

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Expresia glukózových transportérov v tkanivách metódou RT-qPCR u myšieho modelu MASH

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Bianka Šebeňová

Prehlásenie:

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní diplomovej práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry, a v práci riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 15.5.2024

Bianka Šebeňová

Pod'akovanie:

Týmto by som sa chcela veľmi poďakovať vedúcemu mojej práce, prof. PharmDr. Petrovi Pávkovi, Ph.D., za príležitosť pracovať pod jeho vedením, odborné rady a skvelý prístup.

Zároveň sa chcem srdečne poďakovať PharmDr. Alžbete Štefela, Ph.D., za odborný dohľad, trpezlivosť pri osvojovaní laboratórných techník a taktiež za podporu, ktorou mi po celý čas bola.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študent/ka: Bianka Šebeňová

Školiteľ: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Expresia glukózových transportérov v tkanivách metódou RT-qPCR u myšieho modelu MASH

Metabolicky podmienená steatóza pečene je ochorenie, ktoré spadá do súboru prejavov metabolického syndrómu. Dlhodobá pozitívna energetická bilancia vedie k nárastu hmotnosti a metabolickej dysregulácii. Chronicky zvýšený príjem jednoduchých cukrov má za následok zníženú citlivosť tkanív na inzulín, čo sa spočiatku prejavuje hyperinzulinémiou a časom inzulínovou rezistenciou. Úlohou tejto práce bolo zhodnotiť expresiu glukózových transportérov u myší, ktoré boli na MASH diéte, a ktorá obsahovala vysoký podiel tukov a jednoduchých cukrov v kalorickom nadbytku tak, aby napodobňovala tzv. západnú diétu. Ďalším cieľom bolo porovnanie indexu HOMA-IR u myší na MASH diéte oproti kontrole.

Transportéry boli kvantifikované za pomoci RT-qPCR v mRNA z tkanív pečene, *ilea* a tuku. Vyhodnotením dát sa zistilo, že mRNA transportérov SglT1 a Glut2 v *ileu* je vyššia u myší na MASH diéte. Zvýšená bola aj mRNA Glut1 transportéru v pečeni. Glut2 bol v pečeni takmer bez zmeny. Čo sa tukového tkaniva týka, tak Glut1 bol exprimovaný vo vyššej miere oproti kontrole a mRNA transportéru Glut4 bola u myší na MASH diéte mierne inhibovaná.

Inzulín bol stanovený metódou enzýmovej imuno-analýzy (ELISA). Index HOMA-IR zohľadňuje glykémiu a inzulínémiu nalačno a vyšlo, podľa očakávania, že hodnoty u myší na MASH diéte boli vyššie oproti kontrole. To naznačuje, že tolerancia glukózy je narušená a môže byť prítomná inzulínová rezistencia.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Bianka Šebeňová

Supervisor: Prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of diploma thesis: Expression of glucose transporters in tissues by the RT-qPCR method in the murine MASH model

Metabolic-associated fatty liver disease is a condition that belongs to manifestations of the metabolic syndrome. Long-term positive energy balance leads to weight gain and metabolic dysregulation. The consequence of chronic high intake of simple sugars is lowered tissue sensitivity to insulin, initially manifesting as hyperinsulinemia and eventually leading to insulin resistance.

The aim of this diploma thesis was to quantify and evaluate the expression of glucose transporters in mice. Mice were fed with a MASH diet which contained a high amount of fat and simple sugars in a caloric surplus, similar to the western diet. Another goal was to compare the HOMA-IR index in mice on the MASH diet versus the control group fed on the chow diet.

Transporters mRNA were quantified using RT-qPCR in liver, *ileum*, and fat tissue. The data revealed that the mRNA levels of Sglt1 and Glut2 transporters in *ileum* were higher in mice on the MASH diet. Increased mRNA of the Glut1 in the liver tissue was also observed. Liver Glut2 mRNA was almost unchanged. Regarding adipose tissue, Glut1 mRNA was more abundant in comparison with the expression in chow diet-fed mice, and expression of Glut4 mRNA was slightly downregulated in mice on MASH diet.

Insulin levels were quantified using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The HOMA-IR index considering fasting glycaemia and insulinemia revealed that values in mice on the MASH diet were higher than in the control group. It indicates that glucose tolerance is disrupted, and insulin resistance may occur.

OBSAH

1. ZOZNAM SKRATIEK.....	8
2. ÚVOD.....	11
3. TEORETICKÁ ČASŤ	12
3.1 Metabolicky podmienená steatohepatitída	12
3.1.1.Epidemiológia.....	12
3.1.2. Rizikové faktory	12
3.1.3. Komorbidity.....	13
3.1.4. Patofyziológia.....	14
3.1.5. Diagnostika MAFLD	20
3.1.7. Prevencia a liečba	22
3.2. Metabolizmus sacharidov.....	24
3.2.1. Metabolizmus v tenkom čreve.....	24
3.2.2. Prehľad transportérov GLUT a SGLT.....	26
3.2.3. Regulácia glukózových transportérov GLUT2 a SGLT1	29
3.2.4. Homeostáza plazmatickej glukózy	29
3.2.5. Hodnotenie glukózovej homeostázy.....	32
3.2.6 Pečeňový metabolizmus	33
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	37
CIELE PRÁCE	37
5. MATERIÁL A METÓDY	38
5.1. Materiál a chemikálie	38
5.1.1. Chemikálie.....	38
5.1.2. Pomôcky	39
5.1.3.Přístroje.....	39
5.2. Metódy	40

5.2.1. Izolácia RNA	40
5.2.2. Analýza kvalitatívnych a kvantitatívnych parametrov RNA.....	41
5.2.3. Polymerázová reťazová reakcia	43
5.2.4. Odber glukózy a inzulínu	46
5.2.5 Enzýmová imuno-analýza	47
5.2.4. Štatistická analýza	50
6. VÝSLEDKY PRÁCE	51
6.1. Optimalizácia izolácie RNA z tukového tkaniva myši	51
6.2. Výsledky expresie glukózových transportérov	53
6.3. Hodnotenie glukózovej tolerancie.....	56
7. DISKUSIA.....	58
8. ZÁVER	61
9. ZOZNAM LITERATÚRY	62

1. ZOZNAM SKRATIEK

ALT – alanínaminotransferáza

API – *aqua pro injectione* (voda pre injekcie)

AST – aspartátaminotransferáza

ATP / ADP / AMP – adenzíntrifosfát / adenzíndifosfát / adenzínmonofosfát

BMI – body mass index (index telesnej hmotnosti)

cAMP – cyklický adenzínmonofosfát

Ct – cycle of threshold (cyklus prahu)

cDNA – complementary deoxyribonucleic acid (komplementárna deoxyribonukleová kyselina)

DM2 – *diabetes mellitus* 2. typu

DNA – deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)

DNL – *de novo* lipogenéza

dNTPs – deoxyribonucleotidetriphosphates (deoxyribonukleotidtrifosfáty)

ECM – extracelulárny matrix

ELISA – enzyme - linked immuno sorbent assay (enzýmová imunoanalýza)

FADH2 – flavínadenínindinukleotid

FAST – FibroScan - AST (aspartátaminotransferáza)

FLI – fatty liver index (index tukovej pečene)

G6P/ G1P – glukóza-6-fosfát / glukóza-1-fosfát

GGT – gamaglutamyltransferáza

GIP – glukózo - dependentný inzulínotropný polypeptid

GLP-1 – glucagon - like peptide-1 (glukagónu - podobný peptid-1)

Glut / GLUT1 / 2 / 3 / 4 – glukózový transportér 1 / 2 / 3 / 4 (Glut - názvoslovie transportérov u myši / GLUT - názvoslovie transportérov u človeka)

HCC – hepatocellular carcinoma (hepatocelulárny karcinóm)

HIF-1 α – hypoxiou indukovaný faktor-1 α

HIS – hepatic steatosis index (index pečenej steatózy)

HOMA-IR – homeostatic model assessment of insulin resistance (model hodnotiaci homeostázu pri inzulínovej rezistencii)

HSC – hepatálne stelátové bunky

HSL – hormón - senzitivna lipáza

ChREBP – carbohydrate - responsive element - binding protein (proteín - viažuci prvok reagujúci na sacharidy)

IGI – inzulínogénny index

IRS-1 – insulin receptor substrate-1 (substrát-1 pre inzulínový receptor)

IRTK – inzulínový tyrozínkinázový receptor

LOXL-2 – lysoly - oxidáza-2

M/NAFLD – metabolic associated fatty liver disease / non-alcoholic fatty liver disease (metabolicky podmienená tuková choroba pečene / nealkoholická tuková choroba pečene)

M/NASH – metabolic associated steatohepatitis/ non alcoholic steatohepatitis (metabolicky podmienená steatohepatitída / nealkoholická steatohepatitída)

MetS – metabolický syndróm

mRNA – messenger ribonucleic acid (messengerová ribonukleová kyselina)

NADH – nikotínamidadenínukleotid

NADPH – nikotínamidadenínukletidfosfát

NLFS – NAFLD liver fat score (skóre pečenevého tuku u NAFLD)

NFS – NAFLD fat score (skóre tuku u NAFLD)

oGTT – orálny glukózový tolerančný test

PCR – polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)

PNLPLA3 – patatin - like phospholipase domain 3 (patatínu - podobná fosfolipázová doména 3)

PPAR- γ – peroxisome proliferator - activated receptor (receptor γ aktivovaný peroxizómovým proliferátorom)

RNA – ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)

RT-qPCR – real time - quantitative polymerase chain reaction (kvantifikačná PCR v reálnom čase)

SGLT1 /2 / Sglt1 /2 – sodium - glucose transporter (sodno - glukózový transportér 1 / 2, SGLT - názvoslovie pre človeka / Sglt - názvoslovie pre myši)

SREBP-1c – sterol regulatory element - binding protein (väzobný protein-1c pre sterolový regulačný prvok)

TAG – triglyceridy

TGF- β – transforming growth factor- β (transformujúci rastový faktor- β)

TM6SF2 – transmembrane 6 subfamily 2 (gén kódujúci transmembránový protein 6 podrodiny 2)

TMB – 3,3',5,5'-tetrametylbenzidín

TNF α – tumor necrosis factor- α (tumor nekrotizujúci faktor- α)

UTP/UDP – uridíntrifosfát / uridíndifosfát

VCTE – vibration - controlled transient elastography (vibráciami kontrolovaná tranzientná elastografia)

VLDL – very low density lipoprotein (lipoproteín s veľmi nízkou hustotou)

VMK – voľné mastné kyseliny

2. ÚVOD

Metabolické ochorenia sa v posledných rokoch stávajú čoraz viac riešenou témou. Je nimi postihnutá značná časť populácie hlavne vo vyspelých krajinách, ale v posledných rokoch stúpla prevalencia aj v rozvojových. Metabolicky podmienená steatohepatitída (MASH z angl. metabolic associated steatohepatitis), donedávna označovaná ako nealkoholická steatohepatitída (NASH z angl. non alcoholic steatohepatitis), je progresívna forma steatózy pečene. Prejavuje sa hlavne histologickými zmenami na hepatocytoch, ktoré prerastú do fibrózy, prípadne až cirhózy. V prípade MASH nie je neobvyklé, že poškodenie pečene progreduje aj do tumoróznej formy hepatocelulárneho karcinómu (HCC, z angl. hepatocellular carcinoma) (*Sakurai et al. 2021*).

Metabolicky podmienená tuková choroba pečene (MAFLD, z angl. metabolic associated fatty liver disease) ako už z názvu vyplýva, je spôsobená akumuláciou tuku v pečeni. Starší pojem NAFLD/NASH zastrešuje steatózu spôsobenú všetkými príčinami mimo alkoholu. Vzhľadom k tomu, že väčšina diagnostikovaných pacientov trpí príznakmi metabolického syndrómu, zaviedol sa v hepatologických kruhoch pojem MAFLD/MASH ako nová diagnóza, ktorá je definovaná ako hepatálna manifestácia metabolického syndrómu (*Szántová et al. 2022*). Metabolický syndróm zahŕňa ochorenia ako obezita, inzulínová rezistencia až *diabetes mellitus* druhého typu (DM2), arteriálna hypertenzia, dyslipidémia a ďalšie ochorenia spôsobujúce metabolickú a vaskulárnu dekompenzáciu. Inzulínová rezistencia zohráva v patogenéze MAFLD svoju úlohu a podporuje metabolickú dysreguláciu smerom k lipogenéze a teda nadmernej akumulácii lipidov v pečeni (*Kaya a Yilmaz 2022*).

Vplyvu potravy na dysreguláciu metabolizmu a jeho manifestácií sa venuje aj moja práca. V prvej časti na úrovni expresie a v druhej skúmania vplyvu stravy na glukózovú toleranciu. Presný mechanizmus patofyziológie a metabolickej dysregulácie v prípadoch MAFLD a inzulínovej rezistencie nie je kompletne objasnený. Účinky rôznych látok na expresiu glukózových transportérov a glukózovú homeostázu sú naďalej skúmané aj vo výskumnej skupine prof. PharmDr. Petra Pávka, Ph.D. Problematika je predmetom mnohých výskumov, pretože predstavuje sľubné terapeutické ciele pre vývoj nových liečebných a diagnostických stratégií.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Metabolicky podmienená steatohepatitída

3.1.1. Epidemiológia

Celosvetová prevalencia MAFLD sa pohybuje na asi 25% a prevalencia MASH sa odhaduje na 3-5%. Ako už bolo spomenuté, netýka sa len vyspelých krajín ako Severná Amerika a Európa. Počet pacientov narastá aj v prípade Južnej Ameriky a Stredného východu, kde je paradoxne prevalencia najvyššia a v niektorých krajinách presahuje 50%. Najnižšie čísla vykazuje naopak Afrika (*Younossi et al. 2016*). Keďže sa jedná o metabolicky podmienené ochorenie, väčšina pacientov, ktorým je diagnostikovaná MAFLD, trpia aj ďalšími súvisiacimi komorbiditami ako obezita – 51%, arteriálna hypertenzia - 39%, DM2 - 22,5% či dyslipidémia - 69% (*Younossi et al. 2016*).

Epidemiologická situácia na Slovensku a v Českej republike je nepriaznivá. Prevalenčné dáta nie sú dostupné, no o nepriaznivej situácii svedčia nasledovné ukazovatele. Obezitou alebo nadváhou trpí na Slovensku cez 60% dospelých obyvateľov, čo je jeden z najvýznamnejších rizikových faktorov (*Martinka et al. 2021*). Na základe okolností, ktoré *Dvořák et al. (2015)* zistili, nie je prekvapením, že v podobných číslach sa nachádza aj Česká republika. U pacientov s DM2 zistili 79% výskyt steatózy a 13% výskyt fibrózy až cirhózy pečene.

3.1.2. Rizikové faktory

Nadváha a obezita patrí k najplyvnejšiemu rizikovému faktoru, od ktorého sa odvíjajú ďalšie komorbidity priamo súvisiace so vznikom MAFLD. Ako už bolo vyššie spomenuté, patria sem ochorenia spadajúce pod metabolický syndróm - DM2, arteriálna hypertenzia, dyslipidémia. Riziko rozvoja týchto ochorení sa odvíja

od životného štýlu a zvyšuje sa vekom. Všeobecne sú viac rizikovejší muži (*Jonas a Schürmann 2021, Martinka et al. 2021*).

Vznik MAFLD býva podmienený aj geneticky. Ľudia majúci polymorfizmus na géne PNLPLA3 (z angl. patatin-like phospholipase domain 3) kódujúcom fosfolipázu, ktorej aktivita je na základe polymorfizmu znížená, sú náchylnejší na steatózu a fibrózu pečene (*Romeo et al. 2008*).

Ďalším kritickým génom je TM6SF2 (z angl. transmembrane 6 subfamily 2), ktorý je exprimovaný hlavne v pečeni a črevách. Jeho úloha súvisí so sekréciou lipoproteínu s veľmi nízkou hustotou (VLDL, z angl. very low density lipoprotein). Nízka produkcia VLDL spôsobuje ďalšie ukladanie nadbytočného tuku v pečeni (*Kozlitina et al. 2014*). Určitá varianta má túto sekrečnú funkciu obmedzenú a je spájaná so zvýšenou utilizáciou tuku v pečeni. Všeobecne sa dá povedať, že mutácie génov, ktoré zasahujú do metabolizmu v prospech lipogenézy sú rizikovými pre vznik steatózy (*Jonas a Schürmann 2021*).

3.1.3. Komorbidity

Spolu s MAFLD na základe metabolického syndrómu vznikajú extrahepatálne komorbidity, ktoré často bývajú príčinou mortality. Okrem kardiovaskulárnych porúch a diabetu je steatóza spojená aj s ďalšími ochoreniami, medzi ktoré patria napríklad: syndróm polycystických ovárií, hypotyreóza, obštrukčné spánkové apnoe, chronické ochorenie obličiek, osteoporóza, depresia, porucha kognitívnych funkcií a onkologické ochorenia (*Kaya a Yilmaz 2022, Kasper et al. 2020*).

Rakovina spolu s kardiovaskulárnymi komorbiditami sú najčastejšou príčinou mortality u pacientov s MAFLD. MASH a jej súvis s HCC už bola spomenutá, ale MAFLD má negatívny vplyv aj na extrahepatálne typy rakoviny. Malignity, ktoré sa u pacientov s MAFLD vyskytovali najčastejšie, sú kolorektálny karcinóm, rakovina pažeráka, žalúdka, pankreasu, maternice a karcinóm prs (*Liu et al. 2020*).

3.1.4. Patofyziológia

Inzulínová rezistencia

Inzulínová rezistencia je stav, kedy tkanivá strácajú fyziologickú citlivosť na inzulín. To zapríčini hyperglykémiu, hyperinzulinémiu a potrebu tkanív získavať glukózu z iného zdroja. U MAFLD sa v pečeni ukladá tuk a metabolizmus smeruje k lipogénnej aktivite. Inzulínová rezistencia vzniká v tkanivách závislých na inzulíne. To sú hlavne kostrové svalstvo, pečeň a tukové tkanivo (*Petersen a Shulman 2018*).

