hepatocytů. Tato suspenze byla následně přefiltrována přes 8 vrstev gázy do centrifugační zkumavky.

Centrifugace trvala 5 min, při 500 otáčkách (28 g), při 4 °C. Po odlití supernatantu byly hepatocyty promyty roztokem C a znovu centrifugovány (5 min, 4 °C, 28 g), poté byl ještě jednou zopakován celý tento postup. Zkumavka s takto připravenou suspenzí hepatocytů byla od tohoto kroku po celou dobu umístěna v nádobě s ledem a ihned po posledním promytí bylo provedeno počítání viability a stanovení denzity hepatocytů.

### **4.2.2. Viabilita**

Ihned po izolaci se stanovovalo množství živých a mrtvých buněk – viabilita. Na podložním sklíčku se smíchalo 10 µl 100krát zředěné suspenze buněk (0,99 ml roztoku C + 0,01 ml resuspendovaných buněk) s 10 µl Trypanové modři. Po přiložení krycího sklíčka následovalo mikroskopické odečítání viability, kdy se v 10 zorných polích spočítalo množství živých a mrtvých buněk, z čehož se vypočítala hodnota viability v procentech. Hepatocyty, které měly poškozenou plazmatickou membránu přijímaly barvivo a byly zbarveny do modrofialova, zatímco živé buňky zůstaly bezbarvé. Všechny izolace použité pro experimenty měly viabilitu hepatocytů > 90%.

### **4.2.3. Denzita**

Počítání buněk bylo provedeno pomocí automatického přístroje Cellometer<sup>TM</sup> auto T4, který byl propojený s počítačem. Do c-chipu bylo napipetováno 20 µl suspenze 100krát naředěných buněk a výsledek byl uveden v milionech buněk/ml.

#### 4.2.4. Monovrstva hepatocytů

Práce byla prováděna v laminárním boxu s použitím vhodných ochranných pomůcek. Povrch jamek mikrotitračních destiček (well plate – WP) bylo nejprve zapotřebí upravit, aby se buňky mohly dostatečně přichytit (tzv. kolagenování). Do jamek bylo pipetováno přiměřené množství roztoku kolagenu, dno destiček muselo být kompletně pokryté kolagenem. Po 10 minutách byl kolagen odsán zpět do lahvičky. Roztok kolagenu má pro kultivaci hepatocytů příliš kyselý pH, proto bylo nutné jamky, po stažení roztoku kolagenu, neutralizovat stejným množstvím roztoku C, který byl po 10 minutách vyklepnut. Takto upravené WP již byly připraveny k použití.

Do destiček byl napipetován příslušný objem buněčné suspenze (viz. tabulka č. 1). V 96 jamkové WP destičce byl první sloupec využit jako slepý vzorek – nedosahoval buněčnou suspenzi. Destičky s buňkami byly umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 % relativní vlhkost vzduchu), kde byly inkubovány 2 hod.

Tab. č. 1: Objemy a množství buněk v destičkách

Počet jamek v destičce	Denzita zásobního roztoku [mil. bb/ml]	Pipetovaný objem [μl]	Množství buněk v jamce
6	0,5	2000	1 000 000
12	0,5	800	400 000
24	0,5	400	200 000
96	0,5	66	33 000

#### 4.2.5. Příprava ředění lysofosfatidylcholinu

Ze zásobního roztoku lysofosfatidylcholinu (LPC) o koncentraci 20 mmol/l byly připraveny roztoky LPC o požadované koncentraci (0 – 100 μmol/l). Ředění bylo provedeno přidávkem inkompletního Williams. E média (viz tab. č. 2) na celkový objem 15 ml.

##### Výpočet pro roztok LPC o koncentraci 100 μmol/l:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

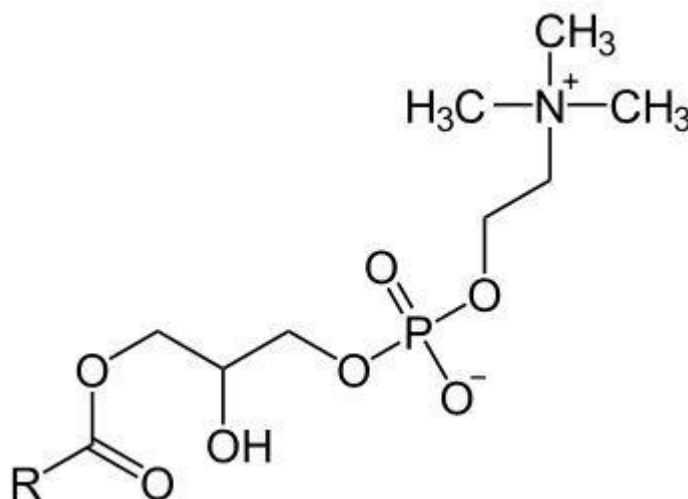
$$V_1 = \frac{0,1 * 15}{20}$$

$$V_1 = 0,075 \text{ ml LPC}$$

Tab. č. 2: Řada roztoků LPC

Koncentrace LPC [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Objem zás. roztoku LPC [ $\mu\text{l}$ ]	Objem inkomplet. Williams. E méd. [ml]
0	0	15
5	3,8	14,99
10	7,5	14,99
20	15	14,98
40	30	14,97
60	45	14,95
80	60	14,94
100	75	14,93

Po přichycení hepatocytů ke kolagenu byly destičky vyklepnuty a do každého typu destičky byly pipetovány roztoky LPC. Objem roztoků LPC byl pro každý typ destičky stejný jako pipetovaný objem suspenze buněk (viz Tabulka č. 1). Následovala 24 hodinová inkubace v  $\text{CO}_2$  inkubátoru.



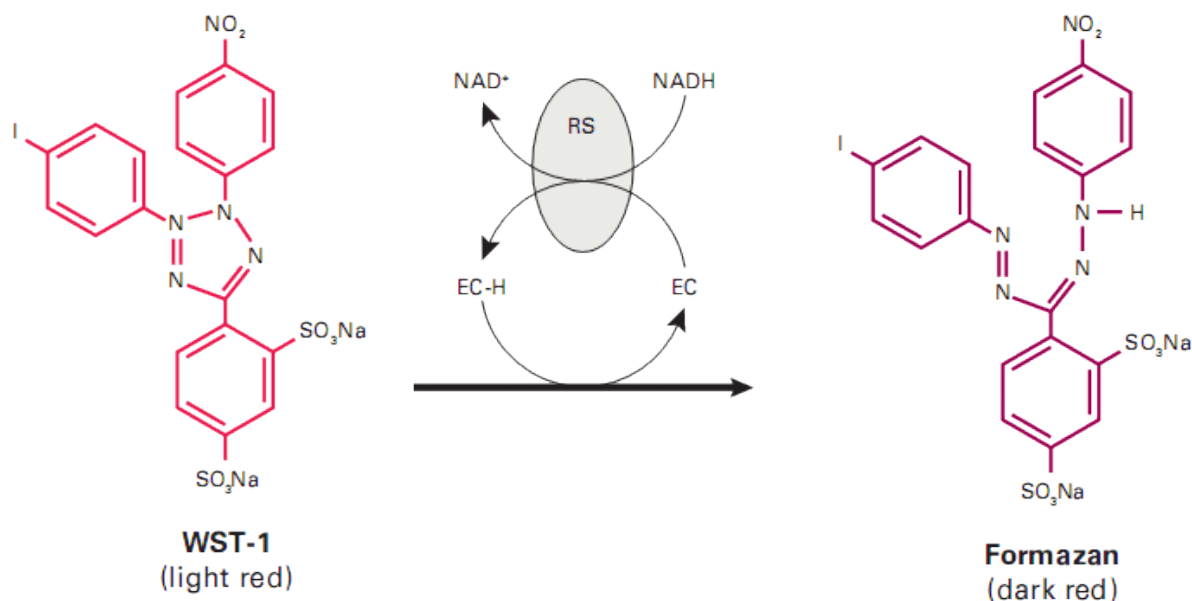
Obr. č. 15: Chemická struktura lysofosfatidylcholinu

(převzato z: <http://labelbluecosmeto.canalblog.com/archives/2009/01/05/11972544.html>).

### 4.3. Spektrofotometrické měření a mikroskopie

#### 4.3.1. Test WST-1

Test využívající WST-1 (4-(3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzendisulfonát) měří aktivitu buněčných dehydrogenáz a slouží jako marker viability buněk. Živé buňky jsou schopny redukovat tetrazoliovou sůl (WST-1) na barevný formazan. Výsledná změna absorbance je měřena spektrofotometricky (Biovision, 2013).



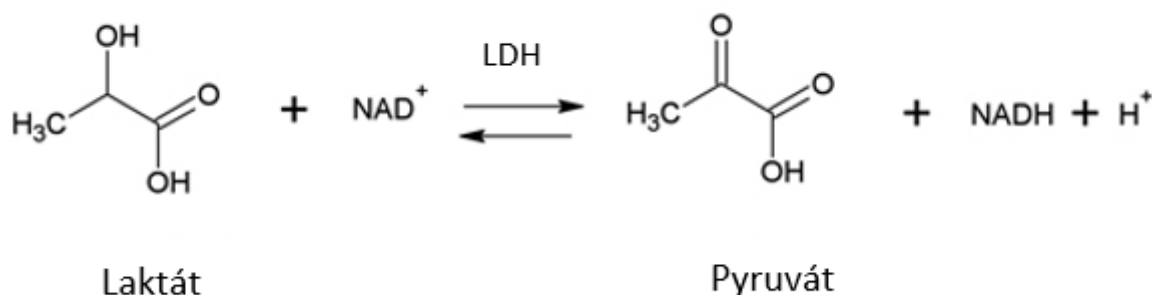
Obr: č. 16: Redukce WST-1 (převzato z: Clontech, 2007)

Pro tento test byly použity 96 WP. Obsah jamek byl po 24 hodinové inkubaci vyklepnut a poté se do všech jamek přidalo 66  $\mu$ l připraveného WST-1 činidla. Činidlo se před použitím naředilo v poměru 1:10 pomocí inkompletního Williamsova E média. Ihned byla změřena absorbance na přístroji Tecan Infinite M200 při vlnové délce 440 nm (čas 0). Destička byla poté umístěna do CO<sub>2</sub> inkubátoru s teplotou 37 °C. Další měření bylo provedeno po 1 hod (čas 1) a 2 hod (čas 2) od času 0. Výsledky byly graficky vyhodnoceny jako rozdíl (nárůst) absorbancí v čase 1, resp. v čase 2 od času 0 a v grafu jsou uvedeny jako procenta pro jednotlivé koncentrace LPC ku kontrole (procenta kontroly).

#### 4.3.2. Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu

Laktátdehydrogenáza (LDH) je redoxní enzym, který katalyzuje reverzibilní přeměnu laktátu na pyruvát. Existuje několik isoform tohoto enzymu, struktura molekuly je totiž tvořena 4 podjednotkami buď podjednotkou M (z angl. muscle) nebo H (z angl. heart). LDH je přítomna v cytoplazmě většiny buněk a do okolí se uvolňuje již při nepatrném poškození buněčné membrány. Slouží tak jako nespecifický marker rozpadu buněk. Při stanovení LDH se

spektrofotometricky měří nárůst absorpance odpovídající zvyšování koncentrace  $\text{NADH} + \text{H}^+$  (Sedlářová, 2015).



Obr. č 17: Reakce katalyzovaná LDH (převzato z: Dostál, 2009)

Pro stanovení aktivity laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu byly využity 24 hod inkubované 12 WP a 24 WP, ze kterých bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  vzorku do nové 96 WP. V každé 96 WP byly ponechány jamky pro LDH kalibrátor. Následovalo přidání 250  $\mu\text{l}$  LDH činidla a poté okamžité měření absorpance na Tecanu při vlnové délce 340 nm v čase 0 – 5 min.

#### 4.3.3. Aktivita laktátdehydrogenázy v buněčném lyzátu

Ke stanovení aktivity laktátdehydrogenázy v buněčném lyzátu byly rovněž využity 24 hod inkubované 12 WP a 24 WP. Po odebrání veškerého kultivačního média byly destičky krátce zamrazeny, aby došlo k rozbití buněčných membrán. Po rozmražení byla do jamek pipetována destilovaná voda, jejíž objem odpovídal původnímu objemu v jamce (viz tabulka č. 1). Pro měření aktivity LDH se pipetovalo 10  $\mu\text{l}$  vzorku a 250  $\mu\text{l}$  LDH činidla do nové 96 WP a měření proběhlo totožně jako měření aktivity LDH v kultivačním médiu.

Naměřená data byla zpracována dle vzorce:

$$\frac{a_{LDH EC}}{a_{LDH EC} + a_{LDH IC}} * 100$$

Výsledky jsou uvedeny jako *LDH leakage* v procentech.

