

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Morfologická charakteristika rozvoje steatózy v precizních
jaterních řezech a možnosti jejího ovlivnění

PETRA PŘIBÁŇOVÁ

Vedoucí bakalářské práce RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své bakalářské práce paní RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a podporu při vypracovávání této práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Ivany Němečkové Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Hradec Králové

.....

Podpis

Obsah

1.	Abstrakt	5
2.	Abstract	6
3.	Úvod.....	7
4.	Cíl práce	8
5.	Teoretická část.....	9
5.1	Morfologie a histologie jater	9
5.1.1	Zevní anatomie jater.....	9
5.1.2	Cévní zásobení jater	10
5.1.3	Vnitřní struktura jater.....	11
5.1.4	Žlučové cesty	13
5.2	Steatóza jater.....	15
5.2.1	Histologický nález	15
5.2.2	Etiologie	18
5.2.3	Diagnostika	19
5.2.4	Léčba.....	20
5.3	Zvířecí modely pro indukci steatózy	21
5.4	PCLS	22
6.	Praktická část.....	23
6.1	Histologické zpracování	23
6.2	Použité barvicí metody	24
6.2.1	Hematoxylin-Eozin.....	24
6.2.2	Olejová červeň.....	25
6.3	Výsledky.....	26
6.4	Diskuze.....	35
6.5	Závěr	37
7.	Seznam použitých zkratk	38
8.	Seznam obrázků.....	39
9.	Seznam literatury	40

1. Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor: Petra Přibáňová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Název práce: Morfologická charakteristika rozvoje steatózy v precizních jaterních řezech a možnosti jejího ovlivnění

Úvod a cíl práce: Nealkoholová jaterní steatóza je jednou z nejčastějších příčin chronického jaterního onemocnění. Je považována za manifestaci metabolického syndromu spojeného s obezitou, dyslipidemií a diabetem mellitem II. typu. Cílem bakalářské práce bylo popsání anatomie a histologie jater a jaterní steatózy, a dále zhotovení histologických preparátů, jejich následné obarvení za účelem sledování vlivu vybraných látek na rozvoj steatózy v jaterní tkáni.

Metody: K přípravě precizních ultratenkých jaterních řezů (PCLS) byla použita myší játra. Vzniklé řezy byly poté inkubovány v různých médiích. Byly zhotoveny parafínové řezy a pod mikroskopem byly pozorovány preparáty obarvené hematoxylin-eozinem nebo olejovou červení.

Výsledky a závěr: Při porovnání kontrolních PCLS bez inkubace s řezy inkubovanými 36 hodin v základním Williamsově médiu jsme zjistili, že došlo k rozvoji nekrózy zejména v centru řezů, z toho důvodu nebylo možné spolehlivě hodnotit působení vybraných látek na rozvoj steatózy. Nezaznamenali jsme rozdíl mezi kontrolními PCLS, které byly inkubovány v základním médiu, a PCLS, které byly inkubovány v médiu pro indukci steatózy, ani po přidání potenciálních anti-steatotických látek. V dalším průběhu experimentu bude nutné zlepšit podmínky inkubace PCLS, aby byla zachována životnost těchto řezů.

Klíčová slova: játra, histologie, steatóza, ultratenké jaterní řezy (PCLS)

2. Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Laboratory diagnostics in healthcare

Author: Petra Přibáňová

Supervisor: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Title of the thesis: Morphological characteristics of steatosis development in precision cut liver slices and the possibility of its modification

Background and the aim of the thesis: Non-alcoholic hepatic steatosis is one of the most common causes of chronic liver disease. It is considered to be a manifestation of a metabolic syndrome associated with obesity, dyslipidaemia and type II diabetes mellitus. The aim of the bachelor thesis was to describe the anatomy and histology of the liver and hepatic steatosis, as well as to prepare histological slides, their subsequent staining and observation of the influence of different substances on the development of steatosis in liver tissue.

Methods: Mouse liver was used to prepare precision cut liver slices (PCLS). The slices were then fixed and incubated in different media. Paraffine slides stained with hematoxylin-eosin or oil red were observed under a microscope.

Results and conclusion: When comparing control PCLS without incubation with slices incubated for 36 hours in basic Williams' medium, we found that necrosis developed mainly in the center of the sections; therefore, it was not possible to reliably assess the effect of selected substances on the development of steatosis. We did not observe any difference between control PCLS that were incubated in basic medium and PCLS that were incubated in steatotic medium, even after the addition of potential anti-steatotic agents. In the future course of the experiment, it will be necessary to improve the incubation conditions of the PCLS to maintain the viability of these slices.

Keywords: liver, histology, steatosis, precision cut liver slices (PCLS)

3. Úvod

Játra představují největší žlázu lidského těla nacházející se v pravém horním kvadrantu břišní dutiny. Jsou významným centrem metabolismu proteinů, cukrů i tuků, zásobárnou vitamínů rozpustných v tucích a významným detoxikačním centrem organismu. Dochází zde také k tvorbě a exkreci žluči a v prenatalním období jsou játra sídlem krve tvorby.

V důsledku nadměrného příjmu alkoholu, obezity, diabetu mellitu II. typu nebo jiných onemocnění dochází k rozvoji ztukovatění jater nazvaného jako jaterní steatóza. Projevem onemocnění je kumulace lipidů v jaterní tkáni a vytváření tukových vakuol v hepatocytech. Steatóza jater se může rozvinout v nealkoholickou steatohepatitidu nebo jaterní cirhózu, a tím dochází k závažnému poškození jater.

Patogeneze nealkoholového ztukovatění jater (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) je velmi komplexní a zahrnuje různé oblasti metabolismu. Ke studiu jsou široce využívány zvířecí modely, v posledních letech se pozornost obrací na častější využívání *in vitro* modelů. Jedním ze slibných modelů jsou precizní ultratenké jaterní řezy (precision cut liver slices, PCLS), které představují zajímavou *ex vivo* alternativu, kdy můžeme studovat všechny buňky jaterní tkáně společně, tak jak jsou uspořádány v živém organismu.

4. Cíl práce

Cílem teoretické části bakalářské práce byl anatomický a histologický popis jater a dále objasnění pojmu steatóza jater, etiologie, diagnostika a léčba tohoto onemocnění.

Praktická část byla zaměřena na vytvoření a obarvení ultratenkých jaterních řezů barvivem hematoxylin-eozin a olejovou červení. Byl zkoumán vliv různých inkubačních médií na změnu stavby a struktury jaterní tkáně.

5. Teoretická část

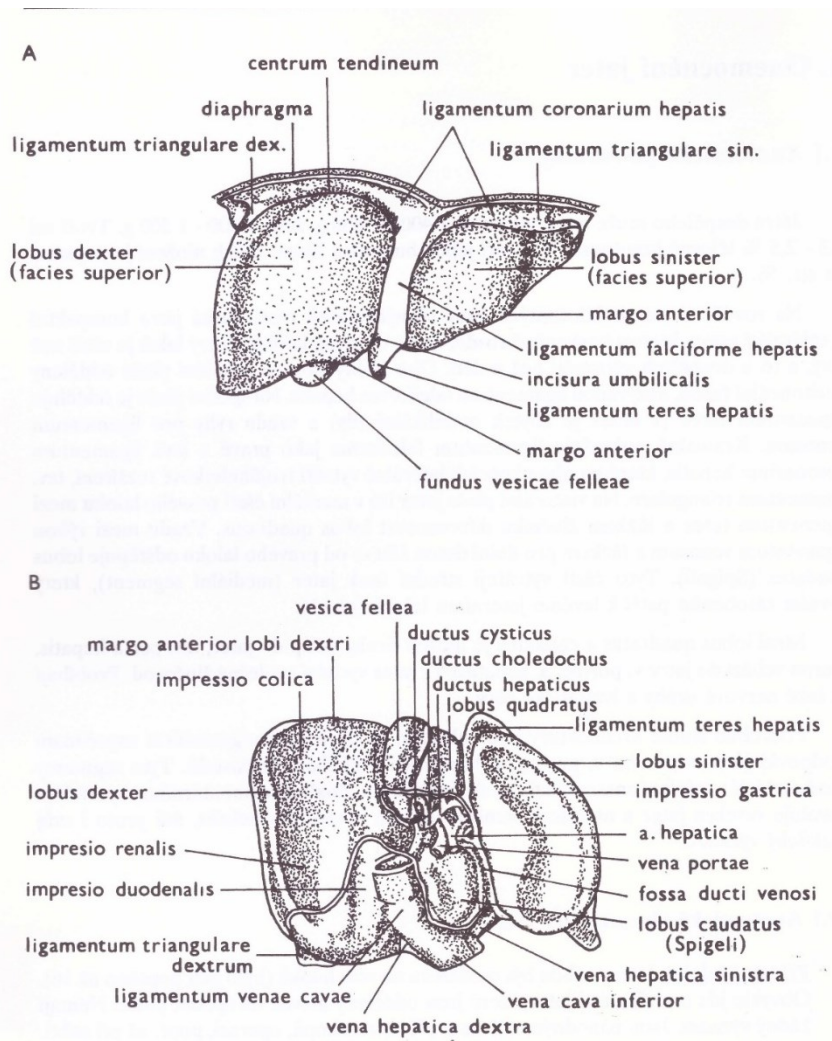
5.1 Morfologie a histologie jater

Játra představují největší žlázu lidského těla. S hmotností 1,5-1,8 kg u dospělého muže a 1,2-1,5kg u dospělé ženy, zaujímají přibližně 3 % tělesné hmotnosti. Jsou uložena v pravém horním kvadrantu břišní dutiny, kde jsou chráněna žebry. Horní část jater končí v úrovni prsních bradavek. Vyplňují pravou brániční klenbu, částečně zasahují do levé brániční klenby. Na místě jsou játra držena peritoneálními vazy a nitrobřišním tlakem vyvíjeným napětím svalů břišní stěny. Játra jsou významným centrem metabolismu proteinů, cukrů a tuků, detoxikačním a imunitním centrem a místem tvorby a vylučování žluči. V prenatálním vývoji jsou také místem krvetvorby. (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš & Žák, 2007) (Abdel-Misih & Bloomston, 2010) (Sherlock & Dooley, 2004)

5.1.1 Zevní anatomie jater

„Tvarem lze játra přirovnat k trojbokému jehlanu položenému na bok se základnou přiloženou k pravé břišní stěně a vrcholem směřujícím k levé břišní stěně.“ (Hůlek & Urbánek, 2018) Horní plocha jater se dotýká bránice (facies diaphragmatica), spodní plocha doléhá na orgány břišní dutiny (facies visceralis), tím na játrech vznikají otisky přilehlých orgánů (impressiones). Celý povrch jater je pokryt peritoneem kromě místa přímého kontaktu s bránicí, a jamek pro žlučník a dolní dutou žílu. (Sherlock & Dooley, 2004) (Lukáš & Žák, 2007)

Játra jsou z anatomického hlediska tvořena dvěma hlavními laloky – větším pravým (*lobus dexter*) a menším levým (*lobus sinister*). Laloky jsou z přední brániční strany odděleny srpovitým vazem (*ligamentum falciforme*), ze strany zadní laloky odděluje Arantiův vaz (*ligamentum venosum*) a ze spodní strany oblý vaz (*ligamentum teres*). Pravý lalok je rozdělen na ocasatý lalok (*lobus caudatus*) na zadní straně jater a lalok čtyřhranný (*lobus quadratus*) na straně spodní (Obrázek 1). Z funkčního hlediska mohou být játra rozdělena do celkem 4 segmentů podle průběhu cévního zásobení a odtoku žluči. Pravá část jater se skládá ze zadního a předního sektoru, levá ze sektoru mediálního a laterálního. Tyto sektory se dále rozdělují a celkově lze játra rozdělit na 8 sektorů. (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš & Žák, 2007) (Sherlock & Dooley, 2004)



Obrázek 1 Anatomie jater. Převzato z: (Brodanová, 1993)

5.1.2 Cévní zásobení jater

Játra mají dvojí krevní zásobování – portální žílou (*vena portae*) a jaterní tepnou (*arteria hepatica propria*). Obě tyto cévy přichází do jater v *ligamentum hepatoduodenale*. Do jater vstupují přes jaterní bránu (*porta hepatis*) nacházející se na spodní straně pravého laloku. Portální žíla přivádí venózní odkysličenou krev z trávicího traktu, žlučníku, slinivky břišní a sleziny. Tato krev, bohatá na živiny, obsahuje látky vstřebané v trávicí trubici, krevní barvivo z rozpadlých erytrocytů, toxiny, xenobiotika a mikroby. Okysličenou krev přivádí jaterní tepna. Obě cévy se v játrech větví na *arteria* a *vena interlobulares* vyskytující se v portobiliárním prostoru, ty se dále dělí na *arteria* a *vena circumlobulares*. V poslední řadě se z *arteria*, resp. *vena circumlobularis* dostává krev do jaterních sinusoid, které se vlévají do centrální žíly (*vena centralis*). Zde začíná odtok krve z jater. Neokysličená krev je z jater odváděna jaterní žílou (*vena hepatica*), která ústí do dolní duté žíly.

