

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Studium mechanismů hepatotoxických a hepatoprotektivních účinků na  
modelově poškozených hepatocytech**

**Alena Moravcová**

**Autoreferát disertační práce**  
**Doktorský studijní program: Fyziologie a patologická fyziologie**

**Hradec Králové**

**2021**

---

Disertační práce byla vypracována v rámci ~~prezenčního~~/kombinovaného studia doktorského studijního programu Fyziologie a patologická fyziologie na Ústavu Fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Alena Moravcová; Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Školitel: doc. MUDr. Halka Lotková, Ph.D.; Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponenti: doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.; Ústav farmakologie, 2. LF UK  
prof. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.; Katedra biologických a biochemických věd, FChT, Univerzita Pardubice

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR ..... dne ..... v ..... od ..... hod.  
(bude doplněno po vyhlášení termínu, místa a času)

Tato práce vznikla za podpory grantu PRVOUK P37/02 a grantu Vnitřní soutěže LF UK v HK s podporou firmy Roche 2012.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

.....  
Titul, jméno, příjmení  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Fyziologie a patologická fyziologie  
Garant studijního program

# 1. OBSAH

<b>1. OBSAH</b> .....	<b>1</b>
<b>2. SOUHRN</b> .....	<b>3</b>
<b>3. SUMMARY</b> .....	<b>4</b>
<b>4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY</b> .....	<b>5</b>
4.1. Jaterní poškození .....	5
4.2. Hepatoprotektiva.....	5
4.3. Využití hepatocytů pro modelové systémy v <i>in vitro</i> podmínkách.....	5
<b>5. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>6</b>
5.1. Porovnání kultivace primárních hepatocytů v <i>monolayeru</i> a v sendvičovém uspořádání .....	6
5.2. Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové ...	6
5.3. Hodnocení protektivního účinku EGCG na hepatocyty v primární kultuře modelově poškozené D-galaktosaminem .....	6
5.4. Hodnocení citlivosti primární kultury hepatocytů s prostou steatózou navozenou mastnými kyselinami na toxické poškození D-galaktosaminem .....	6
5.5. Hodnocení potenciálního protektivního účinku EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity indukovaný mastnými kyselinami v primární kultuře hepatocytů.....	6
<b>6. MATERIÁL A METODIKY</b> .....	<b>6</b>
6.1. Zhotovení primární kultury hepatocytů v <i>monolayeru</i> a v sendviči:.....	6
6.2. Biochemická stanovení.....	7
6.3. Mikroskopické hodnocení buněk a speciální barvení .....	7
6.4. Statistické hodnocení dat .....	8
<b>7. VÝSLEDKY</b> .....	<b>8</b>
7.1. Porovnání kultivace primárních hepatocytů v <i>monolayeru</i> a v sendvičovém uspořádání .....	8
7.2. Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové ...	9
7.3. Hodnocení protektivního účinku EGCG na hepatocyty v primární kultuře modelově poškozené D-galaktosaminem .....	11
7.4. Hodnocení citlivosti primární kultury hepatocytů s prostou steatózou navozenou mastnými kyselinami na toxické poškození D-galaktosaminem .....	12
7.5. Hodnocení potenciálního protektivního účinku EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity indukovaný mastnými kyselinami v primární kultuře hepatocytů.....	14
<b>8. DISKUSE A ZÁVĚRY</b> .....	<b>16</b>
8.1. Porovnání kultivace primárních hepatocytů v <i>monolayeru</i> a v sendvičovém uspořádání .....	16
8.2. Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové .	17

8.3. Hodnocení protektivního účinku EGCG na potkaní hepatocyty v primární kultuře modelově poškozené D-galaktosaminem .....	19
8.4. Hodnocení citlivosti primární kultury hepatocytů s prostou steatózou navozenou mastnými kyselinami na toxické poškození D-galaktosaminem .....	20
8.5. Hodnocení potenciálního protektivního účinku EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity indukovaný mastnými kyselinami v primární kultuře hepatocytů .....	21
<b>9. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
<b>10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI .....</b>	<b>26</b>

## 2. SOUHRN

Poškození jater má rozmanitou škálu příčin, mechanismy poškození však mohou být společné. Nejčastěji dochází k indukci oxidačního stresu v buňce či k přímému poškození důležitých organel. To vede ke smrti buněk, iniciaci zánětlivé reakce a rozvoji fibrózy. Problémem západní civilizace je nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD – *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*). Steatotické hepatocyty mohou vykazovat vyšší senzitivitu k poškození v porovnání s neztukovatělymi.

Studium hepatotoxicity a možné hepatoprotekce vyžaduje pro *in vitro* experimenty vhodné modely. **První částí této práce je příprava modelového zázemí s použitím hepatocytů izolovaných z jater potkana. Nejprve jsme zavedli metodu kultivace hepatocytů v sendviči a zhodnotili její přínos oproti kultivaci v *monolayeru*, a to i pro experimenty trvající 48 hodin, které jsou v naší laboratoři frekventovaně využívány.** Výrazné rozdíly stavu hepatocytů byly zaznamenány od 4. dne kultivace, kdy sendvičový model poskytuje lepší zachování morfologických i funkčních parametrů hepatocytů. Pro naše účely studia mechanismů hepatotoxicity a potenciálních hepatoprotektiv na kulturách maximálně 48 hod. starých by však měla postačit metodika kultivace v *monolayeru*.

**Dále jsme zavedli *in vitro* model steatózy indukované pomocí přísadků kyseliny olejové (OA), palmitové (PA) a jejich směsí do kultivačního média.** V primární kultuře potkaních hepatocytů v *monolayeru* může každá z obou použitých mastných kyselin navodit signifikantní zvýšení obsahu triacylglycerolů (TAG), které je však v případě PA provázeno výrazným cytotoxickým (lipotoxickým) účinkem. Použití směsí OA a PA je doprovázeno vznikem steatózy spojené s nižší cytotoxicitou a lépe zachovanou funkční kapacitou hepatocytů. Při volbě modelu je nutné brát v úvahu situaci, kterou má simulovat. Pro navození prosté steatózy je vhodné použití modelu se samotnou OA, popř. OA v kombinaci s PA, zatímco k navození steatózy provázené apoptózou a cytotoxicitou lze zvolit model s použitím PA.

**Ve druhé části této práce jsme na modelu hepatocytů kultivovaných v *monolayeru* ověřovali, zda inkubace hepatocytů s epigalokatechin galátem (EGCG) vykazuje protektivní účinek vůči poškození modelovým hepatotoxinem D-galaktosaminem (D-GalN).** Protektivní efekt vykazovala pouze preventivní inkubace s EGCG, zatímco podání EGCG souběžně s D-GalN selhalo. K ochraně plazmatické membrány mohla přispět redukce peroxidace lipidů z lipidové dvojvrstvy. Oxidační stres indukovaný v naší práci nejspíše přesáhl schopnost antioxidačních mechanismů zvrátit nedostatek GSH v hepatocytech.

**V dalším kroku jsme na aktuálně zavedeném *in vitro* modelu steatózy hodnotili citlivost steatotických hepatocytů na poškození D-GalN.** Naše výsledky potvrzují vyšší citlivost, míra citlivosti závisí na přítomnosti PA ve steatogenním médiu. Svou úlohu pravděpodobně sehrává oxidační stres a mitochondriální dysfunkce, které PA výrazně podporuje. Ochranný efekt, který vykazuje OA na cytotoxické působení PA, se pravděpodobně v tomto případě neuplatnil, mechanismus je však třeba dále zkoumat. Ověřili jsme, že námi zavedený model indukce steatózy v *in vitro* podmínkách lze využít pro studium hepatotoxicity.

**S využitím zavedeného *in vitro* modelu steatózy jsme také testovali potenciální protektivní účinek EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity.** EGCG omezil lipotoxický účinek. Vliv EGCG na samotný obsah tuků v hepatocytech v naší práci však není jednoznačný. Pokles TAG byl pozorován pouze při rozvoji steatózy navozené OA, pokud byla přítomna PA ve směsi s OA nebo byla použita PA samotná, pokles nebyl pozorován. Dále jsme zaznamenali proapoptotický efekt EGCG na steatotických i neztukovatělych hepatocytech. Tyto nálezy vyžadují další výzkum.

### 3. SUMMARY

Liver damage has a variety of causes, but the mechanisms of damage may be common. Most often, oxidative stress is induced in the cell or important organelles are directly damaged. This leads to cell death, the initiation of an inflammatory response and the development of fibrosis. A problem in Western civilization is Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Steatotic hepatocytes may be more sensitive to damage compared to non-fatty ones.

The study of hepatotoxicity and possible hepatoprotection requires suitable models for *in vitro* experiments. The first part of this work is therefore dedicated to the introduction of a model background using hepatocytes isolated from rat liver. **First, we introduced a method of culturing hepatocytes in a sandwich and evaluated its benefit over cultivation in a *monolayer*,** even for experiments lasting 48 hours, which are frequently used in our laboratory. Significant differences were recorded from day 4 of culture, when the sandwich model provides better preservation of morphological and functional parameters of hepatocytes. However, for our purposes of studying the mechanisms of hepatotoxicity and hepatoprotective effects on cultures up to 48 hours old, a *monolayer* culture methodology should suffice.

**We also introduced an *in vitro* model of steatosis induced by the addition of oleic acid (OA), palmitic acid (PA) and their mixtures to the culture medium.** In primary culture of rat hepatocytes in *monolayer*, each of the two fatty acids used can induce a significant increase in triacylglycerol (TAG) content, which, however, is accompanied by a significant cytotoxic (lipotoxic) effect in the case of PA. The use of a mixture of OA and PA is accompanied by the development of steatosis associated with lower cytotoxicity and better preserved functional capacity of hepatocytes. When choosing a model, it is necessary to take into account its use and the situation to be simulated. It is appropriate to use a model with OA alone, or OA in combination with PA to induce simple steatosis. A model using PA can be chosen to induce steatosis accompanied by apoptosis and cytotoxicity.

**In the second part of this work, we verified, using a model of hepatocytes cultured in *monolayer*, whether incubation of hepatocytes with epigallocatechin gallate (EGCG) shows a protective effect against damage by D-galactosamine (D-GalN).** Only preventive incubation with EGCG showed a protective effect, while co-administration of EGCG with D-GalN failed. Reduction of lipid peroxidation from the lipid bilayer may have contributed to the protection of the plasmatic membrane. The oxidative stress induced in our work probably exceeded the ability of antioxidant mechanisms to reverse GSH deficiency in hepatocytes.

**In the next step, we evaluated the susceptibility of steatotic hepatocytes to D-GalN damage in a currently established *in vitro* model of steatosis.** Our results confirm a higher sensitivity, the degree of sensitivity depends on the presence of PA in the steatogenic medium. It can be speculated that oxidative stress and mitochondrial dysfunction play a role, which PA significantly supports. The protection of OA against the cytotoxic effects of PA probably did not apply in this case, but the mechanism needs to be further investigated. We have verified that our established model of steatosis induced *in vitro* can be used to study hepatotoxicity.

**Using an established *in vitro* model of steatosis, we also tested the potential protective effect of EGCG on the development of steatosis and lipotoxicity.** EGCG reduced lipotoxicity. However, the effect of EGCG on the fat content of hepatocytes is not clear. A decrease of TAG was observed only in the development of OA-induced steatosis, when PA was present in a mixture with OA or alone, no decrease was observed. Furthermore, we observed a proapoptotic effect of EGCG on steatotic and non-fatty hepatocytes. These findings require further research.

## 4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

### 4.1. Jaterní poškození

Poškození jater může být způsobeno širokým spektrem příčin. Významným metabolickým onemocněním manifestovaným steatózou v játrech je NAFLD – Non Alcoholic Fatty Liver Disease, jež představuje frekventovanou chorobu západní populace (1). Vzhledem k postavení jater v metabolismu xenobiotik bývají často původcem jaterního poškození alkohol, léky a další toxické látky. Ukazuje se, že akumulace tuků v hepatocytech může zvyšovat jejich citlivost k poškození xenobiotiky (2-4).

Ačkoliv příčiny poškození jater tvoří etiologicky nesourodou skupinu, mechanismy, které se v něm uplatňují, jsou často společné. Velkou měrou se na rozvoji jaterního poškození podílí oxidační stres, dochází k navození apoptózy a/nebo nekrózy buněk, rozvoji zánětu a fibrózy, která se přechodem do cirhózy stává rizikovým faktorem pro vznik hepatocelulárního karcinomu.

### 4.2. Hepatoprotektiva

Hepatoprotektivní látky příznivě ovlivňují metabolismus hepatocytů, chrání je před poškozením a urychlují regenerační procesy. Mezi látky používané jako hepatoprotektiva patří esenciální fosfolipidy, polyfenoly, silymarin, vitaminy skupiny B, vitamin E a C, kyselina ursodeoxycholová, s-adenosylmethionin a pentoxifylin.

Velmi populární jsou různé rostlinné přípravky a výtažky. Významnou podskupinou rostlinných polyfenolů jsou flavonoidy, pod které spadají biologicky aktivní a terapeuticky nadějně katechiny. Z této skupiny můžeme v listech čajovníku (*Camellia sinensis*) nalézt epikatechin, epigalokatechin, epikatechin galát a epigalokatechin galát (EGCG). Jako velmi slibný se jeví **epigalokatechin galát (EGCG)** (5-7), jehož potenciálně hepatoprotektivní a antisteatotický účinek jsme se rozhodli v této práci testovat.