#### **4.3.4. Aktivita kaspáz v kultivačním médiu**

Pro analýzu extracelulárních kaspáz se použily 12 WP a 24 WP, ze kterých se pipetovalo 50  $\mu$ l kultivačního média do nových 96 WP. Po přidání 150  $\mu$ l činidla pro kaspázy (obsahujícího fluorescenční substrát pro kaspázu 3), se změřila na Tecanu intenzita fluorescence při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm v čase 0, a poté každých 30 min až do celkového času 1,5 hod od času 0. Mezi jednotlivými měřeními byly destičky umístěny v CO<sub>2</sub> inkubátoru při teplotě 37 °C. Výsledky se graficky vyhodnotily jako nárůst intenzity fluorescence v jednotlivých časech od počátečního času. V grafech jsou výsledky uvedeny ve formě procent kontroly.

#### **4.3.5. Aktivita kaspáz v buněčném lyzátu**

Po odebrání kultivačního média, rozbití buněčných membrán a přidání destilované vody proběhlo vlastní měření totožně jako měření aktivity extracelulárních kaspáz. Objem destilované vody byl stejný jako objem kultivačního média.

#### **4.3.6. Mikroskopie**

K focení buněk byly určeny 6 WP destičky. K mikroskopu Olympus IX51 byl připojen digitální fotoaparát Olympus E-600. Buňky byly pozorovány a nafoceny ve fázovém kontrastu při zvětšení objektivu 20x.

#### **4.3.7. Statistika**

Naměřená data byla graficky vyhodnocena v programu Microsoft Excel 2016 a statisticky zpracována pomocí programu GraphPad Prism 8. Nejprve byly použity testy normality (Shapiro-Wilkův test a Kolmogorův-Smirnovův test). V případě normálního rozdělení dat byly výsledky zpracovány pomocí testů one-way ANOVA následované post-hoc (vícenásobným porovnávacím) testem (Turkeyův test). Při nenormálním rozdělení výsledků byly využity neparametrické testy rovněž následované post-hoc testem (Dunnettův test).

## 5. Výsledková část

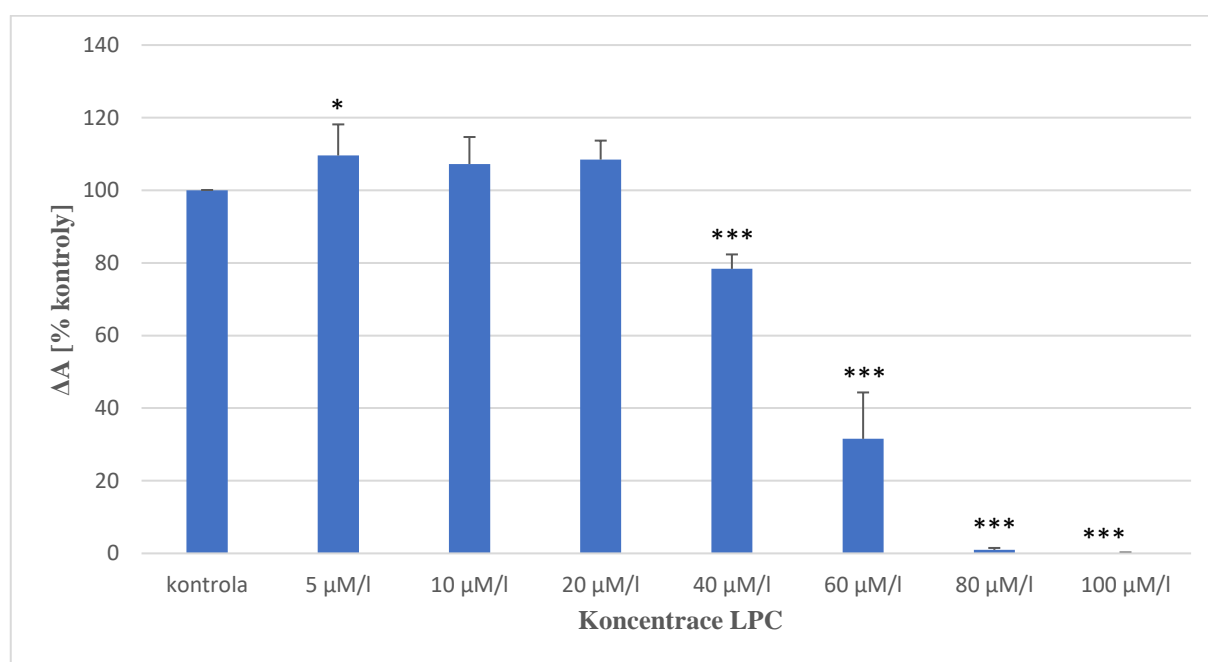
Pokusy byly opakovány alespoň 3x, přičemž ve všech měřeních byl zaznamenán podobný trend výsledků. Uvedené výsledky jsou typické pro daný typ měření.

### 5.1. Stanovení viability hepatocytů (test WST-1)

#### 5.1.1. Aktivita buněčných dehydrogenáz hepatocytů potkana vystavených LPC po dobu 24 hod, rozdíl absorbancí v čase 60 a 0 min.

Hepatocyty byly nejprve kultivovány 2 hod v kompletním Williams. E médiu v CO<sub>2</sub> inkubátoru, což je čas potřebný k přichycení hepatocytů ke kolagenovaným destičkám. Poté byly vystaveny působení daných koncentrací (0 – 100 μmol/l) LPC po dobu 24 hod.

K výraznějšímu poklesu aktivity buněčných dehydrogenáz došlo od koncentrace LPC 40 μmol/l ( $p < 0,001$ ). Velmi nízké, resp. neměřitelné, aktivity buněčných dehydrogenáz byly zaznamenány u koncentrací LPC 80 a 100 μmol/l ( $p < 0,001$ ).

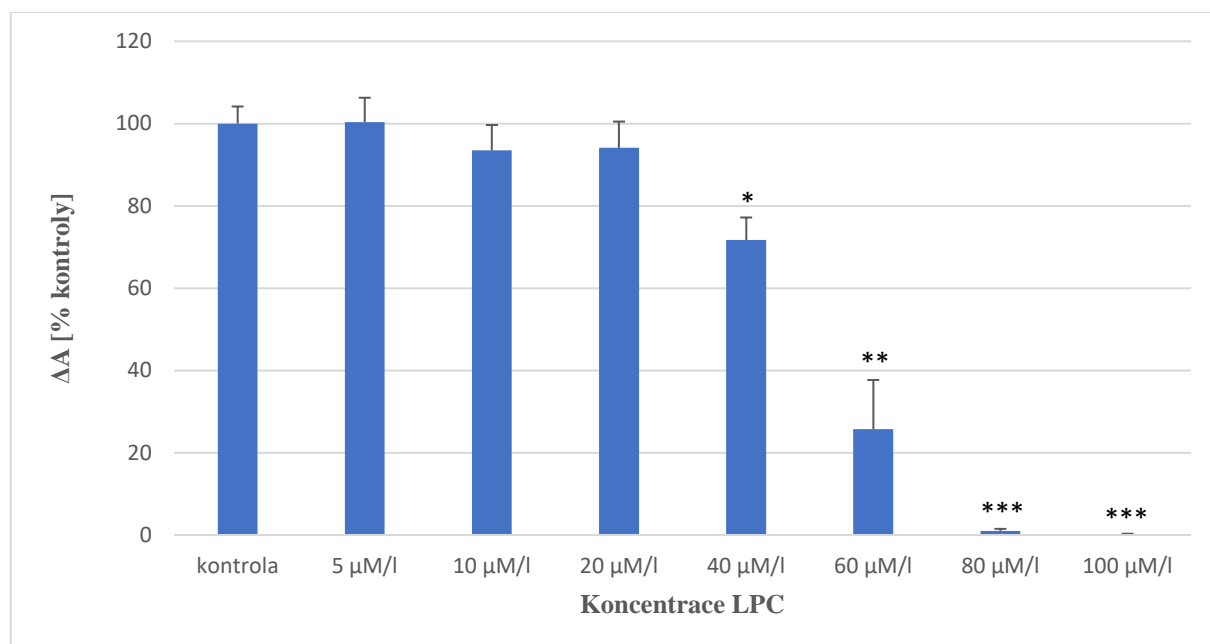


Graf č 1: test WST-1; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 60 a 0 min; AVG + STD. (normální rozdělení; parametrický test; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  vs. kontrola;  $n = 6$ )



### 5.1.2. Aktivita buněčných dehydrogenáz hepatocytů potkana vystavených LPC po dobu 24 hod, rozdíl absorbancí v čase 120 a 0 min.

Podobné výsledky jsou patrné i při rozdílu absorbancí v čase 120 a 0 min. K poklesu aktivity buněčných dehydrogenáz došlo opět od koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$  ( $p = 0,06$ ), výraznější pokles byl zaznamenán u koncentrace LPC 60  $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,01$ ). Hepatocyty po 24 hodinové expozici LPC s koncentrací 80  $\mu\text{mol/l}$ , resp. 100  $\mu\text{mol/l}$  vykazovaly téměř neměřitelné aktivity buněčných dehydrogenáz ( $p < 0,001$ ).

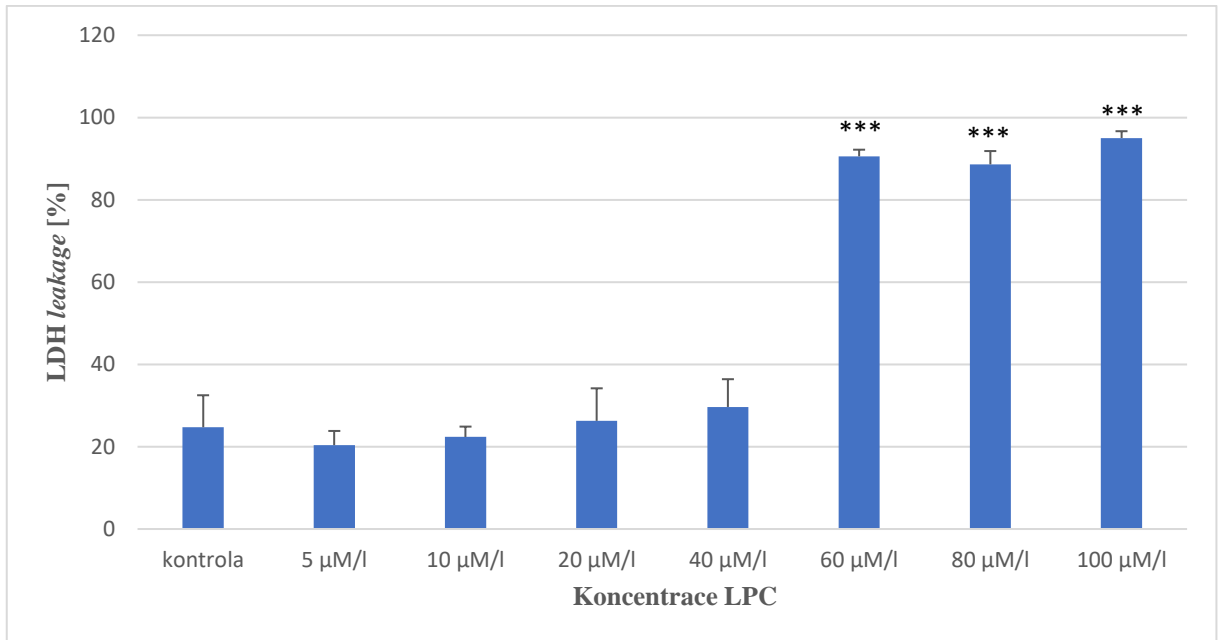


Graf č 2: test WST-1; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 120 a 0 min; AVG + STD. (nenormální rozdělení; neparametrický test; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  vs. kontrola;  $n = 6$ )

## 5.2. Aktivita laktátdehydrogenázy

### 5.2.1. LDH *leakage* hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 12 WP.

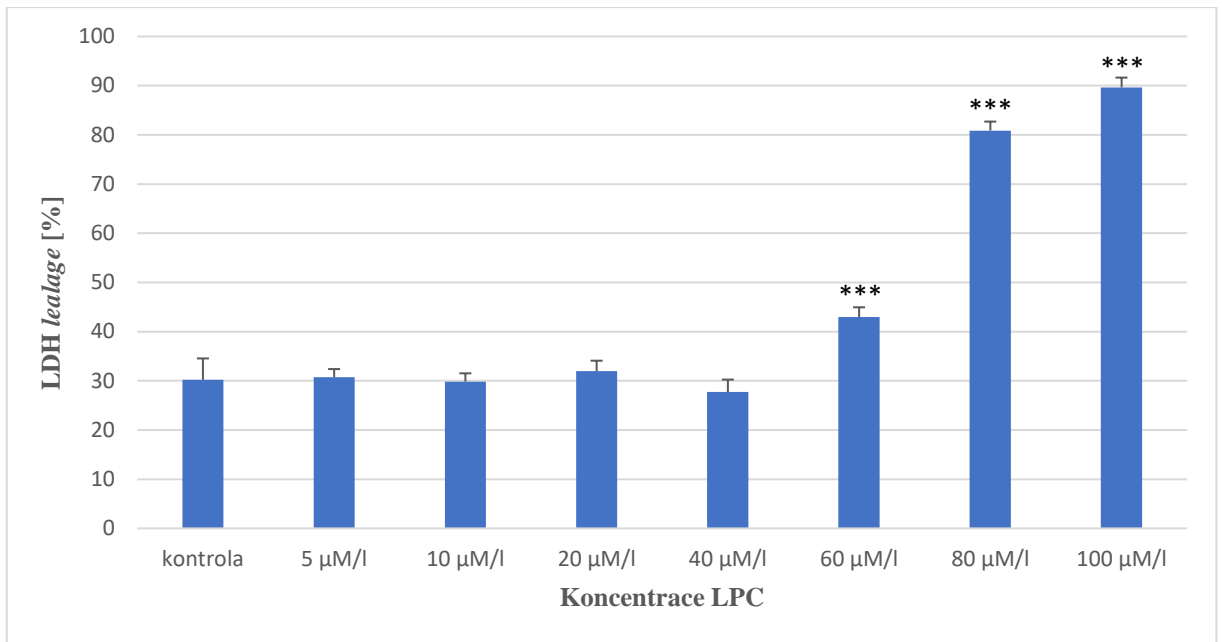
V grafu je patrný nárůst aktivity LDH v kultivačním médiu ku celkové aktivitě LDH od koncentrace LPC 60  $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,001$ ).