Porta hepatis je také místo spojení pravého a levého žlučovodu, které vystupují z jater jako společný jaterní vývod (*ductus hepaticus communis*). (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš & Žák, 2007) (Sherlock & Dooley, 2004) (Trefts a kol., 2017)

5.1.3 Vnitřní struktura jater

Za základní morfologickou jednotku je považován lalůček centrální žíly (*lobulus venae centralis*). Jedná se o šestiboký útvar o rozměrech přibližně 1x2 mm. V játrech se průměrně nachází 50-100 tisíc lalůčků. (Sherlock & Dooley, 2004) (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš & Žák, 2007)

Základní stavební jednotkou jater, tedy i lalůčků, jsou jaterní buňky (hepatocyty). Jsou to polygonální buňky bez bazální membrány tvořící přibližně 60 % jaterní tkáně. Jednotlivé hepatocyty v lalůčku se liší mimo jiné svou enzymatickou výbavou v závislosti od toho, v jaké části lalůčku se nachází. Hepatocyty na okraji lalůčku mají blíže k živinám a vyšší saturaci kyslíkem, proto v nich probíhají oxidační reakce, například glukoneogeneze nebo močovinový cyklus. Jaterní buňky bližší středu lalůčku, které nemají tak velký přístup ke kyslíku a živinám, se podílejí na glykolýze a redukčních reakcích. Jaterní buňky vytváří trámce složené z jedné až dvou vrstev buněk, a tyto trámce se radiálně sbíhají do středu lalůčku, kterým prochází centrální žíla (*vena centralis*). (Beránek & Tichý, 2013) (Sherlock & Dooley, 2004) (Lukáš & Žák, 2007) (Malarkey a kol., 2005)

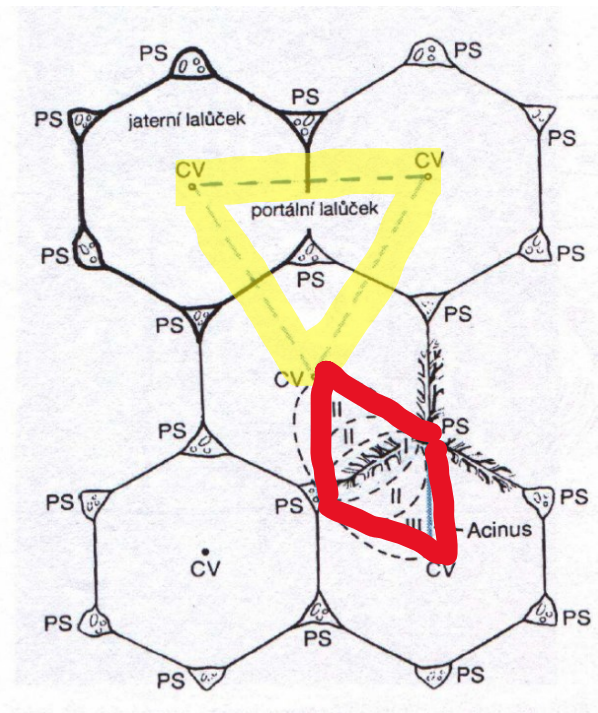
Mezi hepatocyty uvnitř trámce vedou žlučové kanálky a mezi jednotlivými trámcí vedou kapiláry – jaterní sinusoidy – nesoucí smíšenou arteriální a venózní krev do centrální žíly. Sinusoidy jsou vystlány pouze nesouvislou vrstvou fenestrováných endotelových buněk s výběžky a bez bazální membrány. Fenestrace endotelových buněk vytváří jakási síta, která slouží jako filtr látek mezi sinusoidami a Disseho prostorem. Projdou pouze látky menší než 2 μm . Endotelové buňky jsou také schopny endocytózy látek z krve, například transferin, VLDL (lipoproteiny s velmi nízkou hustotou), LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou) a HDL (lipoproteiny s vysokou hustotou). (Brodanová, 1993) (Sherlock & Dooley, 2004) (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš & Žák, 2007) (Junqueira a kol., 1997) (Malarkey a kol., 2005) (Trefts a kol., 2017)

V prostorách mezi kapilárami a hepatocyty se nachází úzký prostor nazván jako Disseho obsahující výběžky hepatocytů a retikulární vlákna. Díky tomuto prostoru se krev bez problémů dostává z prostoru sinusoid do hepatocytů. (Brodanová, 1993) (Sherlock & Dooley, 2004) (Hůlek & Urbánek, 2018) (Junqueira a kol., 1997)

V některých místech stěny kapilár se mezi endotelovými buňkami vyskytují Kupfferovy buňky – fagocytující makrofágy retikuloendotelového systému se schopností endocytózy, jež vycytávají staré krvinky, bakterie, viry nebo nádorové buňky. K povrchu endotelových buněk jsou připojeny Pit buňky ze skupiny cytotoxických lymfocytů. V Disseho prostoru lze také najít hvězdicovité Itovy buňky mající význam jako buňky skladující tuk. V těchto buňkách je také skladován vitamín A ve formě retinyl esterů. (Brodanová, 1993) (Sherlock & Dooley, 2004) (Hůlek & Urbánek, 2018) (Junqueira a kol., 1997) (Krishna, 2013)

Z funkčního hlediska můžeme za základní morfologickou jednotku jater považovat i jiné útvary než jaterní lalůček. Jedním z nich je portální lalůček, který má střed v portobiliárním prostoru a jeho oblast je ohraničena centrálními věnami 3 přiléhajících lalůčků. Další možnou funkční jednotku představuje jaterní acinus tvaru vybroušeného diamantu, který spojuje úseky dvou přilehlých lalůčků, majících stejné cévní zásobení z *arteria* a *vena circumlobulares*. Hepatocyty jsou v acinu rozděleny do tří zón podle vzdálenosti od cévního zásobení. Toto rozdělení je důležité nejen z hlediska metabolismu, ale i intoxikací (Obrázek 2). (Brodanová, 1993) (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš & Žák, 2007) (Junqueira a kol., 1997) (Krishna, 2013)

Portobiliární prostor neboli portální triáda je vazivový prostor mezi lalůčky, v němž se nachází *arteria interlobularis*, *vena interlobularis* a *ductus bilifer interlobularis*. (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš & Žák, 2007) (Sherlock & Dooley, 2004) (Junqueira a kol., 1997),



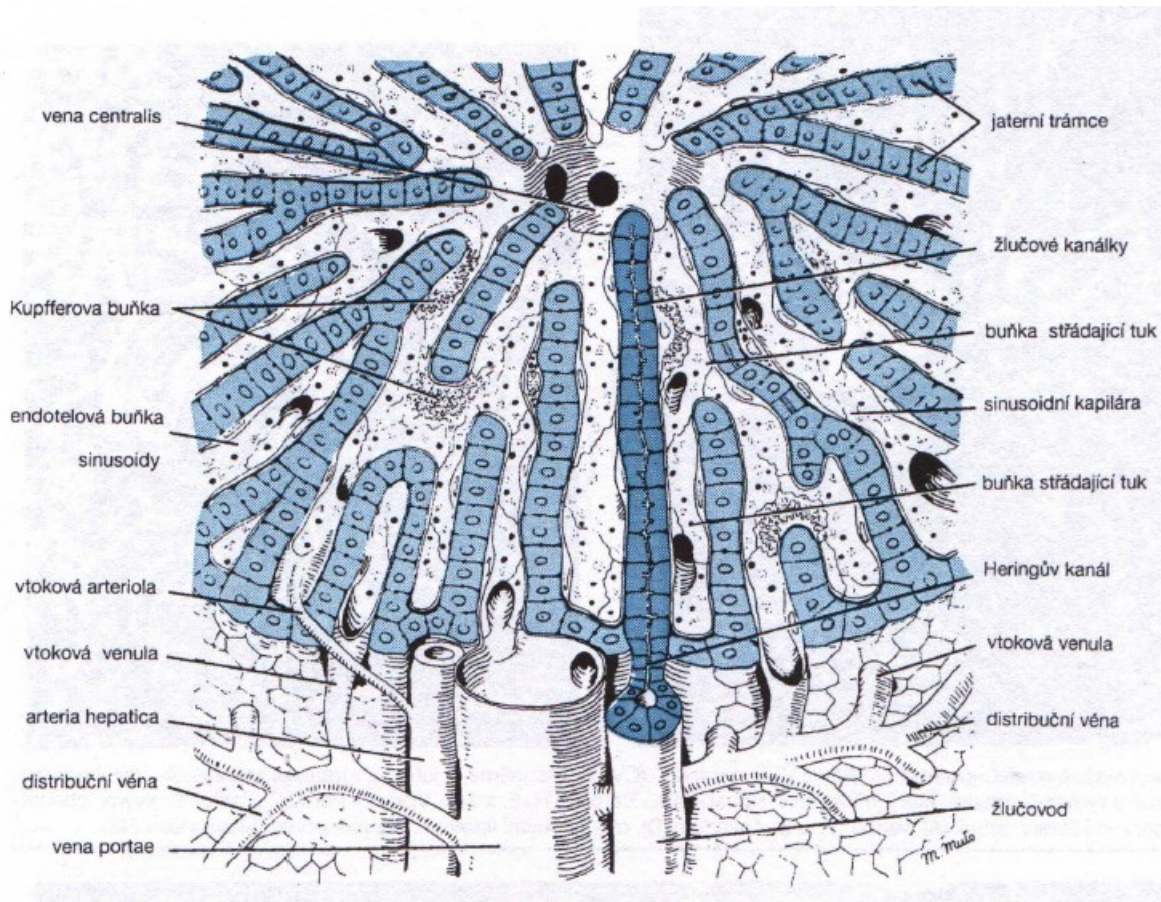
Obrázek 2 Jaterní lalůčky s portobiliárními prostory a jaterním acinem. Převzato a upraveno z: (Junqueira a kol., 1997)

Jaterní acinus (červené ohraničení), centrální véna (CV), portobiliární prostor (PS), portální lalůček (žluté ohraničení)

5.1.4 Žlučové cesty

Žluč je žlutohnědá tekutina obsahující vodu, žlučové kyseliny, cholesterol a další látky. Je produkována hepatocyty a její hlavní význam spočívá v emulgaci tuků. Během jednoho dne je játry vyprodukováno přes 0,5 litru žluči. Ta je skladována ve žlučníku a do tenkého střeva se dostává po příjmu potravy. Žluč je odváděna žlučovými kanálky nacházejícími se mezi hepatocyty uvnitř trámce (Obrázek 3). Žlučové kanálky vytváří složitou síť směřující do intralobulárních Heringových kanálků (*ductuli biliferi*), odkud se dostávají do interlobulárních žlučvodů portobiliárního prostoru (*ductus bilifer interlobularis*), tedy opačným směrem než krev. Heringovy kanálky jsou vystlány jednovrstevným kubickým epitelem, interlobulární žlučovody jsou vystlány epitelem kubickým nebo cylindrickým.

Žlučovody postupně sílí a nakonec ústí do pravého a levého jaterního vývodu (*ductus hepaticus dexter et sinister*). Extrahepatálně se spojují ve společný jaterní vývod (*ductus hepaticus communis*), ke kterému se poté připojí vývod žlučníku (*ductus cysticus*) a společně vytváří hlavní žlučový vývod (*ductus choledochus*). Ten se na závěr spojuje s *ductus pancreaticus*. (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš & Žák, 2007) (Junqueira a kol., 1997)



Obrázek 3 Trojrozměrný nákres lalůčku. Převzato z: (Junqueira a kol., 1997)

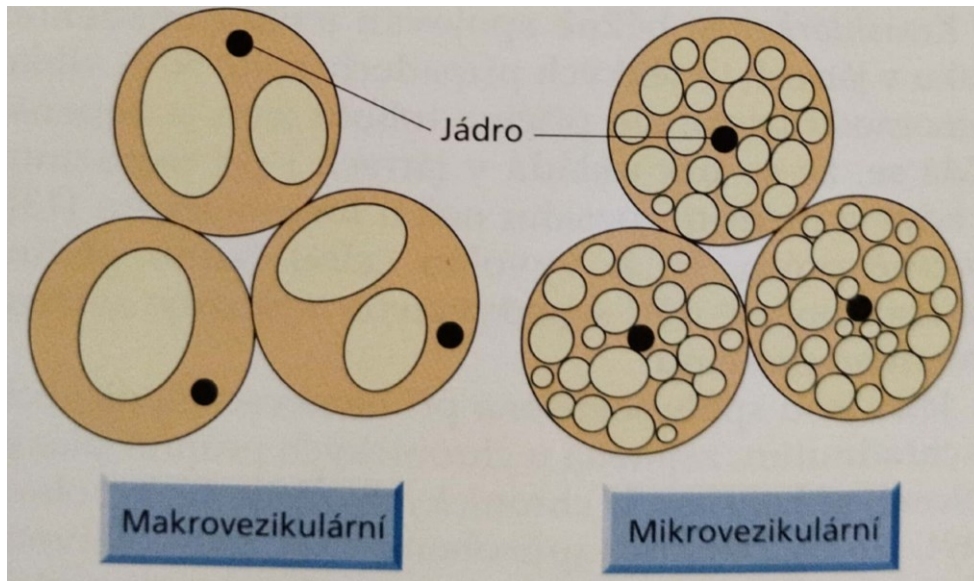
5.2 Steatóza jater

Jaterní steatóza, neboli ztukovatění jater, je metabolická porucha charakterizovaná nadměrným hromaděním tuků, zejména triacylglycerolů, v játrech. Množství tukových kapének v játrech postižených steatózou stoupá z 5 % suché hmotnosti na 10-15 %. Důležité je rozlišení, zda je steatóza zapříčiněna nadměrnou konzumací alkoholu, či nikoli. V prvním případě je steatóza brána jako součást alkoholické choroby jater. Steatóza jater bývá první fází nealkoholické steatohepatitidy (NASH), která může přejít v jaterní cirhózu. Ta představuje závěrečnou ireverzibilní fázi nealkoholického ztukovatění jater (NAFLD). (Brodanová, 1993) (Lukáš & Žák, 2007) (Zavoral & Venerová, 2007) (Karanjia a kol., 2016)