Inzulínová rezistencia v tukovom tkanive

Za fyziologických podmienok je expanzia tukového tkaniva sprevádzaná dostačujúcim náborom adipogénnych buniek a adekvátnou vaskularizáciou a remodeláciou extracelulárneho matrixu (ECM). V patologických podmienkach je tukové tkanivo zväčšené pomocou hypertrofovaných adipocytov, angiogenéza je oslabená a nastáva hypoxia. To má za následok aktiváciu hypoxiou indukovaného faktoru α (HIF- α z angl. hypoxia-induced factor- α), stimuláciu fibrotizačných procesov a aktiváciou prozápalových makrofágov a molekúl (*Sun et al. 2011*). Inzulín v tukovom tkanive inhibuje lipolýzu. V rezistentnom tkanive je lipolýza nepotlačená a voľné mastné kyseliny (VMK) sú odvádzané do pečene a obehu, čo vedie k lipotoxicite a ukladaniu trigliceridov (TAG) do ektopických lokácií (*Sakurai et al. 2021, Sun et al. 2011*).

Vysoké hladiny VMK v sére indukujú aktiváciu prozápalových molekúl v pečeni. Aktivácia makrofágov vedie k zvýšenej aktivite prozápalového citokínu TNF α (z angl. tumor necrosis factor- α), ktorý podporuje lipolýzu a inhibuje inzulínom stimulovanú fosforyláciu IRS1 (insulin receptor substrate – 1). Tiež v procese vystupuje interleukín-6, ktorý spôsobuje zníženú signalizáciu inzulínu v pečeni (*Lumeng et al. 2007, Sun et al. 2011*). Okrem citokínov je vylučovaný aj leptín, ktorý za fyziologických podmienok zabezpečuje pocit sýtosti a pri inzulínovej rezistencii je prítomná aj leptínová rezistencia, a teda nie je dostatočne potlačená chuť do jedla. Vysoká hladina leptínu taktiež podporuje fibrogénny TGF- β (z angl. transforming growth factor - β) (*Sakurai et al. 2021, Torre et al. 2021*).

Inzulínová rezistencia v kostrových svaloch

V kostrovom svale slúži k udržaniu glukózovej homeostázy inzulínom indukovaný transportér GLUT4 (viz. kapitola 3.2.2.). Glukóza, podobne ako v pečeni, je spotrebovaná na zásobný glykogén a na glykolýzu. Inzulínová rezistencia spôsobuje zvýšenie intramyocelulárnych lipidov, čo má za následok zhoršenú signalizáciu molekúl od lipidov odvodených - napríklad diacylglycerol. Nevyužitá glukóza je substrátom v *de novo* lipogenéze (DNL). Okrem metabolických a pečňových komplikácií je s inzulínovou rezistenciou spojená aj sarkopénia - zníženie kvality a kvantity svalovej hmoty (Petersen a Shulman 2018, Samuel a Shulman 2018).

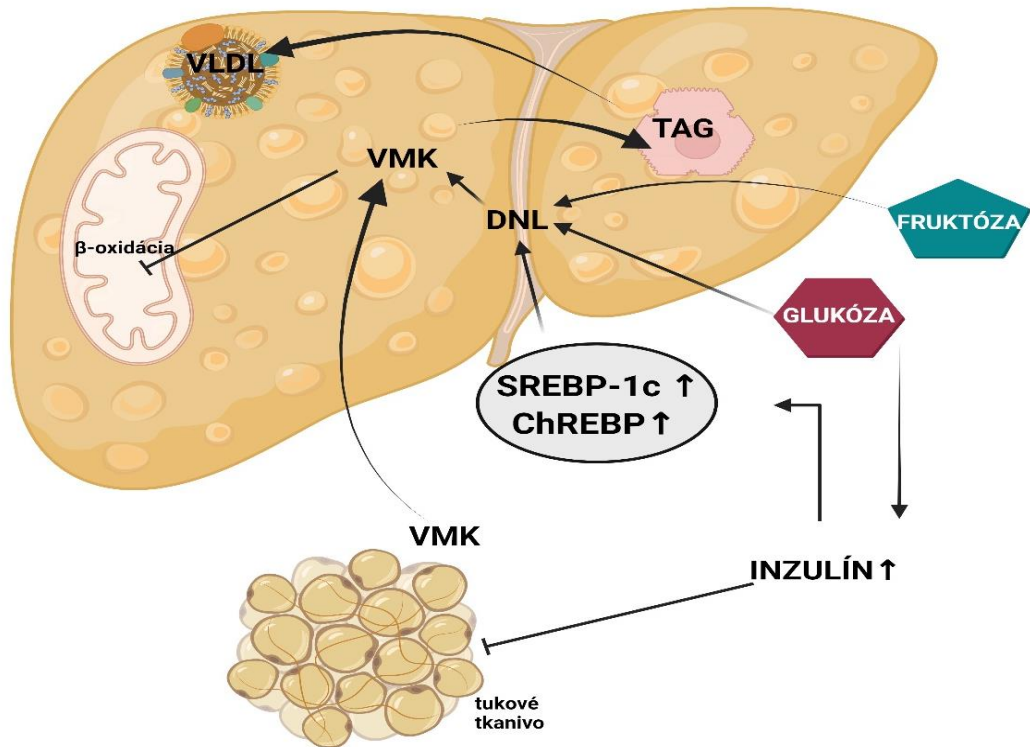
Steatóza

Steatóza je pojem, ktorý označuje akumuláciu lipidov a mastných kyselín v hepatocytoch. O steatóze sa dá hovoriť, keď množstvo postihnutých hepatocytov presiahne 5% (Martinka et al. 2021). Patogenéza nie je presne objasnená, ale vo všeobecnosti sa rozvíja v prípade, kedy príjem a syntéza lipidov prevyšuje ich export. Diéta vyspelých, vysokopříjmových krajín, je často nevyvážená a tvorená prevažne jednoduchými cukrami a nasýtenými tukmi, ktoré sú často chronicky prijímané v nadbytku, spôsobuje okrem nárastu hmotnosti aj hromadenie lipidov a následné ochorenie. V rozvoji MAFLD je dôležitá aj inzulínová rezistencia a hyperinzulinémia, ktorá je dôsledkom zníženej citlivosti na inzulín. Úloha inzulínovej rezistencie v súvislosti s MAFLD však nie je kompletne objasnená (Machado a Diehl 2016).

Inzulín, ktorý sa produkuje vo vyššej miere v stave inzulínovej rezistencie je zodpovedný okrem glukózovej homeostázy aj za reguláciu metabolizmu lipidov. Blokuje β -oxidáciu mastných kyselín, ovplyvňuje ich transport z periférnych tkanív do pečene, stimuluje DNL prostredníctvom pozitívnej regulácie expresie transkripčných faktorov ako napríklad nukleárny PPAR- γ receptor (z angl. peroxisome proliferator – activated receptor gamma), ChREBP (z angl. carbohydrate response element binding protein) a SREBP-1c (z angl. sterol regulatory element - binding protein-1c), ktoré zvyšujú expresiu lipogénnych enzýmov (viz. Obr. 1) (Cobbina a Akhlaghi 2017, Marušić et al. 2021). VMK sú za normálneho stavu ukladané do tukového tkaniva vo forme TAG. U subjektov s MAFLD a inzulínovou rezistenciou je ukládanie

odklonené do ektopických tkanív - kostrového svalstva a pečene. Transport je uľahčený prostredníctvom transportéru FATCD36 (z angl. fatty acid translocase CD36). FATCD36 je zastúpený vo vyššej miere u pacientov s MAFLD a obezitou, oproti jeho expresii u zdravých subjektov (*Fabbrini et al. 2009*). VMK sú spotrebované pri β -oxidácii, reesterifikované na TAG a skladované v hepatocytoch, prípadne v podobe VLDL transportované naspäť do krvného obehu (*Machado a Diehl 2016*).

Neopomenuteľným zdrojom TAG v pečeni je fruktóza. Fruktóza je monosacharid, ktorý sa prirodzene vyskytuje v ovocí, ale jej hlavným zdrojom v súvislosti s problematikou prejedania sa a západne orientovanej stravy je kukuričný sirup, ktorý sa často používa v potravinárskom priemysle ako sladidlo do nealkoholických nápojov. Chronický príjem fruktózy prispieva k ďalšej kumulácii TAG v hepatocytoch. Metabolizmus fruktózy sa kompletne odohráva v pečeni a väčšinou vstupuje do lipogénnych dráh. Jej chronická konzumácia navyše zvyšuje expresiu lipogénnych transkripčných faktorov SREBP1c a ChREBP (*Basaranoglu et al. 2015*).

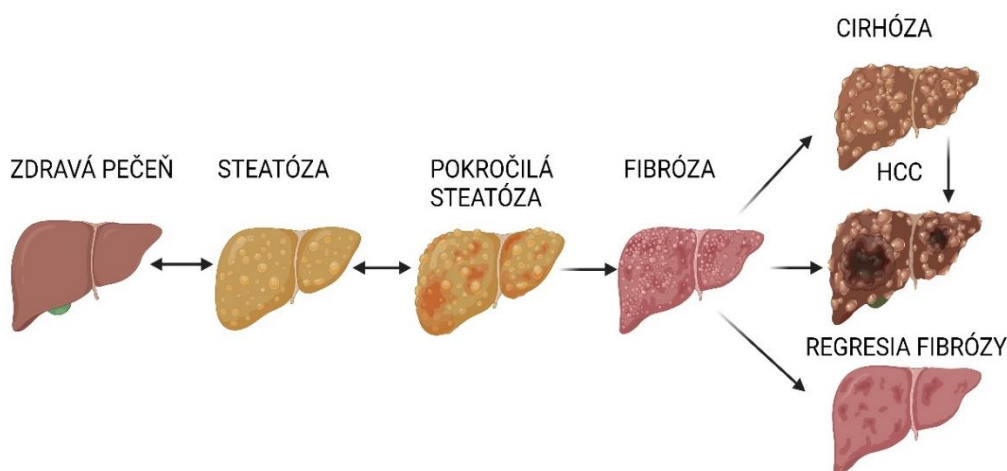


Obr. 1: Inzulínová rezistencia sa v adipocytoch prejavuje zvýšenou aktivitou hormón-senzitívnej lipázy, čo zapríčiňuje rýchlejší tok VMK do pečene. Oxidácia na začiatku inhibovaná, VMK sú prednostne esterifikované do formy TAG a skladované v hepatocytoch, prípadne inkorporované do VLDL. Hyperinzulinémia tiež indukuje expresiu SREBP-1c a ChREBP - transkripčných faktorov DNL. VMK-volné mastné kyseliny, TAG-triacylglyceroly, VLDL-very low density lipoprotein, DNL- de novo lipogenéza (Machado a Diehl 2016). vytvorené v: BioRender.com

Steatohepatitída

Vo fáze, kedy hovoríme o MAFLD, je steatóza nemenná a relatívne bezpečná. Časom dochádza k balónovej degradácii hepatocytov, z dôvodu prítomnosti prozápalových molekúl. Balónovaním (z angl. ballooning) je pomenovaný stav, kedy hepatocyt naboptná a niekoľkonásobne sa zväčší. V ďalšom prograse ochorenia dochádza k fibrotickým zmenám. Fibrogenéza je za fyziologických okolností žiaduci proces, ktorý zabezpečuje regeneráciu poškodených tkanív. Pečeň s MASH je infiltrovaná fibrogénnymi a zápalovými molekulami, ktorých expresia je neustále zvyšovaná, čo vytvára začarovaný kruh a extrémnu saturáciu fibrogénnymi faktormi. Fibróza môže progredovať až do stavu, kedy prechádza do ireverzibilnej cirhózy. Taktiež môže dôjsť až k nádorovému štádiu tohoto ochorenia –HCC (viz. Obr. 2) (Torre et al. 2021, Zhang CY et al. 2016). Cirhóza je asymptomatická a pacientov často

privádza za lekárom neskoro. To je spojené s vysokou mortalitou, pretože v konečnom štádiu je jediným terapeutickým riešením transplantácia pečene (Torre et al. 2021).



Obr. 2: Štádiá ochorenia pečene. Reverzibilita je do určitej miery možná. Pokiaľ fibróza nie je podchytená a ďalej progreduje do cirhózy alebo HCC, už tkanivo nie je schopné uspokojivej regenerácie a je nutná transplantácia pečene. HCC-hepatocelulárny karcinóm (Torre et al. 2021). vytvorené v: BioRender.com

Lipotoxicita zapríčinená nahromadeným tukom v pečeni vedie k poškodeniu organel, hlavne k mitochondriálnej dysfunkcii. Poškodené mitochondrie oxidujú mastné kyseliny vo vyššej miere, takže stúpa produkcia reaktívnych foriem kyslíka nad mieru antioxidantnej kapacity. Zvýšená produkcia reaktívnych foriem kyslíka vedie k oxidačnému stresu v bunkách (Marušić et al. 2021, Cobbina a Akhlaghi 2017). Po dlhodobom dekompenzovanom oxidačnom strese stimulujú mitochondriálne voľné radikály uvoľňovanie prozápalových citokínov a nábor imunitných a fibrogénnych buniek. Oxidačný stres nakoniec poškodí hepatocyty natoľko, že miera zápalového infiltrátu spôsobí apoptózu alebo nekrózu, a zapríčiní tak aktiváciu Kupfferových buniek (Torre et al. 2021).

Hepatálne stelátové bunky (HSC), ktoré sú v zdravej pečeni v kľudovom stave, sa aktivujú. Aktivované HSC podliehajú diferenciácii do formy myofibroblastov. Aktivované HSC vylučujú molekuly ECM bohaté na kolagén 1. a 2. typu. Proteíny

ECM sa hromadia, narúšajú parenchým a vaskulárnu sieť. Dôsledkom je zhoršená funkcia pečene a tvorba jaziev v Disseho priestore (Zhang CY et al. 2016). Medzi kľúčový patrí TGF- β , ktorý je v pokročilom stave steatózy exprimovaný vo vyššej miere oproti zdravej pečeni. TGF- β je produkovaný prevažne v HSC, ale jeho produkciu zabezpečujú aj makrofágy a poškodené hepatocyty. Ďalšie citokíny, ktoré sú v pečeni významne zastúpené, patrí napríklad interleukín-1 α a interleukín-1 β , produkované Kupfferovými bunkami. Zápalový infiltrát zvyšuje taktiež koncentráciu ligandov pre TNF α receptor. TNF α ako induktor apoptózy prispieva k poškodeniu tkaniva (Marušić et al. 2021, Torre et al. 2021).

Ďalšie faktory ovplyvňujúce rozvoj steatózy

Jedným z faktorov, ktoré ovplyvňujú stav pečene a rozvoj MAFLD je stav črevného mikrobiómu. Črevná dysbióza sa ukazuje ako jeden z ďalších dôležitých fibrogénnych faktorov v rozvoji MASH (Boursier et al. 2016). Každé štádium steatózy má svoju charakteristickú črevnú mikroflóru. Je dokázané, že metabolity jednotlivých bakteriálnych kmeňov vykazujú potenciálne pozitívny účinok na orgány mimo čreva. Takisto aj metabolity nežiadúcich bakteriálnych kmeňov môžu prispievať k negatívnym vplyvom na organizmus. U MAFLD sa mení bakteriálne osídlenie a metabolity, ktoré sú produkované, majú svoj podiel na patogenéze MAFLD (Chen a Vitetta 2020).

Mikrobióm je významný aj v metabolizme žlčových kyselín. Žlčové kyseliny sú podstatné v trávení lipidov, no v organizme zastávajú aj ďalšie funkcie. Sú významnými signálnymi molekulami v regulácii homeostázy pečeneového metabolizmu. Žlčové kyseliny regulujú expresiu proteínov prostredníctvom nukleárných receptorov. Napríklad, interagujú s farnezoidným X receptorom (FXR), s G-proteínom spriahnutým Takeda receptorom 5, pregnánovým X receptorom, retinoidným X receptorom, s receptorom pre vitamín D a ďalšími. Ligandy spomenutých receptorov sa javia ako sľubné molekuly s terapeutickým potenciálom liečby MASH a ďalších metabolických ochorení (Farooqui et al. 2022).

3.1.5. Diagnostika MAFLD

Ochorenie je takmer asymptomatické. U niektorých pacientov sa môže objaviť únava alebo bolesť pod pravým rebrom. Kvôli tomu nie je jednoduché MAFLD odhaliť a nie je ojedinelé, že do štádia cirhózy o ochorení pacient nevie. Často je objavená náhodne popri vyšetrení iného ochorenia vďaka zvýšeným pečenným enzýmom. Okrem pečenných testov môže byť ukazovateľom MAFLD hepatomegália, ktorá je viditeľná a hmatateľná počas fyzikálneho vyšetrenia brucha a značí tukovú infiltráciu. Prekážku často predstavuje obezita vyšetovaných (*Marušić et al. 2021*). Napriek zvýšeným transaminázam nevieme z biochemických parametrov určiť štádium ochorenia. Hodnoty transamináz nekorelujú s histologickým stavom pečene. Mierne zvýšené bývajú sérové hladiny alanínaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST). Často bývajú hodnoty ALT vyššie, než AST, hlavne u pacientov s MASH. Asi jedna tretina pacientov má 2-3x zvýšenú aj hladinu alkalickej fosfatázy a γ -glutamyltransferázy (GGT). Hladiny alkalickej fosfatázy a GGT sú zvyčajne zvýšené u pacientov s cirhózou (*Pouwels et al. 2022*).

