

Ovlivnění regenerační schopnosti jater po částečné hepatektomii podáním diety se zvýšeným obsahem cholesterolu standardním a hypercholesterolemickým potkanům

Pavlíková L.¹, Živný P.¹, Živná H.², Mocková P.¹, Palička V.¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové

²Radioizotopové laboratoře a Vivárium Lékařské fakulty Univerzity Karlovy Hradec Králové

SOUHRN

Cíl studie: Zhodnotit regeneraci jater po částečné hepatektomii (PH) u potkanů se steatózou navozenou podáním diety obohacené o cholesterol a zhodnotit roli inzulínu a leptinu v procesu regenerace.

Materiál a metody: V experimentu byli užití standardní laboratorní potkani kmene Wistar (W) a potkani PHHC (Pražský hereditární hypercholesterolemický potkan). Potkani byli rozděleni do 4 skupin a živeni dietami 29 dní *ad libitum*. standardní laboratorní dietou (SLD) a dietou SLD obohacenou o 4 % cholesterolu. Částečná hepatektomie (PH) (68 %) byla provedena 28. den. Jaterní syntéza DNA po částečné hepatektomii (specifická aktivita DNA) byla stanovena na Beckman Coulter analyzer LS 6000 LL, USA. Stanovení koncentrace leptinu a inzulínu bylo provedeno s využitím kitů DRG, Marburg, Germany (Rat Leptin and Insulin RIA kit). Koncentrace sérové glukózy (mmol/l) byly stanoveny systémem Modular Roche, Basel, Švýcarsko. Výsledky byly statisticky zpracovány softwarem SigmaStat 3.1, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA.

Výsledky a závěr: Podávání diety obohacené o cholesterol vedlo k supresi jaterní regenerace v porovnání s kontrolní skupinou, která dostávala standardní laboratorní dietu. Změny v koncentraci leptinu a inzulínu v séru u potkanů živených dietou obohacenou o cholesterol vedly ke změnám v metabolismu a k ovlivnění jaterní regenerace.

Klíčová slova: jaterní steatóza, jaterní regenerace, leptin, inzulín.

SUMMARY

Pavlíková L., Živný P., Živná H., Mocková P., Palička V.: The influence of cholesterol enriched diet to liver regeneration after partial hepatectomy in wistar and hypercholesterolemic rats

Objective: Aim of our study was to show how different diets changed liver regeneration after partial hepatectomy (PH).

Methods: Male Wistar (W) and Prague Hereditary Hypercholesterolemic rats (PHHC) were divided into groups and fed by different diets *ad libitum* for 29 days: standard laboratory diet and diet with addition of 4% cholesterol. Two third partial hepatectomy (PH) was then performed. Liver DNA synthesis was estimated by Beckman Coulter analyzer (Beckman, USA). Serum glucose (mmol/l, Modular Roche), leptin and insulin (ng/l, EIA, DRG, Marburg, Germany) were estimated before and after PH. Statistics: *t-test* (mean \pm SEM) was performed using SigmaStat software (Jandel Scientific, USA).

Results and Conclusions: There was missing interplay between leptin and insulin with adequate activation of glucose and lipids metabolisms to initiation of liver regeneration in rats with CHOL diet.

Key words: liver steatosis, liver regeneration, leptin, insulin.

Úvod

Ve vyspělých zemích je jaterní steatóza častým chronickým jaterním onemocněním, jehož význam byl v posledních letech akcentován definováním jednotek NAFLD a NASH. NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) je přesnější termín zahrnující široké spektrum nealkoholického jaterního poškození – prostou steatózu nebo i zánětlivé poškození, tedy steatohepatitidu (NASH) či pokročilejší stadium cirhózy [1]. Podmínkou diagnózy NAFLD není absolutní abstinence, lze připustit i u pacientů požívající alkohol v „bezpečné“ míře (20 g/den u žen, 30 g/den u mužů) [2]. Na základě populačních studií se předpokládá, že NAFLD je přítomno u 16–23 % populace [1]. Podle literatury může vést jaterní steatóza po rozsáhlé resekci k závažné poruše funkce zbytku jaterní tkáně nebo ke komplikacím po transplantaci steatotických jater [3]. Cílem práce bylo zhodnotit regeneraci jater

po částečné hepatektomii u potkanů se steatózou navozenou podáním diety obohacené o cholesterol.