Graf č 3: LDH *leakage*; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; 12 WP; AVG + STD. (nenormální rozdělení; neparametrický test; \*\*\* -  $p < 0,001$  vs. kontrola;  $n = 6$ )

### 5.2.2. LDH *leakage* hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 24 WP.

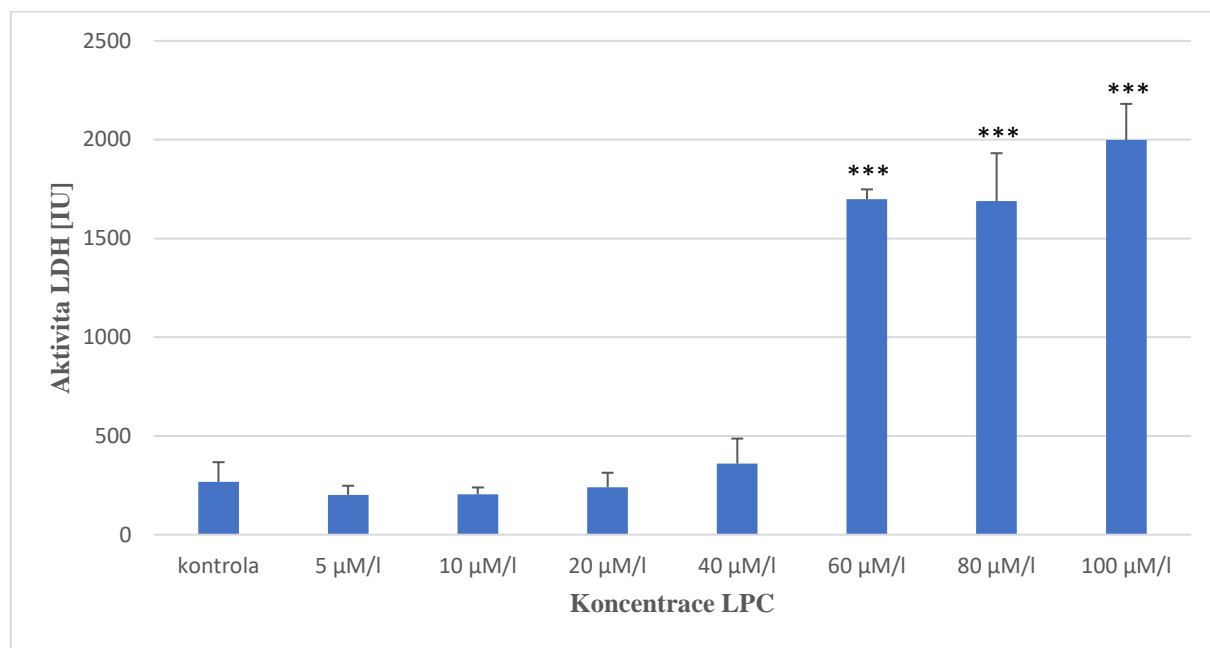
Hepatocyty, které byly exponované LPC v jamkách 24 WP vykazovaly signifikantní zvýšení LDH *leakage* od koncentrace LPC 60  $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,001$ ).



Graf č 4: LDH *leakage*; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; 24 WP; AVG + STD. (nenormální rozdělení; neparametrický test; \*\*\* -  $p < 0,001$  vs. kontrola;  $n = 6$ )

### 5.2.3. Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 12 WP.

Z výsledků aktivity LDH v kultivačním médiu hepatocytů ve 12 WP je patrné, že rovněž zde dochází k signifikantnímu nárůstu aktivity LDH od koncentrace LPC 60  $\mu\text{M/l}$  ( $p < 0,001$ ).

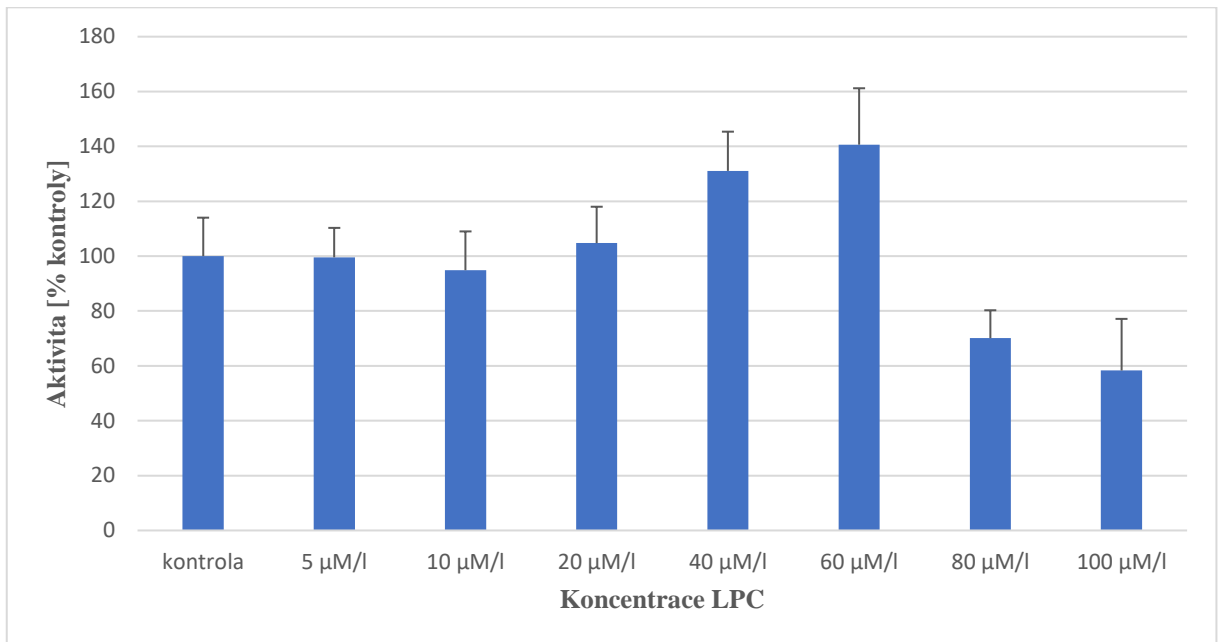


Graf č 5: Aktivita LDH v kultivačním médiu; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; 12 WP; AVG + STD. (normální rozdělení; parametrický test; \*\*\* -  $p < 0,001$  vs. kontrola;  $n = 6$ )

### 5.3. Aktivita kaspázy 3

#### 5.3.1. Aktivita kaspázy 3 v buněčném lyzátu hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 12 WP, rozdíl výsledků v čase 0 a 30 min.

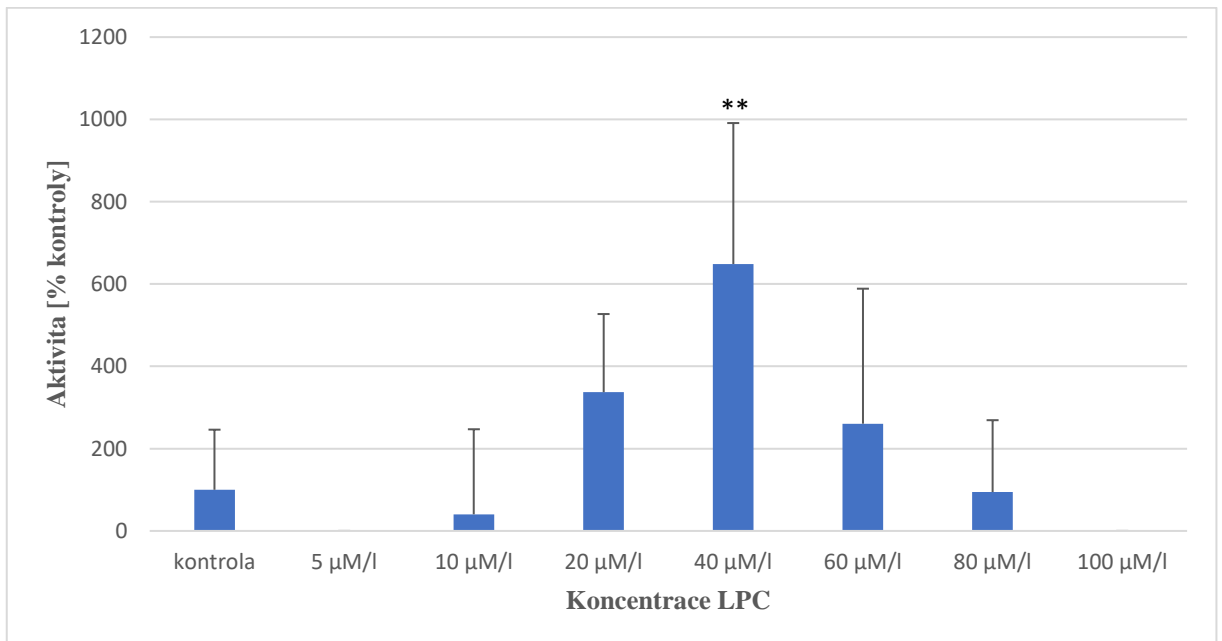
K nárůstu aktivity kaspázy 3 v buněčném lyzátu hepatocytů došlo od koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$ , maximální aktivita byla zaznamenána u koncentrace LPC 60  $\mu\text{mol/l}$  ( $p = 0,1546$ ) zatímco u koncentrací LPC 80 a 100  $\mu\text{mol/l}$  došlo ke snížení aktivity kaspázy 3.



Graf č 6: Aktivita kaspázy 3 v buněčném lyzátu; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 0 a 30 min; 12 WP; AVG + STD. (nenormální rozdělení; neparametrický test;  $n = 6$ )

### 5.3.2. Aktivita kaspázy 3 v buněčném lyzátu hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 24 WP, rozdíl v čase 0 a 90 min.

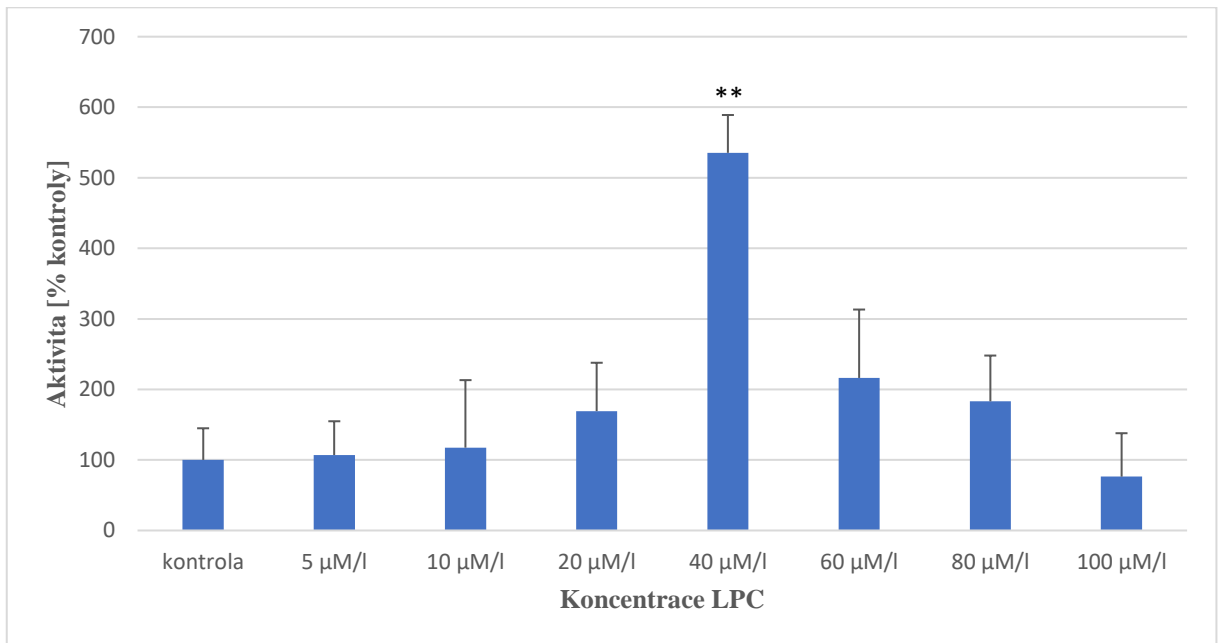
Z výsledků měření aktivity kaspázy 3 ve 24 WP je patrný nárůst aktivity od koncentrace LPC 20  $\mu\text{mol/l}$ , maximum je při koncentraci LPC 40  $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,01$ ), poté následuje opět pokles. U koncentrací LPC 5 a 100  $\mu\text{mol/l}$  byla aktivita kaspázy 3 pod mezí detekce.



