

Doktorský studijní program  
**Fyziologie a patologická fyziologie**

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

**The Study of Mechanisms of Hepatotoxic and  
Hepatoprotective Effects in a Model of Damaged Hepatocytes**

**Mgr. Alena Moravcová**

Školitel: doc. MUDr. Halka Lotková, Ph.D.

Školitel konzultant:

## **Prohlášení autora**

---

### **Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

**Hradec Králové, 2021**

**Alena Moravcová**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala všem, díky nimž tato práce vznikla. Předně mé školitelce doc. MUDr. Halce Lotkové, Ph.D. za odborné vedení během celého postgraduálního studia. Velmi děkuji paní prof. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc., která mě jako přednostka katedry a vedoucí týmu experimentální hepatologie podporovala jak po odborné stránce, tak při zajišťování technického a finančního zázemí pro výzkum. Děkuji doc. MUDr. Otto Kučerovi, Ph.D. za neocenitelnou pomoc v laboratorních metodách. Dále můj dík patří Janě Ondrákové, Mgr. Majce Vaculové a Mgr. Monice Pospíšilové za pomoc nejen s měřením biochemických parametrů. Všem z Ústavu fyziologie děkuji za přátelské a uvolněné prostředí, v němž byla práce zábavou. Můj velký dík patří mým rodičům za dlouholetou a všestrannou podporu, partnerovi Peťasovi i jeho rodičům za časté hlídání Pěti a Liborka.

Práce vznikla s využitím grantových prostředků PRVOUK P37/02 a grantu Vnitřní soutěže LF UK v HK s podporou firmy Roche 2012.

# **OBSAH**

<b>OBSAH.....</b>	<b>4</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>6</b>
<b>1. SOUHRN.....</b>	<b>10</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>14</b>
2.1. Stavba a funkce jater .....	14
2.2. Jaterní poškození.....	18
2.2.1. Hepatotoxiny jako příčina jaterního poškození.....	19
2.3. Mechanismy uplatňující se v jaterním poškození .....	21
2.3.1. Oxidační stres .....	21
2.3.1.1 Antioxidační ochrana jater .....	24
2.3.2. Smrt buňky .....	25
2.3.3. Jaterní zánět .....	29
2.3.4. Fibrotizace jater .....	31
2.4. Jaterní steatóza .....	33
2.4.1. Nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD).....	33
2.5. Hepatoprotektiva .....	35
2.6. Využití hepatocytů pro modelové systémy v <i>in vitro</i> podmínkách .....	37
<b>3. CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>41</b>
3.1. Porovnání kultivace primárních hepatocytů v <i>monolayeru</i> a v sendvičovém uspořádání .....	41
3.2. Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové.....	41
3.3. Hodnocení protektivního účinku EGCG na hepatocyty v primární kultuře modelově poškozené D-galaktosaminem .....	42
3.4. Hodnocení citlivosti primární kultury hepatocytů s prostou steatózou navozenou mastnými kyselinami na toxické poškození D-galaktosaminem.....	42
3.5. Hodnocení potenciálního protektivního účinku EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity indukovaný mastnými kyselinami v primární kultuře hepatocytů .....	42
<b>4. POUŽITÉ METODIKY <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>43</b>
4.1. Pokusná zvířata .....	43
4.2. Izolace hepatocytů .....	43
4.3. Stanovení viability izolovaných hepatocytů.....	46
4.4. Stanovení denzity suspenze hepatocytů .....	47
4.5. Zhotovení primárních kultur hepatocytů potkana.....	48
4.6. Biochemická stanovení.....	51

4.6.1. LDH leakage .....	51
4.6.2. WST-1 test .....	52
4.6.3. Stanovení malondialdehydu (MDA).....	52
4.6.4. Stanovení ROS .....	53
4.6.5. Obsah glutathionu v hepatocytech.....	53
4.6.6. Stanovení aktivity kaspázy 3.....	54
4.6.7. Produkce albuminu hepatocyty.....	54
4.6.8. Produkce urey hepatocyty.....	55
4.6.9. Obsah triacylglycerolů v hepatocytech .....	56
4.6.10. Obsah proteinů .....	57
4.7. Mikroskopické hodnocení buněk a speciální barvení .....	58
4.7.1. Mikroskopické hodnocení buněk ve fázovém kontrastu .....	58
4.7.2. Vizualizace membránového potenciálu mitochondrií pomocí JC-1 .....	59
4.7.3. Barvení tukových kapének pomocí Oil Red O .....	59
4.8. Statistické hodnocení dat .....	60
<b>5. VÝSLEDKY.....</b>	<b>61</b>
5.1. Porovnání kultivace primárních hepatocytů v <i>monolayeru</i> a v sendvičovém uspořádání.....	61
5.2. Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové	67
5.3. Hodnocení protektivního účinku EGCG na hepatocyty v primární kultuře modelově poškozené D-galaktosaminem .....	82
5.3.1. Současná kultivace hepatocytů s EGCG a 20 mM D-GalN po dobu 24 hodin.....	82
5.3.2. Kultivace hepatocytů s EGCG 24 hodin a následná 24-hod. kultivace s EGCG a 40 mM D-GalN...	85
5.4. Hodnocení citlivosti primární kultury hepatocytů s prostou steatózou navozenou mastnými kyselinami na toxické poškození D-galaktosaminem.....	90
5.5. Hodnocení potenciálního protektivního účinku EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity indukovaný mastnými kyselinami v primární kultuře hepatocytů .....	95
<b>6. DISKUSE A ZÁVĚRY .....</b>	<b>106</b>
6.1. Porovnání kultivace primárních hepatocytů v <i>monolayeru</i> a v sendvičovém uspořádání .....	106
6.2. Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové .....	109
6.3. Hodnocení protektivního účinku EGCG na hepatocyty v primární kultuře modelově poškozené D-galaktosaminem.....	113
6.4. Hodnocení citlivosti primární kultury hepatocytů s prostou steatózou navozenou mastnými kyselinami na toxické poškození D-galaktosaminem.....	116
6.5. Hodnocení potenciálního protektivního účinku EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity indukovaný mastnými kyselinami v primární kultuře hepatocytů .....	118
<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>121</b>

## SEZNAM ZKRATEK

<b>4-AAP</b>	4-aminoantipyrin
<b>ADH</b>	enzym alkoholdehydrogenáza
<b>AFLD</b>	<b>Alcoholic Fatty Liver Disease</b> ; alkoholová jaterní steatóza
<b>AIF</b>	<b>Apoptosis Inducing Factor</b> ; apoptózu indukující faktor
<b>ALDH</b>	acetaldehyddehydrogenáza
<b>ALT</b>	enzym alaninaminotransferáza
<b>AMC</b>	7-amino-4-methylkumarin
<b>AMP</b>	adenosinmonofosfát
<b>AMPK</b>	AMP-aktivovaná proteinová kinasa
<b>ANOVA</b>	<b>Analysis of Variance</b> ; analýza rozptylu – druh stat. testování hypotéz
<b>APAP</b>	Acetaminofen; paracetamol
<b>AST</b>	enzym aspartátaminotransferáza
<b>ATB</b>	antibiotikum
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>ATPáza</b>	enzym adenosintrifosfatáza
<b>Bad</b>	proapoptotický protein
<b>Bak</b>	proapoptotický protein
<b>Bax</b>	proapoptotický protein
<b>Bcl-2</b>	<b>B-cell Lymphoma</b> , rodina pro i protiapoptotických proteinů
<b>Bcl-xL</b>	<b>B-cell Lymphoma xL</b> , antiapoptotický protein lymfomu B buněk
<b>Bid</b>	proapoptotický protein
<b>BSA</b>	<b>bovinní sérový albumin</b>
<b>BSEP</b>	<b>Bile Salt Export Pump</b> ; transportní pumpa na kanalikulární membráně hep.
<b>cAMP</b>	cyklický adenosinmonofosfát
<b>CAT</b>	enzym kataláza
<b>cGMP</b>	cyklický guanosinmonofosfát
<b>CTGF</b>	<b>Connective tissue growth factor</b>
<b>CYP2E1</b>	Cytochrom P450 2E1
<b>CYP450</b>	Cytochrom P450; skupina mikrosomálních enzymů k eliminaci xenobiotik
<b>DAMP</b>	<b>Damage-Associated Molecular Patterns</b> ; znaky asociované s poškozením
<b>db/db</b>	myši s mutací genu pro leptinový receptor
<b>D-GalN</b>	D-Galaktosamin
<b>DGAT</b>	diacylglyceracyltransferasa
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle's medium</b>
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>DR 4</b>	<b>Death Receptor 4</b> (TRAIL R1); receptor smrti 4
<b>DR 5</b>	<b>Death Receptor 5</b> (TRAIL R2); receptor smrti 5
<b>ECM</b>	extracelulární matrix
<b>EGCG</b>	Epigalokatechin galát
<b>ELISA</b>	<b>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</b>
<b>EMT</b>	<b>Epithelial to Mesenchymal Transition</b>

<b>ER</b>	endoplazmatické retikulum
<b>ESPA</b>	N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)-m-anisidin
<b>ETC</b>	elektron - transportní řetězec
<b>Fas</b>	receptor smrti Fas
<b>FAS</b>	<b>Fatty Acid Synthase</b> ; syntáza mastných kyselin
<b>FasL</b>	Fas ligand (CD95L) - transmembránový protein z rodiny TNF cytokinů
<b>FBS</b>	fetální <b>bovinní sérum</b>
<b>FFA</b>	<b>Free Fatty Acid</b> ; volná mastná kyselina
<b>GalN</b>	Galaktosamin
<b>GPx</b>	glutathionperoxidáza
<b>GR</b>	glutathion reduktáza
<b>GSH</b>	redukovaná forma glutathionu
<b>GSSG</b>	oxidovaný dimer glutathionu
<b>GST</b>	glutathion – S – transferáza
<b>H4IIEC3</b>	druh potkaní epiteliální hepatomové linie
<b>HDL</b>	<b>High Density Lipoprotein</b> ; lipoprotein s vysokou hustotou
<b>hepa1c1c7</b>	druh myší epiteliální hepatomové linie
<b>HepaRG</b>	Druh lidské immortalizované hepatocytární linie
<b>HepG2</b>	druh lidské epiteliální hepatomové linie
<b>HFD</b>	<b>High Fat Diet</b>
<b>HLA</b>	<b>Human Leukocyte Antigen</b>
<b>HPLC</b>	<b>High-Performance Liquid Chromatography</b>
<b>HRP</b>	<b>Horseradisch Peroxidase</b> ; křenová peroxidáza
<b>HSC</b>	<b>Hepatic Stellate Cells</b> ; jaterní hvězdčité buňky
<b>Huh 7</b>	druh lidské epiteliální hepatomové linie
<b>IDILI</b>	<b>Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury</b>
<b>IL</b>	interleukin
<b>iNOS</b>	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
<b>JC-1</b>	fluorescenční karbocyaninové barvivo k vizualizaci MMP
<b>JNK</b>	c-Jun <b>N-terminal Kinase</b>
<b>K</b>	kontrola
<b>LDH</b>	laktátdehydrogenáza
<b>LPS</b>	lipopolysacharid
<b>MAT</b>	methioninadenosyltransferáza
<b>MDA</b>	malondialdehyd
<b>MDR 3</b>	<b>Multidrug Resistance Protein 3</b> ; transportér v kanalikulární membráně hep.
<b>MK</b>	mastná kyselina
<b>ML</b>	monolayer
<b>MMP</b>	<b>Mitochondrial Membrane Potencial</b> ; mitochondriální membr. potenciál
<b>MOMP</b>	<b>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</b>
<b>MPT</b>	<b>Mitochondrial Permeability Transition</b>
<b>MPTP</b>	<b>Mitochondrial Permeability Transition Pore</b>
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA
<b>MRP 2</b>	<b>Multidrug Resistance-Associated Protein 2</b> ; transportér v membráně hep.
<b>MRP4</b>	<b>Multidrug Resistance-Associated Protein 4</b> ; transportér v membráně hep.
<b>mtDNA</b>	mitochondriální DNA

<b>NAD<sup>+</sup></b>	oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidu
<b>NADH</b>	redukována forma nikotinamidadeninukleotidu
<b>NADPH</b>	redukována forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
<b>NAFLD</b>	<b>Non Alcoholic Fatty Liver Disease</b> ; nealkoholová jaterní steatóza
<b>NAPQI</b>	N-acetyl-p-benzochinonimin
<b>NASH</b>	<b>Non Alcoholic Steatohepatitis</b> ; nealkoholová steatohepatitida
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>Nuclear Factor Kappa B</b> ; nukleární faktor kappa B
<b>NK</b>	<b>Natural Killers</b> ; přirození zabíječi
<b>NK T</b>	<b>Natural Killer T-Cells</b> ; NK T lymfocyty
<b><math>\cdot</math>NO</b>	radikál oxidu dusnatého
<b>OA</b>	<b>Oleic Acid</b> ; olejová kyselina
<b>ob/ob</b>	myši s mutací genu pro leptin
<b><math>\cdot</math>OH</b>	hydroxylový radikál
<b>p38</b>	mitogenem aktivovaná proteinkináza p38
<b>PA</b>	<b>Palmitic Acid</b> ; palmitová kyselina
<b>PAMP</b>	<b>Patogen-Associated Molecular Patterns</b> ; znaky asociované s patogeny
<b>PBS</b>	<b>Phosphate Buffered Saline</b> ; fyziologický roztok pufovaný fosfátem
<b>PDGF</b>	<b>Platelet-Derived Growth Factor</b> ; růstový faktor destiček
<b>pH</b>	<b>Potential of Hydrogen</b> ; potenciál vodíku
<b>PPAR <math>\alpha</math></b>	<b>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha</b>
<b>PPAR <math>\gamma</math></b>	<b>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</b>
<b>PUFA</b>	<b>Polyunsaturated Fatty Acid</b> ; vícenenasycená mastná kyselina
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>RNS</b>	<b>Reactive Nitrogen Species</b> ; reaktivní sloučeniny dusíku
<b>ROS</b>	<b>Reactive Oxygen Species</b> ; reaktivní sloučeniny kyslíku
<b>SAME</b>	S-adenosyl-L-methionin
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfát
<b>Smac/DIA-BLO</b>	<b>Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding Protein with Low pI</b>
<b>SOD</b>	superoxiddismutáza
<b>SREBP-1</b>	<b>Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1</b>
<b>ST-1</b>	standardní peletovaná dieta
<b>SW</b>	sandwich
<b>TAG</b>	triacylglycerol
<b>TBA</b>	thiobarbiturová kyselina
<b>TBARS</b>	<b>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</b>
<b>TCA</b>	trichloroctová kyselina
<b>TGF <math>\beta</math></b>	<b>Transforming Growth Factor beta</b>
<b>TIMP-1</b>	tkáňový inhibitor metaloproteinázy 1
<b>TLR 4</b>	Toll-like receptor 4
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	<b>Tumor Necrosis Factor alpha</b>
<b>TNF-R1</b>	TNF $\alpha$ receptor 1
<b>TRAIL</b>	<b>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</b>
<b>TRAIL R1</b>	TRAIL receptor 1
<b>TRAIL R2</b>	TRAIL receptor 2
<b>UDCA</b>	Ursodeoxycholová kyselina
<b>UDP</b>	uridin-5-difosfát



<b>UPR</b>	<b>Unfolded Protein Response</b> ; odpověď nesložených proteinů
<b>UV/VIS</b>	ultrafialová a viditelná oblast spektra
<b>VLDL</b>	<b>Very Low Density Lipoprotein</b> ; lipoprotein o velmi nízké hustotě
<b>WE</b>	Williams' E médium
<b>WP</b>	<b>Well Plate</b> ; kultivační destička s jamkami
<b>WRL-68</b>	lidská imortalizovaná hepatocytární buněčná linie
<b>WST-1</b>	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium

## **1. SOUHRN**

Poškození jater má rozmanitou škálu příčin. V důsledku jejich postavení v metabolismu xenobiotik dochází často k poškození jater toxickými látkami s následnou poruchou funkcí. I přes různorodost příčin, mechanismy poškození 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. Velikým problémem západní civilizace je nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD – *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*), při které dochází k ukládání tuků v jaterní tkáni. 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 proto 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. Nicméně, pro naše účely studia mechanismů hepatotoxicity a potenciálních hepatoprotektiv na kulturách maximálně 48 hod. starých by měla postačit metodika kultivace v *monolayeru*.**

**Dále jsme zavedli *in vitro* model steatózy indukované pomocí přídatků 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 směsi 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 jeho použití, resp. situaci, kterou má simulovat. Pro navození prosté steatózy se zachováním vysokého stupně viability buněk 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). EGCG patří k**

rostlinným polyfenolům, jejichž významným zdrojem je zelený čaj. Je popisována řada jeho účinků, díky kterým má potenciál vykazovat hepatoprotektivní a antisteatotický účinek.