Pre potvrdenie diagnózy sa využívajú aj zobrazovacie metódy. Spravidla ultrazvukové vyšetrenie, ale aj počítačová tomografia a magnetická rezonancia. Ultrasonografia je spoľahlivá a dostupná technika, ale znovu predstavuje obmedzenie obezita (*Pouwels et al. 2022*). K potvrdeniu MASH je biopsia považovaná za "zlatý" štandard. Biopsia je veľmi výhodná, pretože jednoznačne potvrdí alebo vyvráti diagnózu. Napriek svojim výhodám má aj riziká a limitácie, preto nie je voľbou pre každého pacienta. Kvôli rizikám, ktoré sa spájajú s biopsiou, je snaha nájsť vhodný neinvasívny spôsob, ktorý dokáže chorobu spoľahlivo diagnostikovať a zároveň predpokladať rozsah poškodenia pečene. Na ten účel bolo vyvinutých niekoľko skórovacích systémov (viz. Tabuľka 1) (*Piazzolla a Mangia 2020*).

Tabuľka 1: Vybrané hodnotiace systémy pre MAFLD/MASH a parametre, ktoré zohľadňujú. (Piazzolla a Mangia 2020)

Hodnotiaci systém	Parametre	Diagnostický účel
NLFS	MetS, DM2, AST/ALT, inzulín	Steatóza
HIS	AST/ALT, BMI, DM2, pohlavie	Steatóza
FLI	BMI, obvod pásu, TAG, GGT	Steatóza
NFS	vek, BMI, GLC, trombocyty, albumín	Steatóza
Fib-4	ALT, AST, trombocyty, vek	Fibróza
FAST- VCTE	tuhosť pečene, kvantifikácia tuku	steatóza+fibróza

MetS-metabolický syndróm, BMI-body mass index, GLC - glykémia

NAFLD liver fat score (NLFS) sa vypočítava na základe prítomnosti DM2, metabolického syndrómu, hladiny inzulínu v sére nalačno a pomeru transamináz AST a ALT. Hepatic steatosis index (HIS) zahrňuje pomer AST/ALT, body mass indexu (BMI), DM2 a pohlavie. Fatty liver index (FLI) - hodnotí BMI, obvod pásu, sérové hladiny TAG a GGT. Tieto tri hodnotiace systémy vykazujú vysokú diagnostickú úspešnosť, ale na základe týchto markerov nie je možné kvantifikovať mieru poškodenia pečene. Index Fib-4 hodnotí stupeň fibrózy na základe veku, ALT, AST a počtu trombocytov. NAFLD fat score (NFS) pracuje s vekom, BMI, glykémiou na lačno a pomerom AST/ALT, počtom krvných doštičiek a albumínom (Martinka et al. 2021, Piazzolla a Mangia 2020).

Vysoko efektívna je metóda FAST (FibroScan-AST) - ultrazvukové elastografické vyšetrenie (VCTE, z angl. vibration-controlled transient elastography) s prístrojom FibroScan[®], ktorý meria tuhosť pečene a vďaka parametru riadeného útlmu (ozn. CAP) dokáže kvantifikovať steatózu. Prístroj je vybavený sondami pre dospelých v dvoch veľkostiach - štandardná a XL pre obéznych pacientov. Samotný FibroScan nedokáže spoľahlivo určiť progres fibrózy, preto vznikol algoritmus FAST, ktorý na základe tuhosti pečene, parametra získaného pomocou FibroScanu, hodnoty CAP a hodnoty AST dokáže presnejšie predpovedať štádium ochorenia (Woreta et al. 2022).

3.1.7. Prevencia a liečba

Napriek vysokej prevalencii MAFLD a celkovo ochorení metabolického syndrómu je povedomie a snaha o prevenciu v EÚ nízka, hlavne vo sfére všeobecného lekárstva. Chýbajú odporúčané postupy pre edukáciu laickej verejnosti a základný skrining ochorení spojených s metabolickým syndrómom, taktiež chýbajú epidemiologické dáta zamerané na prevalenciu a incidenciu (*Szántová et al. 2022*). Prevencia je dôležitá z hľadiska rozvoja HCC a ďalších typov rakoviny (*Kaya a Yilmaz 2022*). Asi polovica pacientov by mohla predísť neoplastickým zmenám, keby bolo MAFLD odhalené včas. Diagnostické indexy na predpokladaný stav pečene, ktoré nie sú založené na zobrazovacích metódach, je možné využiť v každej ambulancii praktického lekára bez toho, aby to bolo časovo, či finančne náročné (*Szántová et al. 2022*).

Intervencia v oblasti zmeny životného štýlu a teda zníženie hmotnosti, je jedným z najúčinnějších postupov liečby a prevencie. Znížením hmotnosti dochádza k zníženiu sérových hladín transamináz, regresii steatózy, ale aj fibrózy. Už pri úbytku 5% hmotnosti sú badateľné zmeny v štruktúre pečene. Snaha je intervenovať pacientov k tomu, aby schudli aspoň 10% svojej hmotnosti (*Martinka et al. 2021, Marušić et al. 2021*). Primárne by sa malo jednať o komplexnú zmenu životného štýlu, ktorá zahŕňa hlavne zníženie kalorického príjmu a zavedenie fyzickej aktivity. V prípade neuspokojivého výsledku, alebo slabej adherencii pacientov je možné zaviesť liečivá, ktoré napomáhajú znižovať hmotnosť, prípadne zvážiť možnosť bariatrickej operácie. Samozrejme, so znížením hmotnosti sa zlepšuje aj prognóza kardiovaskulárnej mortality a ďalších komplikácií odvodených od nadváhy a životného štýlu (*Marušić et al. 2021*).

Čo sa týka farmakologickej liečby, zatiaľ nie je schválené žiadne liečivo pre MAFLD/MASH. Skúmaný je efekt metformínu, inhibítorov sodno-glukózových transportérov (SGLT, z angl. sodium-glucose transporter) – empagliflozin, dapagliflozin, agonistov glukagónu podobnému peptidu-1 (GLP-1, z angl. glucagon-like peptide-1) – semaglutid, liraglutid, PPAR- γ agonistov - pioglitazon, statínov, fibrátov a antihypertenzív (*Mantovani et al. 2021*).

V posledných rokoch bolo študovaných niekoľko potenciálnych terapeutických cieľov, ktoré by prognózu MAFLD/MASH mohli pozitívne ovplyvniť. Jednou z nich je kyselina obeticholová, ktorá je agonistickým ligandom pre nukleárny FXR. FXR ligandy vykazujú na zvieracích modeloch zlepšenie MASH. Regulujú metabolizmus lipidov a glukózy, zlepšujú inzulínovú rezistenciu a taktiež majú protizápalové a antifibrotické účinky (*Rotman a Sanyal 2017*). K ďalším príkladom skúmaných terapeutických cieľov patrí napríklad vitamín E, pre jeho antioxidačnú aktivitu, potenciál znižovať oxidačný stres v bunkách a teda znížiť riziko progresu MAFLD do MASH. Ďalším zaujímavým cieľom sú monoklonálne protilátky inhibujúce aktivitu lysolyl-oxidázy-2 (LOXL-2), ktorá figuruje vo fibrogenéze a procese zosieťovania kolagénu (*Rotman a Sanyal 2017, Mantovani et al. 2021*).

3.2. Metabolizmus sacharidov

Metabolizmus ako taký je odlišný v prípade aktívneho, zdravého jedinca a obézneho človeka, ktorý trpí ochoreniami zo škály metabolického syndrómu. Aktívni jedinci profitujú z energie získanej z jednoduchých sacharidov vďaka okamžitému efektu doplnenia energie. Pri získavaní energie sa sacharidy zapájajú do katabolických procesov s cieľom vytvárať energiu vo forme adenozintrifosfátu (ATP) (*Chandel 2021*). Väčšina populácie má problém s nadmernou konzumáciou a s nedostatkom fyzickej aktivity. To vedie ku kalorickému nadbytku, prijatá glukóza sa zapája do anabolických procesov, ktorých produktom sú mastné kyseliny. Mastné kyseliny sú ukladané v podobe TAG v tukovom tkanive. Časom nadmerný kalorický príjem vedie nielen k nárastu hmotnosti, ale aj k dysfunkcii metabolizmu a ochoreniu, ktoré spadajú pod metabolický syndróm (*Chandel 2021, Sakurai et al. 2021*).

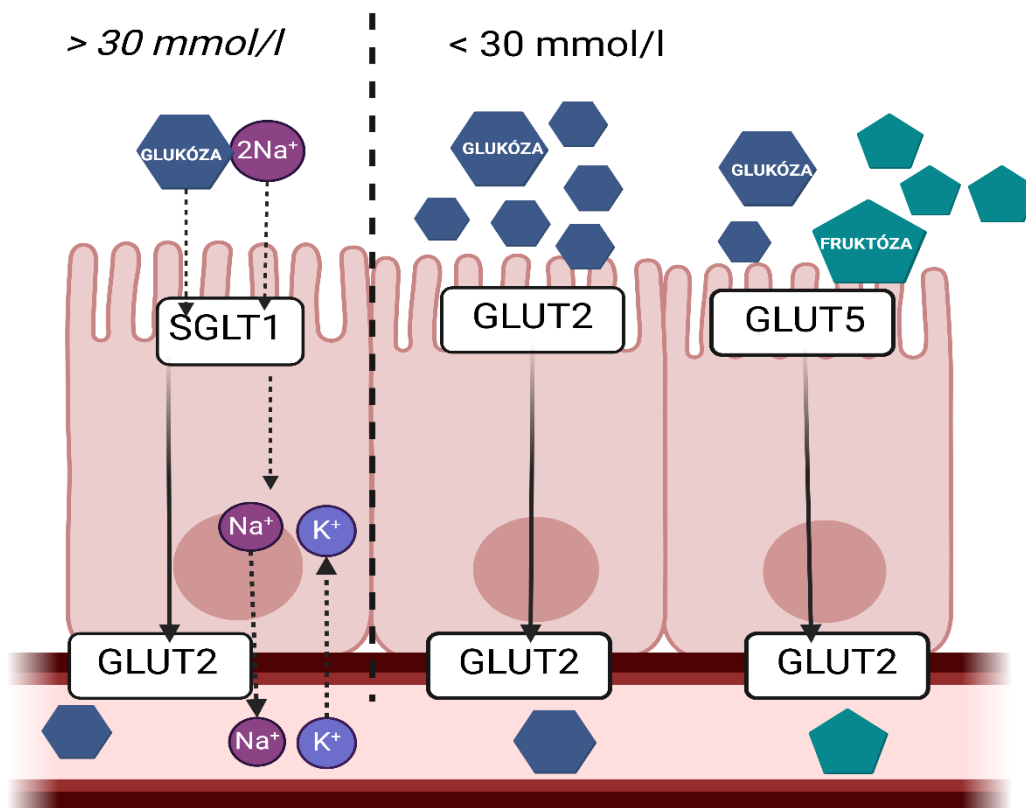
3.2.1. Metabolizmus v tenkom čreve

Po konzumácii sacharidov nastáva rozštiepenie na jednotlivé monosacharidové jednotky. Ďalším krokom je absorpcia cez epitel tenkého čreva (viz. Obr. 3). Pokiaľ je hladina glukózy v lúmen tenkého čreva pod 30 mmol/l – na lačno, prebieha absorpcia cez enterocytárnu apikálnu membránu. Glukóza je prenášaná do buniek enterocytov proti koncentračnému gradientu aktívnym transportom prostredníctvom sodno-glukózového transportéru 1 (SGLT1, z angl. sodium-glucose transporter 1). Transportér využíva k prenosu glukózy koncentračný gradient Na^+ iónov vytvorený pumpou - Na^+/K^+ -ATPázou (*Wright et al. 2011, Koepsell 2020*). Z enterocytu do krvného obehu je glukóza prenesená cez glukózový transportér 2 (GLUT2) facilitovanou difúziou, ktorý je lokalizovaný na bazálnej membráne enterocytu (*Koepsell 2020*).

Pri hladine nad 30 mmol/l je SGLT1 saturovaný, takže glukóza je z lúmen tenkého čreva transportovaná inými mechanizmami. U ľudí bol dokázaný transport facilitovanou difúziou cez GLUT2, ktorý je v tomto prípade integrovaný do apikálnej membrány enterocytu (*Gromova et al. 2021*). Ďalšia hypotéza hovorí

o medzibunkovom transporte tesnými spojmi medzi enterocytmi, kedy by sa glukóza mala prenášať spolu s vodou (Pappenheimer 1990).

Človek z potravy neprijíma len glukózu a polysacharidy z nej zložené. Okrem glukózy sú vstrebávané najmä fruktóza a galaktóza. Prenos galaktózy je sprostredkovaný rovnakým mechanizmom ako u glukózy. Fruktóza sa odlišuje, pretože je primárne prenášaná GLUT5 transportérom na apikálnej strane membrány. Do krvného obehu ju prenáša GLUT2 (Gromova et al. 2021, Koepsell 2020).



Obr. 3: Vľavo- stav na lačno. Glukóza transportovaná primárne cez SGLT1 kotransportom s dvomi sodnými kationmi a Na^+/K^+ ATPázou a na bazolaterálnej membráne vstrebávaná cez GLUT2 do obehu. Vpravo- stav postprandiálny. Glukóza je transportovaná cez GLUT2, ktorý translokoval do apikálnej membrány a do obehu prichádza znova prostredníctvom GLUT2. Prípadne môže glukóza prechádzať aj cez GLUT5, ktorý je hlavným transportérom pre fruktózu. SGLT1-sodium glucose transporter 1, GLUT2 / 5- glucose transporter 2 / 5 (Gromova et al. 2021). vytvorené v: BioRender.com

3.2.2. Prehľad transportérov GLUT a SGLT

Transportéry skupiny GLUT sa nepodielajú len na intestinálnej absorpcii glukózy. Nachádzajú sa v ďalších orgánoch, kde zabezpečujú prenos glukózy do buniek. Glukózové transportéry sú kódované génmi z rodiny SLC2 (viz Tabuľka 2). Zatiaľ bolo identifikovaných 14 typov GLUT transportérov, najlepšie preskúmané sú GLUT1-4. Podľa štruktúrálnej podobnosti sa rozdelili do tried 1, 2 a 3 (Holman 2020).

Tabuľka 2: Prehľad génov, ktoré kódujú najvýznamnejšie glukózové transportéry a ich najčastejšia lokalizácia.

Proteín	Trieda	Kódujúci gén	Miesta expresie
SGLT1		SLC5A1	apikálna membrána enterocytov
GLUT1	1	SLC2A1	HEB, mozog, erytrocyty
GLUT2	1	SLC2A2	LH ostrovčeky, pečeň, tenké črevo, obličky, mozog
GLUT3	1	SLC2A3	neuróny CNS, semenníky,
GLUT4	1	SLC2A4	kostrové svaly, myokard, tukové tkanivo
GLUT5	2	SLC2A5	tenké črevo, obličky
GLUT7	2	SLC2A7	tenké a hrubé črevo, semenníky, prostata

HEB - hematoencefalická bariéra, CNS - centrálny nervový systém, LH-Langerhans. Zdroj (Mueckler a Thorens 2013).

GLUT1

Patrí medzi najviac študované zo všetkých proteínov z SLC rodiny. K miestam, kde je exprimovaný v najvyššej miere patria erytrocyty, HEB, mozog. V rôznej miere sa vyskytuje v každom type buniek (Mueckler a Thorens 2013). V zdravej pečeni je expresia proteínu nízka. Jeho prítomnosť naberá na význam pri stavoch spojených s metabolickým syndrómom. Nie je známy presný mechanizmus, ktorý ovplyvňuje zvýšenú expresiu v pečeni. Dokázaná bola zvýšená expresia GLUT1 v pečeni postihnutej steatózou. Zvýšenie nie je podmienené metabolickým typom steatózy, tento jav sa vyskytuje aj u steatózy vírusového a alkoholického pôvodu (Karim et al. 2012 a 2014).

Abnormálny nárast expresie je prítomný hlavne pri onkogenéze a je významným markerom pri diagnostike HCC (Karim et al. 2012). Dôvod stimulácie GLUT-1 transportéru v rakovinových bunkách je tzv. Warburgov efekt. Nádory bývajú náročné

na spotrebu glukózy, pretože glykolytický metabolizmus je jediným zdrojom ATP. Expresia GLUT1 je stimulovaná, aby bola energetická potreba nádorových buniek naplnená aj v prostredí s nízkou hladinou glukózy (*Airley a Mobasheri 2007, Mueckler a Thorens 2013*).

GLUT2

Exprimovaný je prevažne na membránach tenkého čreva, v β -bunkách pankreasu, taktiež v obličkách a hepatocytoch. Je hlavným transportérom glukózy v pečeni a sprostredkováva obojsmerný tok glukózy v závislosti na aktuálnej potrebe organizmu (*Mueckler a Thorens 2013*). Po absorpcii glukózy GLUT2 spúšťa kaskádu, kedy sa z pankreatických β -buniek začne uvoľňovať inzulín. V hepatocytoch je týmto podnetom aktivovaný transkripčný faktor ChREBP, a tým indukovaná expresia metabolických enzýmov glykolýzy a DNL (*Chadt a Al-Hasani 2020*).

GLUT2 transportuje taktiež fruktózu. Ako už bolo naznačené v predchádzajúcich kapitolách, západná diéta nie je založená len na vysokom príjme tukov a glukózy. Fruktóza je rovnako dôležitým prvkom v pozitívnej energetickej bilancii, ktorej následom je obezita a rozvoj MAFLD (*Basaranoglu et al. 2015*).

GLUT4

Hlavným miestom jeho expresie je tukové tkanivo a kostrové svalstvo. Jeho schopnosť prenášať glukózu je závislá na inzulíne (*Mueckler a Thorens 2013*). Na vonkajšej strane plazmatickej membrány signalizuje inzulín translokáciu GLUT4 z intrecelulárnych vezikúl do plazmatickej membrány. Reguláciu procesu prenosu narúša obezita a DM2 (*Deng a Yan 2016*).

GLUT4 je taktiež intenzívne študovaným proteínom, pre úlohu, ktorú zohráva v patofyziologických procesoch vedúcich k inzulínovej rezistencii a DM2. V tukovom tkanive je za prítomnosti DM2, inzulínovej rezistencie a počas dlhodobého energetického deficitu jeho expresia inhibovaná (*Pedersen et al. 1991*). V kostrovom svale diabetika sú hladiny GLUT4 podobné ako u zdravého jedinca, ale prenos glukózy do buniek je napriek tomu výrazne znížený (*Chadt a Al-Hasani 2020*). Predpokladá sa,

že slabá citlivosť je zapríčinená zníženou schopnosťou translokácie z vnútrobunkového rezervoára na povrch bunky (*Holman 2020*).