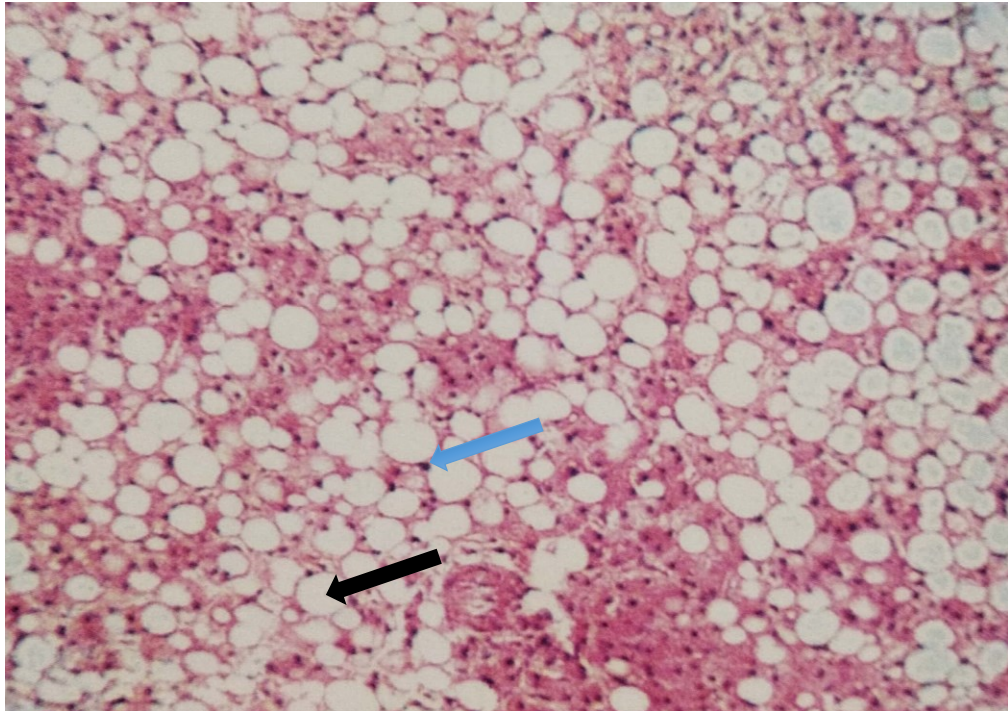
5.2.1 Histologický nález

Z mikroskopického hlediska dělíme steatózu na velkokapénkovou (makrovezikulární) a malokapénkovou (mikrovezikulární) (Obrázek 4). Velkokapénková se projevuje hepatocyty s velkými tukovými vakuolami, kdy jádro buněk je lokalizováno na periferii. Zpočátku se tuk hromadí ve formě kapiček, které postupně splývají a vytváří rozsáhlou tukovou vakuolu (Obrázek 5). U malokapénkové steatózy se tuk nachází v četných malých tukových vakuolách (Obrázek 6). Při postižení 25 % hepatocytů mluvíme o lehké steatóze, těžká nastává při poškození 75 % jaterní tkáně. (Brodanová, 1993) (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš & Žák, 2007) (Sherlock & Dooley, 2004)

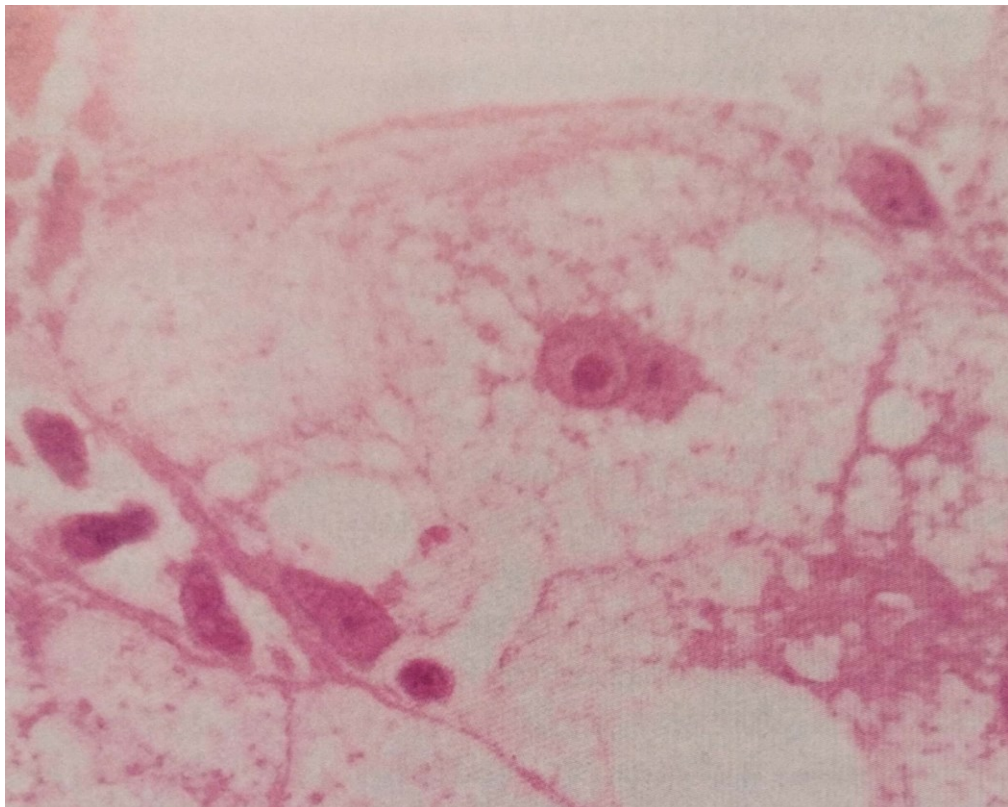
„Vlivem nadměrného hromadění tuku v hepatocytu může docházet k protržení buněčných membrán a k vytvoření tukových cyst.“ (Brodanová, 1993) Dále mohou být nahromaděným tukem stlačovány sinusoidy, čímž dochází ke zhoršenému zásobení tkáně kyslíkem a negativně je ovlivňován metabolismus látek. Rovněž může nastat nekrotizace jaterních buněk. Všechny tyto pochody mohou vést k rozvoji jaterní léze nebo intrahepatální cholestáze. (Brodanová, 1993) (Lukáš & Žák, 2007)



Obrázek 4 Makro- a mikrovezikulární steatóza. Převzato z: (Sherlock & Dooley, 2004)



Obrázek 5 Makrovezikulární steatóza. Převzato a upraveno z: (Sherlock & Dooley, 2004)
Tuková vakuola (černá šipka), jádro vytlačené na periferii buňky (modrá šipka)



Obrázek 6 Mikrovezikulární steatóza. Převzato z: (Sherlock & Dooley, 2004)

5.2.2 Etiologie

Steatóza bývá způsobena poruchou metabolismu tuků v důsledku poruchy hepatocytu, nebo nadměrným přísunem tuků, sacharidů nebo mastných kyselin. Riziková je také nadměrná konzumace alkoholu. Přísun těchto látek převyšuje sekreční schopnost hepatocytu pro lipidy.

Mezi nejčastější příčiny vzniku steatózy patří:

1. Zvýšený přísun mastných kyselin a tuku v potravě
2. Zvýšená mitochondriální syntéza mastných kyselin nebo snížená oxidace (vede ke zvýšené tvorbě triacylglycerolů)
3. Porušený výdej triacylglycerolů z hepatocytu
4. Nadbytečné sacharidy (přeměněna na mastné kyseliny)
(Sherlock & Dooley, 2004)

Příčiny velkokapénkové a malokapénkové steatózy se liší. Makrovezikulární steatóza je podmíněna vrozenými nebo získanými metabolickými poruchami, případně infekcemi, léky nebo toxiny:

- alkohol (až 90 % alkoholiků trpí velkokapénkovou steatózou)
- obezita
- diabetes mellitus II. typu
- hladovění, kachexie
- parenterální výživa
- nemoci pankreatu a GIT (gastrointestinálního traktu)
- galaktosemie
- Wilsonova choroba
- Infekce HCV (virová hepatitida C)
- Estrogeny, kortikosteroidy
- Amiodaron, metotrexát, tetrachlormethan
- Abetalipoproteinémie, hyperlipoproteinémie

(Hůlek & Urbánek, 2018) (Sherlock & Dooley, 2004) (Karanjia a kol., 2016)

Příčiny malokapénkové steatózy:

- a) akutní těhotenská jaterní steatóza
- b) toxicita léků- např. tetracyklin, salicyláty, antikonvulziva
- c) Reyeův syndrom

(Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš & Žák, 2007)

V civilizovaných zemích je rostoucí výskyt nealkoholické jaterní steatózy spojován především s přejídáním se, špatnou životosprávou, a obezitou. Nealkoholická steatóza se také velmi často vyskytuje ve spojení s metabolickým syndromem nebo inzulinovou rezistencí. Provázání mezi metabolickým syndromem a jaterní steatózou dokládá i fakt, že 40 % mužů a 26 % žen s metabolickým syndromem má současně diagnostikovanou jaterní steatózu. Inzulinová rezistence způsobuje v tukové tkáni lipolýzu, dochází k uvolnění mastných kyselin a jejich zvýšenému vstupu do jater. Zároveň omezuje tvorbu glykogenu, zvyšuje glukoneogenezi a inhibuje beta – oxidaci mastných kyselin, čímž je stimulována syntéza triacylglycerolů. Přítomnost většího množství volných mastných kyselin způsobuje apoptózu buněk a způsobuje postupnou fibrotizaci a zánětlivý proces hepatocytů. Zvýšená hladina inzulinu aktivuje SREBP (sterol regulatory element binding protein I) zvyšující lipogenezi. Ve steatózou postižených buňkách je také porušena syntéza apolipoproteinu C3, syntéza VLDL a vylučování lipidů z hepatocytů.

Rovněž byla nalezena spojitost mezi výskytem steatózy a NAFLD a genetickými abnormalitami. (Hůlek & Urbánek, 2018)

Naopak v chudých, přelidněných zemích je steatóza nejčastěji způsobena malnutricí, například bílkovinnou. Typickým onemocněním z podvýživy a nedostatku proteinů je kwashiorkor vyskytující se u podvyživených dětí. S rostoucím věkem onemocnění ustupuje a do cirhózy nepřechází.

V civilizovaných státech je steatóza z podvýživy nejčastěji způsobena malabsorpcí, vážnými chorobami GIT nebo parenterální výživou. (Brodanová, 1993) (Hůlek & Urbánek, 2018)

5.2.3 Diagnostika

Steatóza může probíhat asymptomaticky, případně se objevují nespecifické příznaky a nejčastěji souvisí se zvětšením jater, která současně získají tužší strukturu. Důležité vyšetření pro stanovení správné diagnózy představuje jaterní biopsie v kombinaci s CT (výpočetní tomografií), sonografií, případně magnetickou rezonancí, která slouží jako nejlepší metoda pro zjištění obsahu tuku v játrech.