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. 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. Slibnou strategií vedoucí k možnému prohloubení hepatoprotektivního účinku EGCG by mohlo být prodloužení preventivní inkubace.

**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. Lze spekulovat, že svoji úlohu 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 steatózy navozený 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, pokles oxidačního stresu byl pozorován dokonce i u nesteatotických hepatocytů. 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. V tomto směru jsou třeba studie, které by přinesly další informace o účinku EGCG na regulaci metabolismu lipidů s ohledem na použité mastné kyseliny. Dále jsme zaznamenali proapoptotický efekt EGCG nejen na steatotických hepatocytech, ale překvapivě i na neztukovatělých. Tyto nálezy rovněž vyžadují další výzkum.

## **SUMMARY**

Liver damage has a variety of causes. Due to the role of liver in the metabolism of xenobiotics, liver damage is often caused by toxic substances. Despite the variety of causes, 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 major problem in Western civilization is Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), in which fat is stored in liver tissue. 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 while maintaining a high degree of cell viability. 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 model hepatotoxin D-galactosamine (D-GalN).** EGCG belongs to plant polyphenols, an important source of which is green tea. Many of its effects are described, due to which it has the potential to have a hepatoprotective and antisteatotic effect.

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. Although a positive effect of EGCG on GSH production cannot be ruled out, the oxidative stress induced in our work probably exceeded the ability of antioxidant mechanisms to reverse GSH deficiency in hepatocytes. A promising strategy for a possible enhancement of the hepatoprotective effect of EGCG could be to prolong the preventive incubation.

**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, which PA significantly supports, play a role. 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 the lipotoxic effect. A decrease in oxidative stress was observed even in non-steatotic hepatocytes. However, the effect of EGCG on the fat content of hepatocytes alone is not clear in our work. 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. In this regard, studies are needed to provide further information on the effect of EGCG on the regulation of lipid metabolism with respect to the fatty acids used. Furthermore, we observed a proapoptotic effect of EGCG not only on steatotic hepatocytes, but surprisingly also on non-fatty hepatocytes. These findings also require further research.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Stavba a funkce jater

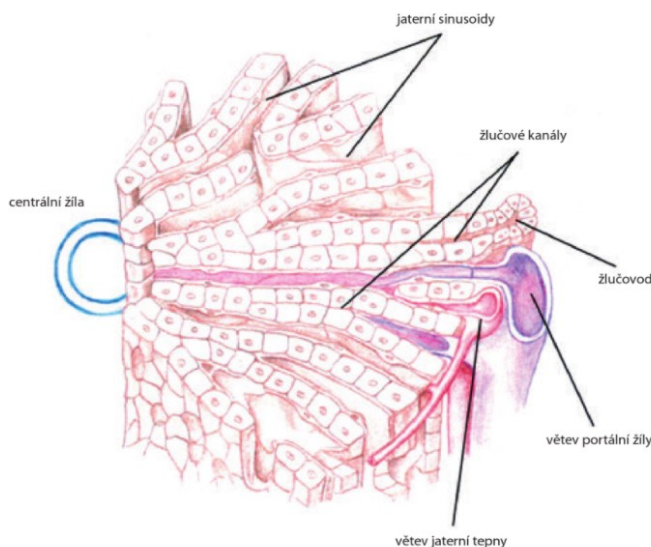
Základní morfologickou jednotkou jater je **jaterní lalůček (lobulus)**. Játra dospělého jedince obsahují v průměru 75 000 lalůčků. Je velký přibližně 2 mm a tvarem připomíná šestiboký hranol tvořený hvězdicovitými trámci hepatocytů uspořádaných kolem centrální žíly. Každý trámec je tvořen dvěma vrstvami hepatocytů a mezi sousedními buňkami vznikají žlučové kanálky ústící do interlobulárního žlučovodu. Hepatocyty v jaterní tkáni jsou polarizované, tj. mají svůj žlučový pól a krevní pól přivrácený k Disseho prostoru (1). Sinusoidální a kanalikulární membrána hepatocytů se liší fyzikálními vlastnostmi a transportními systémy tak, aby docházelo k jednosměrnému pohybu molekul.

V místě styku sousedících lalůčků se nachází tzv. portobiliární prostor. Je vyplněn řídkým kolagením vazivem a probíhá jím interlobulární artérie, vena a žlučovod, souhrnně nazývané jako jaterní triáda. Interlobulární triádou je z jednotlivých lalůčků odváděna žluč a k hepatocytům přiváděna krev z *arteria hepatica* a *vena portae*. Tyto dva cévní oběhy se vzájemně mísí v sinusoidách - zvláštních druzích krevních kapilár bez bazální membrány tvořených jednou vrstvou vysoce fenestrovaných endotelových buněk. Fenestrace usnadňují výměnu makromolekul mezi krví a jaterními buňkami (1). Krev ze sinusoid odtéká centrální žílou do sublobulárních cév, které se sbíhají ve *vv. hepaticae* a ústí do *vena cava inferior* (2).

Vedle hepatocytů je v játrech přítomna řada neparenchymových buněk. Výše zmíněné endotelové buňky nepředstavují pouze bariéru mezi hepatocyty a krví, ale mohou hrát roli v imunitní odpovědi (3). Mezi membránou hepatocytu a endotelovými buňkami sinusoid je úzká štěrbina - tzv. Disseho prostor. V tomto subendotelovém prostoru začínají lymfatické cévy a volně jsou zde rozmístěny hvězdicovité (Itóovy) buňky, které skladují tuk a retinoidy a produkují proteiny extracelulární matrix (1). Při jaterním poškození mohou hvězdicovité buňky změnit svůj fenotyp a přispívat k fibrotizaci tkáně a posléze k rozvoji jaterní cirhózy (4). Na endotelovou stranu Disseho prostoru jsou rovněž situovány Kupfferovy buňky, které fagocytují patogeny přivedené portálním řečištěm, odstraňují imunokomplexy, staré erytrocyty a podílejí se na rozvoji imunitní reakce (5).

Z imunokompetentních buněk vyjma výše zmíněných Kupfferových buněk hrají v jaterní tkáni roli tzv. Pit buňky. Jsou to T-lymfocyty z rodiny přirozených zabíječů (natural killers) a jejich úloha spočívá v ochraně vůči virům a nádorovým buňkám. Dále se zde vyskytují T- i B-

lymfocyty. Na úpravě žluči se mimo jiné podílejí epitelové buňky žlučových cest – cholangiocyty. Velmi zajímavými buňkami žlučového epitelu jsou tzv. oválné buňky. Tyto „primitivní“, značně proliferující, buňky se v případě výrazné ztráty funkčních buněk (poškozením nebo resekci) mohou diferencovat a stát se alternativním zdrojem hepatocytů nebo cholangiocytů (1, 6).

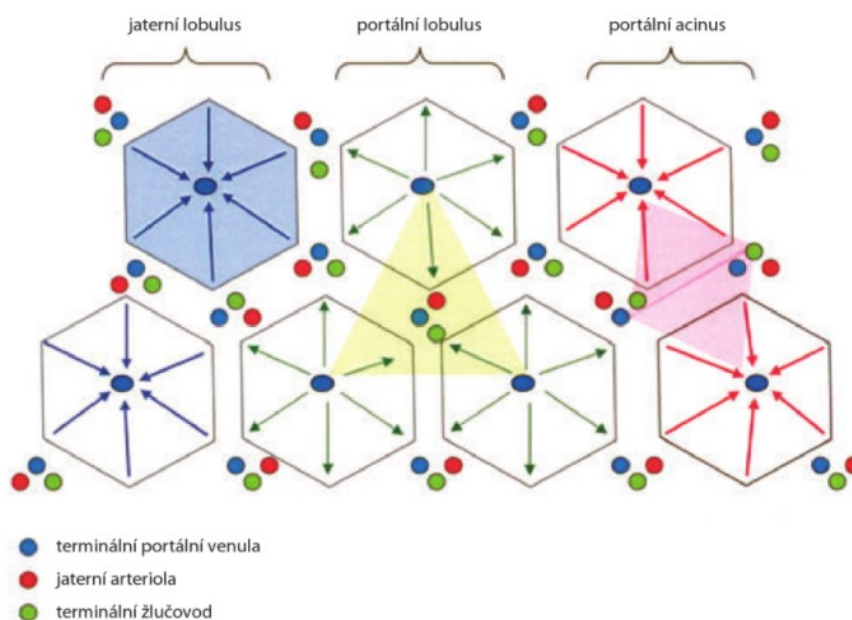


**Obrázek č. 1** – Schéma jaterního lalůčku. In: Ehrmann J, Hůlek P, kolektiv. Hepatologie. Praha: Grada Publishing a.s.; 2010. p. 26.

Z funkčního hlediska je základní jaterní jednotkou **jaterní acinus** (zavedl Rappaport (7)), v němž se jaterní oblast neostře dělí na 3 zóny. Lze si ho představit coby čtyřúhelník, jehož vrcholy tvoří dvě centrální žíly a dvě triády sousedících jaterních lalůčku. Hepatocyty z periportální (v okolí triád) a perivenózní (v okolí centrálních žil) oblasti mají rozdílnou enzymatickou výbavu, liší se i množstvím a uspořádáním buněčných organel, což má za následek odlišnou metabolickou aktivitu i odolnost buněk proti poškození (8). 1. zóna (periportální) je místem styku hepatocytů s okysličenou krví bohatou na živiny. Hepatocyty zde mají vysokou aktivitu respiračních a proteolytických enzymů s převahou oxidačních procesů. Z probíhajících dějů lze uvést například beta-oxidaci mastných kyselin, katabolismus aminokyselin, glukoneogenezi, tvorbu urey, syntézu cholesterolu, glykogenolýzu, tvorbu žluči atd (9). Dále jsou vzhledem ke svému umístění odolnější vůči poškození a v případě toxické léze jater jsou to právě jaterní buňky 1. zóny, které zahajují regenerační procesy jako první. Zóna 2 je přechodná - intermediární. Hepatocyty ze zóny 3 (perivenózní) jsou perfundovány krví s nižším parciálním tlakem kyslíku, ubývají zde živiny a naopak přibývá oxid uhličitý a zplodiny metabolismu (1). Tato oblast je chudší na redukováný glutathion, je náchylnější na poškození

zejména oxidačního charakteru a probíhají zde především biotransformační procesy. Dále se zde uskutečňují děje méně náročné na spotřebu kyslíku (syntéza glykogenu, glykolýza, lipogeneze, ketogeneze, tvorba glutaminu a syntéza žlučových kyselin) (1, 9).

Rozlišujeme dva typy zonální heterogenity. Prvním je typ gradientový, kdy je daný enzym přítomen ve všech hepatocytech jater, avšak rozdílnou měrou. Při druhém, kompartmentovém, typu mohou jaterní buňky určité zóny postrádat daný enzym úplně, zatímco v jiné je přítomen. Tato zonální heterogenita není pevná, dynamicky se mění v závislosti na aktuálním metabolickém stavu (1).



**Obrázek č. 2** – Schéma jaterního acinu In: Ehrmann J, Hůlek P, kolektiv. Hepatologie. Praha: Grada Publishing a.s.; 2010. p. 26.

Játra hrají stěžejní roli v **metabolismu sacharidů, tuků i bílkovin (aminokyselin)**. Vychytávají glukózu z portální krve, probíhá zde konverze fruktózy a galaktózy na glukózu, jsou místem syntézy zásobního glykogenu či přeměny glukózy na lipidy. Jako jediný orgán uvolňují do krevního oběhu glukózu vzniklou glukoneogenezí či štěpením zásobního glykogenu. Udržují tak v referenčních mezích stabilní koncentraci glukózy v krvi - glukostatická funkce jater (1).

V játrech jsou kromě imunoglobulinů a von Willebrandova faktoru syntetizovány všechny plazmatické bílkoviny včetně koagulačních faktorů. Produkce albuminu slouží jako významný ukazatel funkční kapacity jater. Probíhá zde syntéza neesenciálních aminokyselin. Degradace většiny aminokyselin s výjimkou aminokyselin s rozvětveným řetězcem probíhá rovněž v játrech (1).



Jako jediný orgán jsou játra schopna tvořit močovinu a odbourat amoniak vzniklý deaminací aminokyselin či činností střevních bakterií. Vedle močovinového (ornitinového, malého Krebsova) cyklu mohou játra také detoxikovat amoniak jeho přenosem na aminokyselinu glutamát za vzniku glutaminu. Amoniak je v ledvinách z glutaminu uvolněn a následně vyloučen do moči. Játra se tím velmi významně podílejí na regulaci acidobazické rovnováhy vnitřního prostředí (1).

V játrech probíhá beta-oxidace mastných kyselin, jejich desaturace a elongace, syntéza fosfolipidů a některých lipoproteinů (VLDL, HDL) a syntéza cholesterolu. Při intenzivní oxidaci mastných kyselin (např. při hladovění) probíhá v játrech přeměna lipidů na ketolátky, které jsou vylučovány do systémového oběhu a mohou sloužit jako zdroj energie (1).

Játra jsou exokrinní žlázou **produkující žluč**, která představuje významnou exkreční cestu zejména pro látky, jež nemohou být vyloučeny ledvinami a má význam pro trávení a vstřebávání tuků a vitaminů v nich rozpustných (1).