### 4.3. Využití hepatocytů pro modelové systémy v *in vitro* podmínkách

Ke zkoumání hepatotoxicity, mechanismů poškození a hepatoprotekce je nutné používat vhodný experimentální model. Velmi využívaným modelem v *in vitro* podmínkách jsou **primární kultury hepatocytů v tzv. monolayeru**, při nichž jsou jaterní buňky kultivovány na kultivačních destičkách potažených vrstvou vhodné matrix, nejčastěji kolagenu. V těchto podmínkách mohou hepatocyty zachovávat svoje klíčové metabolické funkce i aktivitu biotransformačních enzymů po dobu několika dnů, takže je lze v tomto období využívat pro studium hepatotoxicity i hepatoprotekce (8). S narůstající délkou kultivace vyvstává hlavní limitace tohoto modelu – dediferenciace hepatocytů, která je provázena morfologickými změnami a ztrátou významných jaterních funkcí včetně biotransformací nebo produkce albuminu.

Z hlediska zachování diferencovaného stavu buněk a délky jejich přežití v kultuře se jeví výhodnější kultivace ve formě tzv. **sendviče**. Při sendvičové kultivaci leží hepatocyty mezi dvěma vrstvami extracelulární matrix, takže tento systém umožňuje hepatocytům adherovat ve 3D podmínkách. Hepatocyty v sendviči i po více jak 72 hodinách kultivace zachovávají viabilitu i svoje specifické funkce (9).

Primární kultury hepatocytů, případně hepatomové linie, lze použít k přípravě modelů jaterního poškození včetně steatózy. Stále nejpoužívanějšími modely NAFLD jsou systémy, kdy je steatóza hepatocytů indukovaná dietárně na živém zvířeti (10-12). Dietární indukce steatózy je ovšem časově i finančně náročná. Komerčně „vyráběným“ steatotickým modelem jsou geneticky modifikovaní hlodavci (ob/ob a db/db myši, Zucker fatty rat atd.) (13), jejichž velkou

nevýhodou je především vysoká cena. Přídavkem mastných kyselin do média kultivovaných hepatocytů lze navodit steatózu v *in vitro* podmínkách (14, 15). Nasycená kyselina palmitová (PA; C16:0) a mononenasyčená kyselina olejová (OA; C18:1) jsou nejčastějšími mastnými kyselinami v potravě a triacylglycerolech jater (15). Přestože izolované potkaní hepatocyty jsou v experimentální hepatologii dostupným a hojně využívaným nástrojem, prací, které by se zabývaly hodnocením účinku těchto mastných kyselin na primární kulturu potkaních hepatocytů, bylo před vznikem této disertační práce velmi málo (16) a jejich výsledky byly pro potřeby použití modelu nealkoholové steatózy indukované *in vitro* nedostačující.

## 5. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Tato práce má dva základní cíle. První cíl je zaměřen na rozvoj a optimalizaci *in vitro* kultivačních technik a modelů nezbytných pro experimenty realizované v následující části práce i pro další využití v laboratoři.

5.1. Porovnání kultivace primárních hepatocytů v *monolayeru* a v sendvičovém uspořádání

5.2. Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové

Druhým cílem bylo v *in vitro* podmínkách ověřit, do jaké míry vykazuje výtažek zeleného čaje – EGCG protektivní účinky na toxické poškození neztukovatělých hepatocytů, zda hepatocyty s prostou steatózou vykazují vyšší citlivost na toxické poškození a zda je EGCG schopen tlumit rozvoj steatózy a lipotoxicitu.

5.3. Hodnocení protektivního účinku EGCG na hepatocyty v primární kultuře modelově poškozené D-galaktosaminem

5.4. Hodnocení citlivosti primární kultury hepatocytů s prostou steatózou navozenou mastnými kyselinami na toxické poškození D-galaktosaminem

5.5. Hodnocení potenciálního protektivního účinku EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity indukovaný mastnými kyselinami v primární kultuře hepatocytů

## 6. MATERIÁL A METODIKY

Hepatocyty byly izolovány z jater potkanů kmene Wistar (Velaz; samci; 180 - 240 g) dvoustupňovou kolagenázovou reperfúzí jater (17, 18). K dalším experimentům byly použity jen hepatocyty, jejichž viabilita po izolaci přesahovala 90 % (Tryptan blue, Sigma-Aldrich). Poté byla určena denzita buněk pomocí automatického Counteru Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience, USA).

6.1. Zhotovení primární kultury hepatocytů v *monolayeru* a v sendviči:

Suspenze hepatocytů byla naředěna na odpovídající denzitu v kompletním Williamsově E médiu (BioChrom GmbH; Germany) s obsahem 6 % fetálního bovinního séra (FBS; BioChrom GmbH) a příslušný objem suspenze byl přidán na kultivační destičky potažené kolagenem (Collagen Type I from Rat Tail, Sigma-Aldrich). Během inkubace (2 hod., 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) došlo k vytvoření buněčného ***monolayeru***. Po promytí kultury čistým médiem bylo na destičky napipetováno kompletní Williams' E médium bez (jamky kontrol) nebo s obsahem testované látky (OA, PA, D-GalN, EGCG).



Příprava **sendviče** probíhala na 6ti-jamkových kultivačních destičkách. Objem roztoku kolagenu na vytvoření druhé vrstvy byl 140  $\mu$ l. Koncentrace kolagenu byla 0,8 mg/ml. Sendvič byl 3 hod. inkubován (37°C a 5 % CO<sub>2</sub>) a poté bylo přidáno kompletní Williams' E medium s, resp. bez obsahu FBS.

## 6.2. Biochemická stanovení

K analýze intracelulárních analytů byly hepatocyty lyzovány mrazem (-80 °C, 15 min) a destilovanou vodou.

Ke zhodnocení viability hepatocytů sloužilo stanovení **LDH leakage** (poměr aktivity LDH uniklého do extracelulárního prostředí ku celkové aktivitě LDH) pomocí kitu LDH FS\* DGKC 1970 (DiaSys GmbH, Germany) založeném na principu přeměny pyruvátu na laktát. Rychlost přeměny NADH + H<sup>+</sup> na NAD<sup>+</sup> byla fotometricky (Tecan Infinite M200) stanovena jako úbytek absorbance při 340 nm. Metabolická aktivita hepatocytů byla hodnocena pomocí **WST-1 testu** (Cell Proliferation Reagent WST-1; Roche Diagnostics), který je založený na přeměně tetrazoliových solí na barevný formazán buněčnými, především mitochondriálními, dehydrogenázami. Hodnotíme nárůst absorbance při 440 nm v čase.

Oxidační stres v buňce byl posuzován podle tvorby malondialdehydu (MDA) a reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS) a obsahu glutathionu. Stanovení **MDA** je založeno na měření absorbance produktu MDA a thiobarbiturové kyseliny (TBA) jako TBARS (19). Produkce **ROS** buňkami byla hodnocena pomocí fluorescenční sondy CM-H2DCFDA (Molecular Probes, USA;  $\lambda$ Ex=485 nm;  $\lambda$ Em=535 nm). Výsledky byly vypočteny z rozdílu intenzity fluorescence (40 minut – 0 minut). Stanovení obsahu **glutathionu** probíhalo spektrofotometricky (20).

Apoptóza byla hodnocena z aktivity **kaspázy 3** pomocí kinetické fluorimetrické metody založené na hydrolýze specifického substrátu pro kaspázu 3 - Ac-DEVD-AMC. Produktem štěpení je volný AMC ( $\lambda$ Ex=360 nm;  $\lambda$ Em=465 nm).

Produkcí albuminu a urey jsme hodnotili funkční kapacitu diferencovaných hepatocytů. Ke kvantifikaci **albuminu** v kultivačním médiu je v naší laboratoři používán Rat Albumin ELISA Quantitation Kit (BETHYL), který využívá vazby ovčí protilátky proti potkanímu albuminu imobilizované na povrchu mikrotitrační jamky s albuminem ve vzorku (450 nm). K spektrofotometrické detekci **urey** v médiu je využívána její reakce s diacetylmonoximem za vzniku barevného diazinu.

K určení míry steatózy hepatocytů sloužilo stanovení obsahu triacylglycerolů (**TAG**) pomocí kitu *Triglyceride Colorimetric Assay Kit* (Cayman Pharma) založeného na principu štěpení TAG enzymem lipázou na volné mastné kyseliny a glycerol. Finální rozklad glycerolu je doprovázen vznikem fialového produktu, který lze spektrofotometricky stanovit.

Výsledky WST-1 testu, MDA, ROS, glutathionu, kaspázy 3, albuminu a urey jsou vztaženy na koncentraci proteinů ze stejné kultivační jamky (21). Výsledky TAG jsou vztaženy na koncentraci proteinů měřené ze vzorku po rozrušení hepatocytů sonifikací. Metoda dle Bradfordové těžší z adsorpce barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu.

## 6.3. Mikroskopické hodnocení buněk a speciální barvení

Morfologický vzhled živých neobarvených buněk v kultuře byl pozorován mikroskopii ve fázovém kontrastu (mikroskop Olympus CK 40, případně Olympus IX51). Membránový potenciál mitochondrií (**MMP**) byl vizualizován pomocí fluorescenčního barviva JC-1. Principem metody je schopnost akumulace kationického barviva JC-1 (Molecular Probes, USA) do mitochondrií. Při nízkém membránovém potenciálu se JC-1 vyskytuje jako monomer ( $\lambda$ em 525 nm, zelená). Při vyšších membránových potenciálech JC-1 tvoří tzv. "J-agregáty" ( $\lambda$ em 590 nm, červená). K vizualizaci MMP byl použit fluorescenční mikroskop Olympus IX51 (Olympus,

Japan) doplněný o digitální fotoaparát Olympus E600 (Olympus, Japan). Pořízené fotografie lze vyhodnotit kvalitativně i kvantitativně. K vizualizaci steatózy jsme obarvili neutrální tuky v hepatocytech pomocí **olejové červeně O** s využitím *Steatosis Colorimetric Assay Kit* (Cayman Pharma). K určení lokalizace a pořízení fotografií byly jádra obarvena hematoxylinem. Pro kvantitativní stanovení bylo přidáno extrakční činidlo a měřena absorbance při 500 nm.

#### 6.4. Statistické hodnocení dat

Statistické zpracování dat probíhalo pomocí programu GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Hodnocení statistické významnosti bylo provedeno jednofaktorovým ANOVA testem. K vícečetnému porovnávání mezi skupinami sloužil Tukey-Kramerův post hoc test. V případě nenormálního rozložení hodnot byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s Dunnovým post hoc testem. Všechny výsledky jsou vyjadřovány jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Signifikance jsou vyznačeny následovně: \*\*\*: ( $p < 0,001$ ); \*\*: ( $p < 0,01$ ); \*: ( $p < 0,05$ )

## 7. VÝSLEDKY

### 7.1. Porovnání kultivace primárních hepatocytů v *monolayeru* a v sendvičovém uspořádání

Nejprve bylo nutné na našem pracovišti sendvičovou kultivaci zavést a optimalizovat. Používáme standardní *monolayer* s kolagenem o koncentraci **0,3 mg/ml**, tuto koncentraci na spodní vrstvě sendviče jsme zachovali. Dostatečná doba k ztuhnutí kolagenu bez nežádoucího poškození buněk byla vyhodnocena na **3 hodiny**. Optimální koncentrace kolagenu na vrchní vrstvu sendviče byla stanovena na **0,8 mg/ml**.

Ke kultivaci bylo použito 1,5 ml Williams' E média se suplementy s obsahem 6 % FBS, resp. bez FBS. Kultivační médium bylo každý den měněno za čerstvé a kultury byly takto udržovány po dobu 10 dní.

Každý den byla provedena fotografická dokumentace. Rozdíly mezi kulturami s fetálním bovinním sérem (FBS+) a bez (FBS-) nebyly patrné. První den se *monolayeru* a sendviče výrazněji nelišily - vykazovaly polygonální tvar a kontakty mezi buňkami. Počínaje druhým dnem docházelo u sendvičů k výraznější tvorbě žlučových kanálků, které byly v *monolayeru* patrné jen ojediněle. Čtvrtý den hepatocyty v *monolayeru* získávaly fibroblastům podobný tvar a pomalu se z kultury odlučovaly. 10. den bylo možné v *monolayeru* pozorovat jen ojedinělé buňky, zatímco hepatocyty kultivované sendvičově stále pokrývaly téměř celou plochu destičky, zachovávaly polygonální tvar i přítomnost kanálků.

Každý druhý den bylo médium sbíráno na biochemickou analýzu a buňky zpracovány na stanovení intracelulárních analytů. Statistické porovnání skupin probíhalo vždy v rámci jednoho kultivačního dne.

Druhý den kultivace jsme pozorovali nejvyšší únik LDH do média u *monolayeru* s obsahem FBS a u sendviče bez obsahu FBS ( $p < 0,001$ ), tento únik však znamenal cca 15 % LDH. 4., 6., 8. a 10. kultivační den vykazovaly oba sendviče nižší LDH leakage než hepatocyty kultivované v *monolayerech* ( $p < 0,001$ ).