Mezi možné příznaky patří bolest v pravém podžebří, nebo tlak v nadbříšku. Dále mohou pacienti pozorovat potíže s trávením a vylučováním, hubnutí, nechutenství nebo zvracení. Objektivním a hlavním průkazným nálezem je hepatomegalie, játra jsou nejen zvětšena, ale také získávají bílou barvu. Z laboratorního nálezu lze zjistit zvýšené

hodnoty alaninaminotransferázy (ALT), aspartátaminotransferázy (AST), alkalické fosfatázy (ALP) a gama-glutamyltransferázy (γ -GT). (Brodanová, 1993) (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš, 2005) (Sherlock & Dooley, 2004) (Idilman a kol., 2016)

Pacienti s nově pozitivním nálezem steatózy by měli podstoupit vyšetření k vyloučení všech projevů metabolického syndromu. Také by u nich měly být vyloučeny a případně léčeny jiné možné příčiny steatózy – Wilsonova choroba, HCV a další. Lidé s abnormálními hodnotami jaterních testů, diabetem mellitem II. typu, metabolickým syndromem a dalšími rizikovými faktory by měli podstupovat vyšetření k vyloučení NAFLD. Již diagnostikovaní pacienti se steatózou, NASH nebo fibrózou by měli být pravidelně přetestováni kvůli vysokému riziku rozvoje fibrózy. (Hůlek & Urbánek, 2018)

5.2.4 Léčba

Lidé s jaterní steatózou, případně jejím rozvojem v NASH nebo NAFLD, vykazují zvýšenou nutnost režimových a dietních opatření a také včasné léčby. Rizikové je spojení jaterního onemocnění s metabolickým syndromem, obezitou a inzulinovou rezistencí. V tomto případě je pro pacienty podstatný úbytek hmotnosti, přeměna tuku na svalovou hmotu fyzickou aktivitou a také změna životosprávy. Snížení tělesného tuku vede ke snížení inzulinové rezistence a poškození hepatocytů. Dojde k ústupu nekrózy, fibrózy a zánětlivých změn.

Farmakologická léčba NASH nebo NAFLD je v současné době velmi omezená a zahrnuje pouze malou skupinu léčiv.

Pacienti, u kterých se nedaří zpomalit progresi onemocnění režimovými opatřeními nebo farmakologickou léčbou mohou za určitých podmínek podstoupit bariatrickou operaci, v krajním případě transplantaci jater. (Hůlek & Urbánek, 2018)

5.3 Zvířecí modely pro indukci steatózy

Využívání experimentálních zvířat k biologickému výzkumu a vývoji je nezbytnou součástí zachování spolehlivosti a přesnosti všech prováděných experimentů před klinickým testováním na lidech. V posledních desetiletích je snaha o nalezení šetrnější a výhodnější alternativy zvířecích modelů, která by mohla vést k redukci počtu používaných zvířat.

Experimenty s laboratorními zvířaty mohou být prováděny pouze ve specializovaných akreditovaných laboratořích. Celosvětově jsou stanoveny podmínky, za kterých jsou experimentální zvířata chována tak, aby byly vyloučeny cirkunální vlivy. Prostory jsou klimatizovány na regulovanou teplotu i vlhkost a je nastaven režim 12 hodin světlo, 12 hodin tma. Zvířata mají přístup k potravě a pitné vodě dle libosti, pokud není požadováno jinak. (Beránek & Tichý, 2013) (Starokozhko a kol., 2015)

Základem práce s experimentálními zvířaty je dodržování pravidla 3R - replacement (nahrazení), reduction (omezení) a refinement (zjemnění).

Nahrazení dělíme na úplné a částečné. Úplné představuje kompletní náhradu zvířecích modelů lidskými dobrovolníky, matematickými a počítačovými modely, *in vitro* modely nebo buněčnými liniemi. Částečná náhrada zahrnuje používání takových zvířecích druhů, která podle vědeckých teorií nejsou schopna prožívat utrpení. Řadíme mezi ně drozofily, hlístice nebo nevypělé formy obratlovců. Také se do částečné náhrady počítá usmrcení zvířat za účelem odebrání buněk a tkání a jejich testování *in vitro*, tím se zamezí usmrcení zvířat vlivem výzkumu na nich prováděném.

Omezení počtu zvířat používaných během výzkumu vyžaduje důkladné naplánování a analyzování studie. Vhodné je mimo jiné používání takových metod, které dokáží zjistit maximum informací z každého zvířete tak, aby nebylo potřeba použít další zvíře k získání dalšího potřebného údaje. Je tedy třeba najít rovnováhu mezi množstvím použitých zvířat, mírou jejich utrpení a zároveň dostatečnou interpretací výsledků výzkumu.

Zjemnění zahrnuje minimalizování utrpení, strachu a bolesti zvířat nejen během výzkumu, ale i před a po něm. Mezi takové postupy patří anestezie, analgetika a použití takových metod, které jsou pro zvířata nejšetrnější. Snížení utrpení, stresu a bolesti zvířat má pozitivní vliv na chování, fyziologii a imunitu zvířat. (National Center for Replacement, n.d.) (MacArthur Clark, 2018)

5.4 PCLS

PCLS (Precision Cut Liver Slices) neboli ultratenké jaterní řezy přináší mnoho výhod při přípravě histologických řezů v oblasti hepatologie a farmakologie. Zvířata, jejichž tkáň je použita k experimentům *ex vivo*, nemusí podstupovat žádnou speciální dietu a také množství zvířat potřebných pro experiment se značně snižuje, což napomáhá etické i finanční stránce výzkumu. Na druhou stranu je jasné, že *ex vivo* pokusy nikdy plně nenahradí pokusy *in vivo*. (Beránek & Tichý, 2013) (Starokozhko a kol., 2015)

Omezení v používání PCLS spočívá v jejich krátké životaschopnosti. U řezů inkubovaných déle než 48 hodin dochází k nekrotizaci a poklesu metabolické aktivity, zároveň je přítomné jaterní poškození a smrt buněk způsobené krájením řezů. To vyvolá odpověď tkáně, především Itových buněk, které se přemění na aktivované buňky podobné myofibroblastům a dochází tak k fibrotizaci tkáně. Přestože se některým laboratořím podařilo udržet životaschopnost řezů po dobu delší než 72 hodin, jsou k dispozici jen omezené údaje o udržení morfologie buněk v těchto řezech. (Starokozhko a kol., 2015)

Mezi faktory ovlivňující životnost tkáně a morfologii buněk patří například teplota, koncentrace kyslíku, složení inkubačního média nebo pH. (Starokozhko a kol., 2015) (Dewyse a kol., 2021)

6. Praktická část

6.1 Histologické zpracování

PCLS byly zhotoveny na Katedře biochemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Myší játra byla nakrájena na PCLS na tkáňovém kráječi Krumdieck Tissue Slicer MD4000 (Alabama Research and Development). Poté byly PCLS pro kontrolní skupinu bez inkubace vloženy hned do fixačního roztoku. Další řezy byly inkubovány ve Williamsově médiu s přídavkem glukózy a gentamycinu v inkubátoru na třepačce při 90 rpm a syceny 85 % O₂, 5 % CO₂, s teplotou 37 °C po dobu 36 hodin a poté fixovány ve fixačním roztoku. Další skupina řezů byla inkubována 36 hodin v základním steatotickém médiu s obsahem kyseliny olejové, palmitové, fruktózy, citrátu a inzulinu (MK + F + C + i) nebo s přídavkem xantohumolu (XH), resp. 6-prenylnaringenin (6-PN). Po inkubaci byly řezy přeneseny do fixačního roztoku.

Precizní ultratenké jaterní řezy byly 24-48 hodin fixovány ve 4% roztoku paraformaldehydu. Po fixaci, následném odvodnění a prosycení byly tkáně zality do parafínu a na mikrotomu nakrájeny na řezy o tloušťce 4,5 µm a barveny základní histologickou barvicí technikou hematoxylin-eozin.

Další jaterní řezy z kontrolní skupiny bez inkubace, s inkubací 36 hodin v základním Williamsově médiu s přídavkem glukózy a gentamycinu a základním steatotickém médiu (MK + F + C + i) byly po fixaci ve 4% paraformaldehydu prosyceny v kryoprotektivním médiu TissueTek O.C.T. (Leica Biosystems) a zamraženy v tekutém dusíku. Bločky byly nakrájeny na kryostatu na řezy o tloušťce 10 µm, které byly obarveny olejovou červení pro znázornění tuků.

6.2 Použité barvicí metody

6.2.1 Hematoxylin-Eozin

Barvení hematoxylin-eozinem patří mezi základní histologická barvení umožňující rozlišení jednotlivých intra- a extracelulárních struktur, typů tkání a morfologických změn. V nebarveném preparátu nelze jednotlivé části tkáně odlišit. Během barvení vážou jednotlivé struktury různá barviva a získávají tak specifickou barvu. Tmavě modro-fialově zbarvený hematoxylin barví nukleové kyseliny, zatímco růžový eozin barví nespecificky proteiny. Buněčná jádra a chrupavky získávají modrou barvu, zatímco cytoplazma a extracelulární matrix mají různý stupeň růžového zbarvení. Golgiho aparát je rozeznatelný absencí zbarvení v oblasti kolem jádra. Svaly se barví červeně, kolagenní vazivo je růžové. Výsledek barvení závisí na správném provedení celého procesu barvení a jakákoli chyba v průběhu může znehodnotit výsledky.

Použité barvivo eozin je 1% roztok eozinu v destilované vodě, barvivo hematoxylin Gill je složen ze 4g hematoxylinu, 0,4g jodičnanu sodného, 35,2g síranu hlinitého, 710ml destilované vody, 250ml ethylenglykolu a 40ml kyseliny octové.

Po nakrájení řezů musí být tkáň zbavena parafínu nejprve 3x po 5 minutách xylenem, který je následován sestupnou alkoholovou řadou nejprve po 5 minutách 96% a poté 70% ethanolem, a nakonec jsou řezy namočeny na 5 minut do destilované vody.

Samotné barvení probíhá následovně: nejprve je preparát vložen na 6-8 minut do hematoxylinu, poté je modřen asi 10 minut v pramenité vodě, následuje 2minutové obarvení eozinem a opláchnutí destilovanou vodou.

Krokem následujícím po barvení je odvodnění, nejprve 2x opláchnutí 96% ethanolem a poté směsí ethanolu a xylenu, nejprve v poměru 2:1, poté v poměru 1:2.

Preparáty jsou nakonec projasněny 3x po 3 minutách v xylenu a montovány krycím sklíčkem pomocí montovacího média Eukitt.

6.2.2 Olejová červeň

Olejová červeň slouží jako barvivo k důkazu lipidů ve vzorku tkáně.

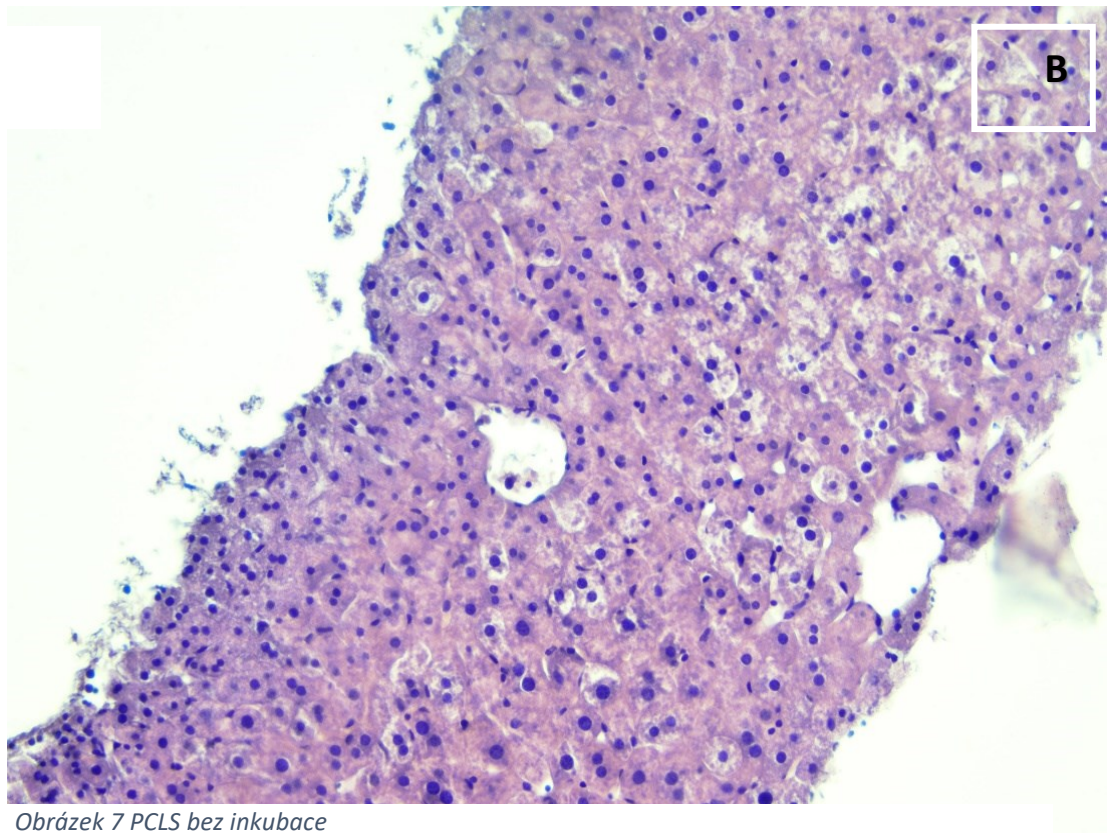
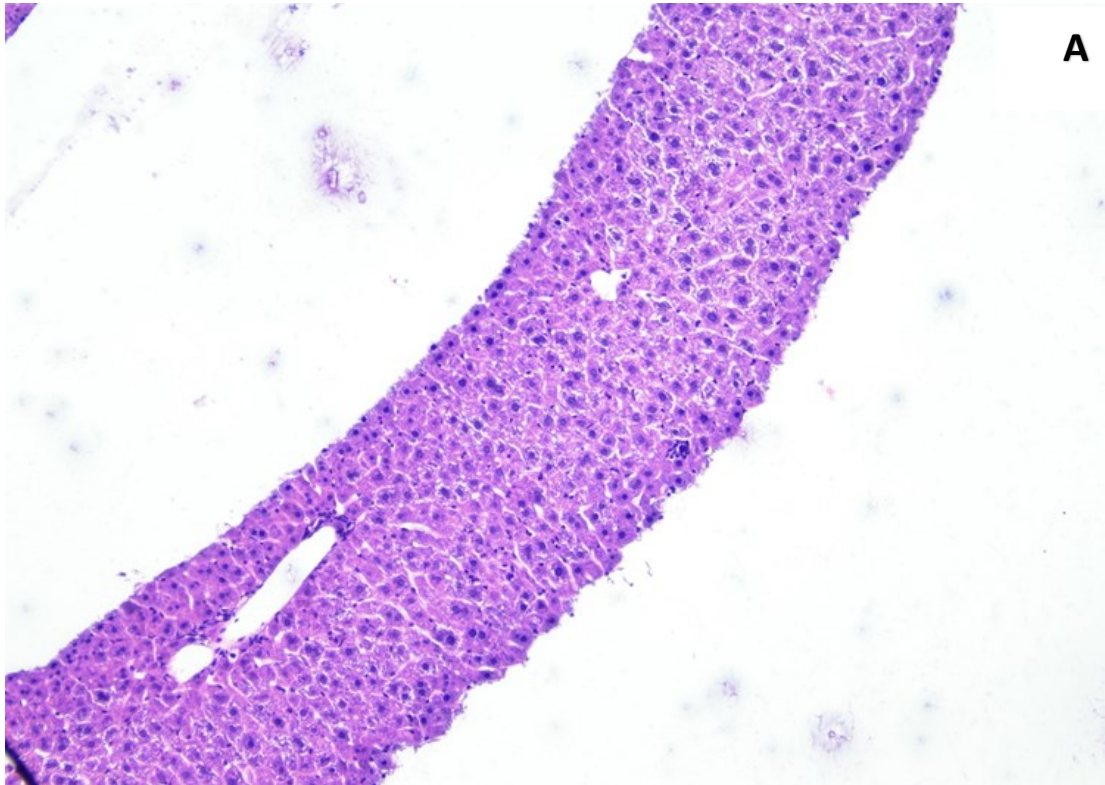
Mateřský roztok využívaný k barvení se skládá z 0,5g oil red/100ml isopropanolu. 60 ml takto připraveného roztoku je poté smícháno s 40 ml destilované vody, zfiltrováno a tím je vytvořen pracovní roztok.