Graf č 7: Aktivita kaspázy 3 v buněčném lyzátu; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 0 a 90 min; 24 WP; AVG + STD. (nenormální rozdělení; neparametrický test; \*\* -  $p < 0,01$  vs. kontrola;  $n = 6$ )

### 5.3.3. Aktivita kaspázy 3 v kultivačním médiu hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 12 WP, rozdíl v čase 0 a 30 min.

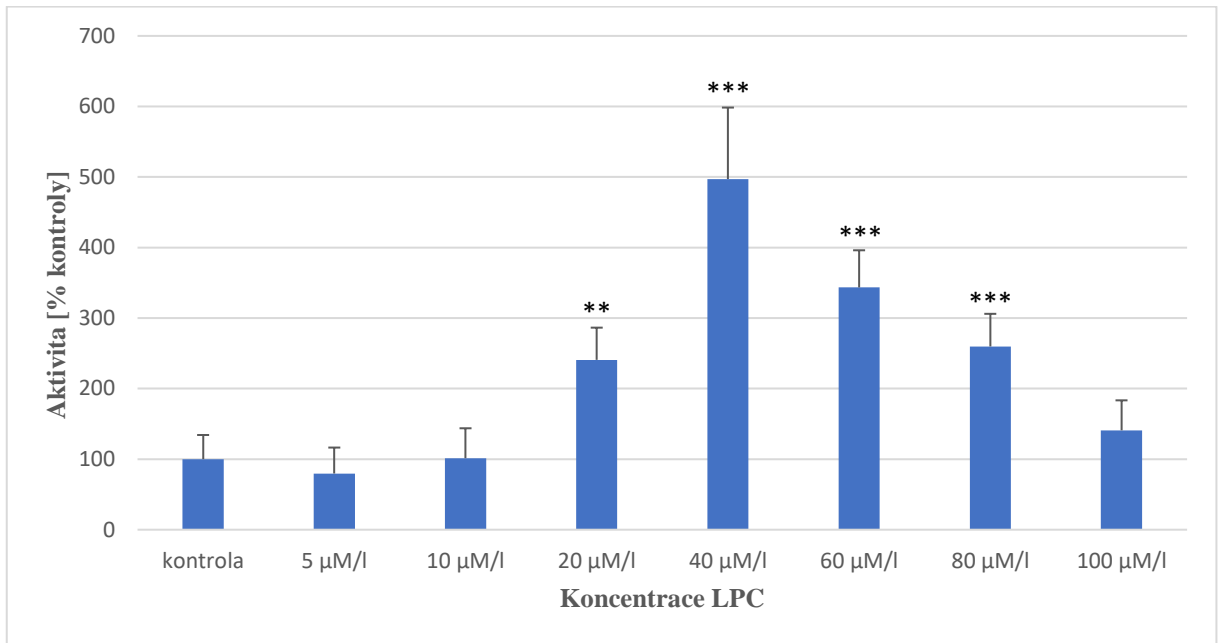
Nejvýraznější aktivita kaspázy 3 u nepřichycených buněk byla zaznamenána u koncentrace LPC 40  $\mu\text{M/l}$  ( $p < 0,01$ ).



Graf č 8: Aktivita kaspázy 3 v kultivačním médiu; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 0 a 30 min; 12 WP; AVG + STD. (nenormální rozdělení; neparametrický test; \*\* -  $p < 0,01$  vs. kontrola;  $n = 6$ )

### 5.3.4. Aktivita kaspázy 3 v kulturačním médiu hepatocytů potkana exponovaných LPC po dobu 24 hod ve 24 WP, rozdíl v čase 0 a 30 min.

Aktivita kaspázy 3 u nepřichycených hepatocytů v kulturačním médiu ve 24 WP výrazněji narůstala od koncentrace LPC 20  $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,01$ ), maximální byla opět u koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,001$ ), u následujících koncentrací LPC již postupně klesala.

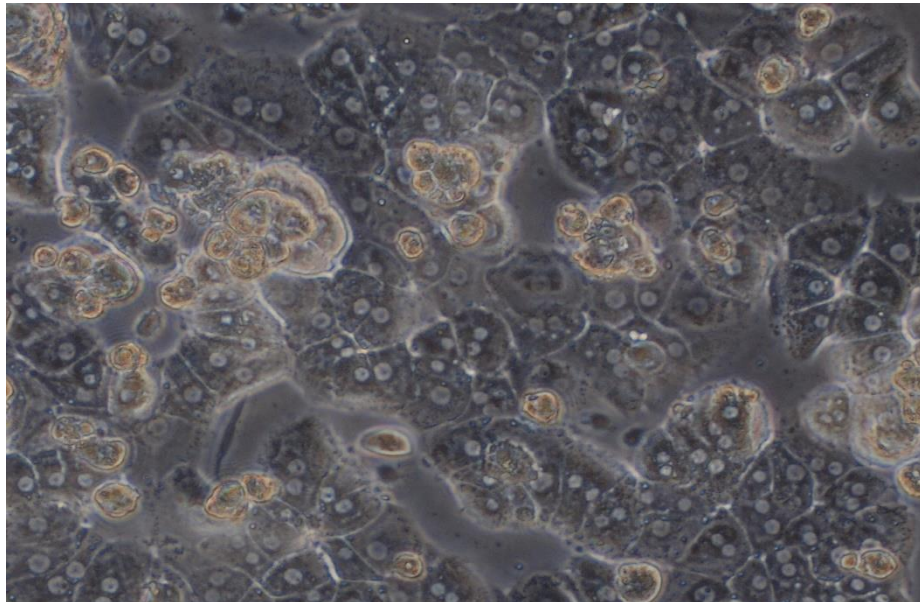


Graf č 9: Aktivita kaspázy 3 v kulturačním médiu; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 0 a 30 min; 24 WP; AVG + STD. (normální rozdělení; parametrický test; \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  vs. kontrola;  $n = 6$ )

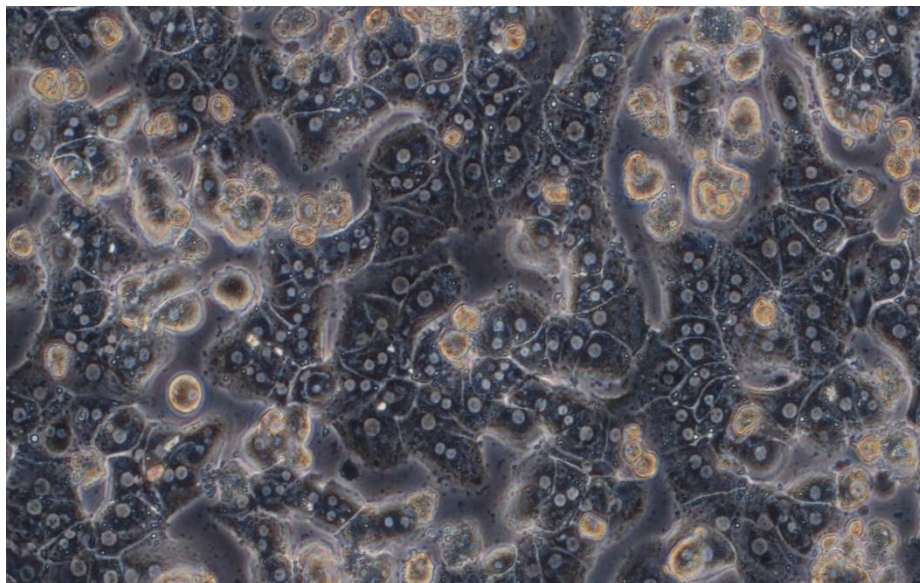


#### 5.4. Morfologické změny

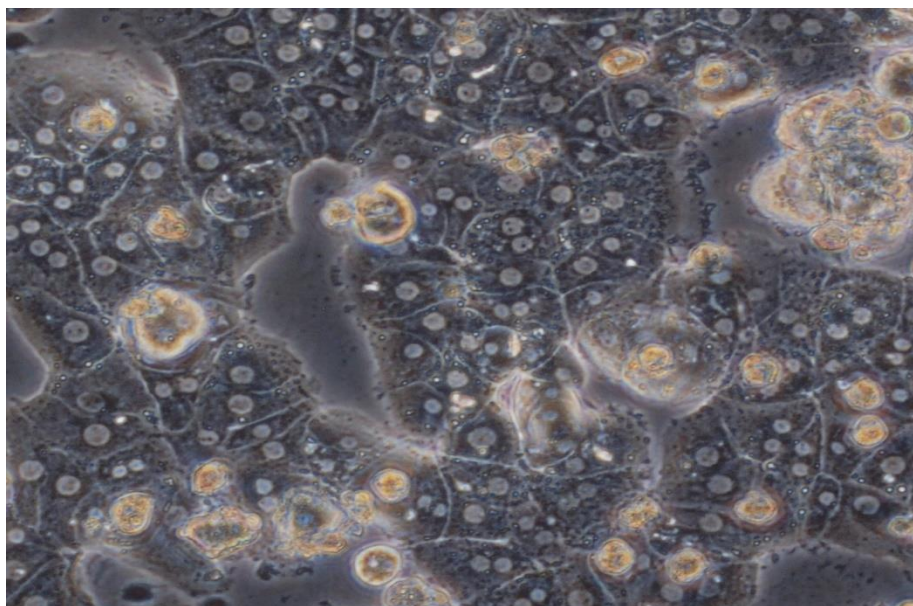
Hepatocyty potkana byly pro mikroskopické hodnocení a fotografování kultivovány v 6 WP v kompletním Williams. E médiu v CO<sub>2</sub> inkubátoru a poté exponovány LPC o daných koncentracích (0 – 100 μmol/l) po dobu 24 hod. Buňky byly pozorovány a fotografovány vždy ve fázovém kontrastu.



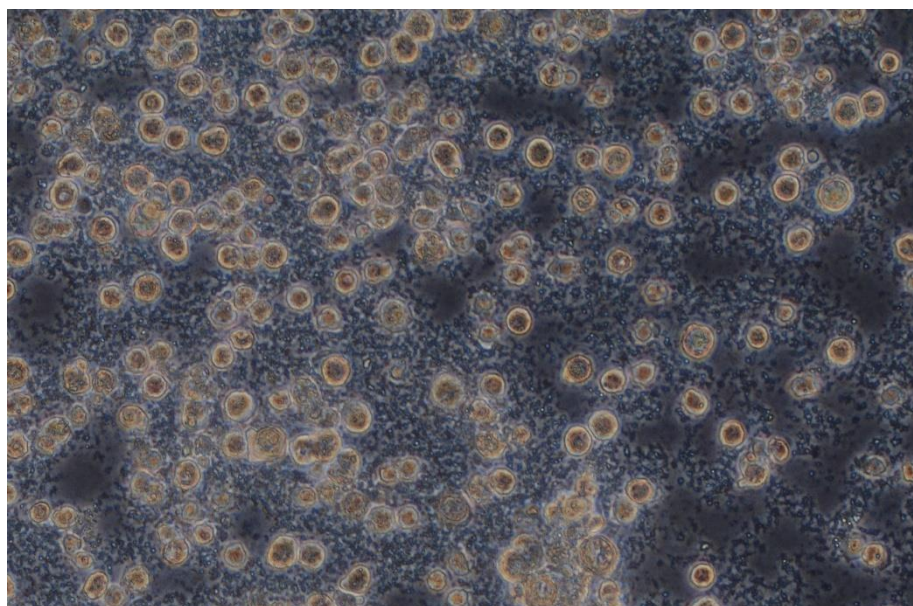
Obr. č. 18: Kontrolní hepatocyty potkana. Hepatocyty bez přídavku LPC, buňky nevykazují známky poškození, mají svůj typický polyedrický tvar, zřetelné jedno až dvě jádra s jadérky, mírně granulovanou cytoplasmu a neporušenou buněčnou membránu (fázový kontrast, zvětšení objektivu 20x).