Játra fungují také jako **zásobárna železa, mědi a vitaminů rozpustných v tucích a vitaminu B12**. Z 15 % se u dospělého jedince podílejí na produkci erythropoetinu (85 % je tvořeno ledvinami), který je významný pro stimulaci erythropoézy v kostní dřeni (1). V době fetálního vývoje tvoří erythropoetin primárně játra a probíhá v nich i erythropoéza, vývojem plodu se ovšem hematopoéza přesouvá do kostní dřeně, v játrech pomalu ustává a po narození obsahují jen sporadické ostrůvky krvetvorné tkáně (10). Při těžkém postižení kostní dřeně se ovšem může hematopoéza v játrech obnovit i u dospělých jedinců (11). Rovněž mohou plnit úlohu krevního rezervoáru, jelikož cévy jater mohou zvětšením svého průsvitu zadržet až 1,5 l krve. Játra mají také termoregulační funkci - metabolicky náročné procesy spotřebovávají cca 12 % kyslíku z oběhu a ohřívají krev opouštějící játra na 39 °C, tj. vůbec nejvíce v celém organismu (12).

Vedle rozmanitých metabolických procesů mají játra neméně důležitou funkci **biotransformační a detoxikační**. Přeměňují látky jak endogenního původu (hemoglobin, hormony, cholesterol) tak exogenního původu (léky a toxické látky). Celý proces zahrnuje čtyři po sobě následující kroky. Nejprve musí být molekula transportována přes sinusoidální membránu do hepatocytu, dále je nutný její transport v cytosolu hepatocytu ke klíčovým místům, kde proběhne degradace či biotransformace a nakonec je látka vyloučena do žluče či zpět do krevního oběhu a dále močí ven z těla (1).

Vlastní biotransformací se rozumí kaskádovitý enzymatický proces, při kterém ze vstupní látky lipofilního charakteru vzniká polární (ve vodě rozpustný) produkt, který může být z organismu vyloučen (13). Rozlišujeme dvě fáze biotransformace.

**1. fáze biotransformace** probíhá v hladkém endoplazmatickém retikulu jaterních buněk a jejím výsledkem je polárnější produkt. Uplatňuje se zde především oxidace, méně redukce a hydrolýza. Drtivá většina látek je oxidována tzv. systémem smíšených funkčních oxidáz (MFO), jehož nejznámějším zástupcem je cytochrom P-450.

Cytochrom P-450 (CYP450) zahrnuje širokou skupinu izoenzymů, které se fylogeneticky vyvinuly jako prostředek k eliminaci xenobiotik. Specifita izoenzymů není nijak vysoká a překrývá se tak, že jeden izoenzym může katalyzovat reakce několika substrátů. Kompenzuje se tím relativně nízký počet enzymů biotransformace.

Vedle monooxidáz obsahujících cytochrom P-450 se uplatňují i monooxygenázy s flavinadenindinukleotidem jako prostetickou skupinou. Výsledkem 1. fáze jsou méně lipofilní produkty, v některých případech je dokonce produkt natolik polární, že je jeho eliminace možná i bez následné konjugace. Na druhou stranu mohou některá hydrofilnější xenobiotika vstupovat přímo do fáze 2.

**2. fáze biotransformace** zahrnuje konjugaci produktu vzniklého v 1. fázi s různými hydrofilními látkami. Tuto reakci katalyzuje skupina enzymů – transferáz. Nejčastěji se uplatňuje glukuronidace (konjugace s kyselinou glukuronovou), vazba s aminokyselinami (s taurinem, glycinem, glutaminem, serinem, kyselinou merkaptovou) a s glutathionem, vazba s kyselinou sírovou, methylace, ethylace, hydroxymethylace a acetylace (1). Rychlost konjugačních reakcí převyšuje rychlost reakcí 1. fáze. Většina enzymů 2. fáze se nachází v cytosolu, kromě transferázy uplatňující se v glukuronidaci (UDP-glukuronosyltransferázy), která je mikrosomální. Vzniklé hydrofilní sloučeniny mohou být vyloučeny žlučí nebo močí (1).

V drtivé většině jsou toxické látky detoxikovány a tak inaktivovány, v některých případech ovšem procesem biotransformace vzniká i z relativně neškodné látky toxická sloučenina (1, 13).

## 2.2. Jaterní poškození

Poškození jater může být způsobeno širokým spektrem příčin. Patří k nim virové nebo bakteriální infekce, k poškození dochází z cholestatických příčin či z důvodů metabolických poruch. Významným metabolickým onemocněním manifestovaným steatózou v játrech je

nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD – *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*), jež představuje frekventovanou chorobu západní populace (14). Vzhledem k postavení jater v metabolismu xenobiotik bývají často původcem jaterního poškození alkohol, léky a další (potenciálně) toxické látky.

### 2.2.1. Hepatotoxiny jako příčina jaterního poškození

Xenobiotika (látky cizorodé pro organismus) s hepatotoxickým účinkem mohou být syntetického i přírodního původu. Do této skupiny patří již zmiňované léky a alkohol, stejně jako alkaloidy rostlin i hub a různé další chemické látky. Do těla nejčastěji pronikají gastrointestinálním traktem, portální žilou jsou transportovány do jater, kde jsou biotransformovány a eliminovány.

Rozlišujeme pravé a idiosynkratické hepatotoxiny. Po podání definované dávky **pravého hepatotoxinu** dochází k poškození vždy. Míra tohoto poškození je závislá na dávce a je jí možno předvídat. Typicky takto vzniká akutní selhání jater (15). Latence je krátká a poškození je reprodukovatelné v experimentu na zvířeti. Pravými hepatotoxiny jsou zpravidla chemikálie, dále alkaloidy muchomůrky hlíznaté ( $\alpha$  amanitin), fosfor a těžké kovy. U léků není pravá hepatotoxicita v drtivé většině případů akceptovatelná (15). Výjimku tvoří léky s vysokým terapeutickým potenciálem indikované na život ohrožující stav (cytostatika - merkaptopurin) a také léčiva, jejichž terapeutická dávka je mnohonásobně nižší než dávka s prokázanou hepatotoxicitou (acetaminofen) (16).

Na rozdíl od výše uvedených pravých hepatotoxinů, **idiosynkratické hepatotoxiny** způsobují jaterní poškození jen u některých, vnímavých, jedinců. Míra jaterní léze nevykazuje závislost na dávce, latentní období je variabilní a neexistuje pro ně reprodukovatelný zvířecí model (15). Typickým představitelem potenciálních hepatotoxinů jsou léky, např. kyselina acetylsalicylová, izoniazid, metyldopa, halotan, estrogeny, androgeny, anabolické steroidy, fenothiazin, antidiabetika, metotrexat, některá antibiotika a mnohé další. K poškození jater může dojít i po užívání bylinných a jiných potravinových doplňků (17).

Individuální citlivost jedince může být způsobena abnormální biotransformací. Příčinou je zpravidla genový polymorfismus skupiny enzymů CYP450 a změna jejich aktivity (18). Dalším důvodem senzitivity některých pacientů je přehnaná imunitní odezva na danou látku. Zde hraje významnou roli genotyp HLA antigenů daného jedince (18, 19). HLA antigeny jsou molekuly na

povrchu buněk, které vystavují peptidové fragmenty proteinů produkovaných (HLA I typu) či pohlcených buňkou (HLA II typu) a prezentují je T lymfocytům.

Pravé hepatotoxiny mohou být v experimentální hepatologii využívány jako modelové látky k navození jaterního poškození. Může se jednat o látky působící hepatotoxicky i v reálných podmínkách (např. alkohol, acetaminofen) nebo využívané pouze pro experimentální účely. K nejčastěji používaným hepatotoxinům, které se experimentálně využívají pro *in vivo* i *in vitro* účely patří:

**D-galaktosamin** způsobuje nekrózu s mikroskopickými a biochemickými znaky podobnými nálezu u virové hepatitidy (20). D-GalN vstupuje do metabolické dráhy D-galaktózy, čímž způsobuje depleci uridinových nukleotidů (21). Následkem toho dochází k poškození syntézy mRNA a proteosyntézy (22). Narušena je rovněž syntéza antioxidantního tripeptidu glutathionu. V mechanismu poškození hrají důležitou roli aktivované Kupfferovy buňky a jimi produkováný TNF $\alpha$ . Na kultivovaných potkaních hepatocytech byla před rozvojem nekrózy detekována apoptóza, tudíž D-GalN může v závislosti na dávce a době expozice způsobovat oba typy buněčné smrti (23, 24).

**Acetaminofen** (APAP) neboli paracetamol je frekventovaně užívané analgetikum – antipyretikum. Terapeutické dávky jsou relativně bezpečné, předávkování APAP ovšem stále patří k hlavním příčinám akutního selhání jater (25). Paracetamol je z 95 % metabolizován především vazbou s kyselinovou glukuronovou či sírovou, zbylých 5 % je oxidováno pomocí CYP2E1 na reaktivní produkt N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI), který je detoxikován pomocí glutathion-S-transferázy vazbou na glutathion. Při předávkování je konjugační kapacita se sulfáty a kyselinou glukuronovou překročena, vzniká více NAPQI, na jehož odstranění nestačí zásoby redukovaného glutathionu. Dochází k oxidačnímu stresu, poškození hepatocytů, nekróze a zánětlivé reakci.

**Alkohol** je v játrech metabolizován dvěma cestami. První zahrnuje funkci alkoholdehydrogenázy (ADH) a vznik acetaldehydu, z kterého následně vzniká působením acetaldehyddehydrogenázy (ALDH) acetát. Tento nestabilní produkt se rozkládá na vodu a CO<sub>2</sub>. Nicméně pokud je substrátu mnoho, acetaldehyd může reagovat s DNA a proteiny za tvorby aduktů, které podněcují imunitní reakce a tvorbu cytokinů (26). Druhá cesta, která se uplatňuje především u chronického abúzu alkoholu, zahrnuje mikrosomální degradaci pomocí alkoholem indukovaného CYP2E1 (27). Jeho působením vzniká značné množství ROS, které způsobuje poškození struktur a senzitivuje hepatocyty k poškození lipopolysacharidem a TNF  $\alpha$ . Vznik ROS může poškozovat rovněž klíčové enzymy respiračního řetězce a  $\beta$  oxidace mastných kyselin.

Tvorba acetátu z ethanolu navíc způsobuje vzestup poměru NADH/NAD<sup>+</sup> v mitochondriích a cytoplasmě, což inhibuje  $\beta$  oxidaci a vede k jaterní steatóze (28). Ethanol navíc snižuje tvorbu antioxidačních látek, např. glutathionu (29). Rozvinutý oxidační stres vede k buněčné smrti, zánětu a aktivaci hvězdovitých buněk, které následně zapříčiní jaterní fibrózu (30).

**Thioacetamid** je metabolizován pomocí mikrosomální monooxygenázy s flavinadenindinukleotidem na toxický thioacetamid-S-oxid (31), který odstartuje pokles obsahu glutathionu a lipoperoxidace buněčných membrán (32). Následkem oxidačního stresu dochází k poškození mitochondrií.

Modelové hepatotoxiny (32, 33) pak v závislosti na podmínkách experimentu (*in vivo*, *in vitro*), dávce, popř. délce podávání umožňují simulovat nejen poškození, které je pro ně specifické, ale lze je využívat i pro hodnocení změn, které nemají specifickou vazbu pouze na daný hepatotoxin (oxidační stres, mitochondriální dysfunkce, fibróza apod.).

### 2.3. Mechanismy uplatňující se v jaterním poškození

Ačkoliv příčiny poškození jater tvoří etiologicky nesourodou skupinu, mechanismy, které se v něm uplatňují, jsou často společné a mohou navodit apoptózu a/nebo nekrózu buněk, zánět a fibrózu, která se přechodem do cirhózy stává rizikovým faktorem pro vznik hepatocelulárního karcinomu. Velkou měrou se na rozvoji jaterního poškození podílí oxidační stres, který provází alkoholové poškození jater (29, 30), nealkoholovou steatohepatitidu (28, 34, 35), cholestatické poškození (36), stejně jako poškození navozené léky (37) apod.

#### 2.3.1. Oxidační stres

Oxidační stres vzniká nerovnováhou oxidačních a antioxidačních systémů ve prospěch oxidantů. Nastává tedy nadměrnou produkcí reaktivních kyslíkových derivátů ROS a reaktivních derivátů dusíku (RNS) nebo porušením jejich likvidace. Biochemickým důsledkem této nerovnováhy je peroxidace lipidů, oxidace thiolových skupin proteinů a oxidace DNA v buňce (38). Na druhou stranu omezená tvorba ROS a RNS jako signálních molekul je nezbytná pro regulaci významných biologických procesů (39).

Řada xenobiotik se může stát hepatotoxickými při procesu **biotransformace**. Jak bylo dříve zmíněno, většina látek je sice játry transformována na stabilní formu, některé ovšem dávají vznik reaktivním metabolitům, jejichž toxicita převyšuje původní látku (40). Elektrofilní

meziprodukty vznikají oxidací cytochromem P-450 např. z halogenovaných alkanů (tetrachlormetan, halotan), alkenů, arenů, alkoholu nebo paracetamolu (acetaminofenu - APAP) (27). Již bylo zmíněno, že APAP je látka, jejíž předávkování patří k nejčastější příčině jaterního selhání. Stojí za tím zvýšená produkce reaktivního metabolitu NAPQI (N-acetyl-p-benzochinonimin), který je běžně detoxikován vazbou na tripeptid **glutathion** ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin). Následná deplece redukováného glutathionu podporuje rozvoj oxidačního stresu. Za vysokou produkcí ROS může být indukce cytochromu P-450. Vlivem chronické konzumace alkoholu se zvyšuje aktivita CYP2E1, indukci mohou způsobit i různá léčiva apod. (28, 41). Na volné radikály může některá léčiva redukovat také NADPH-cytochrom-P-450 reduktáza (metabolismus chinonu či nitroarenů) (40).

Pokud není antioxidační kapacita jater dostatečná, spustí se série změn, na jejímž konci může stát poškození jater. V zóně 3 jaterního acinu probíhají biotransformace a je zde nejvyšší aktivita cytochromu P-450. Vzniklé nestabilní sloučeniny tak způsobují typické zonální poškození a v biopsii jater pak lze nalézt charakteristické centrilobulární nekrózy (8).

V oxidačním stresu hrají důležitou roli **mitochondrie**. ROS a jiné reaktivní metabolity navozují otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti (MPTP - mitochondrial permeability transition pore) a pokles membránového potenciálu mitochondrií (MMP), což jsou významné kroky směřující k apoptóze nebo nekróze buněk v závislosti na míře deplece ATP (42, 43). Navíc samotné mitochondrie jsou zdrojem ROS v buňce. Mitochondrie se tak v této souvislosti mohou stát klíčovými pro rozvoj jaterního poškození (44-49). Kritickým místem tvorby ROS v mitochondriích je respirační řetězec na vnitřní membráně mitochondrií, kde dochází k přenosu elektronů mezi enzymovými komplexy I až IV až na  $O_2$  a tvoří se protonový gradient významný pro syntézu ATP. I za fyziologických podmínek může elektron redukovat molekulární kyslík na nejfrekventovanější reaktivní kyslíkový intermediát *in vivo* - superoxid ( $\cdot O_2^-$ ). Mitochondriální superoxid dismutuje na  $H_2O_2$  spontánně nebo s enzymem **superoxiddismutázou (SOD)**.  $H_2O_2$  je v ideálním případě dále rozložen na kyslík a vodu **katalázou (CAT)** a především **glutathionperoxidázou (GPx)** (50). Může z něj ale také vznikat hydroxylový radikál nebo účinkem myeloperoxidázy chlornanový anion.