Až do 6. kultivačního dne nebyly mezi skupinami v produkci MDA nalezeny signifikantní rozdíly. V 10. dni kultivace byla u hepatocytů kultivovaných v *monolayeru* zjištěna vyšší míra lipoperoxidace než u sendvičů ( $p < 0,001$ ).

Ve 2. kultivačním dni byl nejvyšší obsah albuminu nalezen u hepatocytů v sendviči bez FBS a v *monolayeru* s FBS. Ve 4. dni kultivace převyšovala produkce albuminu u hepatocytů kultivovaných v sendviči bez FBS ( $p < 0,001$ ) produkci u ostatních druhů kultivace, mezi kterými

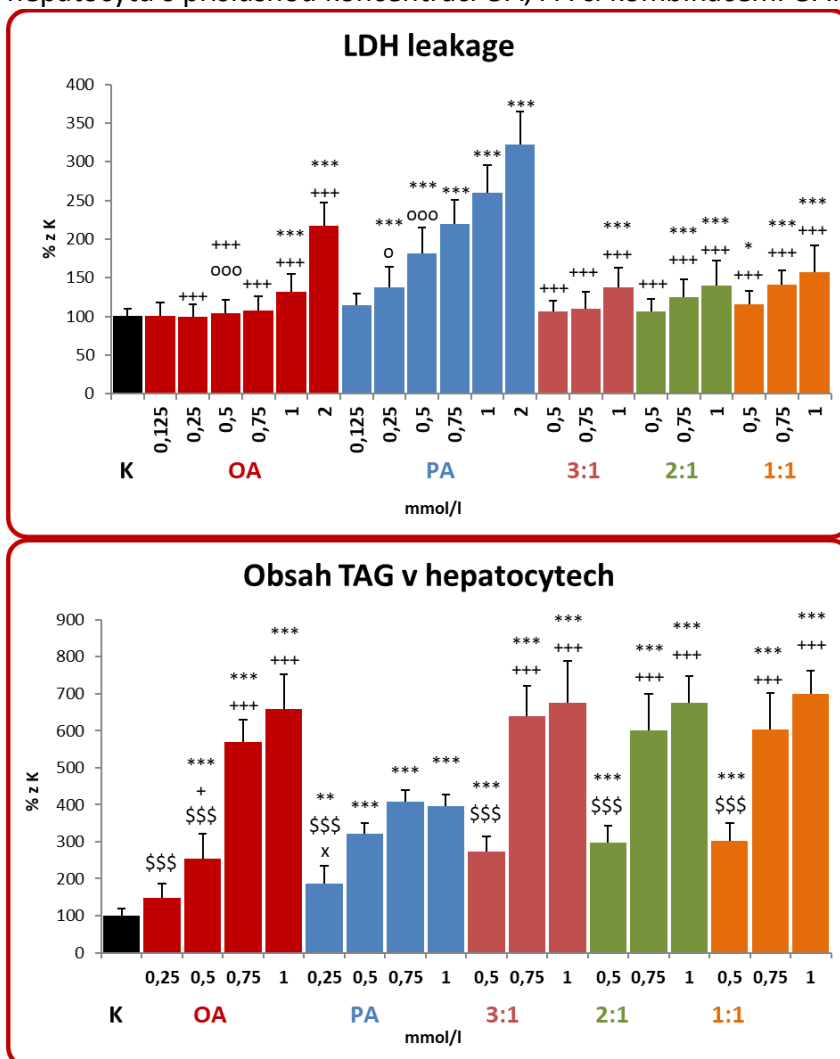
nebyl nalezen rozdíl. Sendvičové kultury si zachovávaly produkci albuminu až do 10. dne, zatímco u *monolayerů* s délkou kultivace postupně ustávala.

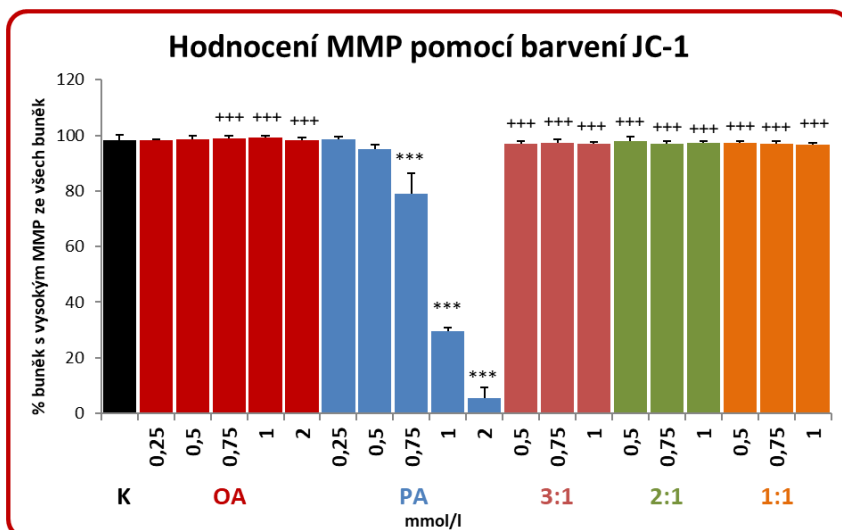
## 7.2. Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové

Po přichycení hepatocytů na kolagen kultivačních destiček bylo k buňkám přidáno Williams' E médium s obsahem olejové (OA) či palmitové kyseliny (PA) o koncentraci 0,125; 0,25; 0,5; 0,75, 1 a 2 mmol/l či kombinací OA:PA 3:1; 2:1 a 1:1 o celkové koncentraci 0,5; 0,75 a 1 mmol/l. Kontrolu představovaly jamky s Williams' E médiem s odpovídajícím obsahem BSA (bovinní sérový albumin) bez obsahu mastných kyselin.

Následně byly buňky 24 hodin kultivovány v prostředí 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Poté bylo médium staženo na biochemická stanovení a buňky zpracovány na zhodnocení intracelulárních analytů.

**Obr. č. 1** - LDH leakage, obsah TAG v hepatocytech a MMP hodnocené po 24hodinové kultivaci hepatocytů s příslušnou koncentrací OA, PA či kombinacemi OA:PA 3:1; 2:1 a 1:1.





\*\*\* vs K; +++ vs PA o stejné koncentraci; ooo vs 1:1 o dvojnásobné koncentraci; \$\$\$ vs stejná mastná kyselina či kombinace o celkové koncentraci 0,75 a 1 mmol/l; xxx vs stejná mastná kyselina či kombinace o celkové koncentraci 0,5 mmol/l

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované v médiu s obsahem BSA bez obsahu mastných kyselin  
 OA; PA; 3:1; 2:1 a 1:1: hepatocyty 24 hod. kultivované v médiu s obsahem mastných kyselin v mmol/l, které byly rozpuštěny v BSA

\*\*\*: (p<0,001); \*\*: (p<0,01); \*: (p<0,05); n≥6

Aktivita buněčných dehydrogenáz a viabilita hepatocytů klesala se vzrůstající celkovou koncentrací mastných kyselin (MK) a s obsahem PA v médiu. Použití samotné OA a kombinace OA:PA mělo v porovnání se samotnou PA o shodné celkové koncentraci za následek signifikantně vyšší WST-1 test (p<0,001) a nižší LDH leakage (p<0,001). Ekvimolární přírůstek OA do směsi k PA (OA:PA 1:1 v celkové koncentraci MK 0,5 resp. 1 mmol/l) byl oproti samotné PA o poloviční celkové koncentraci (0,25 resp. 0,5 mmol/l) provázen poklesem úniku LDH (0,25 mM PA vs 0,5 mM 1:1 (p<0,05); 0,5 mM PA vs 1 mM 1:1 (p<0,001)).

Obsah TAG v hepatocytech stoupal dle očekávání se vzrůstající koncentrací mastných kyselin v médiu, a to od 0,25 mM PA (p<0,01) a od 0,5 mM OA (p<0,001). V nižších koncentracích MK (0,25 a 0,5 mmol/l) byla nalezena vyšší akumulace TAG po PA, při použití vyšších koncentrací MK (0,75 a 1 mmol/l) došlo k výraznější steatóze po OA. Obsah TAG při použití kombinace OA:PA závisel na celkové koncentraci MK a odpovídal obsahu TAG po inkubaci s adekvátním obsahem OA. Navýšení celkové koncentrace mastných kyselin z 0,75 mmol/l na 1 mmol/l již nemělo u žádné z testovaných skupin za následek signifikantní nárůst obsahu TAG v hepatocytech.

Aktivita kaspázy 3 a tvorba ROS stoupala pouze po inkubaci hepatocytů s PA od koncentrace 0,5 mmol/l a více (p<0,001). Přídavek 0,5 mM OA do kultivačního média k 0,5 mM PA (OA:PA 1:1 o celkové koncentraci MK 1 mmol/l) plně zamezil zvýšení aktivity kaspázy 3 a produkci ROS (p<0,001), které jsme pozorovali po použití samotné 0,5 mM PA, ačkoliv celková koncentrace MK byla dvakrát vyšší.

Produkce albuminu klesala u hepatocytů kultivovaných se všemi testovanými koncentracemi PA (p<0,001), zatímco u hepatocytů inkubovaných s OA byl zaznamenán pokles produkce albuminu od koncentrace 1 mmol/l. U kombinací OA:PA klesala tvorba albuminu od celkové koncentrace MK 0,75 mmol/l. Podobně jako ve výše zmíněných případech došlo k protektivnímu účinku OA před poklesem albuminu způsobeným PA - po 0,25 mM PA byla nalezena signifikantně nižší (p<0,05) tvorba albuminu, než po kombinaci OA:PA 1:1 o dvojnásobné celkové koncentraci mastných kyselin.

Pokles MMP vizualizovaného pomocí fluorescenční barvy JC-1 jsme zaznamenali pouze u hepatocytů kultivovaných s PA, a to od koncentrace PA 0,75 mmol/l ( $p < 0,001$ ). Po žádné z testovaných koncentrací kyseliny olejové ani žádné z testovaných kombinací OA:PA nebyl pokles membránového potenciálu mitochondrií pozorován.

### 7.3. Hodnocení protektivního účinku EGCG na hepatocyty v primární kultuře modelově poškozené D-galaktosaminem

Experiment probíhal v uspořádání:

#### a) Současná kultivace hepatocytů s EGCG a D-GalN

- primární kultura hepatocytů v *monolayeru* byla 24 hod. kultivována v souběžně s 20 mM D-GalN a EGCG (1,25; 2,5; 5 a 10  $\mu\text{mol/l}$ ).

#### b) Kultivace hepatocytů s EGCG a následná kultivace s EGCG a D-GalN

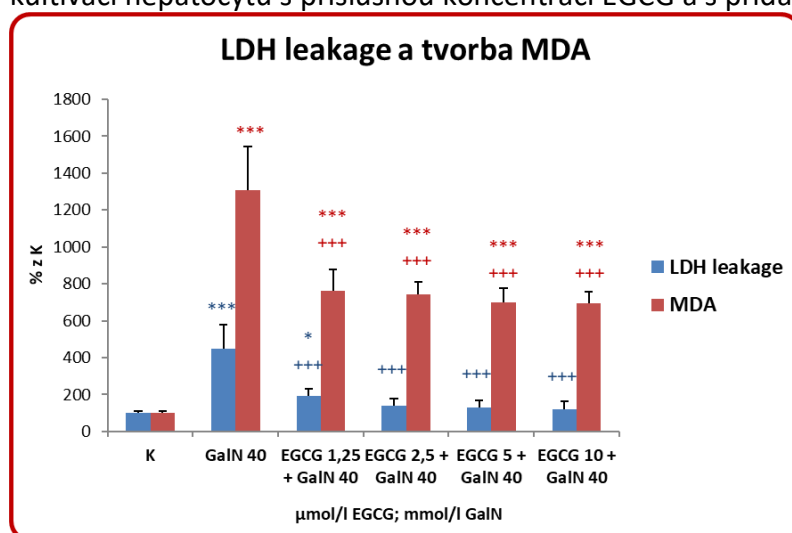
- primární kultura hepatocytů v *monolayeru* byla nejprve 24 hod. kultivována se samotným EGCG (1,25; 2,5; 5 a 10  $\mu\text{mol/l}$ ) a po výměně média byla dalších 24 hod. kultivována se 40 mM D-GalN a EGCG ve výše uvedených koncentracích.