Materiál a metody

V experimentu byli užití standardní laboratorní potkani – samci kmene Wistar (n = 16) a potkani PHHC – Pražský hereditární hypercholesterolemický potkan, inbrední linie potkana s vysokou bazální cholesterolemíí a složením lipoproteinů a metabolismem velmi podobným lidské patologii (n = 16) [4]; celkem to bylo 32 zvířat. Protokol pokusu byl schválen odbornou komisí. Všechny operační výkony na potkanech byly provedeny ve funkční digestoři v éterové anestezii. Potkani kmene Wistar i PHHC byli rozděleni do 4 skupin a byli živeni dietami 29 dní *ad libitum*.

1. skupina: W-SLD – potkani Wistar živeni standardní laboratorní dietou (SLD).

- skupina: W-CHOL – potkani Wistar živeni standardní laboratorní dietou obohacenou o 4 % cholesterolu (CHOL dieta).
- skupina: PHHC-SLD – potkani PHHC živeni standardní laboratorní dietou (SLD).
- skupina: PHHC-CHOL – potkani PHHC živeni standardní laboratorní dietou obohacenou o 4 % cholesterolu (CHOL dieta).

Kontrolní odběr 1,5 ml krve z retroorbitálního sinu byl proveden 25. den. Částečná hepatektomie (68%) byla provedena 28. den experimentu. Pro zhodnocení jaterní regenerace byl 1 hodinu před usmrcením i. v. aplikován methyl ³H-thymidin (Lacomed, spol. s r. o.) a jeho aktivita (specifická aktivita jaterních DNA) byla stanovena na Beckman Coulter analyzer LS 6000 LL, USA [5]. Potkani byli usmrceni za 24 hodin po PH vykrvácením z bifurkace břišní aorty v celkové anestezii. Stanovení koncentrace leptinu a inzulínu bylo provedeno s využitím kitů firmy DRG, Marburg, Germany (Rat Leptin and Insulin RIA kit). Koncentrace sérové glukózy byly stanoveny systémem Modular Roche, Basel, Švýcarsko. Výsledky byly statisticky zpracovány softwarem SigmaStat 3.1, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA.

Výsledky

Podávání CHOL diety vedlo k navození jaterní steatózy, která se projevila nárůstem hmotnosti jater (tab. 1) i změnou histologického obrazu. Potkani kmene Wistar živení CHOL dietou měli zpožděný nástup jaterní syntézy DNA (s. a. DNA) ve srovnání s potkany PHHC (tab. 1).

Table 1. Liver weight and liver DNA synthesis

Group	Liver weight (g) 24 h after PH	s.a. DNA (Bq/mg DNA) 24 h after PH
W-SLD	5.40 ± 0.11	11.21 ± 1.10
W-CHOL	5.97 ± 0.27	6.09 ± 0.82
PHHC-SLD	4.39 ± 0.24	2.92 ± 1.27
PHHC-CHOL	5.70 ± 0.34	4.16 ± 1.00

Koncentrace leptinu byly před PH u potkanů skupiny PHHC-CHOL vyšší ve srovnání s potkany W-CHOL. Po provedení PH došlo u všech potkanů k poklesu koncentrace inzulínu, ale u potkanů Wistar byl tento pokles méně výrazný než u potkanů kmene PHHC (tab. 2). Mezi oběma kmeny nebyly výraznější rozdíly v koncentraci glukózy před i po PH.

Rozdíly byly signifikantní při stanovení koncentrací inzulínu mezi těmito skupinami: W-SLD vs PHHC-SLD ($p = 0,001$) (před PH i po PH); W-SLD vs W-CHOL (před PH, $p = 0,024$); W-CHOL vs PHHC-CHOL ($p = 0,007$). Při stanovení koncentrace leptinu byly statisticky významné PHHC-SLD vs PHHC-CHOL (po PH, $p = 0,009$).

Diskuse

V našem experimentu jsme si položili otázku, jak dieta obohacená o cholesterol změní koncentrace leptinu, inzulínu a glukózy a regenerační schopnost jater u potkanů po částečné hepatektomii. Experiment byl proveden na dvou kmenech potkanů – kmen Wistar (kontrolní) a Pražský hereditárně hypercholesterolemický potkan.

Syntéza jaterních DNA byla nižší u potkanů W-CHOL ve srovnání s W-SLD na rozdíl od PHHC-CHOL, u kterých byla syntéza jaterních DNA vyšší než u skupiny PHHC-SLD. Cholesterol je nezbytným substrátem pro tvorbu membrán při regeneraci nově vznikajících buněk a organel. Je však zřejmé, že u potkanů kmene Wistar vede nadměrný přívod cholesterolu před částečnou hepatektomií k takovému nastavení regulačních mechanismů metabolismu cholesterolu, které nepodporují jaterní regeneraci. Jiná je situace u potkanů PHHC, kde exogenní přívod cholesterolu zřejmě vytváří lepší podmínky pro iniciaci jaterní regenerace [4].