Obr. č. 19. Hepatocyty potkana exponované 5 μmol/l LPC 24 hod. Tukové kapénky v cytoplasmě hepatocytů, buňky bez výraznějšího poškození (fázový kontrast, zvětšení objektivu 20x).



Obr. č. 20: Hepatocyty potkana exponované 40  $\mu\text{mol/l}$  LPC 24 hod. Tukové kapénky v cytoplasmě hepatocytů, pozorovatelná apoptotická tělíska (fázový kontrast, zvětšení objektivu 20x).



Obr. č. 21: Hepatocyty potkana exponované 100  $\mu\text{mol/l}$  LPC 24 hod. Kondenzovaná jádra bez viditelných jadérek, vysoce granulovaná cytoplasmata, poškozená buněčná membrána s uvolňováním obsahu buněk do kultivačního média, buňky se odlučují od kolagenu (fázový kontrast, zvětšení objektivu 20x).

## 6. Diskuze

NAFLD se řadí mezi metabolická onemocnění jater charakterizované jaterní steatózou, která nevznikla vlivem alkoholu. Progrese tohoto onemocnění vede od prosté steatózy, přes NASH s různým stupněm fibrózy, jaterní cirhózu až po hepatocelulární karcinom. V současné době se NAFLD celosvětově považuje za pandemické onemocnění jater. Rozvoj NAFLD je silně asociován s parametry metabolického syndromu vzniklého na podkladě inzulínové rezistence. Nejvýznamnější se zdá být vliv obezity, kdy vlivem zvýšené akumulace TAG v játrech dochází k dalším komplikacím (Byrne, 2015). Expozice hepatocytů vysoké koncentraci daných lipidů, při kterém dochází k hepatocelulárnímu poškození, se označuje termínem *lipotoxicita*. Lipidy zprostředkovávající jaterní lipotoxicitu jsou především volné mastné kyseliny (FFA), triacylglyceroly (TAG), lysofosfatidylcholin (LPC) a ceramidy (Mota, 2016).

Ke studiu lipotoxického účinku LPC byly použity primární kultury hepatocytů potkana kmene Wistar. Lipotoxicita byla prokazována měřením aktivit buněčných dehydrogenáz (WST-1 test), aktivity LDH v kultivačním médiu, LDH *leakage*, aktivity kaspázy 3 a mikroskopickým hodnocením morfologických změn hepatocytů ve fázovém kontrastu. Izolované hepatocyty byly pro tento účel kultivovány 24 hod v kultivačním médiu s přídatkem dané koncentrace LPC.

Cílem práce bylo určit koncentraci LPC, od které dochází k signifikantnímu poškození hepatocytů po 24 hodinové kultivaci. Z naměřených dat byly vytvořeny grafy v programu Microsoft Excel 2016, dále byla tato data zpracována ve statistickém programu GraphPad Prism 8.

Informaci o viabilitě buněk nám poskytl test WST-1 (graf č. 1 + graf č. 2). Pouze živé buňky jsou schopny redukovat tetrazoliovou sůl na formazan, což se projeví změnou zbarvení (Biovision, 2013). Výsledky jsou uváděny jako procenta kontroly, tudíž o kolik procent je výsledná hodnota vyšší nebo nižší v porovnání s kontrolním vzorkem. Z výsledků uvedených v grafu č. 1 je patrné, že k signifikantnímu snížení aktivity buněčných dehydrogenáz došlo od koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$ . U koncentrací LPC 80 a 100  $\mu\text{mol/l}$  nebyla zaznamenána téměř žádná aktivita buněčných dehydrogenáz, což značí téměř nulové množství živých buněk v těchto vzorcích. Aktivity buněčných dehydrogenáz byly měřeny po 60 minutách od času 0.

Graf č. 2, jehož aktivity buněčných dehydrogenáz jsou výsledkem měření po 120 minutách od času 0, vykazuje podobný trend. Viabilita hepatocytů začala rovněž klesat od

koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$ , avšak statisticky významnější pokles byl zaznamenán až u koncentrace LPC 60  $\mu\text{mol/l}$ . Tento rozdíl je pravděpodobně způsobena nenormálním rozdělením dat. U koncentrací LPC 80 a 100  $\mu\text{mol/l}$  byla opět velice nízká aktivita buněčných dehydrogenáz.

LDH je enzym lokalizovaný ve všech buňkách téměř výhradně v cytoplasmě. Za normálních okolností je buněčná membrána pro tento enzym nepropustná, pokud však dojde k jejímu narušení, LDH uniká do kultivačního média a může tak sloužit jako marker poškození buněk. Jako přesnější marker poškození buněčné membrány se používá test LDH *leakage*, který nás informuje o procentu úniku LDH z poškozených buněk v čase (Sedlářová, 2015).

Po 24 hodinové kultivaci primárních hepatocytů potkana s danými koncentracemi LPC je zřejmý signifikantní nárůst LDH *leakage* od koncentrace LPC 60  $\mu\text{mol/l}$  (graf č. 3). Při použití 24 WP (graf č. 4) jsme získali obdobné výsledky – ke statisticky významnému nárůstu LDH leakage došlo od koncentrace LPC 60  $\mu\text{mol/l}$ .

Graf č. 5 udává výsledky aktivity LDH v kultivačním médiu hepatocytů potkana exponovaných LPC 24 hod ve 12 WP. I zde je patrný signifikantní nárůst aktivity LDH v kultivačním médiu od koncentrace LPC 60  $\mu\text{mol/l}$ , což značí, že při této koncentraci došlo k výraznému poškození buněčné membrány.

K posouzení, jaká koncentrace LPC výrazně indukovala apoptózu hepatocytů nám posloužil test na aktivitu kaspázy 3. Tato kaspáza se řadí k tzv. efektorovým kaspázám, které provádějí samotnou aktivaci procesu apoptózy u buněk (Mota, 2016). Za použití fluorescenčního substrátu pro kaspázu 3 byla měřena intenzita fluorescence a výsledky měření byly graficky vyhodnoceny jako procenta kontroly.

Při použití 12 WP (graf č. 6) je patrný nárůst aktivity kaspázy 3 od koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$  s maximální aktivitou při koncentraci LPC 60  $\mu\text{mol/l}$ . Statisticky významnější nárůst aktivity kaspázy 3 je zřetelný ve výsledcích z 24 WP (graf č. 7), kdy je maximální aktivita kaspázy 3 zaznamenána u koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$ . V obou případech se jedná o výsledky měření aktivity kaspázy 3 v buněčném lyzátu hepatocytů. V grafu č. 6 jsou uvedeny výsledky měření po 30 minutách od času 0 zatímco v grafu č. 7 jsou uvedeny výsledky po 90 minutách od času 0. Aktivita kaspázy 3 byla v počátečních měřeních při použití 24 WP u většiny vzorků pod mezí detekce. Je však patrné, že u koncentrace LPC 5 a 100  $\mu\text{mol/l}$  zůstala aktivita kaspázy 3 pod mezí detekce i po 90 minutách. Mohlo to být vlivem nedokonalého nastavení parametrů měřicího přístroje.

Výsledky měření aktivity kaspázy 3 z nepřichycených a ev. rozpadlých buněk (aktivita kaspázy 3 v kultivačním médiu), vykazují při použití 12 WP i 24 WP (graf č. 8 + graf č. 9) velmi podobné výsledky. V obou případech se jedná o výsledky měření po 30 minutách od času 0. Statisticky významný nárůst aktivity kaspázy 3 byl zaznamenán u koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$ . Z výsledků měření aktivity kaspázy 3 jsou patrné maximální hodnoty u koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$ , poté dochází opět k poklesu aktivity. To je pravděpodobně způsobeno jinými typy buněčných smrtí, ke kterým při těchto vyšších koncentracích LPC docházelo.

Při porovnání výsledků WST-1 testu, LDH *leakage*, LDH v kultivačním médiu a výsledků testu na aktivitu kaspázy 3 je patrné, že k signifikantnímu poklesu viability hepatocytů došlo při koncentraci LPC 40  $\mu\text{mol/l}$ . Ve vzorcích s roztokem LPC o koncentracích 60; 80 a 100  $\mu\text{mol/l}$  bylo jen malé množství živých buněk. Dobře to je patrné také na výsledcích LDH *leakage* kdy jsou hodnoty LDH *leakage* právě při těchto koncentracích statisticky významně vyšší. Narušenou buněčnou membránou uniká z buňky nejen LDH, ale i další buněčné dehydrogenázy (Racek, 1999). Rovněž ve výsledcích měření aktivity kaspázy 3 v buněčném lyzátu je patrné maximum při koncentraci LPC 40  $\mu\text{mol/l}$ , zatímco u vyšších koncentrací LPC aktivita kaspázy opět klesá. To je nejspíše způsobeno přítomností nekrózy, o níž nás informuje opět vyšší LDH *leakage* (Mezera, 2014).

Pro posouzení morfologických změn primárních kultur hepatocytů potkana, které byly exponovány daným koncentracím LPC po dobu 24 hod, byly využity buňky nasazené v 6 WP. Hepatocyty byly pozorovány v mikroskopu s fázovým kontrastem.

Kontrolní hepatocyty, které byly kultivovány 24 hod v inkompletním Williams. E médiu, nevykazovaly známky poškození (obr. č. 18). Buňky si zachovaly svůj typický polyedrický tvar, buněčná membrána byla neporušena. Dobře zřetelné bylo jedno až dvě jádra s viditelnými jadérky a mírně granulovaná cytoplasmata. Hepatocyty exponované 5  $\mu\text{mol/l}$  koncentraci LPC (obr. č. 19) vykazovaly přítomnost tukových kapének v cytoplasmě, k výraznějšímu poškození buněk však při použití této koncentrace LPC nedocházelo. Po 24 hod expozici 40  $\mu\text{mol/l}$  koncentraci LPC byly v cytoplasmě buněk pozorovány tukové kapénky a apoptotická tělíska na membráně hepatocytů (obr. č. 20). Tyto morfologické změny korespondují s výsledky testů aktivity kaspázy 3 (graf č. 6 – 9), kdy byla u koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$  zaznamenána nejvyšší aktivita kaspázy 3. U hepatocytů po expozici 100  $\mu\text{mol/l}$  koncentraci LPC (obr. č. 21) bylo zřetelné výrazné poškození buněk. Buňky se odlučovaly od kolagenu, jádra byla kondenzovaná bez viditelných jadérek, cytoplasmata vysoce granulovaná.

Z poškozené buněčné membrány se uvolňoval obsah buněk do kultivačního média. Test WST-1 (graf č. 1 – 2) zaznamenal při této koncentraci LPC téměř neměřitelnou aktivitu buněčných dehydrogenáz, LDH *leakage* bylo naopak vlivem poškozené buněčné membrány vysoké (graf č. 3 – 4). Aktivita kaspázy 3 byla opět nižší (graf č. 6 – 9), jelikož pravděpodobně převládal nekrotický typ buněčné smrti.

Lysofosfatidylcholinem indukovanou lipoapoptózou se zabývali také Kakisaka a kol (2011). Nevyužívali ovšem primární kultury hepatocytů potkana, nýbrž myší primární hepatocyty kultivované ve Waymouthově médiu a lidské buněčné linie Huh-7 kultivované v DMEM. Pracovali se zásobním roztokem LPC o koncentraci 25 mmol/l z čehož byly dále připraveny roztoky LPC s koncentracemi 0 – 85  $\mu\text{mol/l}$ .

Kakisaka a kol. (2011) prokázali, že je LPC aktivním metabolitem nasycené mastné kyseliny. Dle předpokladu došlo k nárůstu intracelulární hladiny LPC u myších primárních hepatocytů úměrně extracelulárním koncentracím jak podané kyseliny palmitové (PA), tak kyseliny stearové (SA). K signifikantnímu zvýšení intracelulární koncentrace LPC došlo při koncentracích PA nebo SA 600  $\mu\text{mol/l}$ . Obdobný nárůst intracelulárního LPC zaznamenali i při podání 85  $\mu\text{mol/l}$  LPC, což potvrzuje, že LPC je membránově permeabilní nebo je účinně transportován do buněk. Pro detekci apoptózy využívali buňky Huh-7 inkubované s LPC o koncentracích 42,5  $\mu\text{mol/l}$  a 85  $\mu\text{mol/l}$ . Jak při hodnocení morfologických, tak biochemických kritérií (měření aktivity kaspázy 3) LPC indukoval apoptózu v závislosti na použité koncentraci. Morfologické změny buněk vyhodnotili po barvení buněk 4,6-diamidin-2'-fenyldindihydrochloridem (DAPI) s následným odečítáním ve fluorescenčním mikroskopu. Aktivita kaspázy 3 byla stejně jako v našem případě hodnocena pomocí fluorescenčního činidla pro kaspázu 3 a vyjádřena jako změna intenzity fluorescence v čase.