GLUT5

Ako už bolo spomenuté, je zodpovedný prevažne za absorpciu fruktózy v tenkom čreve. V súčasnosti sa zvýšil záujem o štúdium metabolizmu fruktózy, pretože abnormálny príjem fruktózy koreluje s nárastom obezity a metabolického syndrómu. Zvýšená konzumácia fruktózy je pravdepodobne príčinou stimulácie expresie GLUT5 v pečeni a zvyšuje riziko rozvoja MAFLD a prozápalových procesov (*Basaranoglu et al. 2015*).

SGLT

Zatiaľ bolo u človeka preukázaných 6 typov sodno-glukózových transportérov, pričom tými najvýznamnejšími sú SGLT1, ktorý je primárne exprimovaný v tenkom čreve a SGLT2, ktorý dominuje v kôre obličiek a je dôležitý pri reabsorpcii glukózy (*Hummel et al. 2011*).

Inhibítory SGLT2, tzv. glykosuriká sú v súčasnosti zavedené v terapii DM2, srdiečného zlyhania a chronického zlyhania obličiek. Javia sa ako potenciálne prínosné aj v terapii MAFLD a hepatocelulárneho karcinómu. Zjednodušene je mechanizmus účinku založený na zníženej reabsorpcii glukózy v obličkách prostredníctvom inhibície SGLT2, čo vedie k nižšej glykémii a zvýšenej spotrebe mastných kyselín na β -oxidáciu. To znižuje množstvo lipidov akumulujúcich sa v pečeni (*Hummel et al. 2011*). Existujú aj selektívne SGLT1 inhibítory, ktoré sú predmetom klinických štúdií a ešte neboli zavedené do praxe (*Io et al. 2019*).

3.2.3. Regulácia glukózových transportérov GLUT2 a SGLT1

Na základe rýchlosti reakcie na regulačný mechanizmus rozoznávame mechanizmy s rýchlou odpoveďou, ktorá je dosiahnutá do niekoľkých minút až hodín a mechanizmy s odpoveďou pomalou, ktorá nastane za niekoľko hodín až dní (*Koepsell 2020*).

Pri zvýšenom príjme potravy sa tenké črevo adaptuje na aktuálne podmienky zväčšením absorpčnej plochy, čo sa označuje ako nešpecifická adaptácia. Nešpecifické adaptácie sú prítomné aj pri DM2 alebo po chirurgickom zákroku. Špecifické adaptačné mechanizmy zahŕňajú zmeny v počte transportných proteínov na oboch stranách membrány. Jedná sa o transkripčné alebo post-transkripčné operácie, ktoré menia absorpčnú kapacitu enterocytov. Expresia obidvoch transportérov môže byť ovplyvnená príjmom glukózy, hormonálne, ale aj cirkadiálnym rytmom (*Koepsell 2020*).

Regulácie SGLT1 sa zúčastňujú rôzne transkripčné faktory, napríklad - hepatocytárny nukleárny faktor (HNF-1 α), transkripčný faktor SP1, ktoré stimulujú aktivitu promotera na géne pre SGLT1 (*Martín et al. 2000*). Expresia GLUT2 je taktiež ovplyvnená HNF-1 α , ale aj SREBP-1c (*Im et al. 2005*), ktoré sa nachádzajú hlavne v hepatocytoch, ale sú prítomné aj v tenkom čreve (*Koepsell 2020*).

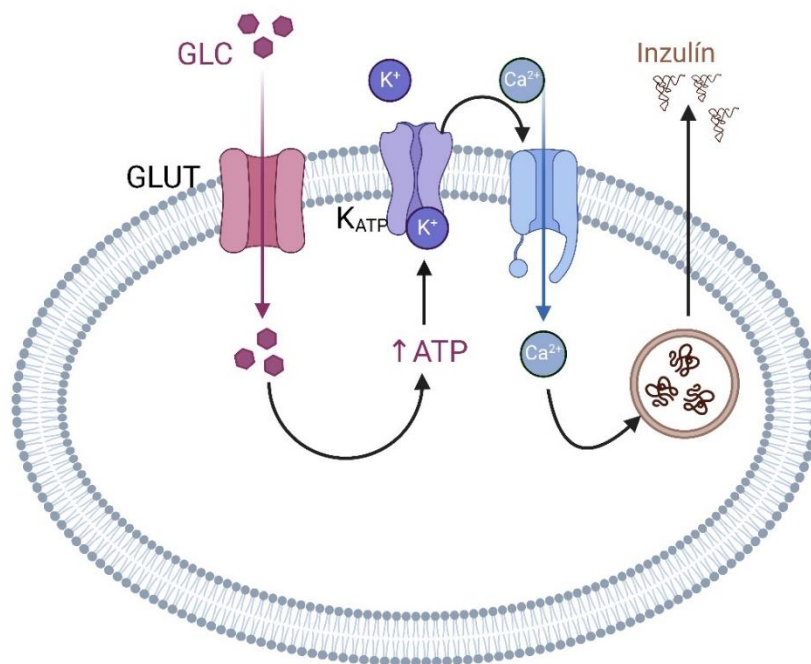
3.2.4. Homeostáza plazmatickej glukózy

Plazmatická glukóza je udržiavaná v relatívne úzkom rozmedzí hodnôt 3,9-5,6 mmol/l. Hormóny, ktoré ovplyvňujú plazmatickú glukózu sú inzulín, glukagón, GLP-1, na glukóze závislý inzulínotropný polypeptid (GIP, z angl. glucose-dependent inzulínotropný polypeptid), amyln, kortizol, adrenalín, hormóny štítnej žľazy a rastový hormón (*Aronoff et al. 2004*). Ďalším mechanizmom udržiavania euglykémie je renálna reabsorpcia glukózy, ktorá prebieha v proximálnom tubule za účasti SGLT2 transportérov (*Hummel et al. 2011*).

Inzulín

V postprandiálnom štádiu je smer glukózy udávaný inzulínom. V reakcii na príjem glukózy β -bunky pankreasu potláčajú aktivitu α -buniek a glukagónu, čím je potlačená glukoneogenéza a glykogenolýza. Po požití sacharidov sa uvoľní v dvoch fázach. Najprv sa bezprostredne po zvýšení glykémie uvoľní inzulín zo zásoby. Potom sa zvýši syntéza inzulínu a podľa aktuálnej glykémie sa ďalej uvoľňuje (Aronoff et al. 2004).

Mechanizmus, ktorým sa inzulín dostáva von z intracelulárnych granúl v β -bunkách je založený na nasledovnom princípe. Pri hyperglykémii je metabolizmus odklonený na glykolytickú stranu, čím začne prevládať koncentrácia ATP. V β -bunkách pankreasu ATP inhibuje ATP-senzitívne K^+ kanály. Tým vzrastá koncentrácia K^+ vo vnútri bunky, čo zapríčiňuje depolarizáciu plazmatickej membrány. To vedie k otvoreniu napäťovo-riadených Ca^{2+} kanálov, ktorých zvyšujúca sa koncentrácia stimuluje exocytózu inzulínových granúl (viz.Obr. 4) (Röder et al. 2016, Tokarz et al. 2018). Po sekrécii je v portálnej žile pomerne vysoká koncentrácia inzulínu, ktorý fosforyláciou aktivuje inzulínový tyrozínkinázový receptor (IRTK) na plazmatickej membráne bunky. Aktiváciou IRTK sa spustí prenos intracelulárneho signálu. Kaskáda vedie k premiestneniu transportéru GLUT4 na povrch bunky a transportu glukózy do intracelulárneho priestoru. Fosforyláciou IRTK a aktiváciou signálnych molekúl napr. mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin), 3-fosfoinositid-dependetná kináza-1 sa aktivuje AKT2 (Guertin a Sabatini 2007), tým sa indukuje funkcia glykogénsyntázy a metabolizmu DNL. Ďalším účinkom inzulínovej signalizácie je zníženie expsie enzýmov glukogénneho charakteru (Samuel a Shulman 2018).



Obr. 4: Mechanizmus inzulínovej sekrécie. Glukóza transportovaná cez GLUT2 je substrátom pre ATP, ktoré aktivuje ATP-dependenty draselný kanál. K^+ ióny depolarizujú membránu, následne sa do bunky dostávajú Ca^{2+} ióny, ktoré stimulujú exocytózu. GLUT-glukózový transportér (Tokarz et al. 2018). vytvorené v: BioRender.com

Glukagón

V stave na lačno figuruje glukagón ako regulačný hormón glukogénnych procesov. Glukagón sa uvoľní, keď koncentrácia glukózy v plazme klesá. Najprv je aktivovaná glykogénolýza, neskôr, po vyčerpaní zásob glykogénu aktivuje glukoneogénu. To sa ale nedeje u diabetikov. Glukagón aj napriek vysokej glykémii stále stimuluje anabolické procesy v pečeni, čo zapríčiňuje ešte vyššiu glykémii. Mechanizmus, akým je glukagón uvoľňovaný, sa podobá sekrécii inzulínu. V α -bunkách nízka hladina glukózy aktivuje ATP-dependenty K^+ kanál, otvoria sa Ca^{2+} kanály typu T. Nasleduje depolarizácia membrány a otvorenie napätovo riadených Ca^{2+} a Na^+ kanálov. Príliv vápenatých a sodných katiónov umožní uvoľňovanie glukagónu (Zeigerer et al. 2021, Röder et al. 2016).

Glukagón putuje do pečene, kde aktivuje glukagónový receptor spriahnutý s G-proteínom. Po naviazaní glukagónu je podjednotkou G-proteínu aktivovaná adenylátcykláza, tvorí sa cyklický adenosínmonofosfát (cAMP), ktorý aktivuje

proteínkinázu. Proteínkináza aktivuje transkripčné faktory pre expresiu glukogénnych enzýmov (Zeigerer et al. 2021).

GIP a GLP-1

GIP a GLP-1 sú hormóny produkované v tenkom čreve a uvoľňované po príjme potravy, označujú sa ako inkretíny. Zohrávajú významnú úlohu v homeostáze glukózy (Röder et al. 2016). GIP stimuluje sekréciu inzulínu. GLP-1 stimuluje sekréciu inzulínu, spomaľuje vyprázdňovanie žalúdka a inhibuje glukagón. Inkretíny stimulujú sekréciu inzulínu po *per os* príjme glukózy. To umožní secernovať inzulín ešte pred vzostupom glykémie. Na rozdiel od GIP je koncentrácia GLP-1 v črevách výrazne nižšia u diabetikov. Oba hormóny sa viažu na receptor spriahnutý s G-proteínom, ktorý na základe aktivácie adenylátcyklázy, a teda zvýšením hladiny cAMP v β -bunkách, stimuluje sekréciu inzulínu (Seino et al. 2010).

3.2.5. Hodnotenie glukózovej homeostázy

Porucha glukózovej homeostázy u inzulínovej rezistencie a DM2 je spôsobená zníženou citlivosťou tkanív na inzulín, čo sa prejavuje hyperglykémiou a hyperinzulinémiou. Bolo vyvinutých niekoľko diagnostických testov a hodnotiacich indexov pre vyhodnotenie glukózovej homeostázy. Väčšina z nich je založená na meraní glykémie a inzulínémie v čase (Park et al. 2021). Ako ďalší ukazovateľ je možné použiť hodnoty glykovaného hemoglobínu alebo C-peptidu, ktorý sa používa aj k diferenciálnej diagnostike na odlíšenie DM2 od DM1 (Martinka et al. 2021).

Euglykemický hyperinzulinemický svorkový test

Je považovaný za zlatý štandard pre hodnotenie glukózovej homeostázy a inzulínovej senzitivity. Testovaným subjektom je podávaná infúziou glukóza. Rýchlosť infúzie sa mení tak, aby bola zachovaná konštantná koncentrácia glukózy v plazme – medzi 5,0-5,5mmol/l. Súčasne je v ďalšej infúzii podávaný inzulín. Pokiaľ je prítomná inzulínová rezistencia, množstvo podávanej glukózy sa znižuje, aby bola zachovaná euglykemická koncentrácia (Park et al. 2021).

Orálny glukózový tolerančný test (oGTT)

V praxi je to veľmi populárny spôsob pre stanovenie glukózovej tolerancie. Ráno, po nočnom hladovaní, je podaný *per os* roztok 20% glukózy, ktorého množstvo je počítané podľa váhy pacienta. Existuje aj varianta s parenterálnym podaním glukózy, no v klinickej praxi je výhodnejšia administrácia glukózy *per os*. oGTT je jednoduchý na realizáciu a lepšie odráža fyziologické podmienky pri prirodzenom príjme glukózy z potravy. Na rozdiel od svorkových testov a parenterálneho glukózového tolerančného testu je pri perorálnom podaní zohľadnený efekt inkretínov. Glykémia sa stanovuje v čase $t = 0$ (glykémia nalačno by sa mala pohybovať okolo 5,6 mmol/l, za hraničnú je považovaná do 6,9 mmol/l), 30, 60, 90 a 120 min (za porušenú glukózovú toleranciu sa považuje glykémia 7,8-11,1.) (Park et al. 2021, Martinka et al. 2021).

Súčasťou testu môže byť aj odber pre stanovenie inzulínu nalačno a následné stanovenie indexu HOMA-IR (z angl. homeostatic model assessment of insulin resistance). Existuje niekoľko možností prevedenia HOMA indexu. Vyhodnotenie HOMA IR je jeden z nich a zameriava sa na hodnotenie inzulínovej rezistencie na základe výpočtu:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{inzulín na lačno } [\mu\text{IU/ml}] \times \text{glukóza na lačno } [\text{mmol/l}]) / 22,5$$

(Park et al. 2021)

3.2.6 Pečeňový metabolizmus

Pečeňový metabolizmus za fyziologických podmienok

V pečeni je glukóza vychytávaná hepatocytmi cez GLUT transportéry a ďalej vstupuje do metabolických ciest podľa aktuálnej potreby organizmu. Glukóza vo vnútri hepatocytu nemôže zostávať voľne, ale musí byť fosforylovaná na glukózu-6-fosfát (G6P) (Adeva-Andany et al. 2016). Vysoká koncentrácia voľnej glukózy v bunke by zapríčinila zníženie koncentračného spádu a zastavenie prenosu cez GLUT transportér, ktorý funguje na facilitovanej difúzii. Naopak defosforylácia glukózy vo vnútri hepatocytov a zvýšenie intracelulárnej koncentrácie voľnej glukózy sa uplatňuje v období hladovania, kedy je nutný transport glukózy do cieľových tkanív (Rui 2014).

Glykolýza

V bunke sa glukóza fosforyluje na G6P pomocou glukokinázy. V čase negatívnej energetickej bilancie G6P vstupuje do anaeróbnej glykolýzy, mení sa na pyruvát a generuje sa ATP. Okrem glykolýzy pyruvát generuje ATP v tkanivách s vysokým okysličením zapojením sa do Krebsovho cyklu (cyklus trikarboxylových kyselín) a oxidatívnej fosforylácie v mitochondriách. Pyruvát do cyklu vstupuje po premene na acetyl-CoA (*Han et al. 2016, Rui 2014*). G6P je tiež substrátom pentózofosfátového cyklu, pri ktorom vzniká NADPH, ktorý je nutný pri lipogenéze a substrátom pre glykogenézu (*Chandel 2021*).

Glykogenéza

Po absorpcii glukózy je potrebné nasyntetizovať zásobný glykogén, ktorý bol počas krátkodobého hladovania vyčerpaný. G6P ako substrát glykogenézy sa mení na izomér glukóza-1-fosfát (G1P) za katalýzy enzýmom fosfo-glukomutáza. G1P a uridíntrifosfát (UTP), za prítomnosti horečnatých iónov, sú ďalej katalyzované enzýmom UDP-glukóza pyrofosfatáza, pričom vzniká UDP-glukóza. Tá následne vstupuje ako prekursor do syntézy glykogénu a za prítomnosti glykogénsyntázy sa pripája k reťazcu. Okrem funkcie prekursoru v syntéze glykogénu je G6P alosterickým aktivátorom glykogénsyntázy a alosterickým inhibítorom glykogénfosforylázy (*Adeva-Andany et al. 2016, Han et al. 2016*).

Glykogenolýza

Uplatňuje sa pri krátkom pôste na základe signalizácie glukagónom. Z glykogénu sa uvoľní G1P - glykogénfosforylázou. Fosfoglukomutáza premiestni fosfát do polohy 6. G6P je translokovaný z cytosolu do endoplazmatického retikula, kde je defosforylovaný glukóza-6-fosfatázou na voľnú glukózu. Glukóza sa uvoľní do krvného obehu a je distribuovaná k cieľovým tkanivám (*Chandel 2021*). Glykogén sa postupne vyčerpáva a glukóza je čím ďalej tým viac syntetizovaná prevažne *de novo* - glukoneogenezou. Glukoneogenéza prebieha v malej miere aj počas krátkodobého hladovania. Postupným vyčerpávaním glykogénu sa pomer metabolických dráh vyrovnáva, až začne prevládať syntéza *de novo* (*Adeva-Andany et al. 2016, Petersen a Shulman 2018*).

Glukoneogenéza

Glukóza je de novo tvorená z glukogénnych aminokyselín, pyruvátu, produktov Krebsovho cyklu a glycerolu. Tieto substráty sú buď dodané z periférie do pečene alebo z nej priamo pochádzajú. Glukoneogenéza je stimulovaná glukagónom a potlačená inzulínom (Rui 2014, Han et al. 2016). Pyruvát je pre transport z mitochondrie do cytoplazmy premenený na oxalacetát a v cytoplazme na fosfoenolpyruvát. Niekoľkými reakciami je zmenený na fruktózu -1,6-bisfosfát a následne fruktóza-1,6-bisfosfatázou defosforylovaný na fruktózu-6-fosfát. Ten je potom konvertovaný na G6P, transportovaný do endoplazmatického retikula a úplne defosforylovaný za vzniku glukózy enzýmom glukóza-6-fosfatázou (Rui 2014).