O leptinu je známo, že hraje klíčovou roli v iniciaci jaterní regenerace [3], a to dvěma způsoby: jednak vlivem na metabolismus tuků a rozvoj jaterní steatózy (která je po částečné hepatektomii „fyziologickým“ – žádoucím jevem), jednak kontrolou produkce a následné aktivace cytokinů klíčových pro jaterní regeneraci. V našem experimentu jsme u skupin W-SLD, W-CHOL a PHHC-CHOL pozorovali nesignifikantní pokles koncentrace leptinu po částečné hepatektomii a u jediné skupiny PHHC-SLD došlo po částečné hepatektomii ke zvýšení koncentrace leptinu. U této skupiny byla zaznamenána nejnižší syntéza jaterních DNA. Je možné usuzovat, že hyperleptinémie má negativní vliv na iniciaci jaterní regenerace. K ustanovení hodnotnějších závěrů by však bylo současně nutné hodnotit kvalitu funkce (respektive stupeň dysfunkce receptorů pro leptin), což v našem experimentu nebylo prováděno.

Odlišnost metabolismu hereditárně hypercholesterolemických potkanů je rovněž demonstrována na koncentracích inzulínu, které byly nižší již před částečnou hepatektomií u hereditární hypercholesterole-

Table 2. Leptin, insulin and glucose concentrations before and 24 hours after PH

Group	Leptin before PH [μg/l]	Leptin after PH [μg/l]	Glucose before PH [μg/l]	Glucose after PH [μg/l]	Insulin before PH [μg/l]	Insulin after PH [μg/l]
W-SLD	9.02 ± 0.74	7.48 ± 1.04	7.13 ± 0.57	7.40 ± 0.56	1.94 ± 0.24	1.23 ± 0.13
W-CHOL	6.18 ± 1.42	5.73 ± 1.11	6.84 ± 0.75	7.87 ± 0.99	1.13 ± 0.20	1.13 ± 0.17
PHHC-SLD	8.13 ± 1.46	12.68 ± 1.6	8.04 ± 0.63	7.65 ± 0.24	0.68 ± 0.17	0.29 ± 0.08
PHHC-CHOL	10.53 ± 1.42	6.7 ± 1.08	7.92 ± 0.58	8.17 ± 0.39	0.8 ± 0.27	0.46 ± 0.12

mických potkanů ve srovnání s potkany kmene Wistar; po částečné hepatektomii nastalo u potkanů PHHC další výrazné snížení koncentrací inzulínu. Insulín bývá ve vztahu k jaterní regeneraci řazen k řadě růstových faktorů, především bývá zmiňována jeho role v iniciaci regenerace sinusoidálních endoteliálních buněk. Důvod nižší koncentrace inzulínu u obou skupin PHHC a skupiny W-CHOL potkanů zůstává nejasný, nepochybně však bude souviset se změnami v utilizaci glukózy a následně i tuků [2].

Závěr

Podávání diety se zvýšeným obsahem cholesterolu vedlo ke změnám v produkci leptinu a inzulínu s následným ovlivněním iniciace jaterní regenerace.

Literatura

1. **Brůha, R., Dvořák, K.** Nealkoholická steatóza a steatohepatitida. *Interní medicína*, 2007, 5, s. 210–212.
2. **Neuschwander-Tetri, B. A., Caldwell, S. H.** Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*, 2003, 37, p. 1202–1219.
3. **Picard, C., Lambotte, L., Starkel, P., Sempoux, C., Saliez, A., Van den Berge, V., Horsmans, Y.** Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J. Hepatol.*, 2002, 36, p. 645–652.
4. **Befekadu, G., Kovar, J., Poledne, R.** High sensitivity of PHHC rat to dietary cholesterol. *Physiol. Res.*, 1992, 41, 4, p. 263–266.
5. **Short, J., Zemel, R., Kanta, J., Lieberman, I.** Stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver parenchymal cells of the intact rats. *Nature*, 1969, 223, p. 956–957.

Práce je podpořena grantem IGA NR/8500-3.

Do redakce došlo 5. 11. 2007.

Adresa pro korespondenci:

Ing. Lenka Pavlíková

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

e-mail: pavlikova.lenka@fnhk.cz