LPC se uvolňuje z intracelulárního prostředí pomocí PLA2 vlivem kaspázy 3, když buňky procházejí apoptózou. Nasycené mastné kyseliny tudíž indukují lipoapoptózu mechanismem závislým na LPC (Kakisaka, 2011).

Han a kol. (2008) ve své studii lipotoxicity pracovali s Chang buňkami. Jedná se o buňky odvozené od buněčné linie HeLa u kterých byla pozorována povaha hepatocytů na základě exprese  $\alpha$ -fetoproteinu a albuminu (Lee, 2002). Tuto povahu Chang buněk prokázali i Han a kol., kteří ve svých výsledcích u těchto buněk prokázali markery typické pro hepatocyty a také schopnost Chang buněk metabolizovat amoniak. Chang buňky byly kultivované ve DMEM médiu s 10% FBS a exponované FFA (PA) po dobu 24 hod, jako v naší práci.

Han a kol. tvrdí, že buněčná smrt > 50% buněk s plnohodnotnými rysy apoptózy nastává právě po 24 hod od ovlivnění buněk FFA.

Apoptóza Chang buněk byla indukována 24 hodinovou expozicí 400  $\mu\text{mol/l}$  PA a to mechanismem závislým na LPC, což se opět potvrdilo stanovením intracelulární koncentrace LPC pomocí daného enzymového kolorimetrického testu. Poškození buněk vyhodnotili z výsledků testu aktivity LDH v kultivačním médiu. Vlastní apoptózu stanovili u buněk barvených Hoechst/PI barvivou a ve fluorescenčním mikroskopu hodnotily nukleární kondenzaci a fragmentaci DNA.

Pro posouzení viability buněk použili, na rozdíl od nás, MTT test. Tento test pracuje na stejném principu jako námi využitý WST-1 test, využívá však jiné barvivo – tetrazoliovou sůl MTT, která se vlivem buněčných dehydrogenáz redukuje na formazan. Test WST-1 se však jeví jako výhodnější, tyto testy využívají ve vodě rozpustné tetrazoliové soli, v porovnání s MTT tak odpadá krok solubilizace. WST-1 test je také méně toxický pro buňky, jelikož pro tetrazoliové soli rozpustné ve vodě je buněčná membrána nepropustná. MTT vstupuje do buněk, kde se poté hromadí nerozpustný formazan (Berridge, 2005).

V našich pokusech byla lipoapoptóza zaznamenána u primárních kultur hepatocytů exponovaných 40  $\mu\text{mol/l}$  LPC. Vyšší koncentrace LPC indukovaly poškození buněčné membrány a nekrózu.

## 7. Závěr

V naší práci jsme hodnotili lipotoxické poškození primárních kultur hepatocytů potkana indukované lysofosfatidylcholinem o vybraných koncentracích.

Z výsledků WST-1 testu je patrné výrazné snížení životnosti buněk od koncentrace LPC 40  $\mu\text{mol/l}$ , tyto výsledky korespondují s výsledky aktivity kaspázy 3, kterými se prokázalo největší množství buněk procházející apoptózou rovněž u této koncentrace. U vyšších koncentrací LPC docházelo pravděpodobně k nekróze buněk, což lze usuzovat z nižší aktivity kaspázy 3 a vyšších hodnot LDH *leakage*. Tyto výsledky byly potvrzeny i mikroskopickým hodnocením morfologických změn buněk.



## Seznam použité literatury

- Abdelmegeed, M. A., Banerjee, A., Yoo, S. H., Jang, S., Gonzalez, F. J., & Song, B. J. Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*, 2012, 57.4: 860-866. doi: 10.1016/j.jhep.2012.05.019.
- Akazawa, Y., Cazanave, S., Mott, J. L., Elmi, N., Bronk, S. F., Kohno, S., Gores, G. J. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *Journal of hepatology*, 2010, 52.4: 586-593. doi: doi.org/10.1016/j.jhep.2010.01.003.
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouët, S., Morel, F., Guillouzo, A. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 2006, 34.1: 75-83. doi: 10.1124/dmd.105.006759.
- Anstee, Q. M., & Day, C. P. The genetics of nonalcoholic fatty liver disease: spotlight on PNPLA3 and TM6SF2. In: *Seminars in liver disease*. Thieme Medical Publishers, 2015. p. 270-290. doi: 10.1055/s-0035-1562947.
- Asrih, M., Jornayvaz, F. R. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *The Journal of Endocrinology*, 2013, 218(3), R25-36.
- Atienzar, F. A., Novik, E. I., Gerets, H. H., Parekh, A., Delatour, C., Cardenas, A., Dhalluin, S. Predictivity of dog co-culture model, primary human hepatocytes and HepG2 cells for the detection of hepatotoxic drugs in humans. *Toxicology and applied pharmacology*, 2014, 275.1: 44-61. doi: 10.1016/j.taap.2013.11.022.
- Ballestri, S., Nascimbeni, F., Romagnoli, D., Baldelli, E., & Lonardo, A. The role of nuclear receptors in the pathophysiology, natural course, and drug treatment of NAFLD in humans. *Advances in therapy*, 2016, 33.3: 291-319. doi: 10.1007/s12325-016-0306-9.
- Bedossa, P., & Patel, K. Biopsy and noninvasive methods to assess progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 2016, 150.8: 1811-1822. e4. doi: 10.1053/j.gastro.2016.03.008.

- Bell, C. C., Hendriks, D. F., Moro, S. M., Ellis, E., Walsh, J., Renblom, A., Sison-Young, R. L. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Scientific reports*, 2016, 6: 25187. doi: 10.1038/srep25187.
- Bellanti, F., Mitarotonda, D., Tamborra, R., Blonda, M., Iannelli, G., Petrella, A., Serviddio, G. Oxysterols induce mitochondrial impairment and hepatocellular toxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 75: S16-S17. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.594.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 2005, 11: 127-152. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7.
- Biovision, Inc. Ready-to-use Cell Proliferation Reagent, WST-1. *BioVision - Life Science Source* [online]. © 2013 [cit. 2013-4-17]. Dostupné z: [<http://www.biovision.com/ready-to-use-cell-proliferation-reagent-wst-1-5637.html>].
- Brunt, E. M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2010, 7.4: 195. doi: 10.1038/nrgastro.2010.21.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, 2016, 65.8: 1038-1048. doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.012.
- Byrne, C., D.; Targher, G. NAFLD: a multisystem disease. *Journal of hepatology*, 2015, 62.1: S47-S64. doi: 10.1016/j.jhep.2014.12.012.
- Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., Lee, J., Shoelson, S. E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nature medicine*, 2005, 11.2: 183. doi: 10.1038/nm1166.
- Cambri, L. T., Ghezzi, A. C., Arsa, G., Botezelli, J. D., de Mello, M. A. R. Standard short-term diet ameliorates the lipid profile altered by a fructose-rich diet in rats. *Journal of developmental origins of health and disease*, 2015, 6.4: 335-341. doi: 10.1017/S2040174415001026.
- Cazanave, S. C., Mott, J. L., Elmi, N. A., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Akazawa, Y., Gores, G. J. JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipoapoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284.39: 26591-26602. doi: 10.1074/jbc.M109.022491.

- Cazanave, S. C., Elmi, N. A., Akazawa, Y., Bronk, S. F., Mott, J. L., Gores, G. J. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010, 299.1: G236-G243. doi: 10.1152/ajpgi.00091.2010.
- Chabowski, A., Żendzian-Piotrowska, M., Konstantynowicz, K., Pankiewicz, W., Mikłosz, A., Łukaszuk, B., Gorski, J. Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate induced insulin resistance in primary rat hepatocytes. *Acta Physiologica*, 2013, 207.2: 346-357. doi: 10.1111/apha.12022.
- Civera, M., Urios, A., Garcia-Torres, M. L., Ortega, J., Martinez-Valls, J., Cassinello, N., Montoliu, C. Relationship between insulin resistance, inflammation and liver cell apoptosis in patients with severe obesity. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2010, 26.3: 187-192. doi: 10.1002/dmrr.1070.
- Clontech. *Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent*. [online] PR6Y2137. © 2007. Dostupné z: [[http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Manuals/WST-1\\_Clontech.pdf](http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Manuals/WST-1_Clontech.pdf)].
- Donato, M. T., Tolosa, L., Gómez-Lechón, M. J. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In: *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 77-93. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7\_5.
- Dostál, J. *Biochemie pro posluchače bakalářských oborů*. Brno: Masarykova univerzita, 2012. ISBN 978-80-210-5020-4.
- Eguchi, A., Wree, A., Feldstein, A. E. Biomarkers of liver cell death. *Journal of hepatology*, 2014, 60.5: 1063-1074. doi: 10.1016/j.jhep.2013.12.026.
- Ehrmann, J.; Hůlek, P. *Hepatologie*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3118-6.
- Ekstedt, M., Hagström, H., Nasr, P., Fredrikson, M., Stål, P., Kechagias, S., Hulcrantz, R. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*, 2015, 61.5: 1547-1554. doi: 10.1002/hep.27368.
- Elferink, M. G. L., Olinga, P., Van Leeuwen, E. M., Bauerschmidt, S., Polman, J., Schoonen, W. G., Groothuis, G. M. M. Gene expression analysis of precision-cut human liver slices indicates stable expression of ADME-Tox related genes. *Toxicology and applied pharmacology*, 2011, 253.1: 57-69. doi: 10.1016/j.taap.2011.03.010.
- Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z., Sanyal, A. J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*, 2018, 67.1: 123-133. doi: 10.1002/hep.29466.

- European Association for the study of the liver. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Obesity facts*, 2016, 9.2: 65-90. doi: 10.1159/000443344.
- Fan, J. G., Kim, S. U., Wong, V. W. S. New trends on obesity and NAFLD in Asia. *Journal of Hepatology*, 2017, 67.4: 862-873. doi: 10.1016/j.jhep.2017.06.003.
- Fasshauer, M., Blüher, M. Adipokines in health and disease. *Trends in pharmacological sciences*, 2015, 36.7: 461-470. doi: 10.1016/j.tips.2015.04.014.
- Fazel, Y., Koenig, A. B., Sayiner, M., Goodman, Z. D., Younossi, Z. M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 2016, 65.8: 1017-1025. doi: 10.1016/j.metabol.2016.01.012.
- Ghosh, A. K., Vaughan, D. E. PAI-1 in tissue fibrosis. *Journal of cellular physiology*, 2012, 227.2: 493-507. doi: 10.1002/jcp.22783.
- Glass, C. K., Olefsky, J. M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell metabolism*, 2012, 15.5: 635-645. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.001.
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Braeuning, A. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of toxicology*, 2013, 87.8: 1315-1530. doi: 10.1007/s00204-013-1078-5.
- Grundy, S. M. Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine* . 2016, 26 (4), 364–373. doi:10.1016/j.tcm.2015.10.004.
- Guo, S. Insulin signaling, resistance and metabolic syndrome: Insights from mouse models into disease mechanisms. *Journal of Endocrinology*, 2014, 220 (2), T1-T23.
- Guy, C. D., Suzuki, A., Burchette, J. L., Brunt, E. M., Abdelmalek, M. F., Cardona, D., Diehl, A. M. Costaining for keratins 8/18 plus ubiquitin improves detection of hepatocyte injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Human pathology*, 2012, 43.6: 790-800. doi: 10.1016/j.humpath.2011.07.007.
- Han, M. S., Park, S. Y., Shinzawa, K., Kim, S., Chung, K. W., Lee, J. H., Chung, W. J. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *Journal of lipid research*, 2008, 49.1: 84-97. doi: 10.1194/jlr.M700184-JLR200.
- Hainer, V. *Základy klinické obezitologie*. 2. vyd. Praha, Czechia: Grada, 2011. ISBN 978-802-4732-52.