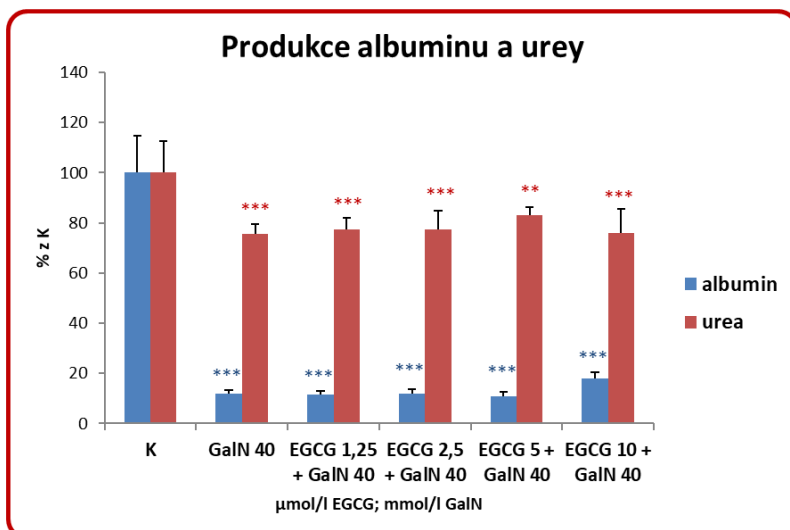
Předchozími výsledky našeho pracoviště i ověřením před samotným experimentem jsme potvrdili, že k navození toxického účinku je možno použít koncentraci 20 nebo 40 mM D-GalN pro 24hod. inkubaci. Koncentrace 40 mmol/l byla vhodná i pro toxické poškození hepatocytů nejprve inkubovaných 24 hod. v médiu bez přídavku D-GalN a následně 24 hod. inkubovaných s D-GalN.

K vyloučení toxického účinku samotného EGCG jsme experimentálně stanovili jeho vhodné koncentrační rozmezí pro obě uspořádání experimentu. V intervalu koncentrací 1,25 – 10  $\mu\text{mol/l}$  EGCG nedošlo ke snížení WST-1 testu, zvýšení LDH leakage ani ke tvorbě MDA.

Současná inkubace hepatocytů s EGCG a 20 mM D-GalN po dobu 24 hodin nevykazovala výrazný protektivní efekt EGCG proti toxickému poškození D-galaktosaminem.

**Obr. č. 2** - LDH leakage, tvorba MDA a produkce albuminu a urey hodnocená po 24hodinové preinkubaci hepatocytů s EGCG o koncentraci 1,25 – 10  $\mu\text{mol/l}$  a následné 24hodinové kultivaci hepatocytů s příslušnou koncentrací EGCG a s přídavkem 40 mM D-GalN.





\*\*\* vs K; +++ vs GalN 40

K: kontrolní hepatocyty 48 hod. kultivované pouze ve Williams' E médiu se suplementy

GalN 40: hepatocyty 24 hod. kultivované s Williams' E médiem a dalších 24 hod. s 40 mM D-GalN

EGCG 1,25 + GalN 40; EGCG 2,5 + GalN 40; EGCG 5 + GalN 40; EGCG 10 + GalN 40: hepatocyty 24 hod. preinkubovány s uvedenou koncentrací EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  a dalších 24 hod. kultivované v médiu s obsahem příslušné koncentrace EGCG a 40 mM D-GalN

\*\*\*: ( $p < 0,001$ ); \*\*: ( $p < 0,01$ ); \*: ( $p < 0,05$ );  $n \geq 8$

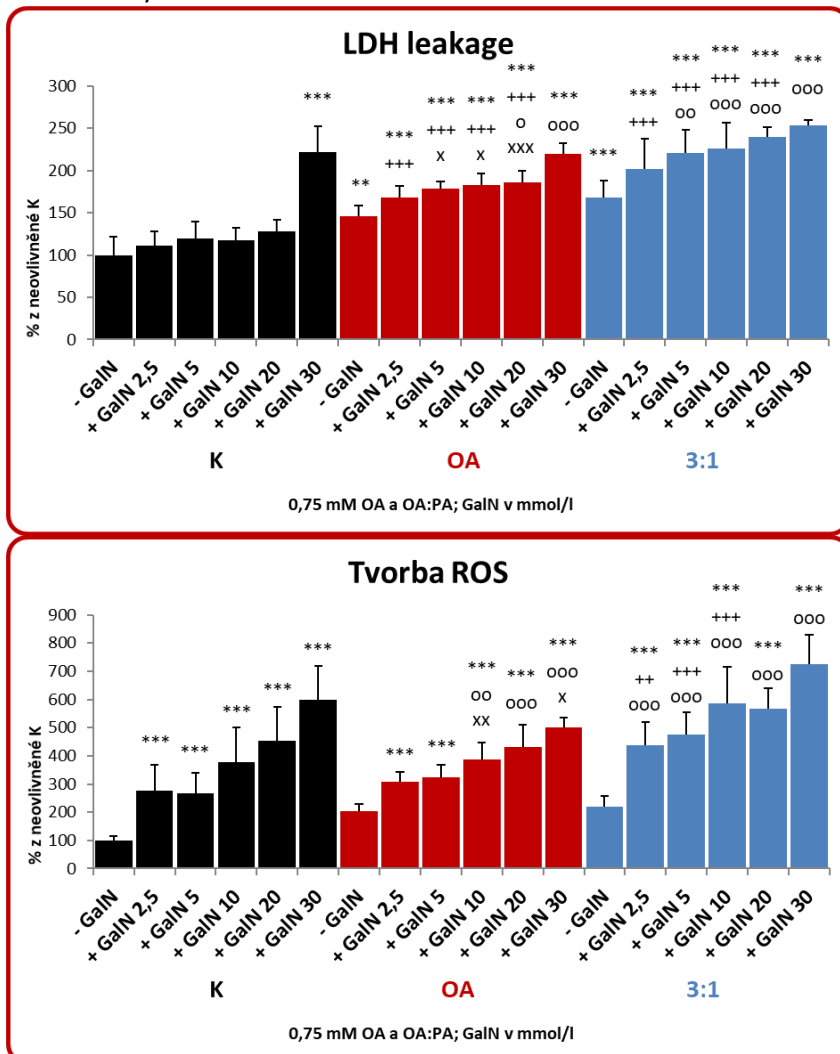
Preinkubace hepatocytů s EGCG a následná 24 hod. kultivace hepatocytů s EGCG a 40 mM D-GalN vykazovala v některých parametrech protektivní účinek EGCG vůči toxickému poškození galaktosaminem. Přídavek 1,25 ( $p < 0,01$ ) a 2,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) koncentrace EGCG měl za následek signifikantní zvýšení hodnoty WST-1 testu oproti samotnému D-GalN. V tomto případě byl přídavek všech testovaných koncentrací EGCG do média ke D-GalN doprovázen také poklesem LDH leakage i snížením tvorby MDA ( $p < 0,001$ ) oproti toxické kontrole (40 mM D-GalN). Snížení úniku LDH do média bylo v případě směsi 2,5; 5 a 10  $\mu\text{M}$  EGCG a 40 mM D-GalN pozorováno až na úroveň intaktních kontrol. Bohužel, žádná koncentrace EGCG přesto nedokázala zabránit či alespoň zmírnit poškození funkční kapacity (produkce albuminu a urey) a poklesu celkového obsahu glutathionu v hepatocytech způsobených toxickým působením D-GalN.

#### 7.4. Hodnocení citlivosti primární kultury hepatocytů s prostou steatózou navozenou mastnými kyselinami na toxické poškození D-galaktosaminem

Úkolem bylo zhodnotit citlivost hepatocytů s prostou steatózou bez současného výraznějšího poškození buněk na toxicitu vybraného hepatotoxinu (D-galaktosaminu). Tento požadavek splňuje použití samotné OA či kombinace OA:PA 3:1 o koncentraci 0,75 mmol/l.

Po přichycení hepatocytů na kolagen kultivačních destiček bylo k buňkám přidáno Williams' E médium s obsahem olejové kyseliny (OA) či kombinace OA:PA v poměru 3:1 o koncentraci 0,75 mmol/l. Kontrolní nesteatotickou skupinu představovaly jamky s příslušným obsahem BSA bez obsahu mastných kyselin. Následně byly buňky 24 hodin kultivovány v prostředí 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Poté bylo médium staženo a nahrazeno čerstvým kompletním Williams' E médiem s obsahem D-GalN o koncentraci 2,5; 5; 10; 20 a 30 mmol/l. Následovala další 24hodinová kultivace v prostředí 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po uplynutí této doby bylo staženo médium na biochemická stanovení a buňky zpracovány na zhodnocení intracelulárních analytů.

**Obr. č. 3** - Hodnocení LDH leakage a tvorby ROS steatotickými hepatocyty kultivovanými 24 h. s mastnými kyselinami k navození steatózy *in vitro* a následně 24 h. s D-GalN o koncentraci 2,5 – 30 mmol/l



\*\*\* vs nižším neovlivněná nesteatotická kontrola (K; - GalN); +++ vs nesteatotické hepatocyty (K) se shodným přídávkem D-GalN; ooo vs příslušné steatotické hepatocyty neovlivněné D-GalN (samotná OA či samotná OA:PA 3:1); xxx vs OA:PA 3:1 se shodným přídávkem D-GalN

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované v médiu s odpovídajícím obsahem BSA bez obsahu mastných kyselin a dalších 24 hod. kultivované bez (- GalN) nebo s přídávkem uvedené koncentrace D-GalN v mmol/l

OA; 3:1: hepatocyty 24 hod. kultivované v médiu s obsahem 0,75 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA a dalších 24 hod. kultivované bez (-GalN) nebo s přídávkem uvedené koncentrace D-GalN v mmol/l

\*\*\*: (p<0,001); \*\*: (p<0,01); \*: (p<0,05); n≥6

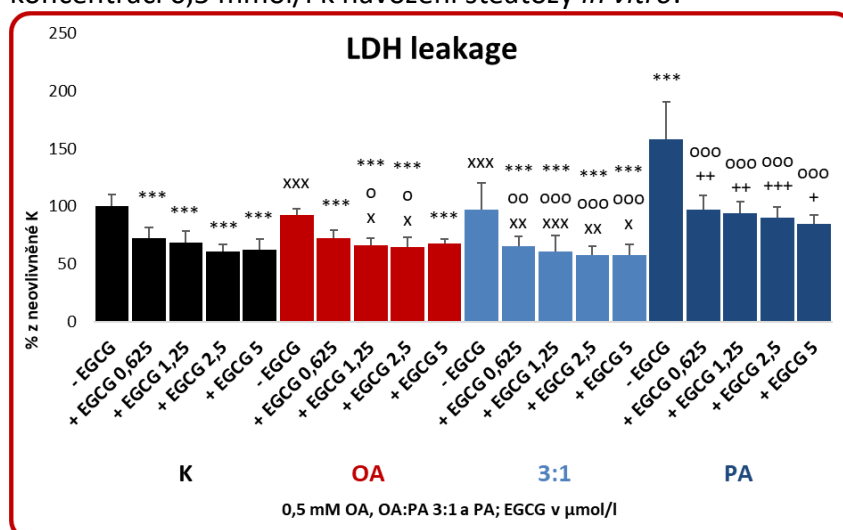
Při kultivaci neztukovatělých hepatocytů s D-GalN došlo ke zvýšení LDH leakage po 30 mM D-GalN (p<0,001). U modelu se steatózou navozenou OA stoupal LDH leakage od 20 mM koncentrace D-GalN, zatímco u kombinace OA:PA 3:1 došlo ke zvýšení již od 5 mM D-GalN. Dále, 5; 10 (p<0,05) a 20 mM (p<0,001) D-GalN vyvolal ve skupině s OA nižší únik LDH do média než u skupin se steatózou indukovanou směsí OA:PA 3:1. Všechny koncentrace D-GalN vyjma té nejvyšší (30 mM) navodily u steatotických hepatocytů výraznější LDH leakage než u nesteatotických hepatocytů (p<0,001).

Aktivita kaspázy 3 se u všech hepatocytů zvýšila po přidavku 2,5; 5 a 10 mM D-galaktosaminu ( $p < 0,001$ ), u nesteatotické skupiny a skupiny OA:PA 3:1 navíc i po 20 mM D-GalN ( $p < 0,001$ ). Nejvýraznější nárůst aktivity kaspázy 3 byl u všech skupin po 2,5 mM D-GalN. Přídavek 2,5 ( $p < 0,001$ ) a 5 ( $p < 0,01$ ) mM D-GalN k hepatocytům s OA způsobil v porovnání s nesteatotickými hepatocyty nižší nárůst aktivity kaspázy 3. Oproti tomu u hepatocytů s OA:PA 3:1 byla po přidavku 2,5 mM D-GalN zaznamenána vyšší aktivita kaspázy 3 než u nesteatotických hepatocytů ( $p < 0,001$ ). Při použití OA k indukci steatózy byla po přidavku 2,5 ( $p < 0,001$ ); 5 ( $p < 0,01$ ) a 10 mM D-GalN ( $p < 0,05$ ) nalezena nižší aktivita kaspázy 3 než při užití OA:PA 3:1. Tvorba ROS vzrůstala u nesteatotické skupiny a skupiny OA:PA 3:1 u všech použitých koncentrací D-GalN. U skupiny s OA byl zaznamenán vzestup tvorby ROS od 10 mM D-GalN. Produkce ROS byla významnější působením 2,5 ( $p < 0,01$ ); 5 a 10 mM D-GalN ( $p < 0,001$ ) na hepatocyty ve skupině OA:PA 3:1 než na nesteatotické hepatocyty. U skupiny se samotnou OA byla po přidavku 10 ( $p < 0,01$ ) a 30 mM D-GalN ( $p < 0,05$ ) zaznamenána nižší tvorba ROS než u OA:PA 3:1.