Glycerol je po prechode do pečene fosforylovaný glycerolkinázou na glycerol-3-fosfát, ktorý sa zapája do glukoneogenézy. Aminokyseliny sú pomocou deaminačných enzýmov premenené na α -ketokyseliny, ktoré vstupujú do Krebsovho cyklu a vzniká z nich pyruvát (Chandel 2021).

Metabolizmus počas inzulínovej rezistencie a MAFLD

Inzulínová rezistencia je stav, kedy tkanivá strácajú fyziologickú citlivosť na inzulín. To zapríčini hyperglykémiu, hyperinzulinémiu a potrebu tkanív získavať glukózu z iného zdroja. U MAFLD sa v pečeni ukladá tuk a metabolizmus smeruje k lipogénnej aktivite (Sakurai et al. 2021).

V predošlých kapitolách už boli načrtnuté metabolické dráhy, ktorých sa to dotýka, preto bude v nasledujúcich riadkoch už len stručné ucelenie danej problematiky.

De novo lipogenéza

Inzulín je hlavným regulátorom lipogenézy *de novo*. Dva hlavné transkripčné faktory, ktoré sa podieľajú na DNL na základe inzulínovej stimulácie sú SREBP-1c a ChREBP. SREBP-1c je regulovaný signalizáciou inzulínu a ChREBP sa aktivuje na základe vychytávania glukózy. PPAR- γ pozitívne reguluje expresiu ďalších génov zapojených do lipogenézy, aj keď nie je doteraz známe, či má v súvislosti s vývojom MAFLD/MASH významné spojenie (Cobbina a Akhlaghi 2017, Marušić et al. 2021).

Zvýšený príjem VMK

VMK sú vychytávané pečeňou za účasti FATCD36 transportéru, ktorý je špecifický pre hepatocyty. Tento transportér sa exprimuje vo vyššej miere, pokiaľ je prílív VMK do pečeni chronicky zvýšený. Zvýšená expresia bola zistená u MAFLD a MASH jedincov a tiež jedincov s inzulínovou rezistenciou (*Cobbina a Akhlaghi 2017, Fabbrini et al. 2009*).

Sekrécia TAG

Obézni pacienti s MAFLD vykazujú vyššiu mieru sekrécie VLDL, ale export TAG von z pečene nekompenzuje jeho nadmernú akumuláciu. U pacientov s MAFLD je narušená inzulínom indukovaná supresia sekrécie VLDL (*Sakurai et al. 2021, Kozlitina et al. 2014*).

Zvýšená β -oxidácia mastných kyselín

Pečeň presýtená lipidmi reaguje zvýšením aktivity β -oxidácie a Krebsovho cyklu. Zvýšená aktivita β -oxidácie z dôvodu pečenej inzulínovej rezistencie produkuje reaktívne formy kyslíku, čo stupňuje oxidačne-stresovú záťaž hepatocytov a následnú zápalovú odpoveď (*Marušić et al. 2021, Sakurai et al. 2021*).

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

CIELE PRÁCE

Metabolizmus cukrov a výskum MASH je veľmi komplexný. Táto diplomová práca pozostáva z troch čiastkových cieľov:

1. Optimalizácia izolácie RNA z tukového tkaniva myší.
2. Stanovenie expresie glukózových transportérov (Sgl1, Glut1, Glut2 a Glut4) v tkanivách: pečeň, črevo (*ileum*) a tukové tkanivo u myší na normálnej diéte a na MASH diéte.
3. Porovnanie glukózovej tolerancie u myší na normálnej diéte a na MASH diéte.

5. MATERIÁL A METÓDY

5.1. Materiál a chemikálie

5.1.1. Chemikálie

Chemikálie pre izoláciu RNA:

- TRIzol reagent ® - Ambion by Life Technologies
- chloroform - Penta
- glykogén - glykogen UltraPure ThermoFisher
- izopropanol - Sigma-Aldrich/Merck
- etanol (absolútny) - Penta
- *aqua pro injectione* (API)

Chemikálie pre reverznú transkripciu a polymerázovú reťazovú reakciu (PCR, z angl. polymerase chain reaction):

- RevertAid RT KIT – thermo scientific by Thermo Fisher Scientific
- TaqMan™ Fast Advanced Master Mix – applied biosystems by Thermo Fisher Scientific
- TaqMan™ Assay Mm00441480_m1 Slc2a1 (génová expresná)
- TaqMan™ Assay Mm00446229_m1 Slc2a2 (génová expresná esej)
- TaqMan™ Assay Mm00436615_m1 Slc2a4 (génová expresná esej)
- TaqMan™ Assay Mm00451203_m1 Slc5a1 (génová expresná esej)
- TaqMan™ Assay Mm00437762_m1 B2m Mouse – referenčný gén

Chemikálie pre analýzu ELISA (z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay):

- Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA kit - ALPCO
- destilovaná voda

5.1.2. Pomôcky

Pomôcky pre izoláciu RNA:

- skalpel
- skúmavka pre homogenizátor so závitom + uzáver - SARSTEDT AG & Co. KG
- guľičky do homogenizátora
- mikropipety a špičky s duálnym filtrom v čistote pre PCR - Eppendorf
- skúmavky v čistote pre PCR - Eppendorf

Pomôcky pre reverznú transkripciu a PCR:

- mikropipety a špičky s duálnym filtrom v čistote pre PCR - Eppendorf
- PCR doštička 96 jamková pre reverznú transkripciu
- PCR doštička 384 jamková pre PCR + fólia

Pomôcky pre ELISA + pre odber glukózy:

- Mikropipety a špičky – Eppendorf
- pipeta
- kadička
- chirurgické nožnice
- skúmavky

5.1.3. Prístroje

- laboratórny mixér - Minishaker Gemini
- homogenizátor guľôčkový - FAST PREP
- centrifúga - Hermle Labortechnik GmbH
- Nanodrop Spectrophotometer ND-1000
- Termocycler (reverzná transkripcia) - BIO-RAD, T100 Thermal Cycler
- Termocycler (PCR) - QuantStudio, 6 Flex
- Glukometer – Easygluco + testovacie prúžky
- inkubačná trepačka - Benchmark, INCU-MIXER MP
- spektrofotometer – Hidex

5.2. Metódy

5.2.1. Izolácia RNA

RNA bola izolovaná metódou extrakcie fenol/chloroform. TRIzol® je komerčné reagenčné činidlo, ktoré sa využíva k izolácii celkovej RNA a DNA (z angl. ribonucleic / deoxyribonucleic acid). Zmes pozostáva prevažne z fenolu, guanidínizotiokyanátu a iných látok zastúpených v menšej miere. Kvôli vysokej dráždivosti je nutné s reagensiou pracovať v digestore a s nasadenými ochrannými pracovnými pomôckami.

Postup (viz. Obr. 5):

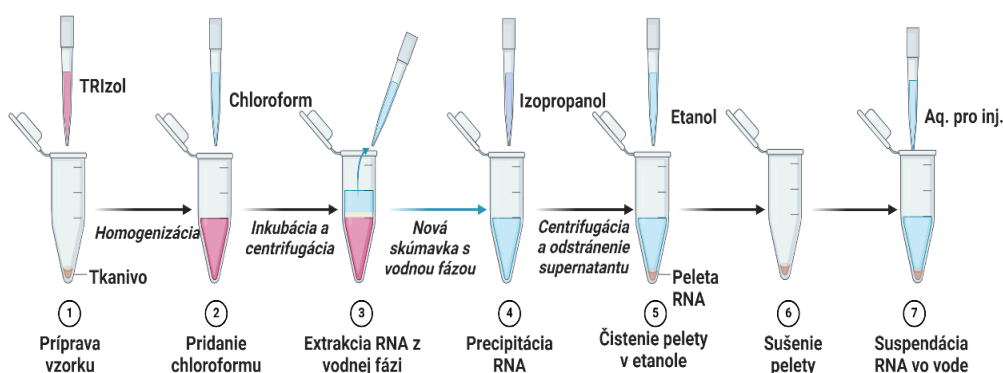
1. Tkanivo s hmotnosťou približne 50-100 mg sa preniesie do 1 ml TRIzolu a homogenizuje sa pri laboratórnej teplote v dvoch 30 sek cykloch.
2. Homogenát sa premiestni do čistých skúmaviek, ktoré sa vložia do centrifúgy na 10 min, pri 12000 g a teplote 4 °C. Následne sa odoberie vodná zložka (tuková obsahuje kontaminanty zhoršujúce výťažnosť) a pokračuje sa v bežnej izolácii.
3. Pridá sa chloroform (k 1ml TRIzolu 0,2 ml chloroformu) a vzorky sa pretrepávajú na asi 15 sek, nechajú sa inkubovať asi 2-3 min pri laboratórnej teplote. Následne sa vzorky premiestnia do centrifúgy na 15 min, pri 12000 g a teplote 4 °C. Zmes je po centrifugácii separovaná na organickú fázu, medzi-fázu a vrchnú, vodnú fázu, ktorá obsahuje RNA. V tomto momente je nutné presunúť prácu do sterilného prostredia a pracovať s pomôckami a reagensiami, ktoré sú zbavené RNáz (ozn. RNase free alebo PCR clean).
4. Vodná fáza je prepipetovaná do novej skúmavky spolu s 1 µl glykogénu. Odber vodnej fázy musí prebiehať veľmi opatrne, aby sa pri odbere nezachytila časť ostatných fáz. V prípade nešikovného pipetovania sa skúmavka opäť sцентриfúguje, aby sa fázy opäť oddelili. Neopatrný odber vodnej fázy znižuje výťažnosť, znečisťuje izolovanú RNA a komplikuje ďalší postup izolácie.

Pridanie glykogénu je voliteľné, ale zlepšuje výslednú kvalitu a výťažnosť. Glykogén je polysacharid, ktorý je nerozpustný v etanole a viaže sa na RNA, čím funguje ako nosič. V praxi to znamená, že RNA ľahšie precipituje a je viditeľnejšia.

6. Do vodnej fázy sa pridá izopropanol (0,5 ml na 1 ml TRIzolu), ktorý bol vychladený na 4-5 °C. Zmes sa pretrepe a inkubuje 10 min pri laboratórnej teplote. Po uplynutí tejto doby sa zmes opäť scentrifuguje na 10 min, pri 12000 g a teplote 4 °C. Po centrifugácii sa v skúmavke objaví precipitát, tzv. peleta – biela, plochá častica.

7. Supernatant sa opatrne vyleje a peleta sa premýva v 1 ml 75% etanole, ktorý bol zchladený v mrazničke (RNA je nestabilná a nízka teplota znižuje riziko degradácie). Skúmavky sa vložia do centrifúgy na 5 min pri 7500 g a teplote 4 °C.

9. Po vybratí sa alkohol vyleje, skúmavka s peletou sa vysuší a resuspenduje v API, v objeme asi 50 µl.



Obr. 5: Izolácia RNA krok po kroku. Pri tkanivách s vysokým podielom tuku je vhodné medzi krokom 1 a 2 zaradiť centrifugáciu (10 min, 4 °C, 12000 g) pre separáciu lipidov a lepšiu výťažnosť izolácie. Medzi krokom 3 a 4 sa môže pridať glykogén. vytvorené v: BioRender.com

5.2.2. Analýza kvalitatívnych a kvantitatívnych parametrov RNA

Na to, aby RNA mohla byť použitá v ďalších metódach, je potrebné stanoviť presnú koncentráciu a parametre čistoty. Využíva sa spektrofotometrické stanovenie na Nanodrope – spektrofotometer skonštruovaný tak, aby analyzoval malé objemy.

Princíp:

Molekuly v roztokoch po expozícii elektromagnetickým žiarením určitej vlnovej dĺžky prechádzajú do excitovaného stavu. V dôsledku prechodu do stavu s vyššou energiou molekula absorbuje časť elektromagnetického žiarenia, odpovedajúce rozdielu energetických hladín excitovanej a neexcitovanej molekuly.

Transmitancia (T) vyjadruje množstvo elektromagnetického žiarenia o určitej vlnovej dĺžke, ktoré prešlo molekulou. Pokiaľ T má hodnotu 1, absorpcia je nulová. Pri spektrofotometrii sa meria absorbancia (A). Absorbancia predstavuje záporný dekadický logaritmus transmitancie ($A = -\log T$). Platí teda, že s rastúcou absorpciou rastie absorbancia. Absorbanciou je možné vyjadriť koncentráciu látky v roztoku. Platí Lambert-Beerov zákon, tzn. absorbancia je priamo úmerná koncentrácii absorbujúcej molekuly v roztoku a šírke absorbujúcej vrstvy (kyvety) (Subhanová 2022).

Nukleové kyseliny najviac absorbujú pri 260 nm. Bežné kontaminanty nukleových kyselín - fenoly a proteíny, absorbujú okolo vlnovej dĺžky 280 nm, a preto sa k vyjadreniu čistoty nukleových kyselín využíva pomer absorbancií pri 260 a 280 nm ($A_{260}/280$). RNA sa považuje za dostatočne čistú, pokiaľ sa $A_{260}/280$ pohybuje okolo **1,8 - 2,0**. Pokiaľ je pomer nižší, značí to prítomnosť spomínaných nečistôt, ktoré absorbujú blízko 280 nm. Sekundárnym ukazovateľom čistoty RNA je pomer absorbancií pri vlnovej dĺžke 260 a 230 nm ($A_{260}/230$). Ideálna hodnota je **2,0 - 2,2**. Nižšie číslo opäť značí prítomnosť nečistôt, ktoré absorbujú pri 230 nm. V prípade izolácie nukleových kyselín sa jedná hlavne o TRIzol, ktorý absorbuje blízko 230 a 270 nm.

Postup:

1. Kyveta Nanodropu sa očistí kusom buničiny.
2. Meranie slepého vzorku (tzv. blank) rozpúšťadla - API.
3. Nanesie sa 1 μ l vzorku a spustí sa analýza na počítači. Po analýze sa kyveta opäť očistí.
4. V prípade neuspokojivého výsledku sa vzorka reanalyzuje, aby sa vylúčila chyba merania.

Po celý čas merania je potrebné uložiť vzorky do ľadu a vyberajú sa len na čas nutný pre pipetovanie, aby sa predišlo predčasnej degradácii RNA.

5.2.3. Polymerázová reťazová reakcia

Reverzná transkripcia

Izolovaná RNA musí byť pred PCR prepísaná do komplementárnej DNA (cDNA, z angl. complementary DNA) reverznou transkripciou.

1. Prepočíta sa objem vzhľadom ku koncentrácii RNA tak, aby bol v každej vzorke 1 µg RNA a prepipetuje sa do čistých skúmaviek. Následne sa do skúmavky pipetujú zložky RT KITu, ktorý obsahuje:

- primer (náhodný hexamérový primer) - 1 µl
- API - do 12 µl (podľa objemu RNA)
- pufer - 4 µl
- RiboLock inhibítor RNáz - 1 µl
- dNTPs Mix (deoxynukleotid trifosfáty) - 2 µl
- RevertAid RT (reverzná transkriptáza) - 1 µl

2. Reverzná transkripcia prebiehala v jednom kroku pri teplote 42 °C, 60 min pomocou termo-cykleru. Po dokončení reakcie sa pokračuje v ďalších krokoch PCR.

Polymerázová reťazová reakcia

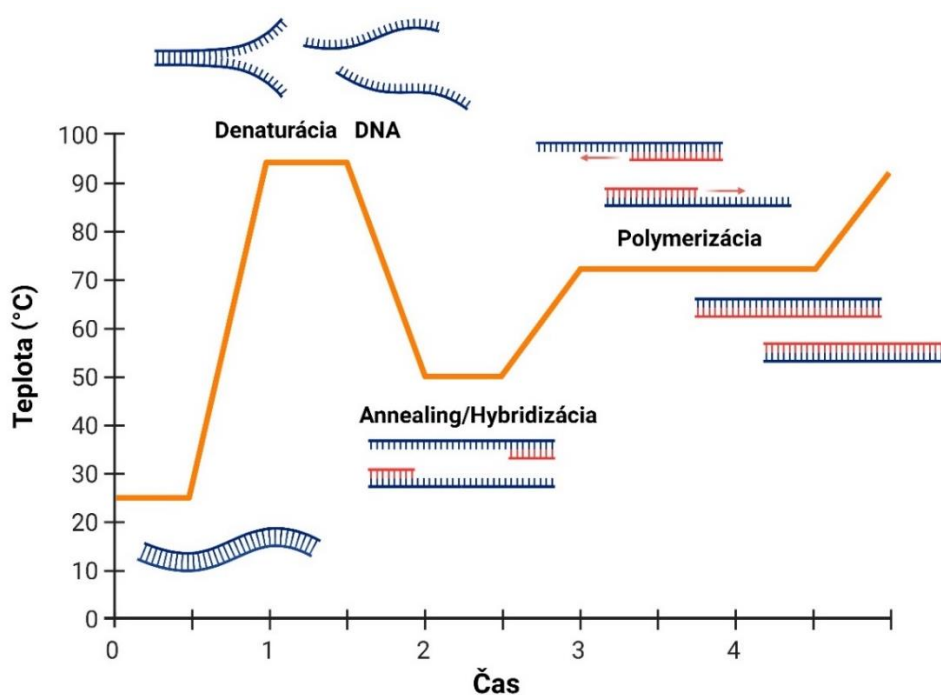
Princíp:

Princípom PCR je amplifikácia (replikácia) fragmentu nukleovej kyseliny, ktorý je ohraničený úsekom báz - primery. Tie sú komplementárne s génom, ktorý exprimuje sledované proteíny. Proces PCR pozostáva z troch nasledovných krokov, ktoré sa cyklicky opakujú (viz. Obr. 6).

1. Denaturácia: Dvojvláknová DNA, ktorá slúži ako templát k replikácii je spojená vodíkovými väzbami, ktoré nie sú pri vysokých teplotách stabilné. V tomto kroku je teplota v termo-cykleri 94 - 98 °C, čo spôsobí rozpojenie vlákien a vznik jednovláknovej DNA.