Řezy zmrazené na -80°C se po vytažení nechají 20 minut osušit na vzduchu. Poté jsou řezy namočeny do destilované vody a na 10 minut ponořeny do barviva oil red O. Následuje oplach pramenitou vodou a na 10-15 sekund barvení naředěným hematoxylinem. Řezy jsou poté opláchnuty a ponořeny do pramenité vody a nakonec montovány do vodného média DABCO.

6.3 Výsledky

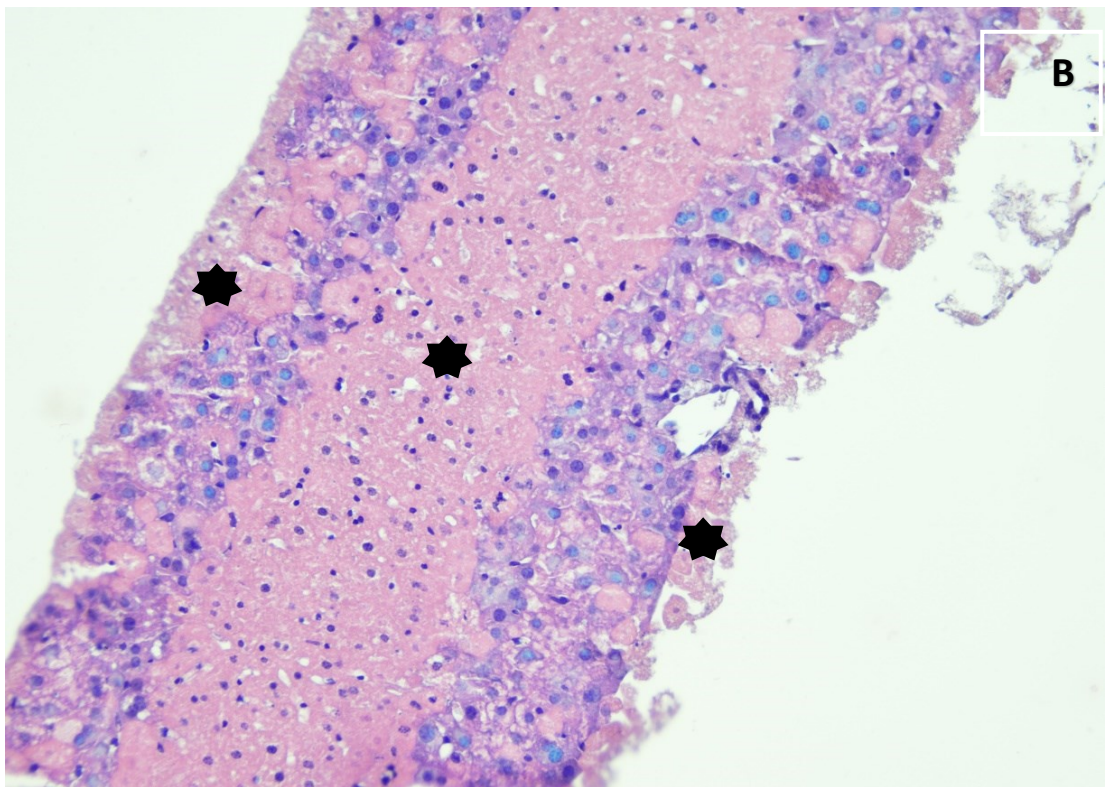
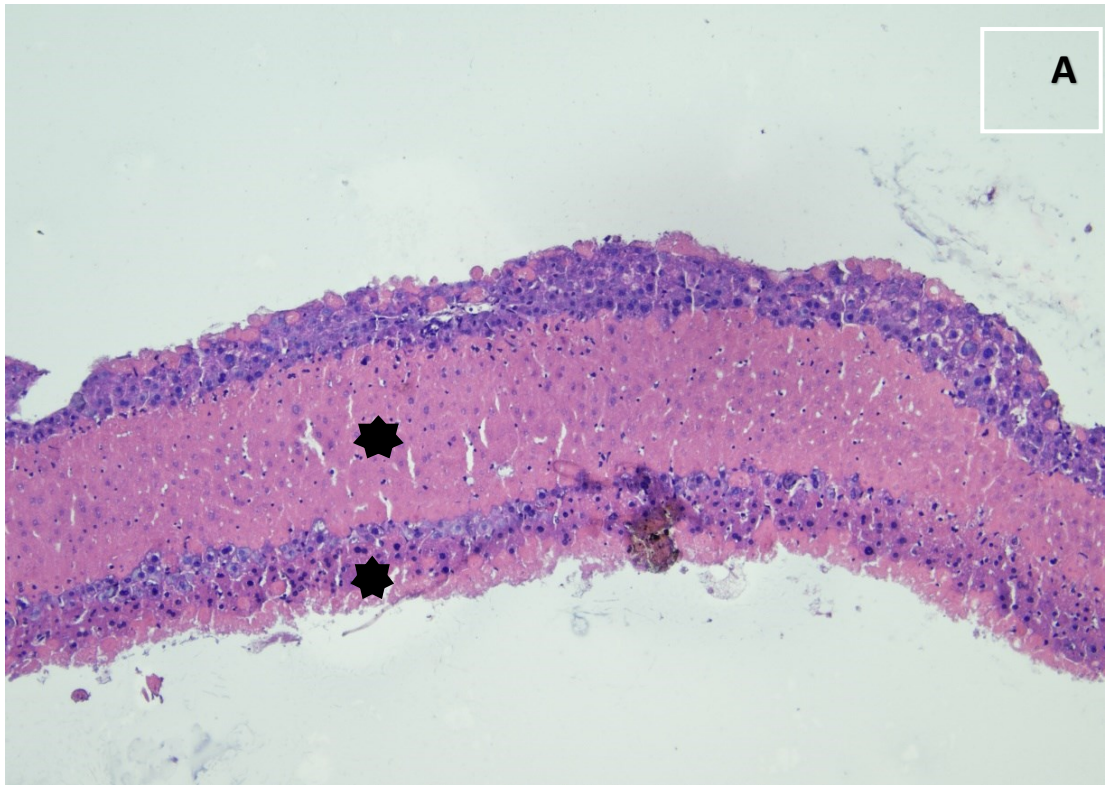
Po inkubaci PCLS v základním inkubačním médiu 36 hodin (Obrázek 8) je viditelná v centrální části řezů začínající nekróza charakterizovaná výraznou eozinofilií cytoplazmy, zmenšením jader a světlou karyoplazmou v porovnání s kontrolním časem 0 hodin (vzorky bez inkubace) (Obrázek 7). Řada nekrotických buněk se nachází rovněž na povrchu řezu. Na periférii řezů je v zachovalých hepatocytech viditelná přítomnost malých lipidových kapének v cytoplazmě, ale jen v malém rozsahu a objevuje se rovněž ballooning hepatocytů se zvětšenými buňkami, jsou přítomny „bílé obláčky“ glykogenu. Při inkubaci řezů v médiu MK + F + C + i (Obrázek 9) jsou opět pozorovatelné lipidové kapénky v hepatocytech ve stejném rozsahu jako při inkubaci v čistém médiu, typická steatóza není přítomna. Inkubace řezů v médiu s přidáním xantohumolu (Obrázek 10) a 6-prenylningenin (Obrázek 11) neměla vliv na množství lipidových kapének.