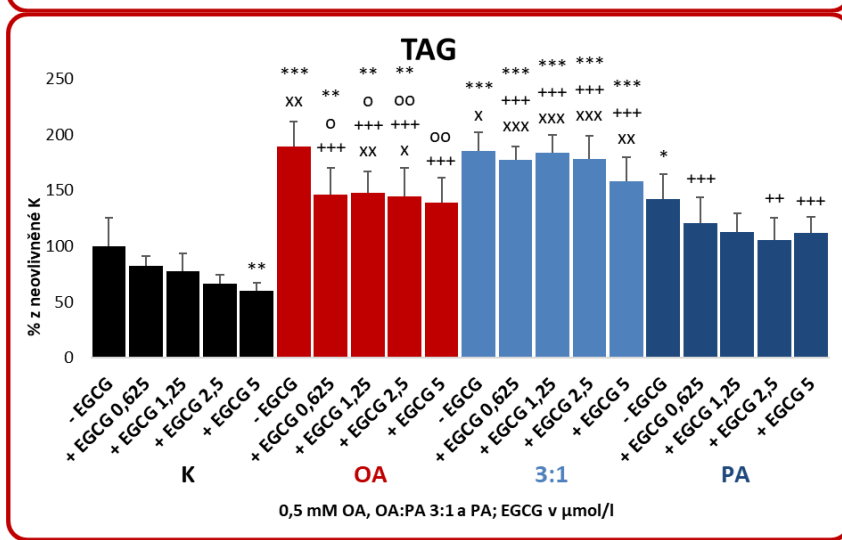
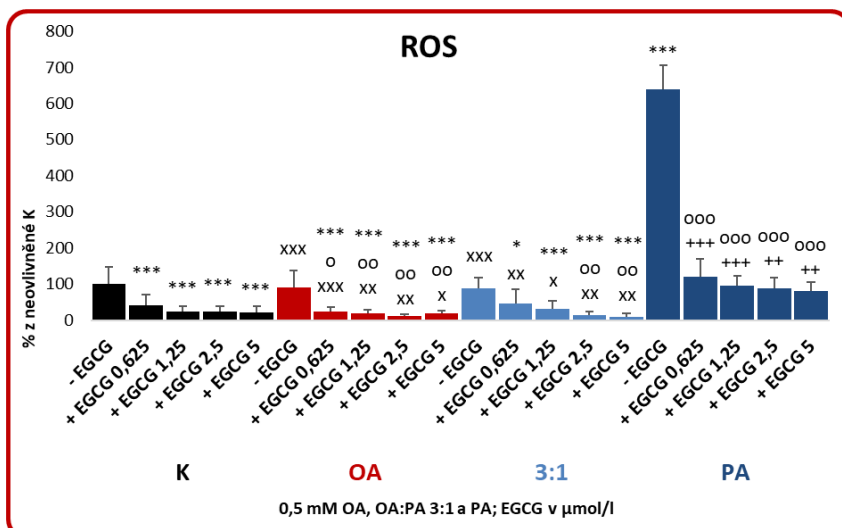
#### 7.5. Hodnocení potenciálního protektivního účinku EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity indukovanými mastnými kyselinami v primární kultuře hepatocytů

Byly zhotoveny kultury v *monolayeru* podle návodu v sekci „Metodiky“. Následně bylo k hepatocytům přidáno Williams' E médium bez nebo s obsahem EGCG o koncentraci 0,625; 1,25; 2,5 a 5  $\mu\text{mol/l}$ . Následně byly buňky 24 hodin kultivovány v prostředí 37 °C a 5 %  $\text{CO}_2$ . Poté bylo médium staženo a nahrazeno čerstvým kompletním Williams' E médiem s obsahem olejové kyseliny (OA), kombinace OA:PA v poměru 3:1 či palmitové kyseliny (PA) o celkové koncentraci 0,5  $\text{mmol/l}$  a bez nebo s obsahem EGCG o koncentraci 0,625; 1,25; 2,5 a 5  $\mu\text{mol/l}$ . Kontrolní nesteatotické hepatocyty představovaly jamky s obsahem BSA ve Williams' E médiu bez obsahu mastných kyselin a bez nebo s odpovídajícím přídavkem EGCG. Následovala další 24hodinová kultivace v prostředí 37 °C a 5 %  $\text{CO}_2$ . Po uplynutí této doby bylo staženo médium na biochemická stanovení a buňky zpracovány na zhodnocení intracelulárních analytů. Výsledky jsou z důvodu dat získaných z min. 3 izolací hepatocytů vyjádřeny jako % z ničím neovlivněné nesteatotické kontroly.

**Obr. č. 4** – LDH leakage, produkce ROS a obsah TAG v hepatocytech hodnocené po 24hodinové preinkubaci hepatocytů s EGCG o koncentraci 0,625 – 5  $\mu\text{mol/l}$  a následné 24hodinové kultivaci hepatocytů s EGCG o shodné koncentraci a mastnými kyselinami o celkové koncentraci 0,5  $\text{mmol/l}$  k navození steatózy *in vitro*.







\*\*\* vs ničím neovlivněná nesteatotická kontrola (K; - EGCG); +++ vs nesteatotické hepatocyty (K) se shodným přídatkem EGCG; ooo vs příslušné steatotické hepatocyty neovlivněné EGCG (samotná OA, samotná OA:PA 3:1 či samotná PA); xxx vs PA se shodným přídatkem EGCG

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přídatkem uvedené koncentrace EGCG v µmol/l a dalších 24 hodin v médiu s obsahem BSA bez obsahu mastných kyselin a bez (- EGCG) nebo s přídatkem uvedené koncentrace EGCG v µmol/l

OA; 3:1; PA: hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přídatkem uvedené koncentrace EGCG v µmol/l v médiu a dalších 24 hod. s obsahem 0,5 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA a bez (- EGCG) nebo s přídatkem uvedené koncentrace EGCG v µmol/l

\*\*\*: (p<0,001); \*\*: (p<0,01); \*: (p<0,05); n≥6

V neztukovatělé skupině měla preinkubace s 0,625; 1,25 a 2,5 µM EGCG za následek zvýšení aktivity buněčných dehydrogenáz (p<0,001). U steatotických skupin jsme tento vliv zaznamenali pouze u preinkubace skupiny OA:PA 3:1 s 1,25 µM EGCG (p<0,05), v ostatních steatotických skupinách neměla preinkubace s EGCG statisticky významný vliv. WST-1 test klesal pod úroveň ničím neovlivněné kontroly u steatotické skupiny OA:PA 3:1 preinkubované s 5 µM EGCG (p<0,05) a u celé steatotické skupiny PA (p<0,001). Ve všech steatotických skupinách preinkubovaných s EGCG (s výjimkou skupiny OA s přídatkem EGCG 5 µmol/l) byl nalezen nižší WST-1 test než u nesteatotických hepatocytů preinkubovaných s EGCG.

Steatotické skupiny OA a OA:PA 3:1 vykazovaly vyšší WST-1 test než skupina PA s odpovídajícím přídatkem EGCG ( $p < 0,001$ ).

Ke zvýšenému úniku LDH oproti ničím neovlivněné kontrole došlo pouze u skupiny PA bez preinkubace s EGCG ( $p < 0,001$ ). U všech skupin došlo preinkubací s EGCG k poklesu LDH leakage oproti příslušné skupině neovlivněné EGCG, pouze u skupiny OA preinkubované s 0,625 a 5  $\mu\text{M}$  EGCG nebyl tento pokles statisticky významný. Preinkubace s EGCG vedla u skupiny s PA k vyššímu LDH leakage než tomu bylo u všech ostatních skupin, pouze u skupiny OA preinkubované s 0,625 a 5  $\mu\text{M}$  EGCG nebyl tento nález potvrzen statistickou významností.

Podobné výsledky jako u LDH leakage byly nalezeny i ve tvorbě ROS a MDA. Vzestup v produkci ROS ( $p < 0,001$ ) a MDA ( $p < 0,05$ ) oproti ničím neovlivněné kontrole byl zaznamenán pouze u steatotické skupiny s PA bez ovlivnění EGCG. Preinkubace této skupiny se všemi testovanými koncentracemi EGCG měla za následek redukci produkce ROS na úroveň ničím neovlivněné kontroly ( $p < 0,001$ ), v případě tvorby MDA dokonce pod její úroveň. U všech ostatních skupin došlo preinkubací s EGCG rovněž k poklesu tvorby ROS, pouze u skupiny OA:PA 3:1 preinkubované s 0,625 a 1,25  $\mu\text{M}$  EGCG nebyla změna oproti OA:PA 3:1 neovlivněné EGCG potvrzena statistickou významností. Steatotické hepatocyty s PA preinkubované s EGCG vykazovaly vyšší produkci ROS než nesteatotické hepatocyty i ztukovatělé hepatocyty s OA či OA:PA 3:1 preinkubované se shodnými koncentracemi EGCG. Naopak, u preinkubace s 1,25 a 2,5  $\mu\text{M}$  EGCG u skupiny PA jsme našli dokonce nižší tvorbu MDA než u neztukovatělých hepatocytů. Podobně i preinkubace s 0,625 a 1,25  $\mu\text{M}$  EGCG u skupiny OA:PA 3:1 a s 1,25 a 2,5  $\mu\text{M}$  EGCG u skupiny OA vedla k nižší tvorbě MDA než tomu bylo u neztukovatělých hepatocytů.

Po přidavku OA ( $p < 0,001$ ), kombinace OA:PA 3:1 ( $p < 0,001$ ) i PA ( $p < 0,05$ ) do média kultivovaných hepatocytů jsme zaznamenali vzestup obsahu TAG i akumulace Oil Red O. Preinkubace steatotické skupiny OA s EGCG měla za následek snížení obsahu TAG i akumulace Oil Red O v hepatocytech oproti OA bez přídatku EGCG, nikoli ale až na úroveň nesteatotické kontroly. Rovněž přídatek EGCG k OA:PA 3:1 (s výjimkou 2,5  $\mu\text{M}$  EGCG) zapříčinil nižší akumulaci Oil Red O v hepatocytech, na hladinu TAG však neměl vliv. Po preinkubaci steatotické PA skupiny s EGCG nebyl nalezen statisticky nižší obsah TAG v těchto hepatocytech.

## 8. DISKUSE A ZÁVĚRY

### 8.1. Porovnání kultivace primárních hepatocytů v *monolayeru* a v sendvičovém uspořádání

Primární kultury hepatocytů jsou používány řadu let jako alternativa k *in vivo* pokusům. Kultivační technika tzv. *monolayeru* (jedné vrstvy buněk přichycených k extracelulární matrix) dovoluje během několika hodin vytvoření kontaktů mezi buňkami, buňky získávají polygonální tvar (9). Dochází však k rychlé dediferenciaci hepatocytů a ztrátě jejich polarity (22, 23). Nastává pokles funkční kapacity hepatocytů, který se zvyšuje s délkou kultivace (24). Dediferenciaci hepatocytů je doprovázena ztrátou viability (25). Morfologicky lze postupně zaznamenat ztrátu kontaktů mezi buňkami, buňky tvarově připomínají fibroblasty a nakonec se odlučují od extracelulární matrix. Sendvičová metoda, při které jsou hepatocyty umístěny mezi dvě vrstvy extracelulární matrix, umožňuje vytvoření kontaktů nejen vzájemně mezi buňkami, ale také mezi buňkami a extracelulární matrix a přiblížit tak více *in vitro* podmínky skutečnému uspořádání v játrech. U hepatocytů se takto daří déle zachovat jejich funkce jako je produkce ury a albuminu (26), nedochází tak rychle k poklesu aktivity biotransformačních enzymů (9, 27, 28). Otázkou je, zda již při kultivaci trvajících 2 dny jsou výhody sendvičové

techniky tak výrazné a bylo by vhodnější používat sendvičovou techniku i pro krátkodobější kultivace.

Faktorem ovlivňujícím stav a funkci buněk v kultuře je i složení kultivačního média (29, 30). Zpravidla se používá komerčně dodávané, v našem případě Williams' E médium, které se dále obohacuje o další složky podporující přichycení buněk na kultivační jamku a udržení diferencovaného fenotypu hepatocytů. K prevenci mikrobiální kontaminace kultur jsou média suplementována antibiotiky a antimykotiky.

Diskutabilním suplementem kultivačního média je fetální bovinní sérum. Ačkoliv bovinní pankreatický inhibitor trypsinu obsažený v séru může mít užitečný vliv na trypsinové proteázy v membránách a zamezit poizolační autodegradaci buněk (31), některé studie uvádějí příznivější dopad bez jeho přídatku (27, 30).

Naším úkolem bylo zavést sendvičovou kultivaci hepatocytů, porovnat ji s kultivací v *monolayeru* a dále zhodnotit vliv obsahu FBS v kultivačním médiu na kulturu v *monolayeru* a sendviči. Zaměřili jsme se na hodnocení viability hepatocytů, úroveň oxidačního stresu a funkční kapacitu hepatocytů. Parametry byly měřeny 2., 4., 6., 8. a 10 den kultivace. Bohužel, technické komplikace v našem experimentu nedovolily měření parametrů 1. den kultivace, podařilo se pouze získat fotografie kultur.