2. Hybridizácia: Prebieha pri teplote 50 - 65 °C. Primery, ktoré sú v reakčnej zmesi v nadbytku hybridizujú s komplementárnymi sekvenciami báz templátovej jednovláknovej DNA.

3. Polymerizácia: Teplota v tejto fáze je 72 - 80 °C a dochádza v nej k syntéze druhého vlákna. DNA polymeráza nasadá na primer a katalyzuje syntézu komplementárneho reťazca s jednovláknovým templátom (Kadri 2019).

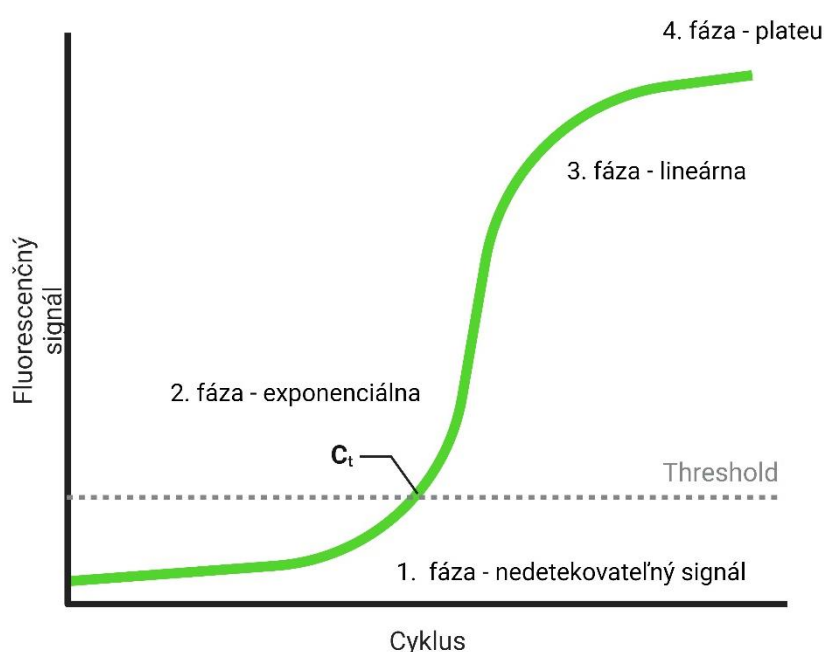


Obr. 6: cDNA sa pri zahrievaní vo vysokej teplote denaturuje na dve samostatné vlákna - denaturácia. Teplota sa zníži, na konce jednotlivých vlákien nasadajú primery, komplementárne s bázami na DNA - hybridizácia. V treťom kroku nastáva syntéza komplementárneho reťazca - polymerizácia (Kadri 2019). vytvorené v: BioRender.com

Génová expresia sa stanovuje pomocou kvantifikačnej PCR v reálnom čase (RT-qPCR, z angl. real time – quantitative polymerase chain reaction), pomocou ktorej vieme určiť relatívnu koncentráciu DNA v analyzovanom vzorku. Detekcia je založená na zachytávaní emitovaného fluorescenčného signálu, ktorý je úmerný s množstvom produktu vyprodukovaným počas jednotlivých cyklov. Kompletná syntéza trvá v závislosti od analýzy 20 - 40 cyklov.

V prvej fáze je množstvo DNA nízke, fluorescencia nepresahuje prah pozadia a teda nie je detekovateľná. Od určitého cyklu sa fluorescenčný signál dostane nad prah pozadia a je možná detekcia. V tejto fáze sa DNA replikuje exponenciálne, preto sa označuje aj ako exponenciálna. Nasleduje spomalenie syntézy - lineárna fáza, kedy je značná časť primerov a dNTPs spotrebovaná, a tomu zodpovedá aj znižujúce sa tempo amplifikácie. S ubúdajúcimi východiskovými zložkami sa reakcia dostáva do *plateu* fázy, kedy sa amplifikácia takmer zastaví (viz. Obr. 7) (Stephenson, 2016).

Amplifikačná krivka



Obr. 7: Amplifikačná krivka. C_t – cycle of threshold (Stephenson, 2016). vytvorené v: Biorender.com

Pre kvantifikáciu DNA sa používa hodnota C_t (z angl. cycle of threshold), ktorá odráža cyklus, v ktorom sa koncentrácia DNA dostala nad prah detekovateľnosti. Aby bolo možné jednotlivé vzorky porovnávať, je vybraná referenčná vzorka, na ktorú sa vzťahujú všetky vzorky za použitia nasledovného vzťahu: $\Delta C_t = C_{t_{\text{vzorka}}} - C_{t_{\text{referenčná vzorka}}}$. ΔC_t sa následne dosadí do vzorca $2^{\Delta C_t}$. Pre kvantifikáciu je obvykle použitý ako vnútorný štandard referenčný gén (tzv. housekeeping gene). Ako referenčné gény sa používajú gény, ktoré kódujú proteíny nevyhnutné pre zachovanie základných funkcií

v bunke a teda ich expresia by mala byť stabilná pri všetkých testovaných vzorkách. Pre výpočet sa používa nasledovný vzťah: $\Delta\Delta Ct = 2^{\Delta Ct_{\text{vzorka}}} / 2^{\Delta Ct_{\text{housekeeper}}}$.

Postup:

1. Každá vzorka cDNA s objemom 1 μl je napipetovaná do PCR doštičky za sebou, v triplicate. Takto sa napipetuje do troch radov (jedna rada pre referenčný gén a dve pre stanovované gény glukózových transportérov).

2. Následne sa k vzorkám napipetujú zložky reakčnej zmesi:

- TaqMan™ Fast Advanced Master Mix - 5 μl
- TaqMan™ génová expresná esej špecifická pre študovaný gén- 1,5 μl
- API voda – 3,5 μl

Po príprave zmesi sa doštička utesní fóliou.

3. Nastavenie RT-qPCR amplifikácie je nasledujúce: 95 °C 20 sek, potom 40 cyklov pri 95 °C na 1 sek, a 60 °C na 20 sek.

4. Po ukončení reakcie sa výsledky interpretujú pomocou Ct hodnôt oproti referenčnej vzorke a ΔCt sa dosadí do vzorca $2^{\Delta Ct}$. Nakoniec sa spočítané hodnoty všetkých vzoriek porovnajú s referenčným génom a dosadia sa do grafu.

5.2.4. Odber glukózy a inzulínu

Práca s laboratórnymi myšami bola realizovaná odborne vyškoleným personálom, v súlade s etickými zásadami. Myšiam bola odobratá glukóza a inzulín po celonočnom lačnení. Pre čo najvyššiu presnosť experimentu musia myši pochádzať z rovnakého kmeňa a musia mať rovnaké pohlavie, vek a zdravotný stav, aby bola metabolická homeostáza v skupine podobná a nevznikali veľké rozdiely v rámci skupiny (*Benedé-Ubieto et al., 2020*).

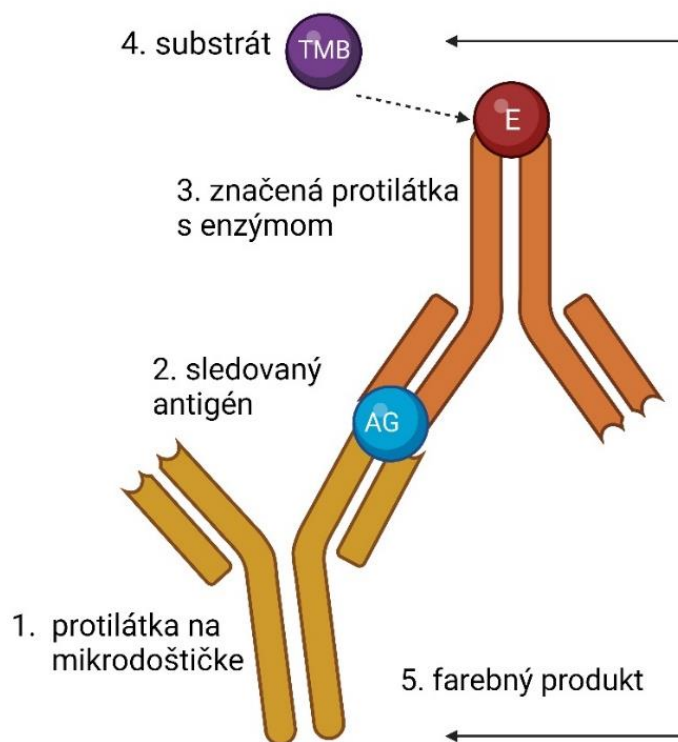
Postup:

1. Myši sa večer pred experimentom umiestnia do samostatných čistých klietok bez prístupu k potrave a s prístupom k pitnej vode.
2. Myši sa odstrihne kúsok z konca chvostíka, prvá kvapka krvi sa zlikviduje a ďalšia sa naberie na testovací prúžok glukometra a zmeria sa glukóza.
3. Následne sa do skúmavky odoberie krv na stanovenie inzulínu. Krv sa scentrifúguje a plazma sa zamrazí pre ďalšie stanovenie.

5.2.5 Enzýmová imuno-analýza

ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) je metóda na kvantitatívnu analýzu antigénov. Analýza je založená na špecifickej interakcii antigénu a protilátky. K jednej z týchto dvoch zložiek je naviazaný enzým, ktorý katalyzuje reakciu za vzniku farebného produktu, ktorý sa stanovuje spektrofotometricky alebo luminiscenčnou spektroskopiou. Koncentrácia produktu je priamo úmerná antigénu vo vzorke.

Existuje niekoľko variant ELISA podľa usporiadania jednotlivých komponentov: priama, nepriama, sendvičová a kompetitívna ELISA. My sme postupovali sendvičovou metódou, ktorej usporiadanie je nasledovné (viz. Obr. 8). Doštička má na dne jamiek naviazanú primárnu protilátku proti stanovovanému antigénu. Antigén sa na ňu naviaže a po vymytí je pridaná druhá - sekundárna protilátka, ktorá je značená a naviaže sa na antigén. Sekundárna protilátka je detekovateľná a vytvára farebný produkt, ktorý je spektrofotometricky vyhodnotený a jeho koncentrácia je úmerná so stanovovaným antigénom (*LabGuide*).



Obr. 8: Sendvičová ELISA. AG - antigén, E - enzým, TMB - 3,3',5,5'-tetrametylbenzidín (LabGuide), vytvorené v: Biorender.com

Postup:

1. Pred začatím analýzy sa kit vytiahne z chladničky, aby sa všetky chemikálie vytemperovali na laboratórnu teplotu.
2. Pufrom sa nariedi zásobný roztok konjugátu. Objem pufru predstavuje 10-násobok oproti objemu konjugátu (1 ml zásobného roztoku sa riedi 10 ml pufru).
3. Destilovanou vodou sa nariedi pufer k premývaniu. Destilovaná voda ide do roztoku v 20-násobku objemu pufru (20 ml pufru a 400 ml vody)
4. Pripravlia sa kontrolné roztoky, ktoré sú vo forme lyofilizátu a rozpustia sa príslušným množstvom vody. Objem vody, v ktorom by mal byť lyofilizát rekonštituovaný, je uvedený v každom kite v Certifikáte analýzy. Kontroly sa nechajú na 30 min odstáť. Pri použití musí byť kvapalina číra.

5. Do prvého stĺpca sa pipetuje kalibračná rada. Kalibračná rada musí byť na každej analyzovanej mikrodostičke. Keďže vzorky majú objem 5 µl, zvolia sa podľa výrobcu kitu štandardy o koncentrácii 0, 0,188 , 0,5 , 1,25 , 3,75 , 6,9 ng/ml a kontroly úrovne 2 a 3, a do ďalších jamiek sú napipetované analyzované vzorky.
6. Do každej jamky sa napipetuje 75 µl konjugátu, mikrodostička sa natesno uzavrie a nechá sa inkubovať 2 hod pri laboratórnej teplote, na trepačke mikrodostičiek nastavenej na 700 otáčok / min.
7. Po inkubácii sa zleje obsah mikrodostičky a 6-krát sa premyje pufrom na premývanie s objemom 350 µl. Medzi jednotlivými premytiami sa vždy mikrodostička obráti, aby sa obsah vylial a následne niekoľko krát poklepe o papierovú utierku. Po poslednom premytí je nutné dôkladne odstrániť zostatkový pufer.
8. Do každej jamky sa napipetuje 100 µl substrátu TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidín). Znova sa mikrodostička zakryje a nechá inkubovať v trepačke po dobu 30 min pri 700 otáčkach / min.
9. Do každej jamky sa napipetuje 100 µl STOP roztoku. Mikrodostičkou sa jemne poklepe, aby sa obsah premiešal a odstránili sa bubliny.
10. Farebný produkt sa vyhodnotí spektrofotometricky pri 450 nm. Zhotoví sa kalibračná krivka, z ktorej sa dopočítajú koncentrácie vzoriek. V prípade, že niektorá zo vzoriek mala vyššiu koncentráciu ako najviac koncentrovaný štandardný roztok, mala by sa daná vzorka nariediť štandardom s nulovou koncentráciou a zopakovať meranie.

Stanovený inzulín sa použil k určeniu indexu HOMA-IR pre zhodnotenie inzulínovej senzitivity, ktorý sa počíta podľa nasledujúceho vzorca: **HOMA-IR= (inzulín na lačno [µIU/ml] x glukóza na lačno [mmol/l]) /22,5**. Číslo v menovateli – 22,5 predstavuje normalizačný faktor, ktorý zohľadňuje ideálnu hodnotu glykémie (4,5 mmol/l) a inzulínu (5 µIU/ml) nalačno. To znamená, že ideálna

hodnota u ľudí je HOMA-IR = 1,0. Za uspokojivú inzulínovú citlivosť sa považujú hodnoty do 2,0.

Inzulín sa prevedie z jednotiek SI na IU. Vzťah, ktorý platí: 1 μ IU/ml = 26 IU/mg (vzťah prevzatý z *Biovendor (2018)* z protokolu pre analýzu myšieho inzulínu pomocou ELISA). Výsledky sa následne spracujú graficky a porovnajú s kontrolnou skupinou.

5.2.4. Štatistická analýza

Pre štatistickú analýzu sme použili nepárový dvojitýberový t-test pomocou softwaru GraphPad Prism verzia 9.3. $p < 0.05$ (značená ako *) je považované ako medze štatistickej významnosti vo všetkých experimentoch, $p < 0.01$ je značené ako **, $p < 0.0001$ je značené ako ****.

6. VÝSLEDKY PRÁCE

6.1. Optimalizácia izolácie RNA z tukového tkaniva myší

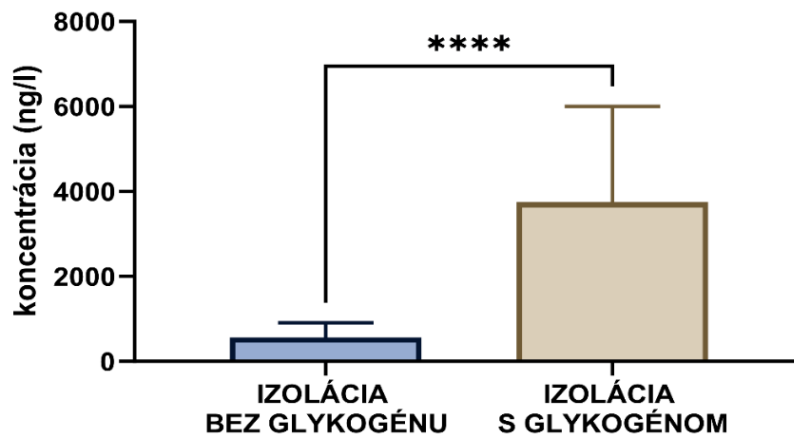
K izolácii RNA bolo použité tkanivo zo skupiny myší na MASH diéte. Tuk predstavuje problém pri izolácii nukleových kyselín. Znižuje výslednú výťažnosť a čistotu. Čistota RNA z tkanív myší na MASH diéte bola významne nižšia v porovnaní s RNA izolovanou z tkanív na chovnej diéte. Preto bola zvolená stratégia odstránenia tuku pred izoláciou a pridanie glykogénu.

Vzorky sa po homogenizácii v Trizole scentrifúgovali na 12000 g, pri teplote 4 °C, po dobu 10 min, čo viedlo k separácii tukovej a vodnej fázy. Vodná fáza obsahujúca RNA bola prepipetovaná do čistých skúmaviek a pokračovalo sa v protokole bežnej izolácie metódou fenol/chloroform (viz. kapitola 5.2.1.).

Celkom sa izolovalo 24 vzoriek bez glykogénu a 24 s glykogénom. V prvej sade vzoriek sa nepodarilo izolovať RNA v dostatočnej koncentrácii a kvalite. Hlavným problémom bola nedostatočná precipitácia RNA počas izolácie, resp. tvorba priehľadnej pelety, čo následne komplikovalo čistenie RNA pomocou etanolu.

Do druhej sady vzoriek bol pridaný glykogén pre zlepšenie precipitácie RNA. Prídavok glykogénu viedol k tvorbe bielej pelety, čo v dôsledku znamenalo významné zvýšenie koncentrácie (viz. Obrázok 9). Vzorky bez glykogénu mali priemernú koncentráciu **564,26 ng/ml** oproti vzorkám, kde bol pridaný glykogén – **3745,14 ng/ml**.