- Hikita, H., Takehara, T., Kodama, T., Shimizu, S., Shigekawa, M., Hosui, A., Kanto, T. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon fas activation in bak/bax-deficient mice. *Hepatology*, 2011, 54.1: 240-251. doi: 10.1002/hep.24305.
- Iles, L. R., & Bartholomeusz, G. A. Three-dimensional spheroid cell culture model for target identification utilizing high-throughput RNAi screens. In: *High-Throughput RNAi Screening*. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 121-135. doi: 10.1007/978-1-4939-6337-9\_10.
- Jennen, D. G., Magkoufopoulou, C., Ketelslegers, H. B., van Herwijnen, M. H., Kleinjans, J. C., van Delft, J. H. Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicological sciences*, 2010, 115.1: 66-79. doi: 10.1093/toxsci/kfq026.
- Kakisaka, K., Cazanave, S. C., Fingas, C. D., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Gores, G. J. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2011, 302.1: G77-G84. doi: 10.1152/ajpgi.00301.2011.
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Yeh, M. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005, 41.6: 1313-1321. doi: 10.1002/hep.20701.
- Knobloch, D., Ehnert, S., Schyschka, L., Büchler, P., Schoenberg, M., Kleeff, J., Nussler, A. K. Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. In: *Human Cell Culture Protocols*. Humana Press, 2012. p. 99-120. doi: 10.1007/978-1-61779-367-7\_8.
- Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Schlensak, M. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell metabolism*, 2015, 21.5: 739-746. doi: 10.1016/j.cmet.2015.04.004.
- Kyffin, J. A., Sharma, P., Leedale, J., Colley, H. E., Murdoch, C., Mistry, P., Webb, S. D. Impact of cell types and culture methods on the functionality of in vitro liver systems—a review of cell systems for hepatotoxicity assessment. *Toxicology In Vitro*, 2018, 48: 262-275. doi: 10.1016/j.tiv.2018.01.023.
- Lee, J. S., Thorgerirsson, S. S. Functional and genomic implications of global gene expression profiles in cell lines from human hepatocellular cancer. *Hepatology*, 2002, 35.5: 1134-1143. doi: 10.1053/jhep.2002.33165.

- Lee, B. H., Kim, M. H., Lee, J. H., Seliktar, D., Cho, N. J., Tan, L. P. Modulation of Huh7. 5 spheroid formation and functionality using modified PEG-based hydrogels of different stiffness. *PLoS One*, 2015, 10.2: e0118123. doi: 10.1371/journal.pone.0118123.
- Li, Y., Naghdi, F. G., Garg, S., Adarme-Vega, T. C., Thurecht, K. J., Ghafor, W. A., Schenk, P. M. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial cell factories*, 2014, 13.1: 14. doi: 10.1186/1475-2859-13-14.
- Liu, Q., Bengmark, S., Qu, S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids in health and disease*, 2010, 9.1: 42. doi: 10.1186/1476-511X-9-42.
- López-Suárez, A., Guerrero, J. M. R., Elvira-González, J., Beltrán-Robles, M., Cañas-Hormigo, F., Bascuñana-Quirell, A. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with blood pressure in hypertensive and nonhypertensive individuals from the general population with normal levels of alanine aminotransferase. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 2011, 23.11: 1011-1017. doi: 10.1097/MEG.0b013e32834b8d52.
- Mattei, G., Magliaro, C., Pirone, A., & Ahluwalia, A. Decellularized human liver is too heterogeneous for designing a generic extracellular matrix mimic hepatic scaffold. *Artificial organs*, 2017, 41.12: E347-E355. doi: 10.1111/aor.12925.
- Martel, C., Allouche, M., Degli Esposti, D., Fanelli, E., Boursier, C., Henry, C., Brenner, C. Glycogen synthase kinase 3-mediated voltage-dependent anion channel phosphorylation controls outer mitochondrial membrane permeability during lipid accumulation. *Hepatology*, 2013, 57.1: 93-102. doi: 10.1002/hep.25967.
- Maruyama, H., Takahashi, M., Sekimoto, T., Shimada, T., Yokosuka, O. Linoleate appears to protect against palmitate-induced inflammation in Huh7 cells. *Lipids in health and disease*, 2014, 13.1: 78. doi: 10.1186/1476-511X-13-78.
- Masuoka, H., C.; Chalasani, N. Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 2013, 1281.1: 106-122. doi: 10.1111/nyas.12016.
- Meex, R. C., Hoy, A. J., Morris, A., Brown, R. D., Lo, J. C., Burke, M., Greve, J. W. Fetuin B is a secreted hepatocyte factor linking steatosis to impaired glucose metabolism. *Cell metabolism*, 2015, 22.6: 1078-1089. doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.023.

- Mezera, V., Kucera, O., Moravcova, A., Peterova, E., Cervinkova, Z. The effect of epigallocatechin gallate on hepatocytes isolated from normal and partially hepatectomized rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2014. doi: 10.1139/cjpp-2014-0069.
- Mota, M., Banini, B. A., Cazanave, S. C., Sanyal, A. J. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 2016, 65.8: 1049-1061. doi: 10.1016/j.metabol.2016.02.014.
- Nogueira, M. A., Oliveira, C. P., Alves, V. A. F., Stefano, J. T., dos Reis Rodrigues, L. S., Torrinhas, R. S., Waitzberg, D. L. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in treating non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition*, 2016, 35.3: 578-586. doi: 10.1016/j.clnu.2015.05.001.
- Paniagua, J. A. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World journal of diabetes*, 2016, 7.19: 483. doi: 10.4239/wjd.v7.i19.483.
- Perušičová, J. *Prediabetes, prehypertenze, dyslipidemie a metabolický syndrom*. Praha: Maxdorf, 2012. ISBN 978-80-7345-272-8.
- Příbramská, M. V., Trumpešová, M. H. Nealkoholická steatohepatitida—součást metabolického syndromu. *Medicína Pro Praxi*, 2008, 5.5: 193-195.
- Racek, J., Eiselt, J., Friedecký, B., Holeček, V., Nekulová, M., Pittrová, H., Rušavý, Z., Senft, V., Šavlová, M., Těšínský, P., Verner, M. *Klinická biochemie*. Praha, Galén, 1999, 305 s., ISBN: 80-7262-023-1.
- Romeo, S., Sentinelli, F., Dash, S., Yeo, G. S. H., Savage, D. B., Leonetti, F., O'rahilly, S. Morbid obesity exposes the association between PNPLA3 I148M (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent. *International journal of obesity*, 2010, 34.1: 190. doi: 10.1038/ijo.2009.216.
- Ricchi, M., Odoardi, M. R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Lonardo, A. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2009, 24.5: 830-840. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x.
- Sakhuja, P. Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis?. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2014, 20.44: 16474. doi: 10.3748/wjg.v20.i44.16474.

- Sedlářová, L. *Analýza oxidačního stresu u modelu isoprenalinové kardiotoxicity po intravenozním podání rutinu*. Vedoucí práce: PharmDr. Tomáš Filipický, Ph.D. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015.
- Singh, R., Wang, Y., Xiang, Y., Tanaka, K. E., Gaarde, W. A., Czaja, M. J. Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. *Hepatology*, 2009, 49.1: 87-96. doi: doi.org/10.1002/hep.22578.
- Sookoian, S., Castaño, G. O., Scian, R., Mallardi, P., Fernandez Gianotti, T., Burgueño, A. L., Pirola, C. J. Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity. *Hepatology*, 2015, 61.2: 515-525. doi: 10.1002/hep.27556.
- Sun, H., Wei, Y., Deng, H., Xiong, Q., Li, M., Lahiri, J., Fang, Y. Label-free cell phenotypic profiling decodes the composition and signaling of an endogenous ATP-sensitive potassium channel. *Scientific reports*, 2014, 4: 4934. doi: 10.1038/srep04934.
- Svačina, Š. *Metabolický syndrom: nové postupy*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-4092-8.
- Szegezdi, E., MacDonald, D. C., Ní Chonghaile, T., Gupta, S., Samali, A. Bcl-2 family on guard at the ER. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2009, 296.5: C941-C953. doi: 10.1152/ajpcell.00612.2008.
- Szendroedi, J., Yoshimura, T., Phielix, E., Koliaki, C., Marcucci, M., Zhang, D., Shulman, G. I. Role of diacylglycerol activation of PKC $\theta$  in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111.26: 9597-9602. doi: 10.1073/pnas.1409229111.
- Tapper, E. B., Sengupta, N., Hunink, M. M., Afdhal, N. H., Lai, M. Cost-effective evaluation of nonalcoholic fatty liver disease with NAFLD fibrosis score and vibration controlled transient elastography. *The American journal of gastroenterology*, 2015, 110.9: 1298. doi: 10.1038/ajg.2015.241.
- Taylor, K., Gordon, N., Langley, G., Higgins, W. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, 2008, 36.3: 327.
- Tilg, H., Moschen, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 2010, 52.5: 1836-1846. doi: 10.1002/hep.24001.



- Tiniakos, D. G. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 2010, 22.6: 643-650. doi: 10.1097/MEG.0b013e32832ca0cb.
- Volmer, R., van der Ploeg, K., Ron, D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110.12: 4628-4633. doi: 10.1073/pnas.1217611110.
- Wainwright, P., Byrne, C. Bidirectional relationships and disconnects between NAFLD and features of the metabolic syndrome. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17.3: 367. doi: 10.3390/ijms17030367.
- Win, S., Than, T. A., Le, B. H. A., García-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J. C., Kaplowitz, N. Sab (Sh3bp5) dependence of JNK mediated inhibition of mitochondrial respiration in palmitic acid induced hepatocyte lipotoxicity. *Journal of hepatology*, 2015, 62.6: 1367-1374. doi: 10.1016/j.jhep.2015.01.032.
- Yki-Järvinen, H. Nutritional modulation of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nutrients*, 2015, 7.11: 9127-9138. doi: 10.3390/nu7115454.
- Yki-Järvinen, H. Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Diabetologia*, 2016, 59.6: 1104-1111. doi: 10.1007/s00125-016-3944-1.
- Younossi, Z. M., Stepanova, M., Rafiq, N., Makhlof, H., Younoszai, Z., Agrawal, R., Goodman, Z. Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. *Hepatology*, 2011, 53.6: 1874-1882. doi: 10.1002/hep.24268.
- Zhang, Y., Zhang, T., Zhang, C., Tang, F., Zhong, N., Li, H., Xue, F. Identification of reciprocal causality between non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome by a simplified Bayesian network in a Chinese population. *BMJ open*, 2015, 5.9: e008204. doi: 10.1136/bmjopen-2015-008204.
- Zhou, Y., Llauradó, G., Orešič, M., Hyötyläinen, T., Orho-Melander, M., Yki-Järvinen, H. Circulating triacylglycerol signatures and insulin sensitivity in NAFLD associated with the E167K variant in TM6SF2. *Journal of hepatology*, 2015, 62.3: 657-663. doi: 10.1016/j.jhep.2014.10.010.

- Ziol, M., Handra-Luca, A., Kettaneh, A., Christidis, C., Mal, F., Kazemi, F., Beaugrand, M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2005, 41.1: 48-54. doi: 10.1002/hep.20506.

## Seznam zkratek

<b>AASLD</b>	americká asociace pro studium onemocnění jater
<b>ACC</b>	acetylkoenzymA karboxyláza
<b>Acyl-CoA</b>	acylkoenzymA
<b>ALT</b>	alaninaminotransferáza
<b>AMP</b>	adenosinmonofosfát
<b>AMPK</b>	AMP-aktivovaná proteinkináza
<b>AP-1</b>	aktivační protein 1
<b>Apo-B</b>	apoprotein B
<b>AST</b>	aspartátaminotransferáza
<b>ATGL</b>	triacylglycerolová lipáza, (zkratka angl. výrazu adipose triglyceride lipase)
<b>BA</b>	žlučové kyseliny
<b>Bcl-2</b>	protein B-buněčného lymfomu 2
<b>Bcl-XL</b>	protein B-buněčného lymfomu velmi velkého
<b>BIM</b>	Bcl-2 protein 11
<b>BH1; BH4</b>	domény proteinů Bcl-2 (Bcl-2 homology)
<b>BMI</b>	index tělesné hmotnosti
<b>CHAPS</b>	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát
<b>CHOP</b>	CCAAT/enhancer vázající homologní protein
<b>CYP; CYP2E1; CYP450</b>	cytochromy
<b>DAG</b>	diacylglycerol
<b>DGAT</b>	diacylglycerolacyltransferáza
<b>DMEM</b>	Dulbeccovo modifikované Eagle médium
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid

<b>DR5</b>	receptor buněčné smrti
<b>DTT</b>	dithiotreitol
<b>ECM</b>	extracelulární matrix
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>ER</b>	endoplasmatické retikulum
<b>E167K</b>	alela genu TM6SF2
<b>FABP</b>	protein vázající se na mastnou kyselinu
<b>FAT</b>	translokáza mastných kyselin
<b>FATP</b>	transportní protein mastných kyselin
<b>FC</b>	volný cholesterol
<b>FHBL</b>	familiární hypobetalipoproteinémie
<b>FFA</b>	volné mastné kyseliny
<b>GFP</b>	zelený fluorescenční protein
<b>GSK-3</b>	glykogensyntáza 3
<b>HCC</b>	hepatocelulární karcinom
<b>HDL</b>	lipoproteiny o vysoké hustotě
<b>HEPES</b>	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
<b>HMGCoA</b>	hydroxymethylglutaryl-CoA
<b>HSL</b>	hormon-senzitivní lipáza
<b>HSPA5; HSP90B1</b>	proteiny tepelného šoku
<b>IKK<math>\beta</math></b>	inhibitor kappa- $\beta$ kinázy
<b>IL-6; IL-8</b>	interleukiny
<b>iPLA2P</b>	na vápníku nezávislá membránová fosfolipáza A2
<b>I148M</b>	alela genu PNPLA3