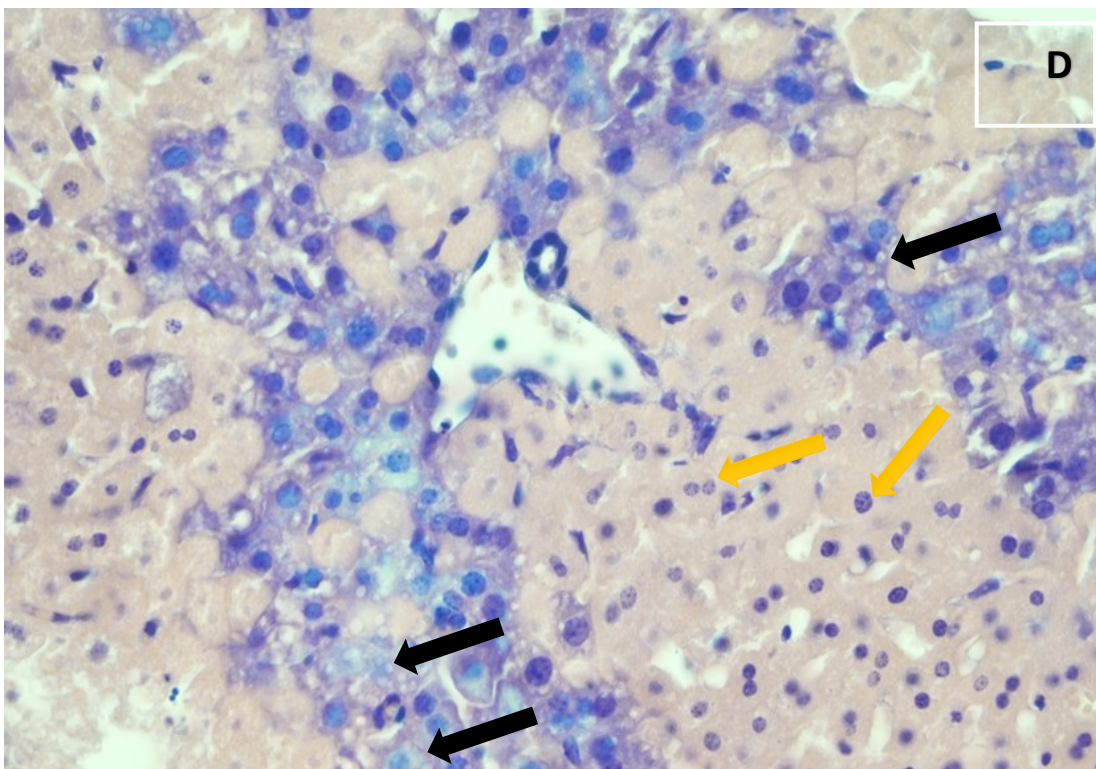
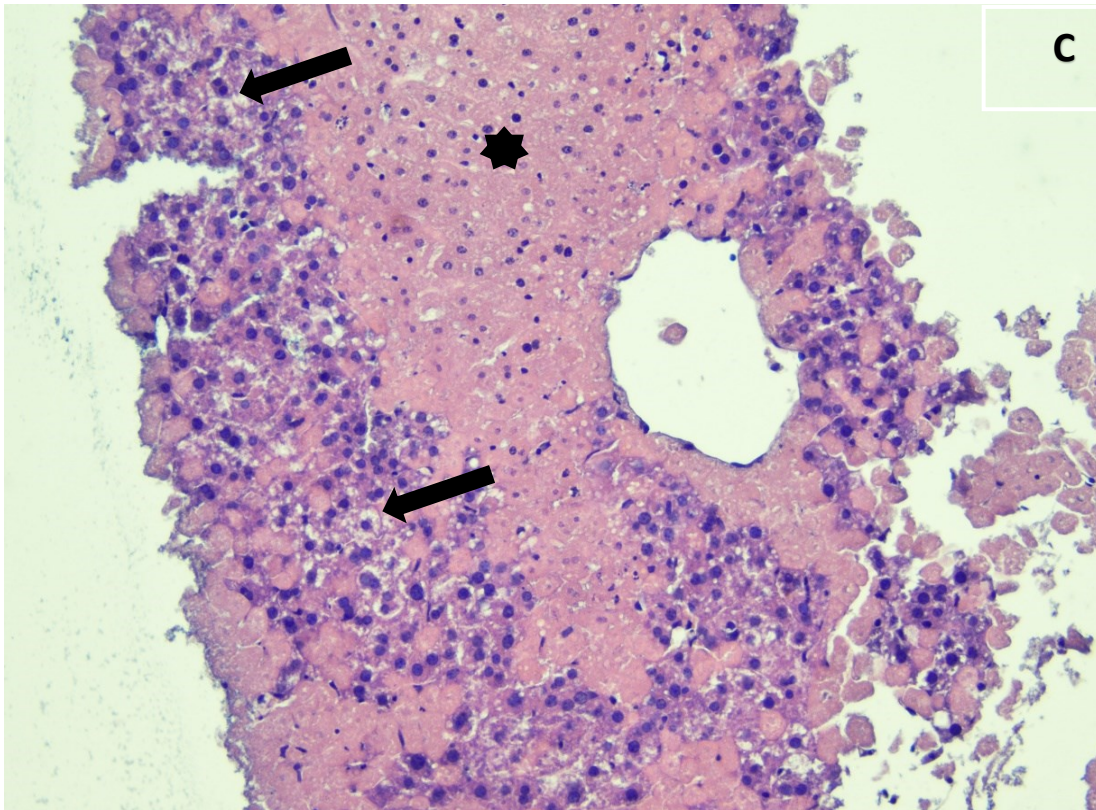
Pro přímé obarvení lipidů jsme použili olejovou červeň. V kontrolních řezech bez inkubace jsme nezaznamenali přítomnost lipidových kapének (Obrázek 12A), avšak po inkubaci 36 hodin v základním médiu bez přídavku látek indukujících steatózu je viditelné malé množství červených tukových kapének v zachovalých hepatocytech (Obrázek 12B). Oblast nekrózy je nespecificky přibarvena jak v centrální části, tak na periférii řezů. Při porovnání s řezy po inkubaci 36 hodin v MK + F + C + i médiu byla reakce barvení stejná (Obrázek 12C).



Obrázek 7 PCLS bez inkubace

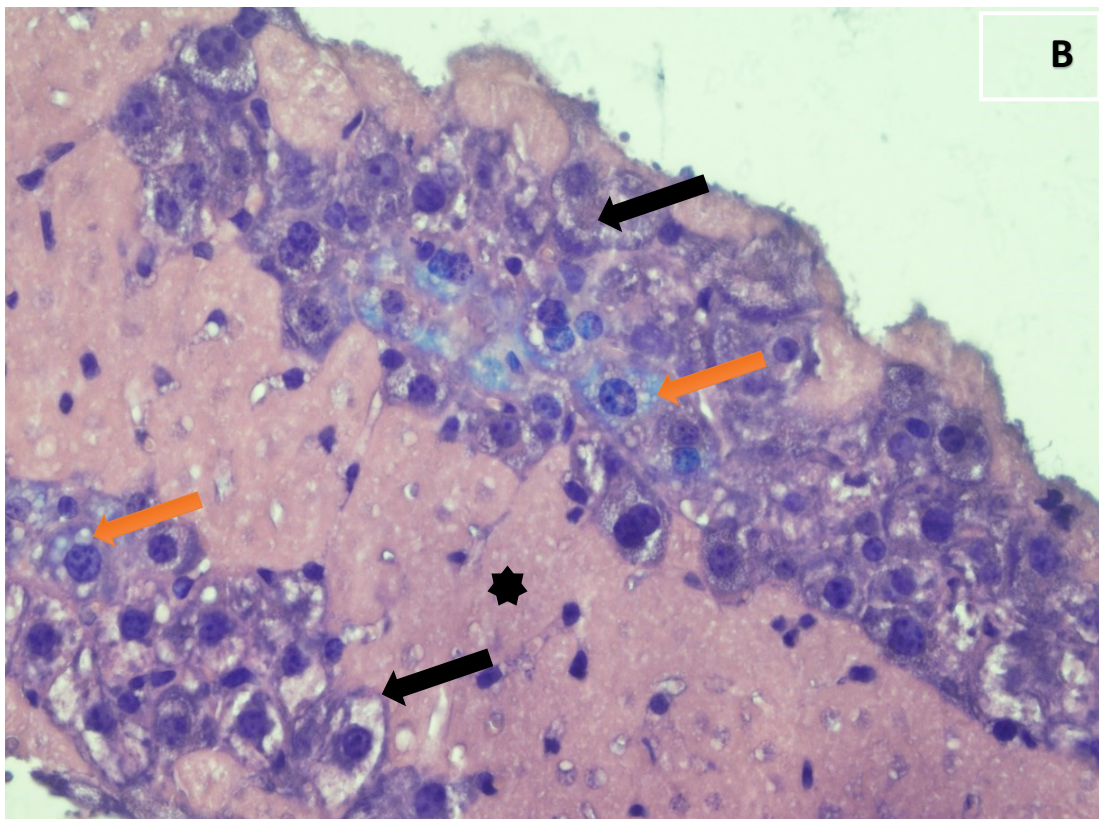
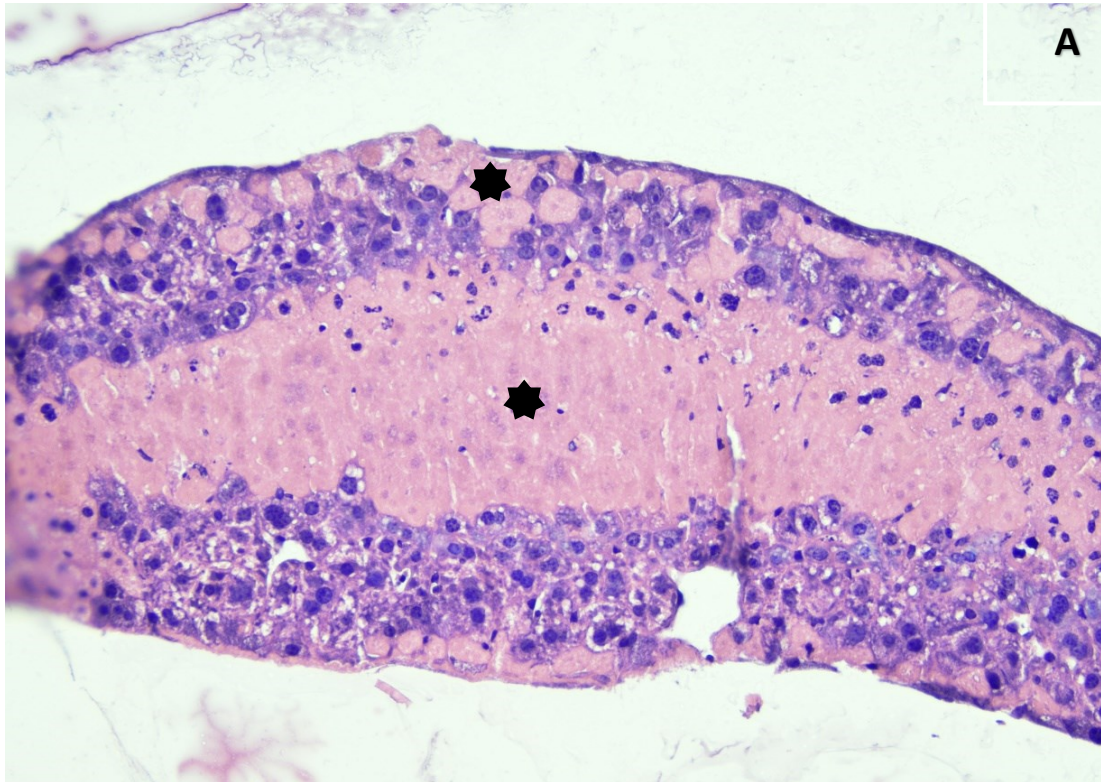
čas 0 hodin; barvení hematoxylin-eozin; zvětšení 100x (A), 200x (B)





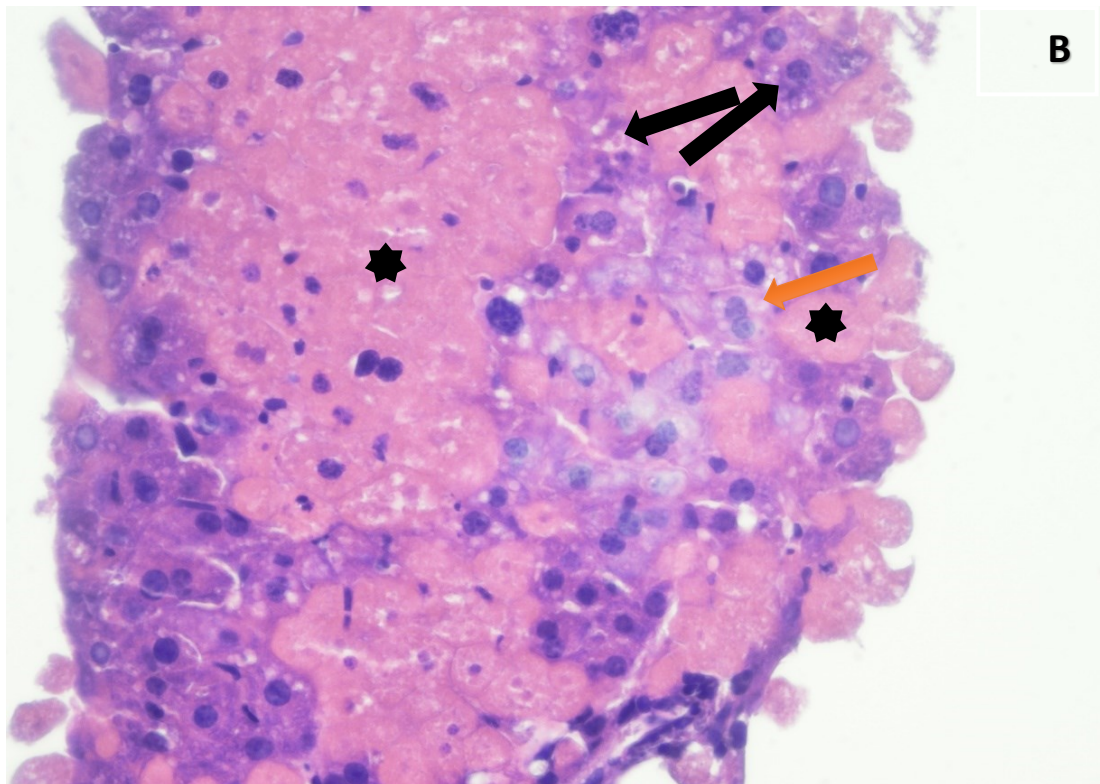
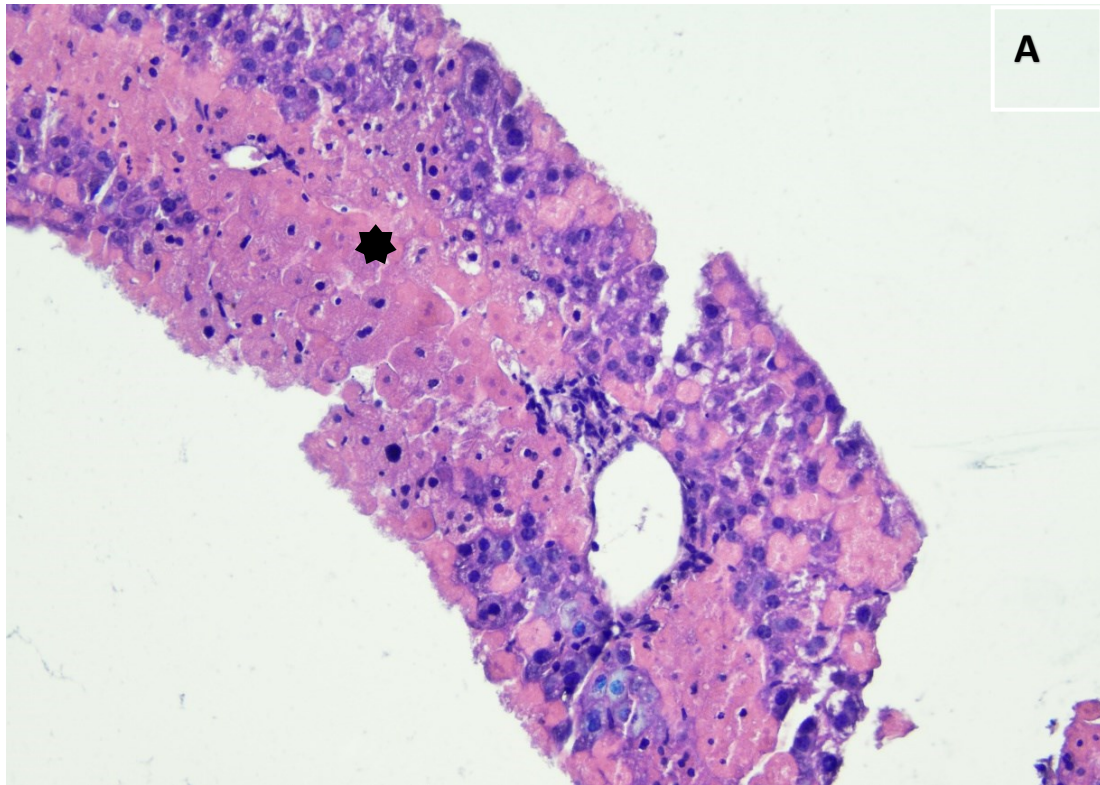
Obrázek 8 PCLS s inkubací v čase 36 hodin v čistém médiu