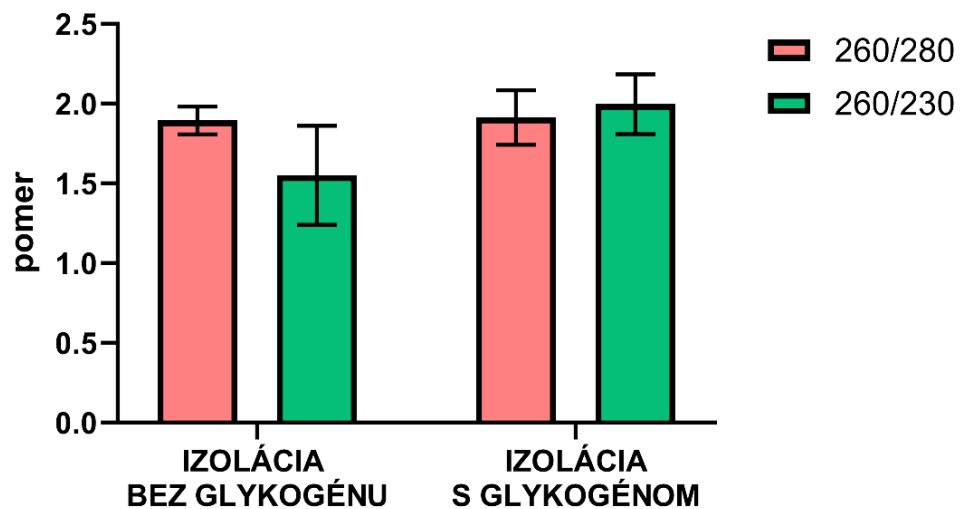
KONCENTRÁCIA RNA



Obr.9: Hodnotenie koncentrácie RNA s a bez použitia glykogénu

Zlepšila sa aj kvalita (viz. Obrázok 10). V prvej sade vzoriek predstavovala – $A_{260}/_{280} = 1,89$ a $A_{260}/_{230} = 1,55$. V druhej sade sa podarili vzorky vo vyššej kvalite – $A_{260}/_{280} = 1,91$ a $A_{260}/_{230} = 2,00$.

ČISTOTA RNA



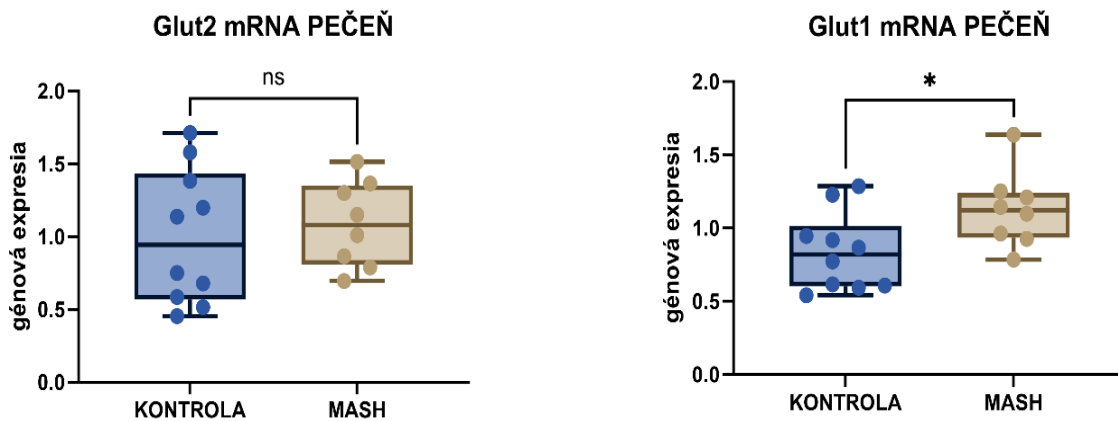
Obrázok 10: Hodnotenie čistoty RNA bez glykogénu a s pridaním glykogénu

6.2. Výsledky expresie glukózových transportérov

Pomocou RT-qPCR bola analyzovaná expresia transportérov Glut1, Glut2, Glut4 a Sglt1 v tkanivách: pečeň, tenké črevo, tukové tkanivo. Tkanivá pochádzali z myši na MASH diéte a ako kontrolná skupina boli použité tkanivá z myši na štandardnej chovnej diéte.

Pečeň

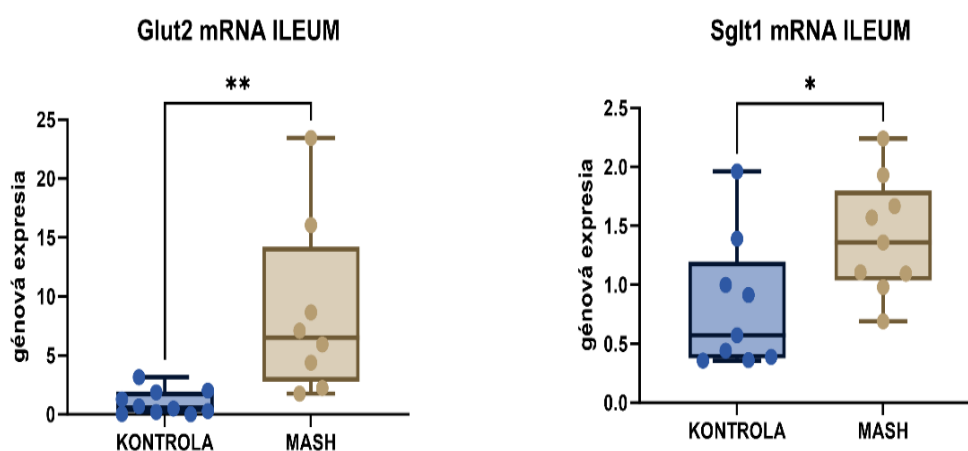
GLUT2 je najvýznamnejším transportérom glukózy v pečeni. Pri rastúcej záťaži na absorpciu glukózy do obehu, v prípadoch ako je MASH, DM2 a inzulínová rezistencia rastie aj význam transportéru GLUT1. V prípade GLUT1 sa zvyšuje expresia pri spomenutých stavoch. U myši na MASH diéte nedošlo k zvýšeniu expresie Glut2 transportéru oproti kontrolnej skupine na normálnej diéte (viz. Obr. 11). mRNA (z angl. messenger ribonucleic acid) Glut1 transportéru bola zvýšená u myši na MASH diéte (viz. Obr. 9), čo koreluje so zvýšenou koncentráciou glukózy v krvnom obehu.



Obr. 11 : Grafické spracovanie výsledkov expresie transportérov Glut2 a Glut1 v pečeni u myši na MASH diéte a na chovnej diéte. mRNA bola u Glut1 zvýšená, u Glut2 takmer bez zmeny.

Tenké črevo (ileum)

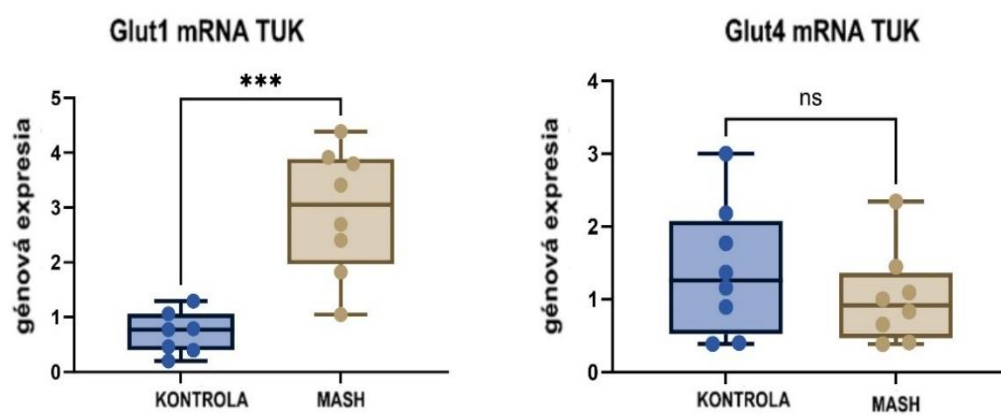
SGLT1 je transportér, ktorý sa uplatňuje hlavne v období hladovania, kedy prebieha absorpcia glukózy proti koncentračnému gradientu. Postprandiálne jeho úlohu preberá vo vysokej miere GLUT2. Pri zvýšenom príjme glukózy vzrastajú nároky na absorpčnú kapacitu, čo má za následok zvýšenie expresie jednotlivých transportérov na membráne enterocytu. To dokazujú aj výsledky z RT-qPCR, kedy bola zistená zvýšená mRNA transportéru Glut2 a Sgl1 u myši na MASH diéte (viz. Obr. 12).



Obr. 12 : Grafické spracovanie výsledkov expresie transportérov *Glut2* a *Sgl1* v tenkom čreve u myši na MASH diéte a na chovnej diéte. mRNA obidvoch transportérov, *Glut2* a *Sgl1* bola zvýšená.

Tukové tkanivo

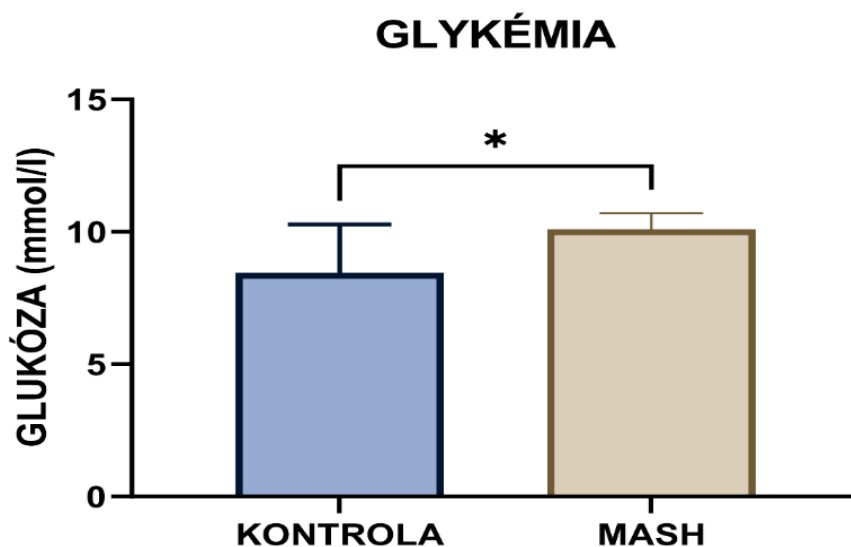
V tukovom tkanive je glukóza prenášaná prevažne za účasti GLUT1 a GLUT4 transportéru. Vysoký kalorický príjem indukuje zvýšený tok glukózy do tukového tkaniva, v ktorom je zároveň prítomná aj inzulínová rezistencia, na čo reagujú aj transkripčné mechanizmy, ktoré inhibujú na inzulíne závislý GLUT4 a naopak indukujú expresiu GLUT1. Potvrdzujú to aj výsledky RT-qPCR, pretože mRNA *Glut1* bola zvýšená a mRNA *Glut4* transportéru bola oproti kontrole v nižšom zastúpení (viz. Obr.13).



Obr. 13 : Grafické spracovanie výsledkov expresie transportérov *Glut1* a *Glut4* v tukovom tkanive u myši na MASH diéte a na chovnej diéte.

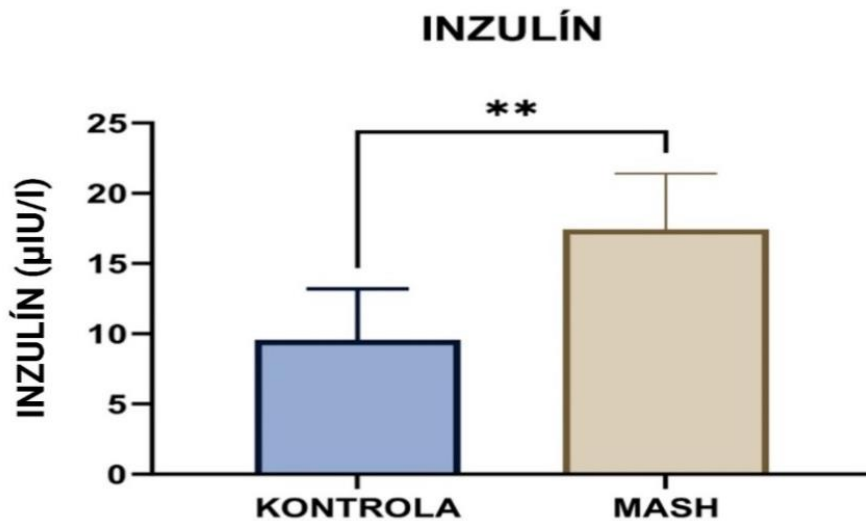
6.3. Hodnotenie glukózovej tolerancie

Glukózová tolerancia sa vyhodnocuje viacerými spôsobmi. V tejto práci prebehlo stanovenie inzulínu a glukózy nalačno a výpočet HOMA-IR. Dokázali sme, že u myši na MASH diéte je glukózová tolerancia a inzulínová senzitivita znížená, čomu nasvedčovali všetky tri zvolené parametre, ktoré boli oproti kontrolnej skupine významne zvýšené. Glykémia nalačno bola u myši na chovnej diéte **8,5 mmol/l** a u myši na MASH diéte **10,1 mmol/l** (viz. Obr. 15).



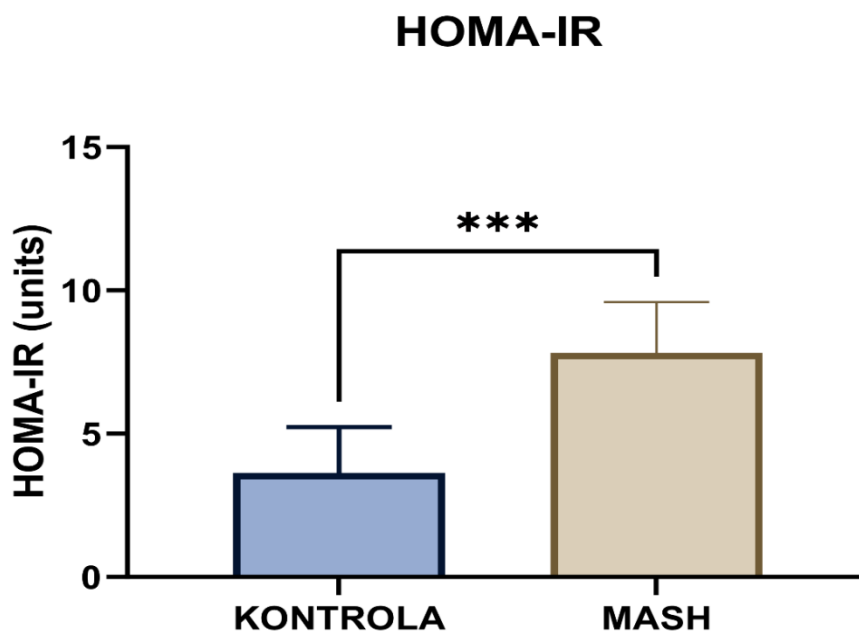
Obr. 15: Glykémia nalačno. U myši na MASH diéte je glykémia vyššia oproti kontrolnej skupine.

Koncentrácia inzulínu nalačno bola pri kontrolnej skupiny stanovená v priemere na **8,64 μ IU/ml** a v skupine na MASH diéte na **15,76 μ IU/ml** (viz. Obr. 14). Koncentrácia inzulínu počas analýzy bola stanovená v jednotkách ng/ml. Graficky sa interpretoval po prevedení na μ IU/ml.



Obr. 16: Inzulín nalačno. U myši na MASH diéte je koncentrácia inzulínu vyššia oproti kontrolnej skupine

Index HOMA-IR vyšiel u kontrolnej skupiny na chovnej diéte **3,29** a u MASH skupiny **7,07** (viz. Obr. 17). To znamená, že inzulínová senzitivita bola podstatne znížená u myši na MASH diéte.



Obr. 15: Index HOMA-IR. Hodnota HOMA-IR bola u myši na MASH diéte výrazne vyššia v porovnaní s kontrolou

7. DISKUSIA

MAFLD a MASH ako manifestácie metabolického syndrómu v pečeni sú stavy, ktoré sa prejavujú na začiatku steatózou, ktorá po rokoch môže progredovať do fibrózy pečene a v najhoršom prípade až do cirhózy alebo HCC. Rozvoj MAFLD je spojený s inzulínovou rezistenciou a porucha glukózovej homeostázy, ktorá je následkom zníženej citlivosti tkanív na inzulín, je podnetom pre akumuláciu lipidov v pečeni z dôvodu odklonenia metabolizmu makronutrientov smerom k lipogenéze (*Machado a Diehl 2016*). Počas dlhodobej, neriešenej MAFLD dochádza k chemotaxii mediátorov fibrogenézy a zápalu a rozvíja sa MASH (*Sakurai et al. 2021*).

Mechanizmy, ktoré majú celý proces na svedomí sú stále predmetom mnohých výskumov, jednak z hľadiska pochopenia patogenézy, ale aj pre skúmanie bunkových štruktúr ako potenciálnych terapeutických cieľov. Téma MAFLD je veľmi komplexná a netýka sa len výskumov na molekulárnej úrovni. Výskum smeruje aj k lepšej diagnostike a prevencii ochorenia.

Prvým cieľom v mojej práci bolo optimalizovať izoláciu RNA z tukového tkaniva. Izolácia z tkanív je problémová. Tkanivá obsahujú kontaminanty ako tuk, proteíny, molekuly ECM, alebo je problém s malým obsahom buniek. Tukové tkanivo má problém s vysokým podielom tuku, takisto aj s malým obsahom buniek. Týmto faktorom treba prispôbiť postup izolácie tak, aby mal výsledný produkt vhodné kvantitatívne a kvalitatívne parametre pre ďalšie metódy. Hlavným cieľom bolo porovnať izoláciu bez glykogénu a s pridaním glykogénu. Následná spektrofotometrická analýza dokázala, že glykogén zlepšuje výťažnosť, ale aj čistotu. Spôsobov, ako zlepšiť kvalitu RNA z tkanív, je viac. Glykogén funguje ako nosič, ktorý sa viaže na RNA, zlepšuje precipitáciu a zviditeľňuje peletu tým, že je nerozpustný v etanole.