<b>JNK; JNK1; JNK2</b>	c-Jun N-terminální kinázy
<b>LDH</b>	laktátdehydrogenáza
<b>LDL</b>	lipoproteiny o nízké hustotě
<b>LPC</b>	lysofosfatidylcholin
<b>MAG</b>	monoacylglyceroly
<b>Mcl-1</b>	protein diferenciace myeloidní leukemické buňky
<b>MTT</b>	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- difenyltetrazolium bromid), substrát pro stanovení aktivity buněčných dehydrogenáz
<b>MUFA</b>	mononenasyčené mastné kyseliny
<b>NADH</b>	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
<b>NAFLD</b>	nealkoholové ztukovatění jater
<b>NASH</b>	nealkoholová jaterní steatohepatitida
<b>NFκβ</b>	nukleární faktor Kappa-β
<b>NPC</b>	neparenchymální jaterní buňky
<b>Nrf2</b>	nukleární transkripční faktor, (zkratka angl. výrazu nuclear factor erythroid 2 - related factor 2)
<b>N-SMáza</b>	neutrální sfingomyelináza
<b>OA</b>	kyselina olejová
<b>PA</b>	kyselina palmitová
<b>PAI-1</b>	inhibitor aktivátoru plasminogenu 1
<b>PKC</b>	proteinkináza C
<b>PLA2</b>	fosfolipáza A2
<b>PNPLA-3</b>	gen kódující protein adiponutrin
<b>PO</b>	palmitooleát
<b>PPAR-α; PPAR-γ</b>	receptory aktivované proliferátory peroxizomů

<b>PTP1B</b>	protein-tyrosin fosfatáza 1B
<b>PUMA</b>	p53 upregulovaný modulátor apoptózy
<b>PUFA</b>	polynenasycené mastné kyseliny
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku
<b>SCD-1</b>	stearoyl-CoA desaturáza 1
<b>SNP</b>	jednobodové nukleotidové polymorfismy
<b>SPT</b>	serinpalmitoyl-CoA transferáza
<b>SREBP</b>	sterolový vazebný protein pro regulační elementy
<b>StAR</b>	steroidní akutní regulační protein
<b>S6K</b>	serin/threoninová kináza
<b>TAG</b>	triacylglyceroly
<b>TM6SF2</b>	gen kódující stejnojmenný membránový protein
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
<b>UPR</b>	zkratka pro angl. výraz - unfolded protein response
<b>VDAC</b>	aniontový kanál závislý na napětí
<b>VLDL</b>	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
<b>WP</b>	well plate (ang. výraz pro několika jamkové destičky)
<b>WST</b>	(4-(3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzendisulfonát), substrát pro stanovení aktivity buněčných dehydrogenáz

## Seznam ilustrací a tabulek

### Obrázky

Obr. 1: Progrese NAFLD.....	10
Obr. 2: Prevalence NAFLD podle věkové skupiny a pohlaví .....	11
Obr. 3: Zdroje a mechanismus akumulace tuku v játrech .....	15
Obr. 4: Interakce mezi jaterní steatózou a metabolickým syndromem .....	16
Obr. 5: Interakce mezi PNPLA3 a TM6SF2 a metabolismus lipidů v jaterní tukové kapénce .....	19
Obr. 6: Molekulární mechanismy lipotoxicity v hepatocytu .....	25
Obr. 7: Postup při diagnostice NAFLD .....	27
Obr. 8: Postup při diagnostice NAFLD při potvrzení metabolického syndromu .....	28
Obr. 9: Makrovezikulární steatóza v centrovaném vzoru.....	30
Obr. 10: Detail makrovezikulární steatózy.....	30
Obr. 11: Hepatocyty se steatózou, balónovitá degenerace hepatocytů a několik zánětlivých ložisek .....	31
Obr. 12: Balónovitý hepatocyt s Malloryho tělískem, obklopen vlákný perisinusoidního kolagenu .....	32
Obr. 13: Perisinusoidová fibróza .....	33
Obr. 14: Kokultivační jaterní modely .....	36
Obr. 15: Chemická struktura lysosofatidylcholinu .....	43
Obr. 16: Redukce WST-1 .....	44
Obr. 17: Reakce katalyzovaná LDH.....	45
Obr. 18: Kontrolní hepatocyty potkana .....	56
Obr. 19: Hepatocyty potkana exponované 5 $\mu\text{mol/l}$ LPC 24 hod.....	56
Obr. 20: Hepatocyty potkana exponované 40 $\mu\text{mol/l}$ LPC 24 hod.....	57
Obr. 21: Hepatocyty potkana exponované 100 $\mu\text{mol/l}$ LPC 24 hod.....	57

### Tabulky

Tab. 1: Objemy a množství buněk v destičkách.....	42
Tab. 2: Řada roztoků LPC .....	43

## Grafy

Graf 1: Test WST-1; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 60 a 0 min .....	47
Graf 2: Test WST-1; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 120 a 0 min .....	48
Graf 3: LDH <i>leakage</i> ; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; 12 WP .....	49
Graf 4: LDH <i>leakage</i> ; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; 24 WP .....	50
Graf 5: Aktivita LDH v kultivačním médiu; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; 12 WP .....	51
Graf 6: Aktivita kaspázy 3 v buněčném lyzátu; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 0 a 30 min; 12 WP .....	52
Graf 7: Aktivita kaspázy 3 v buněčném lyzátu; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 0 a 90 min; 24 WP .....	53
Graf 8: Aktivita kaspázy 3 v kultivačním médiu; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 0 a 30 min; 12 WP .....	54
Graf 9: Aktivita kaspázy 3 v kultivačním médiu; hepatocyty potkana; expozice LPC 24 hod; rozdíl v čase 0 a 30 min; 24 WP .....	55

## Přílohy

Příloha 1: WST-1, LDH <i>leakage</i> .....	80
Příloha 2: Aktivita kaspázy 3 .....	81



## Přílohy

Příloha č. 1: WST-1, LDH leakage. AVG – aritmetický průměr, STD – směrodatná odchylka, n – počet měření. WST: čas 1 = 60 min, čas 2 = 120 min, výsledky jsou uvedeny jako % kontroly, LDH leakage: výsledky jsou vyjádřeny jako aktivita uvolněné LDH v kultivačním médiu (LDH EC) ku celkové aktivitě LDH v procentech.

WST, t = 24 hod, čas 0 - čas 1	n	AVG	STD	WST, t = 24 hod, čas 0 - čas 2	n	AVG	STD
Kontrola	6	100,000	0,079	Kontrola	6	100,000	4,166
LPC 5 $\mu\text{mol/l}$	6	109,584	8,567	LPC 5 $\mu\text{mol/l}$	6	100,375	5,915
LPC 10 $\mu\text{mol/l}$	6	107,226	7,445	LPC 10 $\mu\text{mol/l}$	6	93,493	6,176
LPC 20 $\mu\text{mol/l}$	6	108,448	5,223	LPC 20 $\mu\text{mol/l}$	6	94,101	6,399
LPC 40 $\mu\text{mol/l}$	6	78,354	3,986	LPC 40 $\mu\text{mol/l}$	6	71,699	5,488
LPC 60 $\mu\text{mol/l}$	6	31,537	12,788	LPC 60 $\mu\text{mol/l}$	6	25,735	11,956
LPC 80 $\mu\text{mol/l}$	6	0,953	0,549	LPC 80 $\mu\text{mol/l}$	6	1,005	0,484
LPC 100 $\mu\text{mol/l}$	6	0,136	0,121	LPC 100 $\mu\text{mol/l}$	6	0,245	0,067
LDH leakage, t = 24 hod, 12 WP	n	AVG	STD	LDH leakage, t = 24 hod, 24 WP	n	AVG	STD
Kontrola	6	24,726	7,779	Kontrola	6	30,207	4,342
LPC 5 $\mu\text{mol/l}$	6	20,386	3,450	LPC 5 $\mu\text{mol/l}$	6	30,713	1,675
LPC 10 $\mu\text{mol/l}$	6	22,369	2,524	LPC 10 $\mu\text{mol/l}$	6	29,846	1,677
LPC 20 $\mu\text{mol/l}$	6	26,288	7,905	LPC 20 $\mu\text{mol/l}$	6	31,971	2,120
LPC 40 $\mu\text{mol/l}$	6	29,659	6,750	LPC 40 $\mu\text{mol/l}$	6	27,735	2,515
LPC 60 $\mu\text{mol/l}$	6	90,566	1,610	LPC 60 $\mu\text{mol/l}$	6	42,939	2,008
LPC 80 $\mu\text{mol/l}$	6	88,615	3,235	LPC 80 $\mu\text{mol/l}$	6	80,867	1,831
LPC 100 $\mu\text{mol/l}$	6	95,027	1,650	LPC 100 $\mu\text{mol/l}$	6	89,647	1,989
LDH EC, t = 24 hod, 12 WP	n	AVG	STD				
Kontrola	6	267,62	99,467				
LPC 5 $\mu\text{mol/l}$	6	201,85	46,009				
LPC 10 $\mu\text{mol/l}$	6	204,09	35,190				
LPC 20 $\mu\text{mol/l}$	6	240,24	73,397				
LPC 40 $\mu\text{mol/l}$	6	359,66	127,065				
LPC 60 $\mu\text{mol/l}$	6	1699	49,411				
LPC 80 $\mu\text{mol/l}$	6	1688,4	242,940				
LPC 100 $\mu\text{mol/l}$	6	1998,1	183,043				

Příloha č. 2: Aktivita kaspázy 3. AVG – aritmetický průměr, STD – směrodatná odchylka, n – počet měření. Kaspáza 3 EC – aktivita kaspázy 3 v kultivačním médiu, kaspáza 3 IC – aktivita kaspázy 3 v buněčném lyzátu. Čas 1 = 30 min, čas 3 = 90 min, výsledky jsou uvedeny jako % kontroly.

kaspáza 3, EC, t = 24 hod, čas 1 - čas 0, 12 WP	n	AVG	STD
Kontrola	6	100,000	44,912
LPC 5 $\mu\text{mol/l}$	6	107,018	47,837
LPC 10 $\mu\text{mol/l}$	6	117,404	95,740
LPC 20 $\mu\text{mol/l}$	6	169,204	68,557
LPC 40 $\mu\text{mol/l}$	6	535,350	53,628
LPC 60 $\mu\text{mol/l}$	6	216,257	96,947
LPC 80 $\mu\text{mol/l}$	6	183,076	64,911
LPC 100 $\mu\text{mol/l}$	6	76,294	61,620
kaspáza 3, IC, t = 24 hod, čas 1 - čas 0, 12 WP	n	AVG	STD
Kontrola	6	100,000	14,019
LPC 5 $\mu\text{mol/l}$	6	99,555	10,735
LPC 10 $\mu\text{mol/l}$	6	94,871	14,140
LPC 20 $\mu\text{mol/l}$	6	104,741	13,262
LPC 40 $\mu\text{mol/l}$	6	131,079	14,286
LPC 60 $\mu\text{mol/l}$	6	140,629	20,565
LPC 80 $\mu\text{mol/l}$	6	70,080	10,181
LPC 100 $\mu\text{mol/l}$	6	58,303	18,821
kaspáza 3, EC, t = 24 hod, čas 1 - čas 0, 24 WP	n	AVG	STD
Kontrola	6	100,000	34,262
LPC 5 $\mu\text{mol/l}$	6	79,666	36,765
LPC 10 $\mu\text{mol/l}$	6	101,333	42,443
LPC 20 $\mu\text{mol/l}$	6	240,777	45,641
LPC 40 $\mu\text{mol/l}$	6	497,111	101,309
LPC 60 $\mu\text{mol/l}$	6	343,444	52,668
LPC 80 $\mu\text{mol/l}$	6	259,777	46,249
LPC 100 $\mu\text{mol/l}$	6	140,888	42,495
kaspáza 3, IC, t = 24 hod, čas 3 - čas 0, 24 WP	n	AVG	STD
Kontrola	6	100,000	146,022
LPC 5 $\mu\text{mol/l}$	6	pod mez. det.	
LPC 10 $\mu\text{mol/l}$	6	40,350	206,744
LPC 20 $\mu\text{mol/l}$	6	337,134	189,915
LPC 40 $\mu\text{mol/l}$	6	648,538	342,654
LPC 60 $\mu\text{mol/l}$	6	260,526	328,160
LPC 80 $\mu\text{mol/l}$	6	94,444	174,657
LPC 100 $\mu\text{mol/l}$	6	pod mez. det.	