nekróza na povrchu řezů a v centrální části (*); ballooning hepatocytů (C, černá šipka), lipidové kapénky (D, černá šipka), karyorexe (žlutá šipka); zvětšení 100x (A), 200x (B, C), 400x (D)



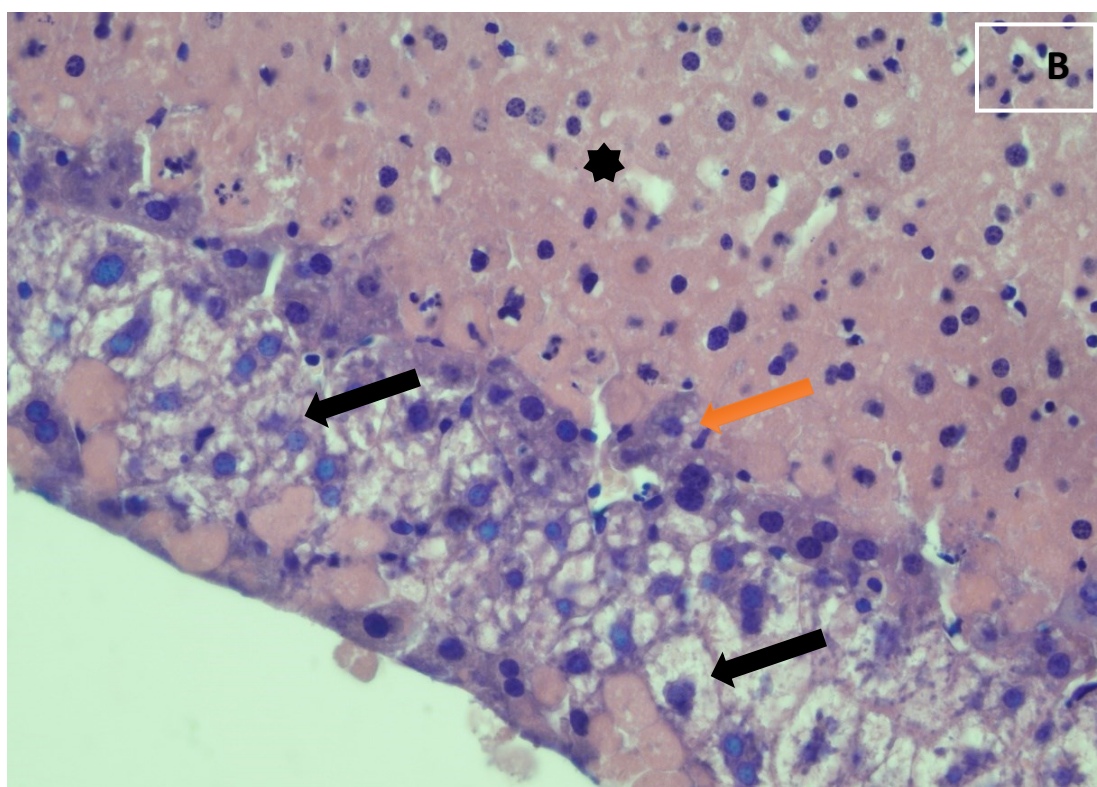
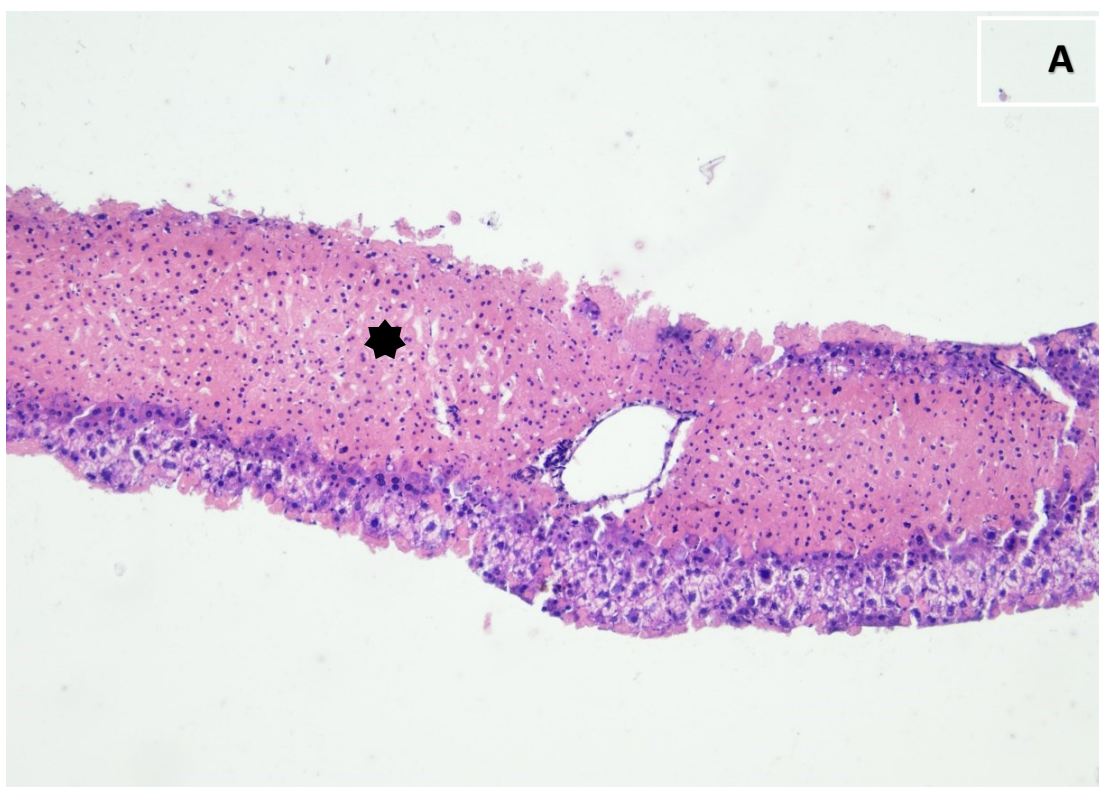
Obrázek 9 PCLS s inkubací v čase 36 hodin v steatotickém médiu (MK+ F+C+i)

nekróza na povrchu řezů a v centrální části (*); ballooning hepatocytů (černá šipka), lipidové kapénky (oranžová šipka); zvětšení 200x (A), 400x (B)



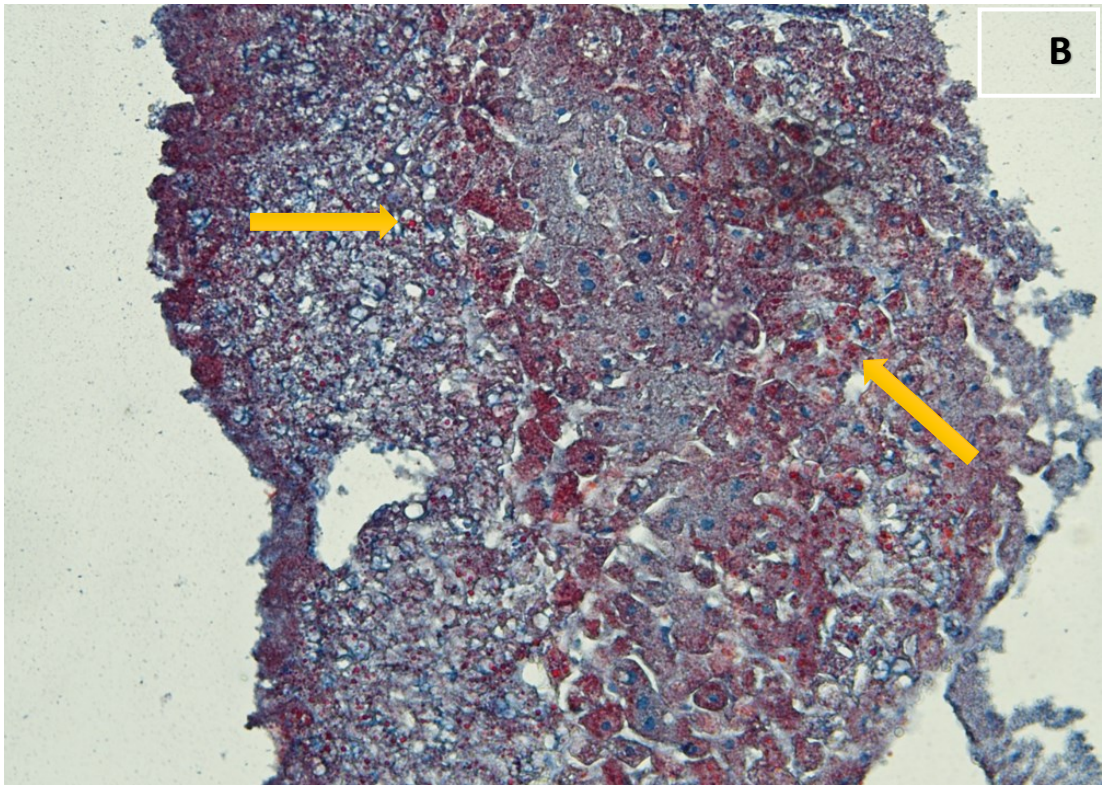
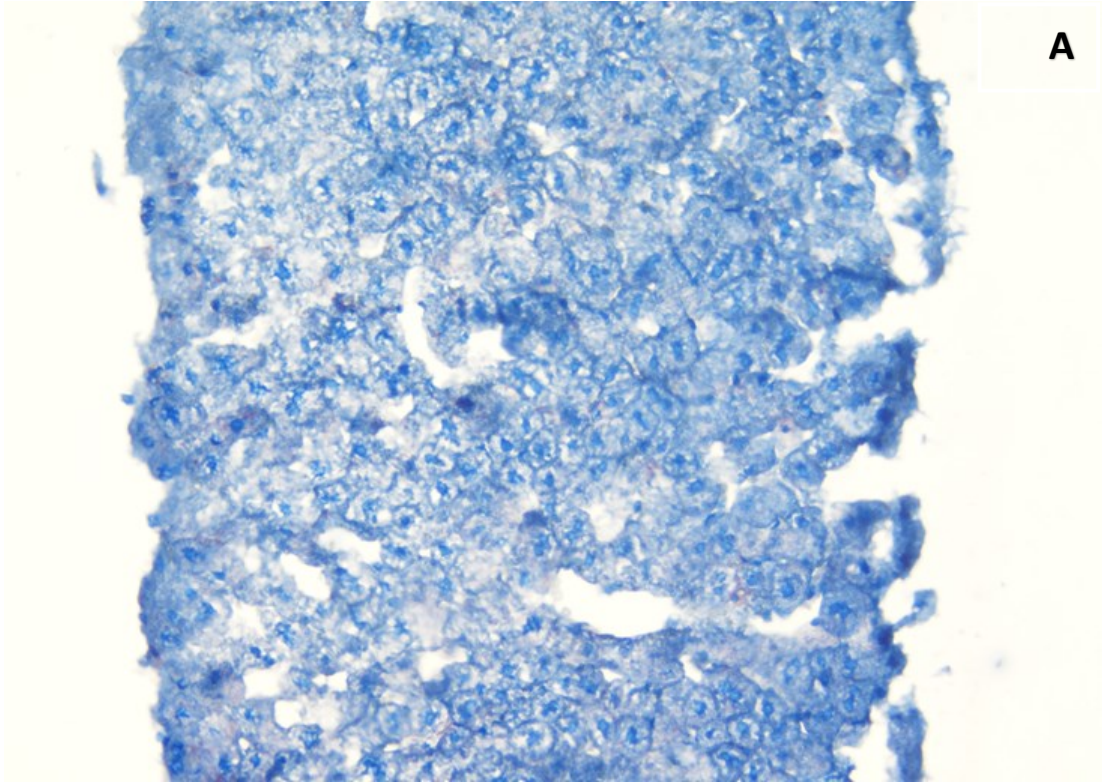
Obrázek 10 PCLS s inkubací v čase 36 hodin v steatotickém médiu (MK+ F+ C+i) s přidavkem xantohumolu (XH)