Soudě z našich výsledků, kultivace v prvních dvou dnech nepřináší výrazné rozdíly mezi technikou v *monolayeru* a sendvičovou metodou. Literární zdroje uvádějí, že LDH leakage byl u sendvičových kultur 1. den kultivace dokonce až dvojnásobně vyšší oproti *monolayeru* (27), což mohlo souviset i s pomalejší adaptací hepatocytů po izolaci, pro což svědčil morfologický obraz. Zatímco hepatocyty v *monolayeru* vytvořily vzájemné kontakty a získaly polygonální tvar již 4 hod. po „seedingu“ (proces přichycování k podkladu), u sendvičů proces trval 24 hod. Současně energetický stav buněk, resp. obsah ATP, byl první den kultivace u sendvičů nižší (27).

Od 4. dne již námi sledované parametry poukazují na výhody kultivace v sendviči, zejména v médiu bez přídatku séra. Sendvičový typ kultivace podporuje vyšší schopnost antioxidační obrany proti rozvoji oxidačního stresu, ke kterému dochází během kultivace (9, 32), což by mohlo vysvětlit nízkou úroveň lipoperoxidace v našich sendvičových kulturách. Velmi důležitým aspektem pro upřednostnění sendvičové kultivace je úroveň aktivity biotransformačních enzymů, což je zásadní např. při farmakologických studiích zaměřených na lékové interakce. Sendvičová technika kultivace může omezit jejich pokles, resp. udržet aktivitu relativně stabilní až 14 dní (27, 32, 33).

**Závěr:** Podařilo se nám do naší laboratoře zavést metodiku sendvičové kultivace primárních hepatocytů potkana. Výrazné rozdíly stavu hepatocytů byly zaznamenány od 4. dne kultivace, kdy sendvičový model poskytuje lepší zachování morfologických i funkčních parametrů hepatocytů. Nicméně, pro naše účely studia mechanismů hepatotoxicity a potenciálních hepatoprotektiv na 1 až dvoudenních kulturách by měla postačit metodika kultivace v *monolayeru*.

## 8.2. Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové

Literární údaje svědčí pro možnost indukce steatózy *in vitro* pomocí přídatku mastných kyselin do média kultivovaných buněk. Nejvíce zastoupenými mastnými kyselinami v potravě a triacylglycerolech normálních i steatotických jater jsou nasycená kyselina palmitová (C16:0) a mononenasycená kyselina olejová (C18:1) (15, 34). V době, kdy tato naše studie vznikala, nebyly nalezeny uspokojivé údaje o dopadu na hepatocyty potkana, které bývají v modelech

*in vitro* hojně využívány. Naším cílem bylo ukázat, jaký efekt má PA a OA na rozvoj steatózy, cytotoxicitu a na funkční kapacitu potkaních hepatocytů v primární kultuře, který nebyl v literatuře uspokojivě popsán.

Přídavek kyseliny palmitové i olejové vedl k signifikantnímu nárůstu obsahu TAG v hepatocytech, který byl závislý na koncentraci mastných kyselin v médiu. Neexistuje jednotný názor, která mastná kyselina indukuje výraznější steatózu (14, 15, 35). Naše výsledky dokumentují, že při nižších koncentracích (0,25; 0,5 mM) mastných kyselin v médiu působila jako větší steatogenní činidlo kyselina palmitová, ve vyšších koncentracích (0,75; 1 mM) vykazovala větší steatogenní efekt naopak kyselina olejová. Vzájemně se vztahující koncentrace PA může mít dopad na útlum tvorby TAG (36). PA nemusí být schopna navodit inkorporaci mastných kyselin do TAG tak efektivně jako OA (35, 37). Tvorba TAG indukovaná olejovou kyselinou může být alespoň zčásti vysvětlena zvýšením exprese lipogenních transkripčních faktorů SREBP-1 a PPAR  $\gamma$  (35).

Naše výsledky potvrdily, že palmitová kyselina vystupuje jako cytotoxické agens, což je v souladu se závěry studií na hepatomových liniích a lidských primárních kulturách hepatocytů (14, 38).

Mezi mírou steatózy a rozsahem poškození buněk nebyla nalezena přímá úměra. Existuje představa, že inkorporace volných mastných kyselin do TAG může působit jako mechanismus vedoucí k ochraně jater před toxicitou volných mastných kyselin (35, 39, 40). V naší studii ovšem hepatocyty vystavené 0,25 a 0,5 mM koncentraci PA vykazovaly vyšší akumulaci TAG zároveň s vyšší cytotoxicitou než hepatocyty vystavené stejně koncentrované kyselině olejové.

Cytotoxicita nasycených mastných kyselin je provázána apoptózou (14, 15, 35). V naší práci jsme po inkubaci hepatocytů s PA zaznamenali signifikantní vzestup aktivity exekutivní kaspázy 3. Oproti tomu expozice buněk OA nezpůsobila vzrůst aktivity kaspázy 3. Ostatní autoři popisují také nulový či pouze malý efekt kyseliny olejové na indukci apoptózy (35, 41, 42). Pro účast mitochondrií v aktivaci apoptózy svědčí nález zvýšené aktivity kaspázy 9 po vystavení HepG2 buněk kyselině palmitové, zatímco olejová kyselina neměla vliv (15). Naše výsledky dokumentují pokles MMP po inkubaci hepatocytů s PA. V případě olejové kyseliny byl MMP zachován.

Mocným stimulem schopným spustit apoptotickou kaskádu v buňce je oxidační stres. Vystavení palmitové kyselině vede k tvorbě ROS (43). V naší práci jsme po inkubaci hepatocytů s PA zaznamenali zvýšenou tvorbu ROS, která korespondovala s aktivací kaspázy 3. Je tedy pravděpodobné, že vznik reaktivních kyslíkových radikálů hraje v apoptóze navozené mastnými kyselinami významnou roli. Kultivace buněk s kyselinou olejovou naopak nezpůsobila tvorbu ROS ani nezvýšila aktivitu kaspázy 3. Tento nález potvrdili i jiní autoři (38).

Naše výsledky prokazují protektivní efekt mononenasycené olejové kyseliny vůči poškození nasycenou palmitovou kyselinou. Tento významný protektivní účinek byl potvrzen jinými autory i později po publikaci našich výsledků (44). PA způsobuje pokles MMP, aktivaci apoptózy a buněčnou smrt, které jsou úzce asociovány se změnami ve skladbě buněčných fosfolipidů (37). V uvedené práci měl přídavek OA k PA za následek snížení inkorporace PA do buněčných fosfolipidů a zvýšení esterifikace TAG. Podpora produkce TAG pravděpodobně ale nebude klíčovým ochranným mechanismem před cytotoxickým účinkem PA, přestože přídavkem OA došlo k potlačení tvorby ROS a aktivace apoptózy. Slibnějším vysvětlením ochranného účinku OA může být její vliv na regulační enzym JNK (44). Inhibice apoptózy navozené mastnými kyselinami je dáována také do souvislosti s autofagií (45, 46).

**Závěr:** V primární kultuře potkaních hepatocytů mohou obě kyseliny při izolovaném použití navodit signifikantní zvýšení obsahu TAG, které je však v případě PA provázeno výrazným cytotoxickým účinkem s produkcí ROS, poklesem mitochondriálního membránového potenciálu a funkční kapacity hepatocytů s markery jak apoptózy, tak nekrózy. Použití směsi OA a PA je doprovázeno vznikem steatózy spojené s nižší cytotoxicitou a lépe zachovanou funkční kapacitou hepatocytů.

### 8.3. Hodnocení protektivního účinku EGCG na potkaní hepatocyty v primární kultuře modelově poškozené D-galaktosaminem

Hlavní komponentou zeleného nefermentovaného čaje jsou katechiny, především epigalokatechin galát (EGCG), který má silné antioxidační účinky. Tato složka může být účinná především pro choroby spojené s oxidačním stresem (47).

*In vitro* techniky odstraňují problém nízké biodostupnosti a umožňují tak určení koncentrací dané látky, které jsou pro hepatocyty netoxické či mají určitý hepatoprotektivní efekt. Cílem naší práce bylo stanovit potenciální hepatoprotektivní efekt EGCG na primární kulturu hepatocytů potkana modelově poškozených D-galaktosaminem. Experiment probíhal v uspořádání, kdy byly hepatocyty vystaveny současně EGCG a D-GalN nebo byly hepatocyty nejprve 24 hodin preinkubovány se samotným EGCG.

Zjistili jsme, že pro intaktní hepatocyty v primární kultuře jsou netoxické dávky EGCG v rozsahu 1,25 - 10  $\mu\text{mol/l}$ . Cytotoxický efekt byl pozorován od 20  $\mu\text{M}$  koncentrace EGCG. Jiní autoři testující cytotoxicitu v *in vitro* podmínkách na hepa1c1c7 myších určili jako toxické dávky EGCG od 100  $\mu\text{mol/l}$  (48). V naší práci netoxické dávky 1,25 - 10  $\mu\text{M}$  EGCG chránily hepatocyty před hepatotoxicitou způsobenou D-GalN. Tento protektivní efekt závisel na načasování dávky EGCG ve vztahu k podání D-GalN. Preventivní preinkubace se samotným EGCG před podáním D-GalN (pretreatment) zmírnila poškození hepatocytů, zatímco pouze simultánní podání EGCG a D-GalN (cotreatment) selhalo.

Smrt hepatocytů způsobená D-GalN spojená s nárůstem oxidačního stresu a zvýšenou produkcí ROS byla popsána v *in vivo* (49, 50) i *in vitro* (51, 52) podmínkách. V našem pretreatmentovém uspořádání experimentu došlo k zachování viability hepatocytů, která korelovala s omezením zvýšené lipoperoxidace způsobené D-GalN. Katechiny jsou považovány za účinné "zhášače" ROS. EGCG je schopno snížit koncentraci lipidových volných radikálů a tím zastavit iniciační a propagační fázi lipoperoxidace. Pokud EGCG vstoupí do lipidové dvojvrstvy, tento protektivní efekt se může projevit v cytoplazmatické membráně (53). D-GalN působí prooxidačně jednak indukci lipoperoxidace a dale snížením obsahu GSH v hepatocytech (24, 54). Buňky reagují na lipoperoxidaci indukci antioxidačních mechanismů (55). GSH je podstatná molekula vystupující jako zhášač a eliminátor reaktivních metabolitů a ROS (56). Bylo zdokumentováno, že EGCG je k likvidaci lipoperoxidace využíván přednostně před GSH, čímž chrání před poklesem GSH a oxidačním poškozením (47, 57). V naší práci EGCG sice zmírnil lipoperoxidaci, nicméně účinek na zachování hladiny GSH nebyl potvrzen. Zelený čaj může zvýšit biosyntézu glutathionu (58). Nelze vyloučit možnost, že během pretreatmentu s EGCG došlo ke zvýšené biosyntéze GSH, který byl posléze působením D-GalN oxidován na GSSG. Oxidační stres mohl překročit kapacitu antioxidačních mechanismů schopných redukce GSSG na GSH (59). Vzniklý GSSG také prochází membránou do kultivačního média (60), kde jsme koncentrace GSH a GSSG nestanovovali. Na izolovaných hepatocytech byla zaznamenána schopnost EGCG reagovat s GSH a způsobit tak jeho přechodný nedostatek (56, 61). Kultivace hepatocytů s EGCG a D-GalN (bez předcházejícího pretreatmentu s EGCG) mohla v protektivním účinku selhat díky prohloubení nedostatku GSH.

D-GalN ovlivňuje také metabolické funkce. V naší práci potlačoval syntézu albuminu a ury. Oxidační stres navozený D-GalN je doprovázen produkcí prozánětlivých cytokinů (49). Tyto cytokiny mohou zapříčinit změny v genové expresi v játrech, která může způsobit pokles syntézy albuminu (62-64). Nemůžeme tedy vyloučit, že v naší studii byla narušena tvorba albuminu v reakci na produkci prozánětlivých cytokinů. Ačkoliv literární data naznačují protektivní efekt zeleného čaje na uvolnění a účinnost prozánětlivých cytokinů (49, 65, 66), které měly za následek snížení hepatotoxicity, naše výsledky nenalezly protektivní efekt EGCG na syntézu albuminu.

**Závěr:** Protektivní efekt na potkaní hepatocyty v primární kultuře poškozené D-galaktosaminem vykazovala pouze preventivní preinkubace s EGCG. K ochraně plazmatické membrány mohla přispět redukce peroxidace lipidů z lipidové dvojvrstvy. Ačkoliv pozitivní efekt EGCG na produkci GSH nemůžeme vyloučit, oxidační stres indukovaný v naší práci nejspíše přesáhl schopnost antioxidačních mechanismů zvrátit nedostatek GSH v hepatocytech.

#### 8.4. Hodnocení citlivosti primární kultury hepatocytů s prostou steatózou navozenou mastnými kyselinami na toxické poškození D-galaktosaminem

Bylo prokázáno, že pacienti s NAFLD mohou vykazovat vyšší náchylnost k lékovému poškození jater než běžná populace (67, 68).

V našem experimentu jsme použili model navozující dostatečnou steatózu bez markantnějšího poškození hepatocytů. Tuto podmínku splňovalo použití samotné OA či kombinace OA:PA 3:1 o koncentraci 0,75 mmol/l k indukci steatózy. Jako modelový toxin byl použit D-galaktosamin (D-GalN) o koncentraci 2,5; 5; 10; 20 a 30 mmol/l.