Nejčastějším zdrojem ROS je komplex I a III (51). Ke zvýšené tvorbě ROS v mitochondriích obvykle dochází při inhibici respiračního řetězce nebo rozpojení respirace a syntézy ATP (28, 49, 52). Oxidační stres poškozuje mitochondriální struktury, prohlubuje se mitochondriální dysfunkce, což přispívá k další tvorbě ROS (46) a progresi poškození. Přitom příčiny těchto patologických změn jsou rozmanité.

Rozpojení respirace a syntézy ATP, inhibice respiračního řetězce a otevření MPT póru mohou být navozeny zvýšenou koncentrací mastných kyselin v játrech, která typicky provází metabolické změny spojené s obezitou a inzulínovou rezistencí, a hrát roli v přechodu od prosté steatózy do steatohepatitidy (47, 53, 54). Inhibice aktivity komplexů v respiračním řetězci, zvýšená lipoperoxidace, tvorba ROS a pokles antioxidantů byly popsány i v souvislosti s cholestatickým poškozením (55-57).

Za mechanismem nežádoucí toxicity některých léků může také stát mitochondriální dysfunkce - rozpojení respirace a syntézy ATP navozují některá nesteroidní antirevmatika, jako inhibitory mitochondriálního elektron-transportního řetězce mohou působit např. simvastatin a tamoxifen (58, 59). Omezením přenosu elektronů v respiračním řetězci se zvyšuje poměr NADH/NAD<sup>+</sup>, snižuje se  $\beta$  oxidace mastných kyselin a může se vyvinout steatóza. Na druhou stranu řada xenobiotik včetně léků může různými mechanismy primárně inhibovat  $\beta$  oxidaci mastných kyselin v mitochondriích (např. salicyláty, amiodaron, valproová kyselina, tamoxifen, glukokortikoidy) (49) a podporovat rozvoj steatózy, nadprodukcii ROS a poškození jater.

Dalšími zdroji ROS a RNS v játrech mohou být **imunokompetentní buňky**. Aktivované Kupfferovy buňky a neutrofilů v játrech produkují singletový kyslík, peroxid vodíku a hydroxylový radikál pomocí enzymového komplexu NADPH oxidázy. Vzniklý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umožňuje reakci s Cl<sup>-</sup> za katalýzy enzymem myeloperoxidázou vznik baktericidních chlornanových aniontů (ClO<sup>-</sup>). Kupfferovy buňky jsou schopny pomocí inducibilní NO syntázy (iNOS) z L- argininu syntetizovat baktericidní NO<sup>•</sup> (60). Společně mají za úkol narušit strukturu pohlceného mikroorganismu, ovšem aktivace imunokompetentních buněk a tvorba ROS se uplatňuje i během tzv. sterilního zánětu. Ten může být vyvolán např. žlučovými kyselinami při cholestáze, toxickém i mechanickém poškození jater či jaterní steatóze (61). Všechny tyto reaktivní látky působí nejen uvnitř fagosomu, ale fagocyty je vylučují i do okolního prostředí. V ideálním případě jsou likvidovány antioxidantními mechanismy, často ale poškozují okolní struktury. Pokud ve tkáni vzniká současně oxid dusnatý i superoxid, reagují spolu za zrodu peroxyinitritu. Nekontrolovaná imunitní odpověď tak může významně přispívat k poškození tkáně jater, jak je uvedeno v samostatné kapitole.

### 2.3.1.1. Antioxidační ochrana jater

Díky četným metabolickým a biotransformačním procesům jsou sice játra vystavena riziku oxidačního poškození, na druhé straně je v játrech vyvinutý komplexní systém antioxidační ochrany, který je možno podporovat i příjmem některých látek v potravě.

Nejprve se uplatňuje zamezení dalšího vzniku nebezpečných reaktivních látek pomocí inhibice enzymů, které ROS a RNS tvoří. Nově vytvořené reaktivní sloučeniny mohou inaktivovat CYP450 a jejich dalšímu vzniku tak zpětnovazebně zamezit (40). Důležitá je také vazba **přechodných kovů** v komplexu s proteiny (např. feritin pro železo), které je pomáhají udržet ve vyšším oxidačním stavu ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). Za určitých podmínek může dojít k uvolnění vazby a k redukci kovu.  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  ionty mohou katalyzovat konverzi relativně neškodného peroxidu vodíku na hydroxidový aniont ( $\text{OH}^-$ ) a velmi agresivní hydroxylový radikál ( $\cdot\text{OH}$ ). Tento proces je znám jako Fentonova reakce. Mědi je v játrech sice méně, ovšem oproti železu reaguje daleko rychleji (62, 63).

Pokud již ROS vzniknou, jsou likvidovány enzymovými antioxidanty (SOD, CAT, GPx). Svou antioxidační úlohu sehrávají tzv. „zhášače“, neboli nízkomolekulární antioxidanty. Tyto látky mohou být endogenního původu (koenzym Q, glutathion, kyselina močová, kyselina lipoová a bilirubin) či přijímané v potravě (vitaminy A, C a E).

Velmi významným nízkomolekulárním antioxidantem jater je tripeptid **glutathion** ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin, GSH). Je využíván glutathionperoxidázou jako donor elektronů a protonů. Pomocí enzymu **glutathion-S-transferázy (GST)** dochází ke konjugaci GSH s reaktivními sloučeninami a jejich vyloučení. Typickým příkladem je již zmiňovaná konjugace glutathionu s NAPQI - reaktivním metabolitem acetaminofenu. Dále je jeho úkolem odstraňovat ROS, udržovat v redukované formě sulfhydrylové skupiny proteinů, cysteinu a koenzymu A a regenerovat tokoferol a askorbát (64). Těmito procesy se spotřebovává jeho redukovaná forma (GSH) a vzniká oxidovaný dimer (GSSG). Zpětnou redukci GSH zajišťuje enzym **glutathionreduktáza (GR)** a udržuje tak v buňkách fyziologický poměr GSH:GSSG 10:1.

Játra skladují vitaminy rozpustné v tucích (A, D a E). Vitamin E ( **$\alpha$ -tokoferol**) je stěžejním antioxidantem fosfolipidových membrán. Při lipoperoxidaci přeměňuje alkylperoxylové radikály na hydroperoxydy, které mohou být posléze zneškodněny glutathionperoxidázou. Významně tím přispívá k zastavení iniciační fáze peroxidace lipidů. Z něj samotného se tak stává tokoferylový radikál, jenž je zpětně regenerován glutathionem, **vitaminem C** či **ubichinolem** (redukovaným koenzymem Q) (64).



Velice zastoupenou, ačkoliv ne nezbytnou, skupinou látek ve stravě člověka jsou flavonoidy obsažené např. v zelenině, ovoci, červeném víně, čaji atd. Tyto látky mají díky své struktuře konjugovaných  $\pi$  vazeb předpoklad být dobrými antioxidanty, jejichž radikály jsou stabilnější než ROS a RNS. Mohou také chelatovat železo, čímž mohou přispívat k antioxidační ochraně tkáně (64). V poslední době jsou populární **katechiny** zeleného čaje, kterým jsou připisovány až „zázračné účinky“. Z této skupiny můžeme v zeleném čaji nalézt epikatechin, epigalokatechin, epikatechin galát a **epigalokatechin galát (EGCG)**.

V případě, že již dojde k poškození biomolekul, jsou na řadě reparační mechanismy, jejichž úkolem je poškozené molekuly, orgány či celé buňky opravit či odstranit.

Jednotlivé složky antioxidačního systému by nemohly fungovat bez vzájemné spolupráce, kdy jeden antioxidační systém plynule navazuje na jiný. Ochranné odbourávání superoxidu superoxididismutázou je podmíněno adekvátním odstraňováním vznikajícího peroxidu vodíku katalázou či glutathionperoxidázou. GPx může správně fungovat jen za přítomnosti dostatku redukovaného glutathionu. Glutathionreduktáza může redukovat GSSG pouze za dostatku redukčních ekvivalentů NADPH, které generuje převážně pentózový cyklus. Podobně tokoferol, který splní svou funkci, musí být regenerován pomocí jiných antioxidačních systémů (askorbát, glutathion atd.). Naopak nadměrný přísun askorbátu tvoří podmínky pro uvolnění železa z vazby feritinu a jeho redukci na  $Fe^{2+}$  katalyzující Fentonovu reakci (65). Jen při správném fungování antioxidačních a oxidačních systémů můžeme zachovat vznik ROS a RNS v míře potřebné pro život a signalizaci, aniž by ovšem vzniklé reaktivní sloučeniny poškozovaly ve zvýšené míře okolní struktury.

### 2.3.2. Smrt buňky

U všech akutních i chronických poškození jater dochází v různé míře k buněčné smrti (66). Xenobiotika mohou způsobovat smrt buňky přímým toxickým účinkem na buněčné složky nebo může být zánik buňky zapříčiněn letální odezvou imunitního systému. První mechanismus mají především pravé hepatotoxiny (alkohol, D-GalN, z léčiv např. acetaminofen), letální reakce imunitního systému se uplatňují především při idiosynkratickém poškození indukovaném léčivem (IDILI – Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury) (67), ale i u nealkoholové steatohepatitidy (68) nebo cholestatického poškození jater (69, 70). Ukazuje se ale, že i při poškození hepatocytů indukovaném např. alkoholem nebo APAP dochází k aktivaci apoptózy prostřednictvím imunokompetentních buněk (71).

Důsledkem iniciace buněčné smrti je zvýšená propustnost mitochondriálních membrán a únik proapoptoticky působících látek z mezimembránového prostoru do cytosolu (72). O tom, bude-li určitý signál k aktivaci apoptózy buňky stačit, rozhoduje převaha proapoptotických signálů nad antiapoptotickými. Při nezvratném narušení homeostázy buňky a nedostatku ATP dochází k nekróze. (73, 74).

Nekróza a/či apoptóza představují typický znak jaterního poškození a jsou majoritním způsobem smrti buňky v játrech (66). Existuje však více než deset různých podtypů buněčné smrti, které svými znaky oscilují mezi apoptózou a nekrózou (75). Například relativně nedávno objevená forma programované nekrózy – nekroptóza, byla detekována u některých jaterních onemocnění a sporadický počet experimentů popisuje zmírnění poškození hepatocytů po blokaci nekroptózy (76).

**Apoptóza**, neboli programovaná buněčná smrt, je zodpovědná za fyziologické odstraňování poškozených nebo starých buněk (77, 78). Tento děj je významný také pro růst a regeneraci jater (79). Apoptóza je mechanismem účinku řady toxických látek a doprovází některé choroby (80).

U buněk odsouzených k apoptóze probíhá kaskáda reakcí, které gradují kondenzací chromatinu, fragmentací DNA, zmenšováním celé buňky a rozdělením na malá, membránou ohraničená, tělíška obsahující organely. Tato apoptotická tělíška jsou následně eliminována fagocytujícími buňkami z okolí (81). Z biochemického hlediska je apoptóza doprovázena zvýšenou propustností vnější mitochondriální membrány, uvolněním cytochromu C do cytosolu a aktivací cysteinových proteáz - kaspáz.

V zásadě můžeme rozeznávat dva způsoby aktivace apoptózy – vnější a vnitřní cestu. **Vnější cesta aktivace apoptózy** je zprostředkována transmembránově uloženými receptory smrti na povrchu cílové buňky, na které se váže specifický ligand. Na hepatocytech, cholangiocytech, Kupfferových, hvězdicovitých a endotelových buňkách jsou v různé míře exprimovány receptory smrti Fas (CD 95), TNF- $\alpha$ -receptor 1 (TNF-R1) a receptory smrti 4 a 5 (DR4 a DR5 neboli TRAIL-R1 a TRAIL-R2) (82, 83). Vazbou ligandu (FasL/CD95L, TNF- $\alpha$  a TRAIL) exprimovaných především na povrchu imunokompetentních buněk (NK, NK T buněk a aktivovaných T lymfocytů) dojde ke spuštění apoptózy. Nastartovaná proteolytická kaskáda je završená aktivací efektorových kaspáz 3, 6 a 7, které jsou zodpovědné za degradaci buněčných proteinů a smrt cílové buňky. Játra jsou do určité míry chráněna proti apoptóze zprostředkované výhradně přes receptory smrti. Zatímco např. u lymfocytů je aktivace efektorových kaspáz způsobena přímo v důsledku vazby ligandu na receptor smrti, u

hepatocytů a cholangiocytů se tak děje pouze při silném podnětu. Při slabším signálu je k aktivaci exekutivních kaspáz zapotřebí permeabilizace vnější mitochondriální membrány (84). V takovém případě dojde po vazbě ligandu na receptor k aktivaci kaspázy 8, která štěpí Bid. Následuje jeho translokace do mitochondrie, aktivace proteinů Bax a Bak a tvorba MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization). Aktivací proteinu Bid se tedy sbíhá vnitřní a vnější cesta aktivace apoptózy.

Za fyziologických podmínek je takto pravděpodobně zajištěno apoptotické odbourávání starých a poškozených buněk (85). Za patologických stavů se vazba ligandu FasL na receptor smrti uplatňuje při virových infekcích v játrech (hepatitida C), ale experimentálně byla popsána i při cholestázě či v reakci na toxické poškození alkoholem nebo acetaminofenem (86-88). Také receptor smrti TRAIL hraje roli v patogenezi infekce hepatitidou B a v toxicitě acetaminofenu (89, 90). Mechanismus apoptózy přes TRAIL se uplatňuje i v lipotoxicitě mastných kyselin. Indukce steatózy pomocí přídatku olejové a stearové kyseliny do média immortalizovaných buněk Huh 7 senzitivizovala tyto buňky k apoptóze způsobené rekombinantním TRAIL ligandem (91).

**Vnitřní cesta aktivace apoptózy** je spouštěna především různými iniciátory intracelulárního stresu, včetně oxidačního stresu, poškozením DNA, UV a  $\gamma$  zářením, nedostatkem růstových faktorů, stresem endoplazmatického retikula a toxiny. Tyto cesty se vždy sbíhají v mitochondrii, kde způsobí mitochondriální dysfunkci a permeabilizaci vnější mitochondriální membrány.

Ve vnější membráně mitochondrie jsou zakotveny proteiny z rodiny Bcl-2, některé působí proapoptoticky (Bax, Bid, Bak, Bad) a některé apoptózu inhibují (Bcl-2, Bcl-xL). Odpovědí na stresové signály v buňce může být aktivace proteinů, které aktivují proteiny Bax a Bak ve vnější membráně mitochondrie, kde se oligomerizují a vytvoří pór. Tento děj má za následek permeabilizaci vnější membrány (MOMP) a únik proapoptotických látek do cytosolu. Cytochrom C a Smac/DIA-BLO aktivují efektorové kaspázy. AIF a endonukleáza G translokují do jádra, kde nastartují degradaci DNA nezávisle na aktivaci kaspáz (66). U některých proapoptoticky působících proteinů se naopak uplatňuje inhibiční vazba na antiapoptické proteiny v mitochondriální membráně.

**Nekróza** je naopak považována za energeticky nenáročný proces, který zahrnuje řadu dějů vedoucích k ruptuře plazmatické membrány. Ztrátou integrity membrány přechází nekróza v ireverzibilní formu a dochází k vyplavení buněčných komponent do extracelulárního prostředí, kde navozují zánětlivou odpověď okolních buněk. Mezi děje vedoucí ruptuře membrány patří

rozvrat iontové homeostázy, zvýšení cytosolové koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , aktivace buněčných proteáz a fosfolipáz a ztráta mitochondriálních funkcí.

Zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v matrix mitochondrie, zvláště za oxidačního stresu, zvýšené koncentrace anorganického fosfátu a deplece adeninových nukleotidů, má za následek otevření MPTP ve vnitřní mitochondriální membráně (42, 92). Otevření MPTP způsobí zvýšení propustnosti membrány mitochondrií pro částice do molekulové hmotnosti 1,5 kDa. Do matrix tak proudí malé osmoticky aktivní molekuly doprovázené vodou a dochází k tzv. bobtnání (swelling) mitochondrií. Objem matrix narůstá, dojde k rozložení krist a k ruptuře vnější membrány (66). Z mezimembránového prostoru jsou uvolněny do cytosolu některé látky, např. cytochrom C, AIF, Smac/DIA-BLO atd., které jsou po spolupráci s molekulami z cytosolu schopné aktivovat kaspázy (92).

Déletrvajícím otevřením tohoto póru dojde ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu a zastaví se produkce ATP. Často dochází dokonce k hydrolýze ATP získaného glykolýzou či jako produktu oxidativní fosforylace jiné, nepoškozené, mitochondrie (42), což má za následek nedostatek ATP v buňce.

Otevření póru může tedy vyústit jak v nekrotickou, tak apoptotickou smrt buňky. Rozhodujícím faktorem je dostupnost ATP pro programovanou smrt. Je-li tedy protražovaným otevřením póru postiženo mnoho mitochondrií, dojde v nich k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu a tím k zastavení produkce ATP, buňka trpí nedostatkem energie a nastává nekrotická smrt. Pokud se ale pór včas zavře či je řada dalších mitochondrií v buňce schopných zajistit dostatek ATP pro iontovou homeostázu buňky a pro aktivaci kaspáz, nastává apoptóza (93). Ve zdravých buňkách lze otevření MPTP chápat jako mechanismus vedoucí k odstranění starých či poškozených mitochondrií tak, aby se poškozená mtDNA dále nereplikovala. Taková mitochondrie je zlikvidována procesem autofagie, zatímco buňka jako celek zůstává nenarušena (94).

V aktivaci nekrózy a především apoptózy v játrech mohou hrát kromě stěžejních mitochondrií velmi významnou roli **lysosomy** či **endoplazmatické retikulum**. Lysosomy mohou na stimuly podněcující smrt buňky, jakými je oxidační stres či lipidové mediátory, reagovat permeabilizací membrány. Do cytosolu pak unikají lysosomální enzymy, např. katepsiny B a D, které jsou schopny štěpit a tím aktivovat proapoptotické proteiny podobně jako kaspázy. Tyto proteázy se podílejí na apoptotické smrti buď spolupráci s kaskádou kaspáz či mechanismem na nich nezávislým. Hepatocyty obsahují jak hladké, tak drsné endoplazmatické retikulum. V hladkém ER probíhají biotransformační procesy, v drsném je uskutečněno skládání proteinů

vytvořených ribosomy. V ER jsou lokalizovány děje jako glukoneogeneze a syntéza lipidů, slouží také jako zásobárna intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  a reguluje tak jeho cytosolovou koncentraci. Endoplazmatické retikulum může být zdrojem ROS. CYP450 v endoplazmatickém retikulu mohou produkovat reaktivní metabolity, což může vyústit v poškození membrán ER. Z endoplazmatického retikula uvolněné  $\text{Ca}^{2+}$  ionty jsou vychytávány mitochondriemi, kde spouští sled reakcí završený otevřením MPTP se všemi důsledky. V případě stresu drsného endoplazmatického retikula je narušeno skládání proteinů a je nastartován adaptační mechanismus zvaný UPR (Unfolded protein response). UPR je souborem různých signálů z ER do jádra, které mají za cíl zachovat homeostázu buňky a v případě její neudržitelnosti vedou k apoptóze. Stres ER může být způsoben deplecí vápenatých iontů, inhibitory glykosylace a přebytkem mastných kyselin v ER, např. palmitové kyseliny (66).

### 2.3.3. Jaterní zánět

Zánět jaterního parenchymu provází celou řadu jaterních chorob včetně cholestatických onemocnění, hepatitid, rozvoje NAFLD (95) a toxického poškození (71). Rizikem infekce virem hepatitidy B a C, NAFLD a alkoholismu je relativně častý rozvoj cirhózy až karcinomu jater v důsledku chronického zánětu.

Za fyziologických podmínek vykazují játra určitou imunologickou toleranci, která je chrání před ničivými dopady aktivovaných složek imunitního systému. V játrech je různými mechanismy aktivně podporována tolerance antigenu (5). Spolu se střevem se tak podílí na nastolení snášenlivosti vůči potravinovým antigenům (96). Na druhou stranu jsou játra schopná adekvátní imunitní reakce na patogeny a poškození.

Jako reakce na smrt buněk se může rozvinout tzv. sterilní zánět. Rezidentní **Kupfferovy buňky** jsou pomocí Toll-like receptorů schopny rozpoznávat s poškozením asociované molekulární struktury (DAMP - Damage-Associated Molecular Patterns). Dochází k reakci imunitního systému podobně jako při rozpoznávání PAMP (Patogen-Associated Molecular Patterns) imunokompetentními buňkami. To má za následek jejich další aktivaci a tvorbu ROS prostřednictvím NADPH oxidáz. Aktivované Kupfferovy buňky jsou mohutným zdrojem prozánětlivých cytokinů  $\text{TNF}\alpha$  a  $\text{IL-1}\beta$ , které působí jako chemoatraktanty a aktivátory ostatních buněk imunitního systému. Cytokiny  $\text{TNF}\alpha$  a  $\text{IL-1}\beta$  ovlivňují rovněž na úrovni proteinu p38, JNK či produkce ROS signální dráhy, které mohou vyústit apoptotickou smrtí hepatocytů. Znaky asociované s poškozením jsou rozpoznávány i **cholangiocyty**, které začnou produkovat

prozánětlivé cytokiny (TNF $\alpha$ , IL-6), chemokiny (IL-8) a různé růstové faktory (97). **Hvězdicovité** (Itóovy, stelátní,) **buňky** jsou při jaterním poškození schopny detekovat součásti rozpadlých hepatocytů, aktivovat se a produkovat cytokin TGF  $\beta$  a profibrogenní faktor CTGF a naopak reagovat na cytokiny produkované dalšími, např. Kupfferovými, buňkami. Na endotelových buňkách jater jsou pod vlivem chemokinů exprimovány adhezní molekuly, jež podporují přestup dalších **monocytů**, **neutrofilů** a **T lymfocytů** z oběhu do jater (61, 98). Monocyty/makrofágy a neutrofilové rovněž nesou Toll-like receptory a reagují na struktury DAMP (případně PAMP) produkcí cytokinů a oxidačním vzplanutím. Vzniklé ROS poškozují tkáň, může dojít k další smrti jaterních buněk a vyplavení vnitrobuněčných struktur do tkáně a tím další amplifikaci zánětu (99).

Imunitní reakce může odstartovat také steatóza. Toll-like receptory imunokompetentních buněk mohou reagovat na volné mastné kyseliny (FFA) podobně jako na produkty rozpadlých poškozených hepatocytů. Bylo zjištěno, že zatímco volné mastné kyseliny mohou fungovat jako DAMP, inkorporace FFA do TAG má ochranný efekt a k rozpoznávání antigenu Toll-like receptory nedochází (100).

V patogenezi jaterního poškození hraje důležitou roli přítomnost lipopolysacharidu (LPS) z gramnegativních bakterií střeva. LPS je endotoxin vykazující významný aktivační účinek na Kupfferovy buňky, je detekován pomocí Toll-like receptorů a stimuluje Kupfferovy buňky k produkci prozánětlivých i profibrogenních cytokinů a ROS (101). U myši prostých mikrobiomu či po podání ATB bylo zaznamenáno snížení alkoholem či tetrachlormethanem indukovaného poškození jater (102-104). Vliv mikrobiomu byl prokázán rovněž u patogeneze NAFLD, respektive v její progresi do steatohepatitidy (105).

Kupfferovy buňky jsou v určitém prostředí (IL-4, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$ , apoptotické buňky atd.) schopny diferenciaci na podtyp, který produkuje naopak spíše protizánětlivé cytokiny, např. IL-10 a TGF  $\beta$  (106). TGF  $\beta$  patří mezi hlavní aktivátory hvězdicovitých buněk, jenž je fenotypově změněn na myofibroblastům podobné buňky produkující kolagen, čímž se podílí na procesu hojení. Při neadekvátní aktivaci mohou ovšem významně přispět k fibrotizaci tkáně (107). IL-10 je protizánětlivý cytokin, který má za úkol imunitní reakce spíše tlumit. Je schopen potlačit aktivitu iNOS a tím možný vznik nebezpečného peroxynitritu. Genticky upravené myši, kterým chyběl IL-10, měly po vystavení tetrachlormetanu vyšší produkci TNF- $\alpha$  a TGF- $\beta$  i závažnější fibrotické změny než wild type myši (108, 109). Aktivované Kupfferovy buňky mohou také indukovat exportní transportéry (MRP4) v hepatocytech a tím je snazším zbavení se toxických látek v podstatě chránit před poškozením (98, 110).

Imunitní reakce mohou podněcovat také nově vzniklé neznámé struktury způsobené oxidačním stresem - příkladem může být alergická reakce na dříve používané anestetikum **halotan**. Při jeho biotransformaci pomocí CYP450 vznikají reaktivní intermediáty, které se váží na cytosolové proteinové struktury. Přímá toxicita těchto reaktivních sloučenin a jejich aduktů se projeví relativně mírným poškozením doprovázeným zvýšenými aminotransferázami v séru u přibližně 20 % pacientů (111). U senzitivních jedinců ovšem mohou být štěpy aduktů vystavovány na povrchu hepatocytu, neznámý antigen může být rozpoznán imunokompetentními buňkami a je zahájena odezva imunitního systému, která může vyústit ve fulminantní hepatitidu. Nově vytvořené adukty byly zaznamenány i na povrchu Kupfferových buněk, které figurují jako buňky prezentující antigen (112). V séru takových jedinců byly nalezeny specifické protilátky proti aduktům a imunokomplexy (113).

Úkolem zánětlivé reakce je nejen eliminace patogenů a poškozených buněk, podílí se také na hojení a reparaci tkáně. Do určité míry je některými mechanismy schopna zmírnit i toxické poškození. Xenobiotika mohou ovšem různými cestami vyvolat neadekvátní či protražovanou imunitní odezvu v játrech, která má v řadě případů za následek prohloubení vzniklého poškození jaterní tkáně, včetně fibrotizačních změn.

#### 2.3.4. **Fibrotizace jater**

Jaterní fibróza, vyznačující se abnormální tvorbou extracelulární matrix, se vyskytuje u většiny chronických jaterních chorob v pokročilejším stadiu. Ve fibrotizaci může vyústit řada patologických stavů, včetně virové hepatitidy a různých onemocnění alkoholového, cholestatického, autoimunitního či metabolického původu, NAFLD nevyjímaje (114).

Fibrotizace tkáně povětšinou navazuje na protražované poškození a zánětlivou odpověď ve tkáni (4). Tento stav je úzce asociován s oxidačním stresem, zvýšenou hladinou TGF  $\beta$  a smrtí hepatocytů (115). Dlouhodobou reakcí na inzult dochází k hojení rány, při němž nalezneme zvýšenou tvorbu proteinů extracelulární matrix zároveň se sníženou degradací mezibuněčné hmoty. Mění se i zastoupení jednotlivých proteinů matrix a dochází tak k intraorgánové akumulaci mezibuněčné hmoty s majoritním obsahem vláknitého kolagenu typu I a III. Jaterní fibróza je považována za rané stádium cirhózy, která díky destrukci fyziologické architektury jater omezuje metabolické, syntetické a biotransformační funkce jater. Cirhóza je navíc rizikovým faktorem pro vznik hepatocelulárního karcinomu. Účinná terapie jaterní fibrózy není dodnes plně známá (114).

Za abnormální tvorbu extracelulární matrix jsou přímo odpovědné aktivované myofibroblasty. Tyto buňky se ve zdravých játrech nevyskytují a jejich původ v poškozených játrech může být různý. Nejčastěji je popisována přeměna klidových hvězdicovitých buněk (HSC) obsažených v Disseho prostoru jater (4). Při jaterním poškození a přetrvávající zánětlivé reakci mohou být tyto buňky aktivovány různými působky. Mezi hlavní aktivátory HSC spadá zejména PDGF (platelet-derived growth factor) a TGF  $\beta$ , ale také IL-6, IL-17, leptin, atd. (6, 116, 117). PDGF je zodpovědný především za proliferaci HSC a za jejich senzitivizaci na fibrogenní cytokiny (118). TGF  $\beta$  produkují samy aktivované HSC, ale také Kupfferovy buňky či trombocyty (118). U fibrotizačních onemocněních je často detekovaný pokles GSH (119), což prohlubuje nerovnováhu ve prospěch oxidantů. Nezlikvidované ROS stimulují produkci TGF  $\beta$  a dalších profibrogeních mediátorů v Kupfferových, dalších imunokompetentních (120) a hvězdicovitých buňkách, na které má rovněž proliferační vliv (121). Typický profibrogenní účinek byl zaznamenán např. u produktu peroxidace lipidů, 4- hydroxynonenalu (122, 123). Parakrinně a autokrinně produkováný TGF  $\beta$  působí fenotypovou přeměnu HSC na myofibroblastům podobné buňky, které ztrácejí obsažený retinol a masivně produkují kolageny typu I, III a IV a laminin (15). Aktivované hvězdicovité buňky secernují také tkáňový inhibitor metaloproteinázy 1 (TIMP-1). Metaloproteináza 1 je zodpovědná za modulaci apoptózy hvězdicovitých buněk a za degradaci extracelulární matrix, její inhibice tedy výrazně prohlubuje nerovnováhu mezi tvorbou a odbouráváním ECM (124).

Dalším zdrojem myofibroblastů mohou být portální fibroblasty, které se podílejí na fibrotizaci především portální jaterní zóny (124). Ve zdravé tkáni se podílejí na obratu ECM. Na myofibroblasty se diferencují především v reakci na cholestatické onemocnění, ale v určité míře se nejspíše uplatňují i při ostatních chronických chorobách jater (4).

Další teorie zahrnují diferenciaci na myofibroblasty z mezenchymální kmenové buňky pocházející z kostní dřeně, která se dostane do poškozených jater a tzv. EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition). Při tomto ději se hepatocyty a cholangiocyty vystavené TGF  $\beta$  fenotypově přemění na buňky podobné mesenchymálním kmenovým buňkám, a ty se posléze mohou diferencovat na myofibroblasty. V experimentu byla na procesu jaterní fibrózy potvrzena pouze malá (125), v případě EMT dokonce žádná (126), účast těchto buněk. Majoritním zdrojem ECM v poškozených játrech jsou pravděpodobně aktivované hvězdicovité buňky, popř. portální fibroblasty (4).