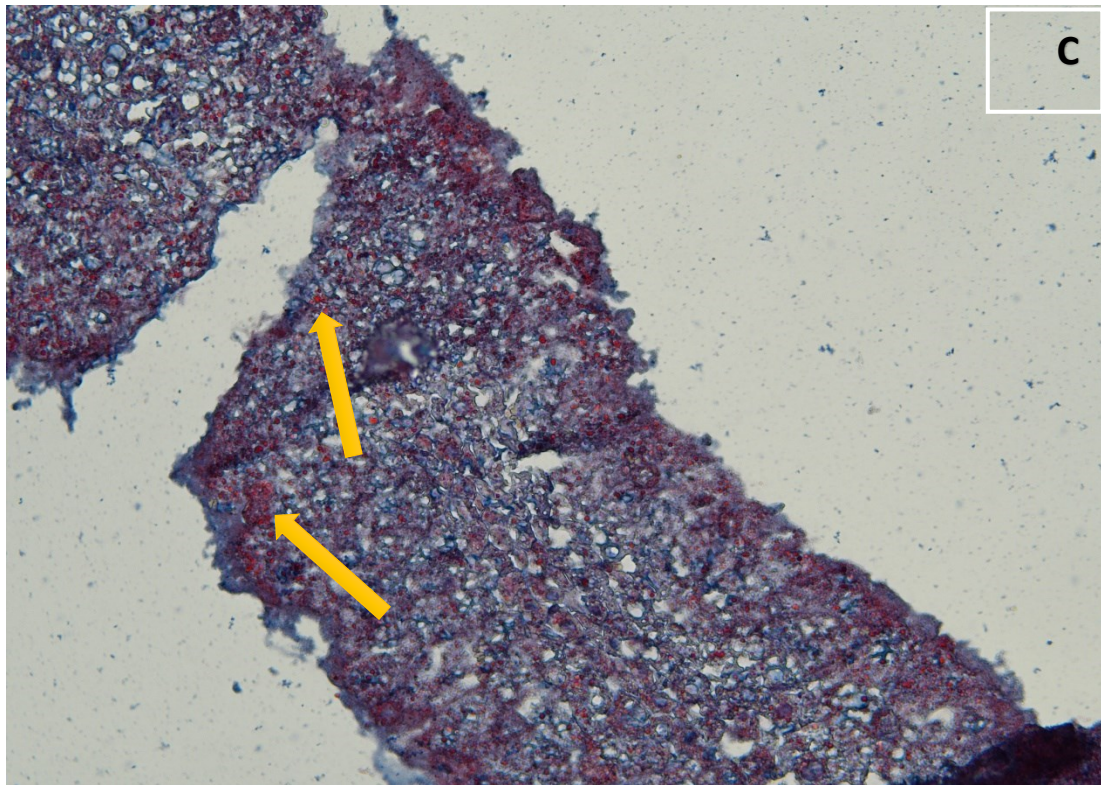
nekróza na povrchu řezů a v centrální části (*); ballooning hepatocytů (černá šipka), lipidové kapénky (oranžová šipka); zvětšení 200x (A), 400x (B)



Obrázek 11 PCLS s inkubací v čase 36 hodin v steatotickém médiu (MK+ F+ C+i) s přidavkem prenylnaringenin (6-PN)

nekróza na povrchu řezů a v centrální části (*); ballooning hepatocytů (černá šipka), lipidové kapénky (oranžová šipka); zvětšení 100x (A), 400x (B)





Obrázek 12 Olejová červeň

kontrolní řezy bez inkubace (A), řezy s inkubací 36 hodin v základním médiu (B), řezy s inkubací 36 hodin v MK + F + C + i médiu (C); lipidové kapénky (žlutá šipka); zvětšení 200x

6.4 Diskuze

Jaterní steatóza je metabolická porucha projevující se hromaděním množství lipidů v jaterní tkáni. Čistě ztukovatění jater může v případě zanedbání léčby přejít v rozvoj steatohepatitidy, fibrózy nebo cirhózy a dochází k nevratnému poškození jater. (Brodanová, 1993) (Lukáš & Žák, 2007) (Zavoral & Venerová, 2007) (Karanjia a kol., 2016) (Hůlek & Urbánek, 2018)

Rozlišujeme dva základní typy steatózy v závislosti na tom, zda mají spojitost s nadměrným příjmem alkoholu, či nikoli. Ve vyspělých státech světa se steatóza často objevuje ve spojení s obezitou, špatnou životosprávou nebo inzulinovou rezistencí. Naopak v rozvojových státech světa je výskyt steatózy spojován především s malnutricí. (Brodanová, 1993) (Lukáš & Žák, 2007) (Zavoral & Venerová, 2007) (Karanjia a kol., 2016) (Hůlek & Urbánek, 2018)

Velké riziko steatózy spočívá ve faktu, že nemá specifické příznaky, které by ji jednoznačně identifikovaly. V mnoha případech má asymptomatický průběh, nebo se může projevovat nespecificky bolestí či tlakem v břiše. Nejvhodnější metodou k diagnostice zůstává jaterní biopsie v kombinaci s dalšími vyšetřeními, včetně laboratorních. (Brodanová, 1993) (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš, 2005) (Sherlock & Dooley, 2004) (Idilman a kol., 2016)

Nejdůležitější prevencí je změna stravy a životního stylu, omezení konzumace alkoholu a dostatek pohybu. V případě selhání těchto opatření je za určitých podmínek dostupná farmakologická léčba, případně lze podstoupit chirurgický zákrok v podobě bariatrické operace nebo transplantaci jater. (Hůlek & Urbánek, 2018) (Lukáš, 2005)

Cílem pilotní studie bylo pozorování, zda dokážeme indukovat rozvoj steatózy v jaterní tkáni pomocí kombinace vybraných látek (mastné kyseliny, fruktóza, citrát, inzulin), které jsou popisovány ve vztahu s poruchou metabolismu tuků, případně zda přítomnost xantohumolu a 6-prenylaringeninů dokáže zmírnit tento proces. Vzhledem k rozvoji patologických změn při pouhé inkubaci v čistém médiu v čase 36 hodin není možné v tomto uspořádání experimentu sledovat účinek vybraných látek na jaterní tkáň.

Výsledky pilotní studie jsou nepříznivě ovlivněny přítomností nekrózy, navíc barvení tuků olejovou červení neprokázalo přítomnost většího množství lipidů

charakteristických pro steatózu po inkubaci v médiu obsahujícím látky s prosteatotickými vlastnostmi. V dalším pokračování experimentů bude pozornost věnována zejména vylepšení inkubačních podmínek pro zajištění morfologické stability a viability řezů.

6.5 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo využití znalostí z oblasti hepatologie a histologie k morfologické charakteristice rozvoje jaterní steatózy v ultratenkých jaterních řezech.

Na připravených jaterních řezech jsme chtěli sledovat rozvoj steatózy a případné ovlivnění flavonoidy xantohumolem a 6-prenylnaringeninem. Inkubace PCLS *ex vivo* však v pilotní studii vedla k rozvoji nekrózy hepatocytů, proto nebylo možné hodnotit působení jakýchkoliv látek na tyto řezy. Předpokládáme, že pokud se nám podaří zlepšit inkubační podmínky, aby byla zachována životnost buněk, tak by tento model mohl sloužit ke studiu různých patologických procesů *ex vivo*, a díky tomu by se mohly snížit počty experimentálních zvířat potřebných pro vědecké pokusy.

7. Seznam použitých zkratek

ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
C	citrát
CT	výpočetní tomografie
CV	centrální vena
F	fruktóza
GIT	gastrointestinální trakt
HCV	virová hepatitida C
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou
I	inzulin
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
MK	mastná kyselina
NASH	nealkoholická steatohepatitida
NAFLD	nealkoholické ztukovatění jater
PCLS	precizní ultratenké jaterní řezy
PS	portobiliární prostor
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou
XH	xantohumol
6-PN	6-prenylnaringenin
γ -GT	gama-glutamyltransferáza

8. Seznam obrázků

Obrázek 1 Anatomie jater.....	10
Obrázek 2 Jaterní lalůčky s portobiliárními prostory a jaterním acinem.	13
Obrázek 3 Trojrozměrný nákres lalůčku.	14
Obrázek 4 Makro- a mikrovezikulární steatóza.	16
Obrázek 5 Makrovezikulární steatóza.	17
Obrázek 6 Mikrovezikulární steatóza.	17
Obrázek 7 PCLS bez inkubace	27
Obrázek 8 PCLS s inkubací v čase 36 hodin v čistém médiu	29
Obrázek 9 PCLS s inkubací v čase 36 hodin v steatotickém médiu (MK+ F+C+i)	30
Obrázek 10 PCLS s inkubací v čase 36 hodin v steatotickém médiu (MK+ F+ C+i) s přídavkem xantohumolu (XH).....	31
Obrázek 11 PCLS s inkubací v čase 36 hodin v steatotickém médiu (MK+ F+ C+i) s přídavkem prenylnaringenin (6-PN)	32
Obrázek 12 Olejová červeň	34

9. Seznam literatury

ABDEL-MISIH, Sherif RZ; BLOOMSTON, Mark. Liver anatomy. *Surgical Clinics*, 2010, 90.4: 643-653.

BERÁNEK, Martin; TICHÝ, Miloš. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalytika*. Karolinum, 2013 (s. 55).

BRODANOVÁ, Marie; KORDAČ, Václav. *Klinická hepatologie*. Grada Avicenum, 1994 (s 11-17, 322-326).

DAY, Christina E. a kol. *Histopathology: Methods and protocols*. Humana Press, 2014.

DEWYSE, Liza; REYNAERT, Hendrik; VAN GRUNSVEN, Leo A. Best practices and progress in precision-cut liver slice cultures. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22.13: 7137.

FISCHER, Andrew H. a kol. Preparation of cells and tissues for fluorescence microscopy. *Basic Methods in Microscopy: Protocols and Concepts from Cells: A Laboratory Manual; Spectro, DL, Goldman, RD, Eds*, 2006.

HŮLEK, Petr a Petr URBÁNEK. *Hepatologie*. 3. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018 (s. 17-31, 350-356, 377-390).

IDILMAN, Ilkay S.; OZDENIZ, Ilknur; KARCAALTINCABA, Musturay. Hepatic steatosis: etiology, patterns, and quantification. In: *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. WB Saunders, 2016. p. 501-510.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa. José Carneiro a Robert O. Kelley. *Základy histologie*, 1997, 7 (s. 303-318).

KARANJIA, Rustam N. a kol. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. *World journal of gastroenterology*, 2016, 22.45: 9880.

KRISHNA, Murli. Microscopic anatomy of the liver. *Clinical liver disease*, 2013, 2.Suppl 1: S4.

LUKÁŠ, Karel. *Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry*. Grada Publishing as, 2005 (s. 141-142).

LUKÁŠ, Karel a Aleš ŽÁK. *Gastroenterologie a hepatologie: učebnice*. Praha: Grada, 2007 (s. 45-47, 179-181).

CLARK, Judy MacArthur. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal of Nutrition*, 2018, 120.s1: S1-S7.

MALARKEY, David E. a kol. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicologic pathology*, 2005, 33.1: 27-34.

National Center for Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research. *The 3Rs*. Dostupné z: <https://www.nc3rs.org.uk/who-we-are/3rs>

SHERLOCK, Sheila a James DOOLEY. *Nemoci jater a žlučových cest*. Hradec Králové: Olga Čermáková, 2004 (s. 1-17, 387, 390, 423-429).

STAROKOZHKO, Viktoriia a kol. Viability, function and morphological integrity of precision-cut liver slices during prolonged incubation: Effects of culture medium. *Toxicology in Vitro*, 2015, 30.1: 288-299.

TREFTS, Elijah, Maureen GANNON a David H. WASSERMAN. The liver. *Current Biology*, 2017, 27(21):R1147-R1151.

ZAVORAL, Miroslav; VENEROVÁ, Johana. *Gastroenterologie a hepatologie*. Triton, 2007 (s. 92-93).