Naše výsledky dokumentují vyšší citlivost steatotických hepatocytů k toxickému poškození D-GalN. V práci porovnávací účinek D-GalN na hepatocyty izolované z normálních a steatotických jater potkana (indukováno podáváním vysokotukové diety po 6 týdnů) byly nalezeny srovnatelné výsledky LDH leakage. U nesteatotických hepatocytů stoupal LDH leakage od koncentrace D-GalN 30 mmol/l, zatímco u steatotických již od 20 mmol/l D-GalN. Nárůst aktivity kaspázy 3 nebyl pozorován v žádné ze skupin (69).

Oxidační stres přispívá k rozvoji toxického účinku D-GalN (52, 54, 70). Steatotické hepatocyty mohou být citlivější k navození produkce ROS a lipoperoxidace působením D-GalN (69). V naší práci přídavek D-GalN do média k hepatocytům se steatózou navozenou pouze olejovou kyselinou nezvyšoval oproti nesteatotickým hepatocytům se stejným přídávkem D-GalN produkci ROS ani aktivitu kaspázy 3. Jiná situace byla ovšem v případě, kde byla jako steatogenní činidlo použita kombinace OA:PA. Po přídávku 2,5 - 10 mM D-GalN k těmto hepatocytům byla oproti nesteatotickým hepatocytům se stejným obsahem D-GalN zaznamenána vyšší produkce ROS. Po přídávku 2,5 mM D-GalN byla nalezena rovněž vyšší aktivita kaspázy 3. Zvýšená produkce ROS navozuje dysfunkci mitochondrií a MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore) (71). Naše předchozí výsledky dokumentují výrazný efekt PA na snížení MMP a produkci ROS, který byl potlačen OA. Ačkoliv byl zmíněný ochranný účinek zaznamenán při použití ekvimolární směsi OA a PA, zdá se, že k zesílení poškozujícího účinku přidaného D-GalN postačuje i podstatně menší obsah PA ve steatogenním činidle.

**Závěr:** Naše výsledky s použitím *in vitro* modelu steatózy primárních hepatocytů potkana navozené mastnými kyselinami potvrzují vyšší citlivost steatotických hepatocytů k toxickému poškození D-galaktosaminem. Míra citlivosti závisí na přítomnosti kyseliny palmitové ve steatogenním médiu. Lze spekulovat, že svoji úlohu sehrává oxidační stres a

mitochondriální dysfunkce, které jsou palmitovou kyselinou výrazně podporovány. Ochranný efekt, který vykazuje olejová kyselina na cytotoxické působení kyseliny palmitové, se pravděpodobně v tomto případě neuplatnil, mechanismus je však třeba dále zkoumat.

#### 8.5. Hodnocení potenciálního protektivního účinku EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity indukovanými mastnými kyselinami v primární kultuře hepatocytů

Dále nás zajímalo, může-li EGCG snížit rozvoj steatózy a popř. tlumit lipotoxický účinek. V naší studii jsme využili model *in vitro* steatózy navozený OA, kombinací OA a PA 3:1 a PA v celkové koncentraci mastných kyselin 0,5 mmol/l. Dle našich výše uvedených výsledků OA, resp. OA s PA navodí steatózu, avšak bez výrazného poškození hepatocytů. PA indukuje steatózu provázenou lipotoxickým poškozením.

Hepatocyty byly nejprve kultivovány 24 hod. s EGCG (0,625; 1,25; 2,5; 5  $\mu$ M) a po výměně média pokračovala dalších 24 hod. kultivace s EGCG a současně s mastnými kyselinami. Indukce steatózy pomocí PA měla dle očekávání za následek zvýšení LDH leakage, produkce ROS a lipoperoxidace. EGCG zmírnil lipotoxický efekt PA ve všech použitých koncentracích, a to až na hladinu ničím neovlivněných kontrol, v případě MDA dokonce pod tyto hodnoty. Pokud byla ve steatogenním médiu přítomna OA, ke zvýšení těchto parametrů indukcí steatózy nedošlo, ovšem i v těchto skupinách vedl přídavek EGCG k poklesu úniku LDH do média a tvorby ROS, a to pod hodnoty nesteatotických hepatocytů neovlivněných EGCG. V závislosti na koncentraci EGCG došlo i k poklesu tvorby MDA. EGCG snížil LDH leakage a tvorbu ROS dokonce i u nesteatotických buněk. EGCG je schopno snížit koncentraci lipidových volných radikálů a tím zastavit iniciační a propagační fázi lipoperoxidace. Pokud EGCG vstoupí do lipidové dvojvrstvy, tento protektivní efekt se může projevit v cytoplazmatické membráně (53). Schopnost snížit oxidační stres účinkem EGCG byla zjištěna i na modelu dietou navozené NASH (72).

Tlumivý účinek EGCG na rozvoj steatózy se lišil s ohledem na mastnou kyselinu, která byla k indukci použita. V případě OA byl účinkem EGCG zmírněn rozvoj steatózy. Pokud byla použita PA, ať samostatně nebo ve směsi s OA, potlačení obsahu TAG v hepatocytech nebylo pozorováno. Ovšem v případě kombinace OA:PA 3:1 byla preinkubací s EGCG zmírněna akumulace olejové červeně O svědčící pro zmírnění steatózy. U skupiny PA bylo snížení akumulace Oil Red O v hepatocytech pozorováno pouze po 2,5  $\mu$ M EGCG ( $p < 0,01$ ). Jiní autoři (73) sice prokázali vliv EGCG na snížení TAG v hepatocytech se steatózou indukovanou PA spojený s poklesem exprese proteinů SREBP-1c a FAS významnými v lipogenezi, ale účinek testovali na HepG2 linii a použili nižší koncentraci PA a vyšší koncentraci EGCG. Obdobně nález zvýšené autofagie účinkem 40  $\mu$ M EGCG a poklesu intracelulárních lipidů byl studován na Huh7 linii. Významným faktorem pro zahájení autofagie byla popsána AMPK (AMP-aktivovaná proteinová kinasa), jejíž fosforylaci EGCG podporuje (74).

V naší práci všechny koncentrace EGCG způsobily vyšší aktivitu kaspázy 3. V literatuře je popsán antiproliferativní a proapoptotický vliv EGCG na nádorové buňky (75-77), EGCG má schopnost aktivovat kaspázy a působí inhibičně na aktivovaný NF- $\kappa$ B v nádorových buňkách (77). EGCG také zvýšil expresi proapoptotického p53 a Bax (78). Informací o účinku EGCG na nenádorové hepatocyty v literatuře není mnoho (79, 80). V naší laboratoři byl však pozorován proapoptotický efekt EGCG i na primárních kulturách hepatocytů potkana (81). V tomto případě byly použity vyšší koncentrace EGCG než v našem experimentu (od 5 – 100  $\mu$ mol/l) a statisticky významné zvýšení aktivity kaspázy 3 bylo pozorováno od 10  $\mu$ M EGCG. Obdobný nález jsme zaznamenali i na hepatocytech potkana izolovaných po parciální hepatektomii a kontrolní laparotomii, které byly dále 24 hod. kultivovány s EGCG (82). Je třeba však

podotknout, že doba kultivace s EGCG u našich předešlých prací byla 24 hod., zatímco v našem experimentu probíhala inkubace s EGCG 48 hod..

**Závěr:** Naše studie poukázala na význam EGCG v prevenci oxidačního stresu spojeného s rozvojem steatózy a útlumu lipototoxicity. Vliv EGCG na samotný obsah tuků v hepatocytech však v naší práci není jednoznačný. Pokles TAG byl pozorován pouze při rozvoji steatózy indukované OA, pokud byla přítomna PA ve směsi s OA nebo samotná, pokles nebyl pozorován. V tomto ohledu jsou potřeba studie, které by přinesly další informace o regulaci metabolismu lipidů v přítomnosti různých mastných kyselin a možnostech jeho ovlivnění. V naší práci jsme zaznamenali proapoptotický efekt EGCG na neztukovatělých i steatotických hepatocytech potkana.

## 9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Tolman KG, Dalpiaz AS. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Ther Clin Risk Manag.* 2007;3(6):1153–63.
2. Kucera O, Rousar T, Stankova P, Hanackova L, Lotkova H, Podhola M, et al. Susceptibility of rat non-alcoholic fatty liver to the acute toxic effect of acetaminophen. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 2012;27(2):323-30.
3. Kucera O, Lotkova H, Stankova P, Podhola M, Rousar T, Mezera V, et al. Is rat liver affected by non-alcoholic steatosis more susceptible to the acute toxic effect of thioacetamide? *International journal of experimental pathology.* 2011;92(4):281-9.
4. Kucera O, Endlicher R, Rousar T, Lotkova H, Garnol T, Drahota Z, et al. The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2014;2014:752506.
5. Oliveira MR, Nabavi SF, Daglia M, Rastrelli L, Nabavi SM. Epigallocatechin gallate and mitochondria-A story of life and death. *Pharmacological research.* 2016;104:70-85.
6. Eng QY, Thanikachalam PV, Ramamurthy S. Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *J Ethnopharmacol.* 2018;210:296-310.
7. Chowdhury A, Sarkar J, Chakraborti T, Pramanik PK, Chakraborti S. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* 2016;78:50-9.
8. Bachmann A, Moll M, Gottwald E, Nies C, Zantl R, Wagner H, et al. 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays (Basel).* 2015;4(1):64-83.
9. Tuschl G, Mueller SO. Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes-cell morphology and differential gene expression. *Toxicology.* 2006;218(2-3):205-15.
10. Kucera O, Garnol T, Lotkova H, Stankova P, Mazurova Y, Hroch M, et al. The effect of rat strain, diet composition and feeding period on the development of a nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* 2011;60(2):317-28.
11. Vetelainen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 2007;22(9):1526-33.
12. Feillet-Coudray C, Fouret G, Vigor C, Bonafos B, Jover B, Blachnio-Zabielska A, et al. Long-Term Measures of Dyslipidemia, Inflammation, and Oxidative Stress in Rats Fed a High-Fat/High-Fructose Diet. *Lipids.* 2019;54(1):81-97.
13. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2014;10(2):131-45.
14. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipopoptosis. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(17):12093-101.



15. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Martinez-Romero A, Jimenez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-biological interactions*. 2007;165(2):106-16.
16. Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, et al. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology*. 2007;46(3):823-30.
17. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *The Journal of cell biology*. 1969;43(3):506-20.
18. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in cell biology*. 1976;13:29-83.
19. Lefevre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Therond P, et al. [Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances]. *Annales de biologie clinique*. 1998;56(3):305-19.
20. Rousar T, Kucera O, Lotkova H, Cervinkova Z. Assessment of reduced glutathione: comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Analytical biochemistry*. 2012;423(2):236-40.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
22. Beigel J, Fella K, Kramer PJ, Kroeger M, Hewitt P. Genomics and proteomics analysis of cultured primary rat hepatocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2008;22(1):171-81.
23. Zeigerer A, Wuttke A, Marsico G, Seifert S, Kalaidzidis Y, Zerial M. Functional properties of hepatocytes in vitro are correlated with cell polarity maintenance. *Experimental cell research*. 2017;350(1):242-52.
24. Kucera O, Cervinková Z, Lotková H, Kriváková P, Rousar T, Muzáková V, et al. Protective effect of S-adenosylmethionine against galactosamine-induced injury of rat hepatocytes in primary culture. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2006;55(5):551-60.
25. Elaut G, Henkens T, Papeleu P, Snykers S, Vinken M, Vanhaecke T, et al. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Current drug metabolism*. 2006;7(6):629-60.
26. Rowe C, Gerrard DT, Jenkins R, Berry A, Durkin K, Sundstrom L, et al. Proteome-wide analyses of human hepatocytes during differentiation and dedifferentiation. *Hepatology*. 2013;58(2):799-809.
27. Tuschl G, Hrach J, Walter Y, Hewitt PG, Mueller SO. Serum-free collagen sandwich cultures of adult rat hepatocytes maintain liver-like properties long term: a valuable model for in vitro toxicity and drug-drug interaction studies. *Chemico-biological interactions*. 2009;181(1):124-37.
28. Bell CC, Dankers ACA, Lauschke VM, Sison-Young R, Jenkins R, Rowe C, et al. Comparison of Hepatic 2D Sandwich Cultures and 3D Spheroids for Long-term Toxicity Applications: A Multicenter Study. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2018;162(2):655-66.
29. Fraczek J, Bolleyn J, Vanhaecke T, Rogiers V, Vinken M. Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: at the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies. *Archives of toxicology*. 2013;87(4):577-610.
30. Vinken M, Papeleu P, Snykers S, De Rop E, Henkens T, Chipman JK, et al. Involvement of cell junctions in hepatocyte culture functionality. *Critical reviews in toxicology*. 2006;36(4):299-318.
31. Berry MN, Edwards AM. *The Hepatocyte Review*: Kluwer Academic Publishers; 2000. 605 p.
32. Orsini M, Sperber S, Noor F, Hoffmann E, Weber SN, Hall RA, et al. Proteomic Characterization of Primary Mouse Hepatocytes in Collagen Monolayer and Sandwich Culture. *Journal of cellular biochemistry*. 2018;119(1):447-54.
33. Bellwon P, Truisi GL, Bois FY, Wilmes A, Schmidt T, Savary CC, et al. Kinetics and dynamics of cyclosporine A in three hepatic cell culture systems. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2015;30(1 Pt A):62-78.
34. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2004;106(6):635-43.

35. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2009;24(5):830-40.
36. Pan Z, Wang J, Tang H, Li L, Lv J, Xia L, et al. Effects of palmitic acid on lipid metabolism homeostasis and apoptosis in goose primary hepatocytes. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;350(1-2):39-46.
37. Leamy AK, Egnatchik RA, Shiota M, Ivanova PT, Myers DS, Brown HA, et al. Enhanced synthesis of saturated phospholipids is associated with ER stress and lipotoxicity in palmitate treated hepatic cells. *Journal of lipid research*. 2014;55(7):1478-88.
38. Mei S, Ni HM, Manley S, Bockus A, Kassel KM, Luyendyk JP, et al. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2011;339(2):487-98.
39. Yamaguchi K YL, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007;45(6):1366-74.
40. Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1801(3):299-310.
41. Kong JY, Rabkin SW. Lovastatin does not accentuate but is rather additive to palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2002;67(5):293-302.
42. Sparagna GC, Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB. Fatty acid-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes: redox signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2001;3(1):71-9.
43. Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(18):14890-5.
44. Chen X, Li L, Liu X, Luo R, Liao G, Li L, et al. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life sciences*. 2018;203:291-304.
45. Zhang E, Lu X, Yin S, Yan M, Lu S, Fan L, et al. The functional role of Bax/Bak in palmitate-induced lipoapoptosis. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2019;123:268-74.
46. Munch D, Rodriguez E, Bressendorff S, Park OK, Hofius D, Petersen M. Autophagy deficiency leads to accumulation of ubiquitinated proteins, ER stress, and cell death in Arabidopsis. *Autophagy*. 2014;10(9):1579-87.
47. Jimenez-Lopez JM, Cederbaum AI. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate protects HepG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity. *Free radical biology & medicine*. 2004;36(3):359-70.
48. Inoue H, Maeda-Yamamoto M, Nesumi A, Murakami A. Delphinidin-3-O-galactoside protects mouse hepatocytes from (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cytotoxicity via up-regulation of heme oxygenase-1 and heat shock protein 70. *Nutrition research (New York, NY)*. 2012;32(5):357-64.
49. Lin BR, Yu CJ, Chen WC, Lee HS, Chang HM, Lee YC, et al. Green tea extract supplement reduces D-galactosamine-induced acute liver injury by inhibition of apoptotic and proinflammatory signaling. *Journal of biomedical science*. 2009;16:35.
50. Yoshikawa T, Furukawa Y, Murakami M, Takemura S, Kondo M. Effects of vitamin E on D-galactosamine-induced or carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Digestion*. 1982;25(4):222-9.
51. Gonzalez R, Ferrin G, Hidalgo AB, Ranchal I, Lopez-Cillero P, Santos-Gonzalez M, et al. N-acetylcysteine, coenzyme Q10 and superoxide dismutase mimetic prevent mitochondrial cell dysfunction and cell death induced by d-galactosamine in primary culture of human hepatocytes. *Chemico-biological interactions*. 2009;181(1):95-106.
52. Quintero A, Pedraza CA, Siendones E, Kamal ElSaid AM, Colell A, Garcia-Ruiz C, et al. PGE1 protection against apoptosis induced by D-galactosamine is not related to the modulation of intracellular free radical production in primary culture of rat hepatocytes. *Free radical research*. 2002;36(3):345-55.
53. Saffari Y, Sadrzadeh SM. Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life sciences*. 2004;74(12):1513-8.

54. McMillan JM, Jollow DJ. Galactosamine hepatotoxicity: effect of galactosamine on glutathione resynthesis in rat primary hepatocyte cultures. *Toxicology and applied pharmacology*. 1992;115(2):234-40.
55. Seven A, Guzel S, Seymen O, Civelek S, Bolayirli M, Uncu M, et al. Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. *Yonsei medical journal*. 2004;45(4):703-10.
56. Lu Y, Sun J, Petrova K, Yang X, Greenhaw J, Salminen WF, et al. Metabolomics evaluation of the effects of green tea extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2013;62C:707-21.
57. Murakami C, Hirakawa Y, Inui H, Nakano Y, Yoshida H. Effects of epigallocatechin 3-O-gallate on cellular antioxidative system in HepG2 cells. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2002;48(2):89-94.
58. Park HJ, DiNatale DA, Chung MY, Park YK, Lee JY, Koo SI, et al. Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic antioxidant defenses in ob/ob mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2011;22(4):393-400.
59. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(10):1169-83.
60. Lotkova H, Cervinkova Z, Kucera O, Krivakova P, Kand'ar R. Protective effect of S-adenosylmethionine on cellular and mitochondrial membranes of rat hepatocytes against tert-butylhydroperoxide-induced injury in primary culture. *Chemico-biological interactions*. 2005;156(1):13-23.
61. Galati G, Lin A, Sultan AM, O'Brien PJ. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free radical biology & medicine*. 2006;40(4):570-80.
62. Marinkovic S, Jahreis GP, Wong GG, Baumann H. IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1989;142(3):808-12.
63. Sharma RJ, Macallan DC, Sedgwick P, Remick DG, Griffin GE. Kinetics of endotoxin-induced acute-phase protein gene expression and its modulation by TNF-alpha monoclonal antibody. *The American journal of physiology*. 1992;262(5 Pt 2):R786-93.
64. Wang XY, Li WQ, Lu J, Li N, Li JS. [Mechanism of reduction of albumin expression induced by lipopolysaccharide in rat hepatocytes]. *Chinese medical journal*. 2005;118(20):1695-702.
65. He P, Noda Y, Sugiyama K. Green tea suppresses lipopolysaccharide-induced liver injury in d-galactosamine-sensitized rats. *The Journal of nutrition*. 2001;131(5):1560-7.
66. Abe K, Ijiri M, Suzuki T, Taguchi K, Koyama Y, Isemura M. Green tea with a high catechin content suppresses inflammatory cytokine expression in the galactosamine-injured rat liver. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*. 2005;26(5):187-92.
67. Tarantino G, Conca P, Basile V, Gentile A, Capone D, Polichetti G, et al. A prospective study of acute drug-induced liver injury in patients suffering from non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2007;37(6):410-5.
68. Tarantino G, Di Minno MN, Capone D. Drug-induced liver injury: is it somehow foreseeable? *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009;15(23):2817-33.
69. Kucera O, Lotkova H, Sobotka O, Cervinkova Z. The effect of D-galactosamine on lean and steatotic rat hepatocytes in primary culture. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2016;64 Suppl 5:S637-46.
70. Ranchal I, Gonzalez R, Lopez-Sanchez LM, Barrera P, Lopez-Cillero P, Serrano J, et al. The differential effect of PGE(1) on d-galactosamine-induced nitrosative stress and cell death in primary culture of human hepatocytes. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2006;79(3-4):245-59.
71. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;46(6):821-31.

72. Kuzu N, Bahcecioglu IH, Dagli AF, Ozercan IH, Ustundag B, Sahin K. Epigallocatechin gallate attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by high fat diet. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008;23(8 Pt 2):e465-70.
73. Zhang Q, Yuan H, Zhang C, Guan Y, Wu Y, Ling F, et al. Epigallocatechin gallate improves insulin resistance in HepG2 cells through alleviating inflammation and lipotoxicity. *Diabetes research and clinical practice*. 2018;142:363-73.
74. Zhou J, Farah BL, Sinha RA, Wu Y, Singh BK, Bay BH, et al. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), a Green Tea Polyphenol, Stimulates Hepatic Autophagy and Lipid Clearance. *PloS one*. 2014;9(1):e87161.
75. Valenti D, de Bari L, Manente GA, Rossi L, Mutti L, Moro L, et al. Negative modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation by epigallocatechin-3 gallate leads to growth arrest and apoptosis in human malignant pleural mesothelioma cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1832(12):2085-96.
76. Nishikawa T, Nakajima T, Moriguchi M, Jo M, Sekoguchi S, Ishii M, et al. A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins. *Journal of hepatology*. 2006;44(6):1074-82.
77. Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene*. 2004;23(14):2507-22.
78. Roy AM, Baliga MS, Katiyar SK. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(1):81-90.
79. Ni J, Guo X, Wang H, Zhou T, Wang X. Differences in the Effects of EGCG on Chromosomal Stability and Cell Growth between Normal and Colon Cancer Cells. *Molecules*. 2018;23(4).
80. Chen ZP, Schell JB, Ho CT, Chen KY. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett*. 1998;129(2):173-9.
81. Kucera O, Mezera V, Moravcova A, Endlicher R, Lotkova H, Drahota Z, et al. In vitro toxicity of epigallocatechin gallate in rat liver mitochondria and hepatocytes. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:476180.
82. Mezera V, Kucera O, Moravcova A, Peterova E, Cervinkova Z. The effect of epigallocatechin gallate on hepatocytes isolated from normal and partially hepatectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2014;92(6):512-7.

## 10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

### **Původní vědecké práce v impaktovaném časopise**

Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Rychtrmoc D, Lotková H. The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res* 2016; Suppl 5: S 627-36. IF: 1.461 (pro 2016)

Kučera O, Mezera V, Moravcová A, Endlicher R, Lotková H, Drahota Z, et al. In vitro toxicity of epigallocatechin gallate in rat liver mitochondria and hepatocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015:476180. doi: 10.1155/2015/476180 IF: 4.492 (pro 2015)

Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Rousar T, Rychtrmoc D, et al. Comparison of acetaminophen toxicity in primary hepatocytes isolated from transgenic mice with different apolipoprotein E alleles. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(6):863-73. IF: 2.804 (pro 2015)

Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Červinková Z. Epigallocatechin gallate does not accelerate the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* 2014; 59(5): 976-85. IF: 2.613 (pro 2014)

Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Červinková Z. The effect of epigallocatechin gallate on hepatocytes isolated from normal and partially hepatectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2014; 92(6): 512-7. IF: 2.386 (pro 2014)

### **Původní vědecká práce v recenzovaném časopise**

Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Lotková H. Antioxidative effect of epigallocatechin gallate against D-galactosamine-induced injury in primary culture of rat hepatocytes. *Acta Medica* 2014; 57 (1): 3-8.

### **Přednášky, plakátová sdělení**

#### přednáška

Moravcová A., Kučera O., Červinková Z., Mezera V., Lotková H.: Podíl kyseliny olejové a palmitové na indukci steatózy a cytotoxicitě v primární kultuře hepatocytů potkana. 91. Fyziologické dny, 3. – 5. 2. 2015, Brno

Mezera V., Kučera O., Moravcová A., Peterová E., Červinková Z.: Vliv epigalokatechin gallátu (EGCG) na regeneraci jater po částečné hepatektomii u potkanů. 41. Májové hepatologické dny, 15 - 17. 5. 2013, Karlovy Vary

#### Postery

Lotková H., Moravcová A., Kučera O., Červinková Z.: *In vitro* model of steatosis induced by fatty acids as a tool for studies of toxicity. 10th World Congress on Targeting Mitochondria, 27 – 29. 10. 2019, Berlin

Lotková H., Moravcová A., Kučera O., Rychtrmoc D., Červinková Z.: Hodnocení citlivosti steatotických hepatocytů v primární kultuře na toxické poškození. 92. Fyziologické dny, 2 - 4. 2. 2016, České Budějovice

Moravcová A., Kučera O., Červinková Z., Mezera V., Rychtrmoc D., Lotková H.: Cytotoxický účinek mastných kyselin a jeho dopad na funkční kapacitu hepatocytů potkana. 42. Májové hepatologické dny, 28 - 30. 5. 2014, Karlovy Vary

Mezera V., Kučera O., Moravcová A., Peterová E., Červinková Z.: Vliv epigalokatechin galátu (EGCG) na hepatocyty z potkanů po částečné hepatektomii. 42. Májové hepatologické dny, 28 - 30. 5. 2014, Karlovy Vary

Moravcová A., Červinková Z., Kučera O., Lotková H.: Zavedení a optimalizace podmínek sendvičové kultivace hepatocytů. 18. Vědecká konference LF a FN, 22. 1. 2014, Hradec Králové

Moravcová A., Lotková H., Kučera O., Roušar T., Červinková Z.: Účinek epigalokatechin galátu na primární kulturu hepatocytů modelově poškozených D-galaktosaminem. 41. Májové hepatologické dny, 15 - 17. 5. 2013, Karlovy Vary

Kučera O., Moravcová A., Roušar T., Mezera V., Lotková H., Endlicher R., Červinková Z.:  
Posouzení hepatoprotektivního a hepatotoxického účinku epigalokatechin galátu na  
hepatocyty potkana v primární kultuře. 41. Májové hepatologické dny, 15 - 17. 5. 2013,  
Karlovy Vary

Sákra L., Lotková H., Šiller J., Kohoutek L., Moravcová A., Červinková Z: Sekreční a fagocytární  
aktivita peritoneálních makrofágů 72 h. po laparoskopicky nebo laparotomicky vedené  
operaci u potkana. 88. Fyziologické dny, 7 - 9. 2. 2012, Hradec Králové