## 2.4. Jaterní steatóza

Při jaterní steatóze dochází k akumulaci tuků, především triacylglycerolů, ve formě tukových kapének v cytoplazmě hepatocytů. Ačkoliv určitý stupeň ztukovatění je fyziologický jev, játra nejsou tkáň primárně určená ke skladování lipidů. Steatózou se rozumí stav, kdy ztukovatění postihuje více jak 5 % hepatocytů či tukový podíl tvoří více než 5 % hmotnosti jater (127).

Etiologie vzniku jaterní steatózy je různorodá, její projevy, morfologické a metabolické změny jsou ovšem podobné. Nadbytek tuků v játrech obecně vzniká díky nerovnováze mezi vstupem lipidů do jater a jejich odbouráváním či exportem z jater (128). Steatóza tedy nastává nadměrným příjmem mastných kyselin či sacharidů v potravě, zvýšenou mobilizací tuků z tukové tkáně, jejich nadměrné syntéze *de novo*, sníženou oxidací mastných kyselin či narušeným transportem z jater ve formě VLDL (129). Jak již bylo zmíněno, steatózu mohou indukovat některé léky zasažením do mitochondriální funkce.  $\beta$  oxidace mastných kyselin může být blokována přímo nebo následkem inhibice respiračního řetězce (129).

U pacientů s pravidelným abúzem alkoholu můžeme typicky najít tzv. alkoholovou steatózu (**Alcoholic Fatty Liver Disease – AFLD**). Alkohol zvýšenou expresí CYP2E1 a útlumem antioxidačních mechanismů podporuje tvorbu ROS v játrech. Oxidační stres poškozuje mitochondriální funkce a způsobuje akumulaci tuků v játrech. Produkt degradace ethanolu – acetát navíc způsobuje zvýšení poměru NADH/NAD<sup>+</sup> v mitochondriích a cytoplazmě. Tím inhibuje  $\beta$  oxidaci a vede k jaterní steatóze (28).

V klinické medicíně rozlišujeme i tzv. nealkoholovou jaterní steatózu (**NAFLD**), při níž dochází k akumulaci tuků v játrech bez abúzu alkoholu (pacient nepřekračuje dávky 20 g ethanolu za den).

### 2.4.1. Nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD)

NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) je úzce spjata s nadměrným kalorickým příjmem, inzulinovou rezistencí, diabetem II. typu a je chápána jako jaterní manifestace metabolického syndromu. Jde o nejrozšířenější chronickou jaterní chorobu v západních zemích, jejíž prevalence a incidence zůstává vysoká (14). Histopatologický obraz onemocnění se pohybuje od prosté steatózy až po zánětlivé změny jater s fibrotizací tkáně (NASH), která může progredovat v cirhózu jater či hepatocelulární karcinom. Nebezpečí steatózy spočívá nejen

v možné progresi onemocnění, ale navíc se ukazuje, že akumulace tuků v hepatocytech může zvyšovat jejich citlivost k poškození xenobiotiky (130-132).

Přesná patogeneze NAFLD ani cílená farmakologická léčba není i přes vzrůstající výzkum tohoto problému dodnes plně známa (14, 133). Panuje všeobecně akceptované vysvětlení, že akumulace tuků v játrech a NAFLD nastane vlivem hyperinzulinémie a inzulínové rezistence, které bývají asociovány s obezitou. Hormonální dysbalance má za následek mobilizaci tuků z tukové tkáně a podporu syntézy mastných kyselin *de novo*. Hyperinzulinémie může aktivovat membránový transkripční faktor SREBP-1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 c), který je zodpovědný za indukci klíčových genů *de novo* lipogeneze. Tato situace, podpořená nadměrným kalorickým příjmem, vyúsťuje zvýšeným obsahem lipidů v játrech.

Dodnes není ani plně známo, co přesně způsobuje progresi NAFLD do NASH (134). Hovoří se o tzv. teorii „*two hit*“, kde první „zásah“ představuje samotná akumulace TAG. Ačkoliv se zdá, že ta sama o sobě neskýtá větší riziko, může senzitivizovat játra pro sekundární „zásahy“. Těmi jsou především oxidační stres a s ním spojená peroxidace lipidů, aktivace CYP450, zánětlivá reakce se zvýšenou produkcí zánětlivých cytokinů a aktivace hvězdovitých buněk, jejichž nadměrná stimulace má za následek fibrotizaci tkáně (135). Roli v rozvoji zánětu hrají také endotoxiny pocházející ze střeva (105). Nyní se používá spíše hypotéza „*multiple parallel hits*“, která lépe odráží skutečnou podstatu (136).

Problém je, proč u některých pacientů trpících jaterní steatózou dojde k rozvoji steatohepatitidy, zatímco u jiných nikoli. Některé z výše uvedených aspektů onemocnění budou pravděpodobně spíše důsledky rozvoje nemoci než vlastní příčinou progresu. Významnou roli sehrává lipotoxicita navozená mastnými kyselinami a tvorba ROS. Při nadměrném přísunu volných mastných kyselin dochází k jejich zvýšené mitochondriální oxidaci a podpoře tvorby ROS. Klíčový by mohl být rozvoj mitochondriální dysfunkce. Rozpřažení oxidativního řetězce přispívá k další genezi ROS a poklesu tvorby ATP. Při překročení oxidační kapacity mitochondrií, nebo jsou-li tyto organely poškozené, dochází k alternativnímu metabolismu mastných kyselin pomocí cytochromů, peroxizomů či  $\omega$ -oxidace v hladkém ER (137). To může vést ke vzniku dalších ROS a lipotoxických produktů, jež jsou schopny iniciovat zánětlivou reakci s následnou aktivací hvězdovitých buněk a produkcí kolagenu. Ve zmnožené tukové tkáni při obezitě jsou produkovány adipokiny s prozánětlivým účinkem. Např. leptin je schopen aktivovat hvězdovité buňky (15) a tím podpořit fibrózní změny. Přejít do NASH může souviset i s hladinou adiponektinu.

## 2.5. Hepatoprotektiva

Hepatoprotektivní látky příznivě ovlivňují metabolismus hepatocytů, chrání je před poškozením a urychlují regenerační procesy. Mechanismy účinku těchto látek jsou různorodé a často působí na více úrovních současně. Mohou příznivě působit na membrány a udržovat jejich fluiditu, dále se uplatňují jejich antioxidační účinky včetně stimulace tvorby glutathionu. Častý je rovněž zásah do biotransformačních procesů ovlivněním aktivity enzymů či substituce klíčových meziproduktů metabolismu.

Mezi hepatoprotektiva používaná v klinické praxi patří však pouze několik preparátů - esenciální fosfolipidy, silymarin, kyselina ursodeoxycholová a s-adenosylmethionin. V léčbě alkoholové hepatitidy i jiných jaterních chorob se v poslední době využívá i pentoxifylin. N-acetylcystein, který poskytuje aminokyselinu cystein potřebnou pro tvorbu glutathionu, je využíván jako antidotum paracetamolu (138).

**Ursodeoxycholová kyselina (UDCA)** je sekundární žlučová kyselina produkovaná střevními bakteriemi a představuje přibližně 3 % z celkové nabídky žlučových kyselin (15). Díky svým hydrofilním vlastnostem a blokaci vstřebávání hydrofóbních žlučových kyselin ze střeva příznivě působí na odtok žluče (139). UDCA ovlivňuje složení smíšených micel, čímž brání přímému kontaktu žluče s cholangiocyty. Stimuluje sekreci chloridů a bikarbonátů do žluče a zvyšuje expresi BSEP, MDR 3 a MRP 2 transportérů v membráně hepatocytů. Má rovněž antiapoptické, imunomodulační a protizánětlivé účinky (15). Byl prokázán pozitivní účinek UDCA na cholestatická onemocnění a primární biliární cirhózu. Dále snižuje sérovou hladinu TNF- $\alpha$ , potlačuje stres ER a zlepšuje jaterní citlivost na inzulin, což vzbuzuje naději na potenciální terapeutikum NASH (140). Klinické studie na tomto poli ovšem nejsou jednotného výsledku (140).

**Esenciální fosfolipidy** jsou směsí nenasycených mastných kyselin, především kyseliny linolové a linolenové. Fosfolipidy příznivě ovlivňují tvorbu a složení buněčných membrán (141). V experimentu na zvířeti bylo pozorováno zpomalení fibrotizace při alkoholovém poškození jater (142). U pacientů byl v malých či nekontrolovaných studiích pozorován příznivý vliv těchto látek na regeneraci jaterních buněk, snížení sérových aminotransferáz a subjektivní zlepšení stavu pacienta s toxickým postižením jater (143, 144), lékovým postižením, virovou hepatitidou B (145, 146) a jaterní cirhózou (147). Větší randomizovaná studie prokazující jednoznačný účinek těchto látek bohužel chybí (148).

Jedním z nejdéle známých a nejčastěji užívaných přírodních hepatoprotektiv je výtažek z ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Aktivní složku představuje směs flavonoidů – silybinu, silydianinu a silychristinu – souhrnně nazývaných **silymarin**. Silymarin patří mezi antioxidanty a snižuje produkci volných radikálů (149), může bránit vazbě toxinů na membránové receptory hepatocytů (150), ovlivňuje propustnost membrán a má inhibiční vliv na TNF- $\alpha$ . Na zvířecích experimentech byl prokázán příznivý účinek silymarinu při jaterním poškození paracetamolem, alkoholem či muchomůrkou zelenou (151). V klinické praxi se silymarin používá v léčbě alkoholového jaterního poškození, u akutních a chronických hepatitid a při toxickém poškození. Většina indikací se opírá pouze o izolovaná klinická pozorování či malé studie. Podloženou indikací je léčba otravy muchomůrkou zelenou (148).

**S-adenosyl-L-methionin (SAME)** je produkován v cytosolu řady buněk, především však jaterních. SAME je syntetizován z aminokyseliny methioninu a ATP za katalýzy enzymem methioninadenosyltransferázy (MAT). Slouží jako donor methylové skupiny pro methyltransferační reakce v organismu (152, 153). Methylovací fosfolipidů biologických membrán napomáhá udržet jejich fluiditu a následně může zvýšit množství produkované žluči (154, 155). Je prekurzorem pro syntézu glutathionu a taurinu, díky čemuž je jeho účinnost nejmarkantnější proti poškození reaktivními kyslíkovými radikály, které generuje řada toxinů. Hepatoprotektivní efekt SAME byl potvrzen při poškození jater tetrachlormethanem, acetaminofenem, D-galaktosaminem, thioacetamidem a ischemicko-reperfúzním poškozením (153, 156-164). Klinicky bylo po podání SAME prokázáno zlepšení sérových markerů u pacientů s cholestázou (165). V experimentálních studiích SAME snižoval aktivitu biotransformačního cytochromu CYP2E1, který je zodpovědný za tvorbu reaktivních intermediátů alkoholu a řady jiných xenobiotik (153). Dále vystupuje jako klíčový metabolit regulující růst, diferenciaci a smrt hepatocytů (153).

**Pentoxifylin** je neselektivní inhibitor fosfodiesterázy, který zvyšuje nitrobněčnou koncentraci cAMP a cGMP, má protizánětlivé účinky, snižuje hladinu TNF $\alpha$  a expresi profibroticky působících cytokinů a prokolagenu I (166). Uplatňuje se především v léčbě akutní alkoholové hepatitidy, kde je jeho účinnost prokázána klinickými studiemi (167, 168). Bylo také publikováno několik studií hodnotících léčbu pentoxifylinem u pacientů s NASH (169). Při jeho podávání může dojít k poklesu AST a ALT a částečně i ke zlepšení histologického nálezu (148).

Experimentálně se testuje velké množství látek, které jsou potenciálními hepatoprotektivy. Velmi populární jsou látky rostlinného původu (170, 171). Často se s nimi setkáváme i jako s volně prodejnými doplňky stravy. Bohužel, je třeba počítat s tím, že i přes

slibné účinky v *in vitro* podmínkách či v pokusu na zvířeti, v klinické praxi mohou vykazovat pouze omezenou či dokonce nulovou účinnost (148, 172).

Širokou skupinu potenciálních hepatoprotektiv představují rostlinné polyfenoly. Přijímáme je v zelenině, ovoci, luštěninách, obilovinách, kávě a červeném víně, jejich kvantitativně nejvýznamnějším zdrojem je však zelený čaj. Významnou podskupinou 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). Nejvyšším obsahem těchto látek disponuje především nefermentovaný zelený čaj. Jako velmi slibný se jeví **epigalokatechin galát (EGCG)** (173-175), jehož potenciálně hepatoprotektivní účinek jsme se rozhodli v této práci testovat.

EGCG je významným antioxidantem (175). Jednak je sám schopen tvořit málo reaktivní radikály a detoxikovat tak účinek ROS, jednak zvyšuje expresi antioxidantních enzymů v buňce. Jeho další charakteristikou je protizánětlivé působení. Inhibuje aktivaci Toll-like receptoru 4 (TLR 4) a cestu NF- $\kappa$ B a tím zabraňuje zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů a rozvoji imunitní odpovědi (176, 177). EGCG díky svému vlivu na metabolismus lipidů snižuje hladinu tuků a působí proti obezitě. Inhibuje klíčový transkripční faktor lipogeneze PPAR $\gamma$  a aktivuje PPAR $\alpha$ , který podporuje vychytávání mastných kyselin a jejich následnou  $\beta$  oxidaci (178). Díky jeho výše zmíněným vlastnostem má potenciál vykazovat hepatoprotektivní i antisteatotický účinek.

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

Ke zkoumání hepatotoxicity, jejich mechanismů a možností hepatoprotekce je nutné používat vhodný experimentální model. Dříve byly k tomuto účelu výhradně využívány studie *in vivo*. Jejich hlavní předností je možnost studia patofyziologie jater ve vztahu s dalšími orgánovými systémy a dopady na organismus jako celek. Nevýhodou je obtížnost detailně zachytit děje na subcelulární úrovni a také narůstající etická a legislativní omezení. Kritériem pro užití *in vitro* modelů je optimální zachování metabolických a funkčních vlastností hepatocytů. Hepatocyty v *in vitro* modelech by měly s ohledem na cíl studií zachovávat alespoň vybrané funkce tak, aby odrážely situaci *in vivo* (179).

Velmi využívaným nástrojem v *in vitro* podmínkách jsou kultivované hepatocyty. Jako zdroj buněk mohou sloužit **hepatomové linie**, např. HepG2 či HepaRG. Jejich výhodou je komerční dostupnost a proliferační kapacita, nicméně alterace pro hepatocyty specifických

funkcí vlivem transformace těchto buněk může jejich využití limitovat (179). Velmi frekventovaným přístupem je proto použití **izolovaných hepatocytů**. Nejčastěji je pro izolaci v drobných modifikacích využívána dvoustupňová reperfúze jater kolagenázou (180). Touto metodou je možné získat velký počet viabilních buněk s vysokým zastoupením hepatocytů. Využívána jsou játra ryb, obojživelníků, ptáků i savců, včetně člověka, pro svou dostupnost však především játra hlodavců – morčat, králíků, křečků a zejména myši a potkanů. Méně často slouží jako zdroj buněk játra prasat, která ovšem na rozdíl od jater hlodavců lépe odrážejí metabolické aspekty lidských jater. Komplikací častého využití lidských jater k izolaci hepatocytů jsou etické překážky, omezená dostupnost materiálu, riziko přenosu infekčních nemocí na personál a popř. i nízká viabilita získaných buněk. Výhodou je naopak snazší extrapolace výsledků do podmínek *in vivo* u člověka, protože zde odpadají mezidruhové rozdíly (181).