Zhang H. et al. (2023) optimalizovali izoláciu RNA z tuku tým, že tkanivá homogenizovali zachladené tekutým dusíkom na $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Centrifugácia v prvom kroku bola rozdelená na 2-krát po 5 minút, v niektorých krokoch prebiehala na 16000 g. Ďalší postup bola klasická fenol/chloroformová extrakcia bez použitia glykogénu. Nakoniec precipitovanú peletu trikrát premyli v etanole a resuspendovali. Nízka teplota znižuje degradabilitu RNA a vyššia relatívna centrifugačná sila zabezpečí lepšie oddelenie fáz,

a teda nižšiu kontamináciu vrchnej fázy fenolmi. Pri porovnaní výsledkov z článku a z mojej práce je vidieť, že prídavok glykogénu zabezpečil oveľa vyššiu výťažnosť oproti postupu autorov (aj keď nie je uvedený presný objem vody ani objem odpipetovanej vodnej fázy, dá sa predpokladať, že keď autori pracovali s rovnakými objemami reagentii, odber RNA bol v zhruba podobnom objeme). Čo sa čistoty týka, taktiež sa ako schopnejší ukázal glykogén. Izolácia RNA má mnoho premenných (ľudský faktor, množstvo a kvalita biologického materiálu), ktoré vplyvajú na výslednú kvalitu vzoriek, takže sa nedá jednoznačne dokázať, ktorý spôsob je výhodnejší.

Ďalšou časťou mojej práce bolo stanovenie expresie transportérov glukózy Glut1, Glut2, Glut4 a Sgl1 v tkanive tenkého čreva, pečene a tuku myši. Strava s vysokým obsahom tuku a jednoduchých cukrov spôsobuje zmeny vo fyziologických funkciách metabolizmu. Následkom zníženej glukózovej tolerancie a inzulínovej senzitivity je aj ovplyvnenie expresie glukózových transportérov. Transportéry pre glukózu sú intenzívne študované, pretože predstavujú potenciálne terapeutické ciele pre terapiu nielen MAFLD, ale aj DM2. Látky, ktoré inhibujú SGLT1 sú potenciálnymi antidiabetickými liečivami (*Io et al. 2019*). Inhibícia GLUT1 je skúmaná skôr z hľadiska protinádorovej terapie (*Airley a Mobasheri 2007*), než antidiabetickej, ale GLUT4 je solídny adept v terapii DM2. V stavoch so zníženou inzulínovou senzitivitou je expresia GLUT4 znížená. Stimulácia expresie vyvoláva lepšiu glukózovú toleranciu (*Wallberg-Henriksson a Zierath 2001*).

V pečeni myši na diéte MASH bola indukovaná expresia Glut1 transportéru, Glut2 bol takmer bez zmeny. To sa takmer zhoduje aj s tým, na čo prišli *Karim et al. (2014)*. Na ľudských tkanivách sledovali expresiu GLUT transportérov v pečeni. GLUT1 vykazoval vysokú mieru expresie oproti zdravej pečeni a expresia GLUT2 sa takmer nepohla. V tenkom čreve bola u myši na MASH diéte zvýšená mRNA obidvoch transportérov - Glut2 a Sgl1. Moje zistenia sa zhodujú s doterajšími poznatkami o tom, že zvýšený príjem D-glukózy ovplyvňuje mieru expresie glukózových transportérov v tenkom čreve. *Miyamoto et al. (1993)* v publikácii o vplyve príjmu jednoduchých cukrov na expresiu transportérov došli k rovnakému záveru. Tukové tkanivo vykrmovaných myši vykazovalo zvýšenú expresiu Glut1 a zníženú expresiu Glut4. Závery publikácií ohľadom expresie Glut v tukovom tkanive vychádzajú rovnako pre Glut4, teda je pozorované zníženie expresie. Glut1 vyšiel v publikácii *Pedersen et*

al. (1991) s opačným výsledkom. Potkany na diéte s vysokým obsahom tuku mali zníženú expresiu obidvoch transportérov. Tento rozdiel by mohol byť spôsobený rozličnou potravou laboratórnych zvierat. Spomínaná vysokotučná diéta nemusela zahŕňať aj zvýšený príjem sacharidov, takže nároky na transport glukózy mohli byť splnené aj pri nízkej expresii Glut1.

Diagnostika MAFLD a MASH je komplikovaná, pretože tuková pečeň sa neprejavuje takmer žiadnymi symptómami a povedomie o prevencii je nízke. Nie je veľa materiálov, ktoré by sa dostali do rúk praktických lekárov, aj keď existuje niekoľko hodnotiacich systémov, ktoré využívajú jednoducho získateľné dáta, sú relatívne spoľahlivé a málo nákladné (*Szántová et al. 2022*). Poslednou časťou mojej práce bolo porovnať toleranciu glukózovej záťaže u myši na MASH diéte pomocou indexu HOMA-IR. HOMA-IR sa počítalo na základe glykémie nalačno a inzulínémie nalačno. V porovnaní s prácou publikovanou autormi *Fraulob et al. (2010)*, sa údaje celkom zhodovali. Podarilo sa potvrdiť, že vysokotučná diéta zhoršuje toleranciu na glukózovú záťaž. Zvýšená bola glykémia aj inzulínemia nalačno. V článku, aj v mojej práci, mali myši nalačno glukózu a inzulín vyšší oproti kontrolnej skupine. Tým pádom boli porovnateľné aj indexy HOMA-IR. V mojej práci je HOMA-IR do 10, v článku bol 44-100. Je to tým, že *Fraulob et al. (2010)* použili pre inzulín jednotky molárnej koncentrácie (pmol/l). Prepočet medzi je SI jednotkami a medzinárodnými - IU bolo komplikované vyhľadať, navyše sa zdroje rozchádzali v tom, či je tento výpočet relevantný u zvieracích modelov. Každopádne s určitosťou sa podľa vypočítaného HOMA-IR dá povedať, že glukózová tolerancia bola u MASH skupiny narušená. Nejde však určiť, či mala glukózovú toleranciu kontrolná skupina v norme. Glykémia nalačno bola vyššia než fyziologické rozmedzie, inzulín podľa použitého výpočtu tiež, ale dôvodom pre vyššie hodnoty nemusí byť *prediabetes*. Vyššiu glykémiu mohol spôsobiť stres, narušený režim a zmena cirkadiálneho rytmu pred testom.

8. ZÁVER

Metabolický syndróm je súbor ochorení, ktoré vznikajú ako následok obezity a dlhodobého kalorického nadbytku. V dnešnej konzumnej dobe, kedy jedlo neslúži len ako prostriedok prežitia, sa čoraz viac stretávame s nadváhou a zdravotnými komplikáciami, ktoré s ňou súvisia. Jednou z diagnóz, ku ktorej sa dá nezdravým životným štýlom dopracovať je MAFLD. MAFLD je charakterizovaná zvýšenou utilizáciou tuku v pečeni a spravidla je sprevádzaná inzulínovou rezistenciou, ktorá negatívne ovplyvňuje glukózovú homeostázu. V mojej práci som sa konkrétne venovala charakterizácii expresie glukózových transportérov, ktorých produkcia je vplyvom diéty pozmenená. Druhá časť mojej práce pozostávala z porovnania glukózovej tolerancie myši na MASH diéte, a to za pomoci diagnostického indexu HOMA-IR, ktorý slúži ako jeden z prostriedkov pre odhalenie inzulínovej rezistencie.

Prvým čiastkovým cieľom bolo optimalizovať izoláciu RNA z tukového tkaniva, čo sa podarilo splniť. Ukázalo sa, že glykogén je kľúčovým prídavkom v izolácii RNA z problematických tkanív a zlepšil kvalitatívne aj kvantitatívne parametre izolovaných vzoriek.

V druhej časti mojej práce som pomocou RT-qPCR stanovila mRNA glukózových transportérov v tkanivách pečene, tenkého čreva (*ileum*) a tuku. Porovnávala som expresiu u myši na MASH diéte oproti myšiam kŕmených štandardnou chovnou diétou. Expresia glukózových transportérov tak bola stanovená v súlade s doterajšími poznatkami, jedinou odchýlku predstavoval transportér Glut1 v tukovom tkanive.

Posledným cieľom bolo porovnanie glukózovej tolerancie u myši kŕmených na MASH diéte s kontrolnou skupinou na chovnej diéte, a to na základe glykémie a inzulínémie. Z týchto hodnôt som vypočítala index HOMA-IR. Výsledok vyšiel tak, ako sa očakávalo, teda že strava s vysokým obsahom tuku a cukrov zhoršuje glukózovú homeostázu.

9. ZOZNAM LITERATÚRY

Adeva-Andany María M, Pérez-Felpete N, Fernández-Fernández C, Donapetry-García C, Pazos-García C. Liver glucose metabolism in humans. *Bioscience Reports*. 2016 Nov 29;36(6).

Airley RE, Mobasher A. Hypoxic Regulation of Glucose Transport, Anaerobic Metabolism and Angiogenesis in Cancer: Novel Pathways and Targets for Anticancer Therapeutics. *Chemotherapy*. 2007;53(4):233–56.

Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*. 2004 Jul 1;17(3):183–90.

Basaranoglu M, Basaranoglu G, Bugianesi E. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*. 2015 Apr 1;4(2):109–16.

Benedé-Ubieto R, Estévez-Vázquez O, Ramadori P, Cubero FJ, Nevzorova YA. Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2020 Feb 18;13:439–50.

Boursier J, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*. 2016 Jan 13;63(3):764–75.

Chadt A, Al-Hasani H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2020 Jun 26;472(9):1273–98.

Chandel NS. Carbohydrate Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2021 Jan;13(1):a040568.

Chen J, Vitetta L. Gut Microbiota Metabolites in NAFLD Pathogenesis and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Jul 23;21(15):5214.

Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metabolism Reviews*. 2017 Mar 17;49(2):197–211.

Deng D, Yan N. GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters. *Protein Science*. 2016 Jan 4;25(3):546–58.

Dvořák K et al. The prevalence of nonalcoholic liver steatosis in patients with type 2 diabetes mellitus in the Czech Republic. *Biomedical Papers*. 2015 Sep 30;159(3):442

Fabbrini E, et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Aug 24;106(36):15430–5.

Farooqui N, Elhence A, Shalimar. A Current Understanding of Bile Acids in Chronic Liver Disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2022 Jan;12(1):155–73.

Fraulob, et al. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* vol. 46,3 (2010): 212-23.

Frank Harold Stephenson. Chapter 9. In: Frank Harold Stephenson. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory*. Edition Third. Academic Press; 2016. ISBN: 9780123756916

Gromova LV, Fetissov SO, Gruzdkov AA. Mechanisms of Glucose Absorption in the Small Intestine in Health and Metabolic Diseases and Their Role in Appetite Regulation. *Nutrients*. 2021 Jul 20;13(7):2474.

Guertin DA, Sabatini DM. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*. 2007 Jul;12(1):9–22.

Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of Glucose Metabolism from a liver-centric Perspective. *Experimental & Molecular Medicine*. 2016 Mar;48(3):e218–8.

Holman GD. Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2020 Jun 26;472(9):1155–75.

Hummel CS, Lu C, Loo DDF, Hirayama BA, Voss AA, Wright EM. Glucose transport by human renal Na⁺/d-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2011 Jan;300(1):C14–21.

Im SS, et al. Glucose-Stimulated Upregulation of GLUT2 Gene Is Mediated by Sterol Response Element–Binding Protein-1c in the Hepatocytes. *Diabetes*. 2005 Jun 1;54(6):1684–91.

Io F, et al. SGL5213, a novel and potent intestinal SGLT1 inhibitor, suppresses intestinal glucose absorption and enhances plasma GLP-1 and GLP-2 secretion in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2019 Mar;

Jonas W, Schürmann A. Genetic and epigenetic factors determining NAFLD risk. *Molecular Metabolism*. 2020 Nov;50(3):101111.

Kadri K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Perspectives on Polymerase Chain Reaction* [Internet]. 2019 Jun 7; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/67558>

Kasper P et al. NAFLD and Cardiovascular Diseases: A Clinical Review. *Clinical Research in Cardiology: Official Journal of the German Cardiac Society*, 21 July 2020, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8238775/>

Karim S, Adams DH, Lalor PF. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World Journal of Gastroenterology*. 2012 Dec 14;18(46):6771–81.

Karim S, et al. Dysregulated hepatic expression of glucose transporters in chronic disease: contribution of semicarbazide-sensitive amine oxidase to hepatic glucose uptake.” *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* vol. 307,12 (2014): G1180-90.

Kaya E, Yilmaz Y. Metabolic-associated Fatty Liver Disease (MAFLD): A Multi-systemic Disease Beyond the Liver. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2021 Oct 19;10(2):329–38.

Koepsell H. Glucose transporters in the small intestine in health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2020 Aug 23;472(9):1207–48.

Kozlitina J, et al. Exome-Wide Association Study Identifies a TM6SF2 Variant That Confers Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nature Genetics*. vol. 46, no. 4. 16 Feb. 2014. pp. 352–356.

Liu S et al. Association between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Extrahepatic Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lipids in Health and Disease*, vol. 19, no. 1, 31 May 2020

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*. 2007 Jan 2;117(1):175–84.

Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016 Jun;150(8):1769–77.

Mantovani A, Dalbeni A. Treatments for NAFLD: State of Art. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Feb 26;22(5):2350.

Martín MG, Wang J, R. Sergio Solórzano-Vargas, Lam JT, Turk E, Wright EM. Regulation of the human Na⁺-glucose cotransporter gene, *SGLT1*, by HNF-1 and Sp1. *American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000 Apr 1;278(4):G591–603.

Marušić M, Paić M, Knobloch M, Liberati Pršo AM. NAFLD, Insulin Resistance, and Diabetes Mellitus Type 2. Filipović B, editor. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2021 Feb 17;2021:1–9.

Miyamoto K, et al. Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars. *The Biochemical Journal*. 1993 Oct 1. 295(Pt1):211–5.

Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34(2-3):121–38.

Pappenheimer JR. Paracellular intestinal absorption of glucose, creatinine, and mannitol in normal animals: relation to body size. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1990 Aug 1;259(2):G290–9.

Park SY, Gautier JF, Chon S. Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2021 Sep 30;45(5):641–54.

Pedersen O, Kahn CR, Flier JS, Kahn BB. High Fat Feeding Causes Insulin Resistance and a Marked Decrease in the Expression of Glucose Transporters (Glut 4) in Fat Cells of Rats. *Endocrinology*. 1991 Aug;129(2):771–7.

Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*. 2018 Oct;98(4):2133–223.

Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells*. 2020 Apr 17;9(4).

Pouwels S, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *BMC Endocrine Disorders*. 2022 Mar 14;22(1).

Romeo S et al. Genetic Variation in PNPLA3 Confers Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nature Genetics*, vol. 40, no. 12, 25 Sept. 2008, pp. 1461–1465

Rotman Y, Sanyal AJ. Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2017 Jan 1;66(1):180-90.

Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic Regulation of Glucose Homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*. 2016 Mar 11;48(3):1–19.

Rui L. Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*. 2014 Jan 10;4(1):177–97.

Sakurai Y, Kubota N, Yamauchi T, Kadowaki T. Role of Insulin Resistance in MAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Apr 16;22(8):4156.

Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metabolism*. 2018 Jan;27(1):22–41.

Seino Y, Fukushima M, Yabe D. GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. *Journal of Diabetes Investigation*. 2010 Feb;1(1-2):8–23.

Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Jun 1;121(6):2094–101.

Szántová M, et al. Skrining MAFLD v reálnej praxi na Slovensku: štúdia SIRIUS. *Diabetes a Obezita*. 2022; 22(44): 109-124

Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *The Journal of Cell Biology*. 2018 Apr 5;217(7):2273–89.

Torre P, Benedetta Maria Motta, Sciorio R, Masarone M, Persico M. Inflammation and Fibrogenesis in MAFLD: Role of the Hepatic Immune System. *Frontiers in Medicine*. 2021 Dec 9;8.

Wallberg-Henriksson H, R. Zierath J. GLUT4: a key player regulating glucose homeostasis? Insights from transgenic and knockout mice. *Molecular Membrane Biology*. 2001 Jan;18(3):205–11.

Woreta TA, et al. Validation of the accuracy of the FAST™ score for detecting patients with at-risk nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in a North American cohort and comparison to other non-invasive algorithms. Strnad P, editor. *PLOS ONE*. 2022 Apr 15;17(4):e0266859.

Wright EM, Loo DDF, Hirayama BA. Biology of Human Sodium Glucose Transporters. *Physiological Reviews*. 2011 Apr;91(2):733–94.

Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver disease-Meta-analytic Assessment of prevalence, incidence, and Outcomes. *Hepatology*. 2016 Feb 22;64(1):73–84.

Zeigerer A, Sekar R, Kleinert M, Nason S, Habegger KM, Müller TD. Glucagon's Metabolic Action in Health and Disease. *Comprehensive Physiology*. 2021 Apr 1;11(2):1759–83.

Zhang CY, Yuan WG, He P, Lei JH, Wang CX. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(48):10512.

Zhang, Hongwei, Yaoming Liu, Bingcheng Yu, Rong Lu. An optimized TRIzol-based method for isolating RNA from adipose tissue. *BioTechniques* vol. 74,5 (2023): 203-209.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

Biovendor, 2018. LBIS Mouse Insulin ELISA Kit (RTU). In: biovendor.com. [Internet]. Available from: [https://www.biovendor.com/file/6136/1-RSHAKRIN-011RUR%20Mouse%20Insulin%20ELISA%20Kit%20\(RTU\)%20ENG.002.A.pdf](https://www.biovendor.com/file/6136/1-RSHAKRIN-011RUR%20Mouse%20Insulin%20ELISA%20Kit%20(RTU)%20ENG.002.A.pdf)

LabGuide. Imunologické metody. In: labguide.cz [Internet]. Available from: <https://labguide.cz/imunologicke-metody/>

Martinka E et al. Interdisciplinárne odporúčania pre diagnostiku a liečbu diabetes mellitus, jeho komplikácií a najvýznamnejších sprievodných ochorení. Slovenská diabetologická asociácia. Sept. 2021. Available from: www.prolekare.cz/casopisy/forum-diabetologicum/2021-supplementum-2-2/download?hl=cs.

Subhanová, I. ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY 1. LF UK Spektrofotometrie Praktické cvičení z lékařské biochemie [Internet]. 2022 Available from: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/5360/uvod.pdf>