Vlastní proces izolace hepatocytů může být doprovázen izolačním stresem. Jeho vlivem dochází ke ztrátě tkáňové integrity, k narušení mezibuněčných kontaktů a k ischemicko-reperfučnímu poškození buněk. Hepatocyty ztrácejí svou polaritu, některé své specifické funkce (182) a mění tvar. Použitím izolačních roztoků s obsahem proteolytických enzymů může dojít až k rozkladu membránových bílkovin a tím ke ztrátě struktury plazmatické membrány (181). Pro omezení izolačního stresu je nutné optimalizovat podmínky izolace zejména s ohledem na aktivitu použité kolagenázy, syčení izolačního roztoku kyslíkem, pH a iontové složení použitých roztoků, délku izolace, centrifugační podmínky atd. Z izolovaných buněk lze připravit suspenzi či primární kultury.

Výhodou **buněčných suspenzí** je jejich relativně rychlá a nenáročná příprava, snadná manipulace a při studiu hepatotoxicity možnost testování více koncentrací či látek zároveň. Hepatocyty v suspenzi ovšem nevytvářejí mezibuněčné kontakty, morfologicky zachovávají svůj kulovitý tvar získaný během izolace. Jejich použití je z důvodu postupného poklesu viability omezeno pouze na několik hodin po izolaci. Jsou proto vhodné především pro krátkodobé (v řádech hodin) toxikologické studie a také pro hodnocení aktivit různých buněčných enzymů včetně studia energetického metabolismu (183).

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. Morfologicky vykazují takto kultivované hepatocyty polygonální tvar. 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 (184). Hodnocení

morfologie v kombinaci s funkčními parametry jsou zásadní při posuzování míry poškození hepatocytů. 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.

Pro uchování diferencovaného stavu hepatocytů je nezbytná přítomnost buněčných interakcí (185). Jaterní buňky *in situ* vytvářejí kontakty nejen mezi sebou, ale také s molekulami extracelulární hmoty. Ta je tvořena především kolageny I-IV, glykoproteiny jako je laminin a fibronectin a také proteoglykany (heparansulfát) (186). Ukazuje se, že složení ECM má dopad na tvar buněk a kontakty vytvářené mezi buňkami (187), které mají význam pro udržení metabolismu xenobiotik (188), zatímco transportní systémy v hepatocytech jsou ovlivněny zejména interakcemi mezi buňkami s ECM (189).

Z tohoto důvodu je pro oddálení procesu dediferenciace nejvhodnější co nejvíce simulovat podmínky *in vivo*. Stabilitu primárních kultur hepatocytů významně ovlivňuje výběr kultivačního média, jeho vhodná suplementace a volba extracelulární matrix. Existuje řada komerčně vyráběných médií, z nichž každé má své spektrum použití i omezení. Nejčastěji používanými jsou Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), Liebovitz L-15, RPMI 1640, Waymouth's MB 752/1, Chee's a Williams' E medium. Pro toxikologické experimenty bylo jako vhodné vyhodnoceno Williams' E médium (190) a Chee's médium (191). Do médií lze dále přidávat různé suplementy a docílit tak optimalizace složení, které podporuje přežívání a diferencovaný stav buněk (inzulin, glukagon, aminokyseliny, glukokortikoidy, antibiotika, antimykotika, růstové faktory atd.). Pro *in vitro* kultivaci se využívají všechna uvedená fyziologická pojiva, avšak nejrozšířenější jsou kolageny, především kolagen typu I (192-194). Dále existují komerčně dodávané směsi několika pojiv, např. Matrigel®, jež obsahuje laminin, kolagen IV a entaktin (182).

Důležitou otázkou je rovněž množství a uspořádání extracelulární matrix. Primární hepatocyty kultivované v podmínkách monolayeru představují 2D kultivační systém. 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 udržují tvar typický pro situaci *in vivo*, jsou zřetelné žlučové kanálky i po více než 72 hodinách kultivace a déle zachovávají viabilitu i svoje specifické funkce (195). Novým slibným systémem je možnost získání plně fyziologického pojiva včetně na matrix navázaných růstových faktorů z jater zbavených buněk (196). Vytváří se tak kostra, ke které

buňky adherují – scaffold. Rapidně se rozšiřuje seznam i synteticky vyráběných poživ ve formě nanovláken či hydrogelů na bázi polymerů a peptidů. 3D kultivace mohou probíhat i bez použití této opory, tzv. scaffold-free systémy. Buňky se pak kultivují např. v agregátech označovaných jako sféroidy. Technicky je možné podpořit i zonální uspořádání např. použitím mikrofluidních čipů, které respektují vaskularizaci jaterního acinu (197).

Využívá se rovněž kokultivace hepatocytů s jinými jaterními nebo dokonce mimojaterními buňkami. Kontakt hepatocytů s neparenchymovými jaterními buňkami více přibližuje kultivační podmínky situaci *in vivo*, pro studium hepatotoxicity je třeba brát v úvahu zejména úlohu Kupfferových buněk.

Vzhledem k tomu, že NAFLD patří k nejrozšířenější chronické chorobě jater ve vyspělých zemích a steatóza by mohla přispívat k vyšší senzitivě jater na toxické poškození, studium hepatotoxicity v *in vitro* podmínkách by mělo respektovat tuto skutečnost. 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 nutričně na živém zvířeti. Velice rozšířená je tzv. **vysokotuková dieta** (High Fat Diet, HFD) (198), dále **methionin, cholin-deficientní dieta** (199) a **dieta bohatá na tuky a fruktózu** (High fat/High Fructose Diet) (200). Nutriční indukce steatózy je ovšem časově i finančně náročná. Komerčně „vyráběným“ steatotickým modelem jsou rovněž **geneticky modifikovaní hlodavci** (ob/ob a db/db myši, Zucker fatty rat atd.) (201), jejichž velkou nevýhodou je především vysoká cena. Přídavkem mastných kyselin do média kultivovaných hepatocytů lze navodit steatózu v *in vitro* podmínkách (202, 203). Příprava modelu je relativně rychlá, výrazně eliminuje soubor pokusných zvířat. Takto připravené kultury vykazují základní obraz jaterní steatózy. Nasycená kyselina palmitová (PA; C16:0) a mononenasycená kyselina olejová (OA; C18:1) jsou nejčastějšími mastnými kyselinami v potravě a triacylglycerolech jater (203). Existují práce popisující účinky těchto kyselin na myši (202, 204, 205), husí (206) či lidské primární kultury hepatocytů (207) a hepatocelulární nádorové linie (203, 204, 207, 208). 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 (207) a jejich výsledky byly pro potřeby použití modelu nealkoholové steatózy indukované *in vitro* nedostačující.



### **3. CÍLE PRÁCE**

Tato práce má dva základní cíle uskutečňované v několika níže definovaných krocích. 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.

Druhým cílem bylo v *in vitro* podmínkách ověřit, do jaké míry vykazuje výtažek zeleného čaje – epigalokatechingalát (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 cytotoxicitu, resp. lipotoxicitu.

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

- 3.1.1. Zavést a optimalizovat sendvičovou kultivaci hepatocytů.
- 3.1.2. Porovnat základní parametry viability, funkční kapacity a oxidačního stresu na hepatocytech kultivovaných až 10 dní sendvičovou metodou a v *monolayeru* s nebo bez přídavku fetálního bovinního séra v médiu
- 3.1.3. Zhodnotit vhodnost sendvičového modelu pro kultivaci trvající dva dny a pro dlouhodobější experimenty

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

- 3.2.1. Porovnat vliv kyseliny palmitové, olejové a jejich kombinací na indukci steatózy a cytotoxicitu (lipotoxicitu) v primární kultuře hepatocytů v *monolayeru*
- 3.2.2. Definovat vhodný model prosté steatózy bez současného výrazného poškození hepatocytů pro následující hodnocení citlivosti steatotických hepatocytů vůči hepatotoxinu

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

Hodnotit možný protektivní vliv různých koncentrací EGCG na primární kulturu potkaních hepatocytů v *monolayeru* modelově poškozených D-galaktosaminem (D-GalN) v následujícím uspořádání:

- 3.3.1. Současná kultivace hepatocytů s EGCG a 20 mM D-GalN po dobu 24 hodin
- 3.3.2. Kultivace hepatocytů s EGCG 24 hodin a posléze 24hodinová kultivace hepatocytů s EGCG a současně s 40mM D-GalN

S využitím zavedeného modelu steatózy v primární kultuře hepatocytů (cíl 3.2.) mohly být realizovány další cíle:

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

- 3.4.1. Porovnat míru oxidačního stresu a cytotoxicitu navozenou D-GalN u nesteatotických hepatocytů a hepatocytů s prostou steatózou
- 3.4.2. Zhodnotit vliv kyseliny olejové a kyseliny palmitové jako induktorů steatózy na cytotoxicitu navozenou D-GalN

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

- 3.5.1. Hodnotit potenciální protektivní účinek různých koncentrací EGCG na rozvoj steatózy indukované kyselinou olejovou, kombinací kyseliny olejové a palmitové a kyselinou palmitovou.
- 3.5.2. Porovnat vliv EGCG na míru cytotoxicity a rozvoj steatózy s ohledem na typ mastné kyseliny navozující steatózu

## **4. POUŽITÉ METODIKY IN VITRO**

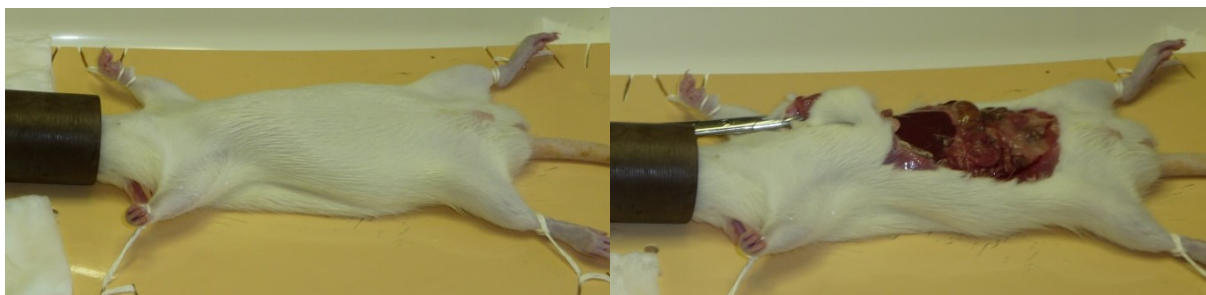
### **4.1. Pokusná zvířata**

Pro izolaci hepatocytů byli použiti samci potkanů kmene Wistar (Velaz) o hmotnosti 180 až 240 g. Zvířata byla chována za standardních podmínek při konstantní teplotě  $23 \pm 1$  °C, relativní vlhkosti vzduchu  $55 \pm 10$  %, výměně vzduchu 12 – 14x za hodinu a při 12hodinovém světelném režimu (6,00 – 18,00 hod.). Potkani byli ustájeni v klecích po 6 – 10 potkanech. Po celou dobu měli volný přístup k pitné vodě. Krmeni byli *ad libitum* standardní peletovanou dietou (ST-1, Velaz, Česká republika; 10 % energie z tuků, 30 % energie z proteinů a 60 % energie ze sacharidových zdrojů). Pokusy byly schváleny Odbornou komisí pro dobré životní podmínky zvířat Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze podle §15f a §15g zákona č. 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů a §5 a §8 vyhlášky č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat. Veškeré nakládání se zvířaty se řídilo platnými evropskými směrnici European Guidelines on Laboratory Animal Care.

### **4.2. Izolace hepatocytů**

Hepatocyty byly izolovány metodou dvoustupňové kolagenázové reperfúze jater podle Berryho a Frienda (209) s modifikací dle Seglena (210). Výhodou metody je vysoká výtěžnost (z 1 g jaterní tkáně lze získat asi  $40 - 60 \times 10^6$  buněk) při zachování vysokého stupně viabilních buněk (85 – 95 %). Příměs neparenchymových buněk jater je uváděna jako menší než 5 % (211).

Pokusné zvíře (potkan) je v etherové celkové anestezii fixováno na operační stůlek (obr. č. 3). Po dezinfekci břišní stěny jodovou tinkturou následuje otevření břišní dutiny pomocí stříhu ve tvaru „V“ skrz kůži a svalovinu (obr. č. 4).



**Obr. č. 3 – Potkan připravený na operačním stole**

**Obr. č. 4 – „V“ stříh**

Odsunutím orgánů dutiny břišní na levou stranu potkana se odkryje přístup k *v. cava inferior*, do které aplikujeme heparin ve fyziologickém roztoku (200 m.j. na 100 g hmotnosti potkana). Tupým nástrojem uvolníme *v. portae*, do níž zavedeme kovovou kanylu (obr. č. 5), která je napojená na perfúzní aparaturu (obr. č. 6).



**Obr. č. 5 – Zavedení kanyly do *v. portae***



**Obr. č. 6 – Játra ve speciálním stojánku**

Perfúzní aparatura je naplněna příslušným roztokem temperovaným na 37 °C a nasyceným karbogenem (plynná směs 95 % O<sub>2</sub> a 5 % CO<sub>2</sub>). Z důvodu prevence vzduchové embolie větví *v. portae* nesmí být v aparatuře nikdy přítomny vzduchové bubliny. Nejprve proběhne perfúze jater *in situ* roztokem A, který neobsahuje vápenaté ionty. Jejich absence umožňuje lepší rozrušení desmosomálních spojů mezi buňkami. Poté je nutné přívod perfúzního roztoku zastavit a prostříhnout *v. cava inferior*, abychom se vyvarovali poškození jater tlakem. Následuje co nejrychlejší vyjmutí jater z dutiny břišní, jejich oplach fyziologickým roztokem, fixace do speciálního stojánku a finální proplach roztokem A v aparatuře (obr. č. 7).



**Obr. č. 7 – Izolační aparatura:** použité perfúzní roztoky se ve vodní lázni temperují na 37 °C, jsou vedeny do zásobníku izolačních roztoků uloženým cca 40 cm nad kádinkami s izolačními roztoky. Jednotlivé části aparatury (peristaltická pumpa, kádinky s roztoky a zásobník roztoků) jsou spojeny silikonovými hadicemi (Ø 5 mm).

Pokračujeme recirkulační perfúzí jater roztokem B s obsahem kolagenázy (Collagenase NB 4 Standard Grade z bakterie *Clostridium histolyticum*, Serva, Germany) a  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Vápenaté ionty jsou nezbytné pro správnou funkci kolagenázy. Optimální doba promývání je 14 minut. Poté jsou játra ponořena do roztoku C s přidavkem bovinního sérového albuminu (BSA) a mechanicky rozvolněna. Obsah albuminu je vhodný pro zachování onkotických podmínek. Přesné složení roztoků A, B a C je přehledně uvedeno v [tabulce č. 1](#).

Suspenzi buněk přefiltrujeme přes sterilní gázu do centrifugační zkumavky a centrifugujeme po dobu 5 minut (28 g, 4 °C; *Rotina 35R*, Hettich). Buňky resuspendujeme v roztoku C s obsahem BSA a znovu centrifugujeme za stejných podmínek. Celý postup opakujeme ještě jednou. Izolované hepatocyty jsou v centrifugační zkumavce uloženy do ledové tříště a uchovávány při 4 – 8 °C do použití. Bezprostředně po izolaci je stanovena viabilita a denzita izolovaných buněk.

Název roztoku	Složení roztoku	poznámka
<b>Roztok A</b>	8 g NaCl 0,4 g KCl 0,0977 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,1206 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O 0,06 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,188 g NaHCO <sub>3</sub> 0,19 g EGTA Dest. H <sub>2</sub> O do 1000 ml	syceno karbogenem (7 min.) pH = 7,3 – 7,4
<b>Roztok B</b>	4,8 g NaCl 0,24 g KCl 0,05862 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 0,07236 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O 0,036 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,3528 g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1,314 g NaHCO <sub>3</sub> Dest. H <sub>2</sub> O do 600 ml	syceno karbogenem (7 min.) pH = 7,3 – 7,4 0,055 g surové kolagenázy do 200 ml roztoku B. (množství kolagenázy se pro každou šarži liší (rozdílná aktivita), pro novou šarži kolagenázy vytitrovat ideální dávku)
<b>Roztok C</b> (Krebs – Henseleitovo médium)	6,9 g NaCl 0,36 g KCl 0,1441 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,13 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,374 g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 2g NaHCO <sub>3</sub> 0,9 g glukózy Dest. H <sub>2</sub> O do 1000 ml	Pro manipulaci s izolovanými buňkami používat roztok C s přidavkem BSA (1,333 g BSA do 100 ml)

Tabulka č. 1 - Složení izolačních roztoků

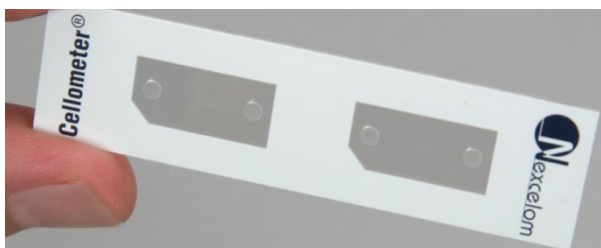
### 4.3. Stanovení viability izolovaných hepatocytů

Stanovení viability probíhá pomocí barvení hepatocytů trypanovou modří (sodná sůl toluidin-diazo-diamino-naftol-disulfonové kyseliny), která je schopna procházet přes cytoplazmatickou membránu buněk. V živých buňkách dochází k jejímu vypuzení, zatímco v buňkách s poškozenou integritou membrány pozorujeme její akumulaci.

20 µl suspenze izolovaných hepatocytů zředíme v 990 µl roztoku C s obsahem BSA. Na připraveném očištěném podložním sklíčku smísíme 10 µl této suspenze s 10 µl 0,4% trypanové modře (Tryptan blue, Sigma-Aldrich) a přikryjeme krycím sklíčkem. Ve světelném mikroskopu (Carl Zeiss Jena Laboval 4) při zvětšení alespoň 200 x počítáme nejméně v deseti polích neobarvené (živé) a modře obarvené (mrtvé) buňky. Výslednou viabilitu vyjadřujeme v procentech (poměr počtu živých buněk vůči celkovému počtu buněk).

#### 4.4. Stanovení denzity suspenze hepatocytů

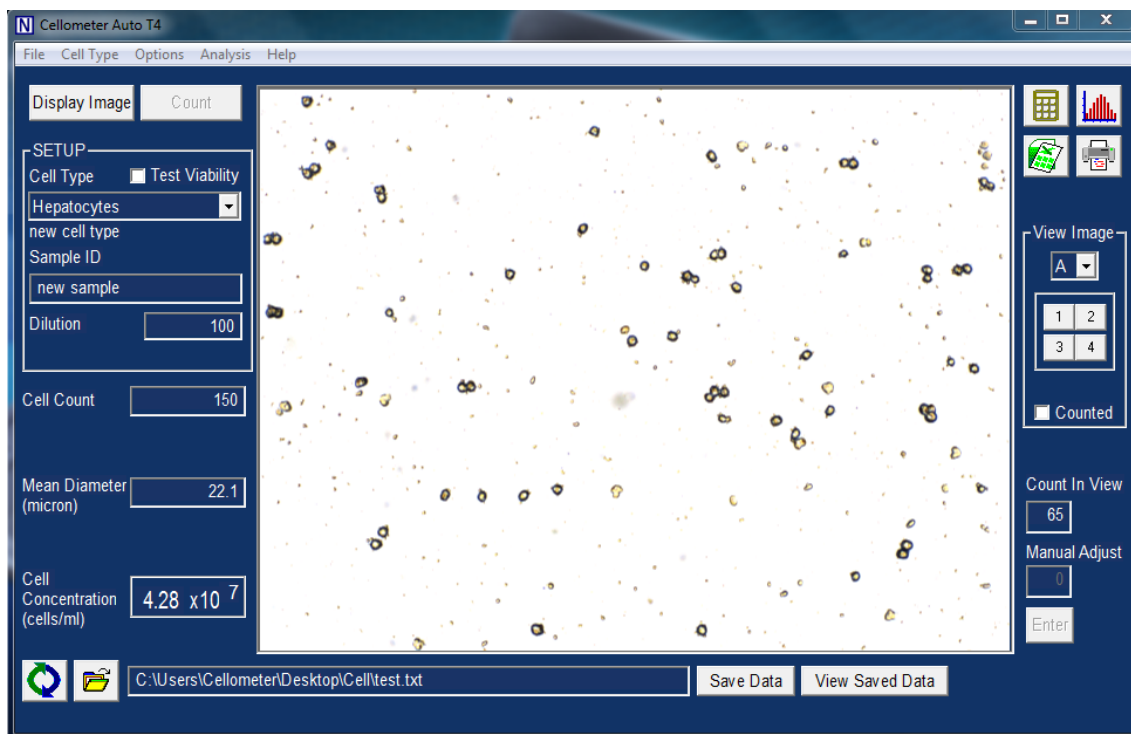
10  $\mu$ l suspenze hepatocytů zředíme v 990  $\mu$ l roztoku C s obsahem BSA, promícháme a do obou otvorů počítací komůrky napipetujeme 20  $\mu$ l (obr. č. 8). V programu nastavíme příslušné hodnoty (typ počítaných buněk, použité ředění...) a na automatickém Counteru Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience, USA) spustíme vlastní počítání (obrázky č. 9 a 10). Výsledek uvádíme v počtu buněk \* 10<sup>6</sup> v 1 ml suspenze.



Obr. č. 8 – Komůrka na počítání denzity buněk.



Obr. č. 9 – Cellometer Auto T4 připojený k PC.



**Obr. č. 10 – Výstup z programu Cellometer s nastavenými parametry** (typ počítaných buněk: hepatocyty; ředění: 100x). Densita hodnocené suspenze je 42,8 milionů buněk v ml suspenze.

#### 4.5. Zhotovení primárních kultur hepatocytů potkana

##### **Postup zhotovení primární kultury hepatocytů v *monolayeru*:**

Veškerá manipulace s pomůckami pro buněčnou kultivaci probíhá v laminárním boxu (obr. č. 11). Nejprve je nutné potáhnout povrch kultivační destičky kolagenem. Kolagen typu I (Collagen Type I from Rat Tail, Sigma-Aldrich) byl přes noc rozpouštěn ve 20 mM kyselině octové (2 mg kolagenu do 6,66 ml 20 mM kyseliny octové, odpovídá koncentraci kolagenu 0,3 mg/ml). Dostatečný objem tohoto roztoku kolagenu necháme 10 min. v kontaktu s povrchem vybrané kultivační destičky. Následně roztok kolagenu odstraníme a jamku destičky zneutralizujeme roztokem C či Williams' E médiem.





Obr. č. 11 – Laminární box.



Obr. č. 12 – Inkubátor na buněčné kultury.

Existuje řada kultivačních destiček (Well Plate - WP) využívaných v naší laboratoři. V následující tabulce č. 2 uvádím jejich stručný přehled a optimální počet hepatocytů na jednu jamku vybrané destičky.

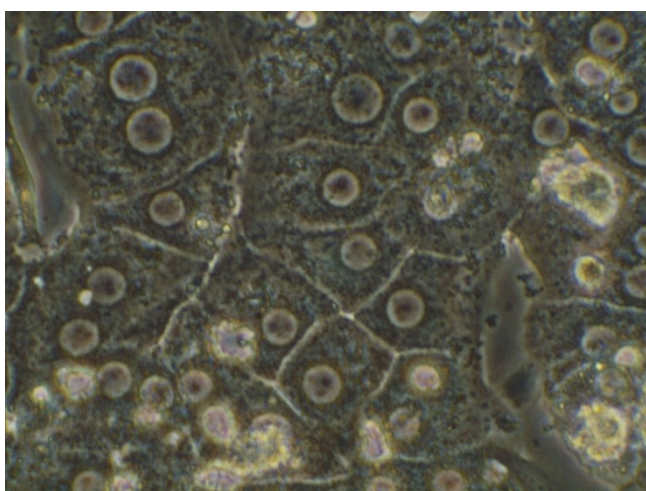
Typ použité WP	Plocha jamky [cm <sup>2</sup> ]	Koncentrace suspenze [10 <sup>6</sup> /ml]	Objem susp. na jamku [ml]	Počet buněk na jamku [*10 <sup>6</sup> ]
Petriho miska 6 cm	21	1	2	2
6jamková	9,6	0,5	2	1
12jamková	3,9	0,5	0,8	0,4
24jamková	1,9	0,5	0,4	0,2
96jamková	0,32	0,3	0,1	0,03

**Tabulka č. 2 – Přehled používaných kultivačních destiček.** U příslušného typu WP je uvedena plocha jednotlivé jamky, použité ředění suspenze hepatocytů, optimální objem naředěné suspenze na jednu jamku destičky a odpovídající počet buněk v jedné jamce.

Hepatocyty jsou naředěny na odpovídající denzitu ve Williamsově E médiu bez L-glutaminu a fenolové červeně (BioChrom GmbH; Germany) obohaceném o některé suplementy - L-glutamin (2 mM; BioChrom GmbH), penicilin (190 IU/ml; BioChrom GmbH), streptomycin (190 µg/ml; BioChrom GmbH), inzulin (0,08 IU/ml; Actrapid, Hoechst, Germany), dexametazon (0,12 µg/ml; Merck, Germany) a glukagon (0,008 mg/ml; Novo Nordisk, Denmark). Takto obohacené Williamsovo E médium nazýváme *kompletní Williamsovo E médium*. Pro účely

přichycení hepatocytů ke kolagenu přidáváme do kompletního Williams E média 6 % fetálního bovinního séra (BioChrom GmbH). Toto médium nazýváme *kompletní Williamsovo E médium s FBS*.

Následně na předem pokolagenované a zneutralizované destičky nanášíme příslušný objem suspenze hepatocytů (uvedený v [tabulce č. 2](#)). Destičky s hepatocyty jsou poté na 2 hodiny uloženy do inkubátoru ([obr. č. 12](#)), který udržuje prostředí o 37°C, 95 % vzduchu + 5 % CO<sub>2</sub>. Po přichycení živých buněk ke kolagenu se vytvoří jedna vrstva buněk – tzv. „*monolayer*“ ([obr. č. 13](#)). Následuje odsátí média s nepřichycenými buňkami a proplach kultury čistým médiem, které je následně nahrazeno kompletním Williams' E médiem obvykle bez FBS a s případným obsahem testované látky.



**Obr. č. 13** – Hepatocyty přichycené na kolagen v kulturačních destičkách (fázový kontrast, zvětšení objektivu 40x).

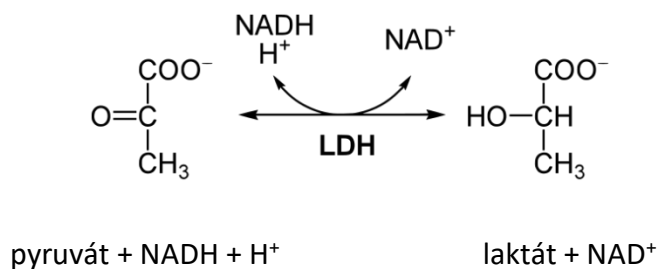
#### **Postup zhotovení sendvičové kultury:**

Příprava probíhá obdobně jako u *monolayeru* a je prováděna na 6 jamkových kulturačních destičkách. Po přichycení buněk na kolagen kulturační destičky následuje proplach buněk Williams' E médiem. Na vytvoření druhé vrstvy kolagenu je použito 140 µl roztoku kolagenu o koncentraci 0,8 mg/ml. Tento roztok je připravován ze zásobního roztoku kolagenu ve 20 mM kyselině octové o koncentraci 4 mg/ml a bezprostředně před užitím ředěn William's E médiem bez suplementace, jehož pufrční síla postačuje k neutralizaci kyselého roztoku kolagenu. Sendvič je 3 hod. inkubován (37°C a 5 % CO<sub>2</sub>). Po této době je možno přidat kulturační médium.

## 4.6. Biochemická stanovení

### 4.6.1. LDH leakage

Laktátdehydrogenáza (LDH) je enzym obsažený v cytoplasmě buněk řady tkání včetně jaterní. Katalyzuje reverzibilní přeměnu pyruvátu na laktát a zpět (obr. č. 14). Často se využívá stanovení tzv. LDH leakage (poměr aktivity do extracelulárního prostředí uvolněného LDH ku celkové aktivitě LDH). V *in vitro* experimentech se jedná o velmi citlivý ukazatel poškození plazmatické membrány hepatocytů.



**Obr. č. 14** - Reakce katalyzovaná enzymem laktátdehydrogenázou. Převzato z: Laktátdehydrogenáza. Wikiskripta: projekt 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlovy [online]. 2009. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Laktátdehydrogenáza>.

Stanovení probíhá pomocí kitu LDH FS\* DGKC 1970 (DiaSys GmbH, Germany). Kit obsahuje dvě reakční směsi. Reakční směs R1 obsahuje pyruvát ve fosfátovém pufru, hlavní složkou R2 je NADH. Smísením reakčních roztoků R1 a R2 v poměru 4:1 je získáno reakční činidlo.

Pro stanovení extracelulárního LDH je použito kultivační médium, pro hodnocení aktivity intracelulárního LDH jsou buňky lyzovány mrazem v (-80 °C, 15 min) a destilovanou vodou. Poté je lyzát použitý jako vzorek. Do 96 jamkové destičky pipetujeme 5 µl deionizované vody (slepý vzorek), kalibrátoru o známé aktivitě LDH a vzorku. Přidáme reakční činidlo temperované na 37 °C a fotometricky stanovujeme rychlost přeměny NADH + H<sup>+</sup> na NAD<sup>+</sup> jako úbytek absorbance při 340 nm (Tecan Infinite M200). Měření probíhá ihned (t 0) a 4x se opakuje v intervalu po 1 minutě (t 1-4).

#### 4.6.2. **WST-1 test**

WST-1 test je test založený na přeměně tetrazoliových solí na barevný formazán buněčnými, především mitochondriálními, dehydrogenázami. V naší laboratoři je využívána tetrazoliová sůl s označením WST-1 (disodná sůl 4-[3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonové kyseliny), nicméně na podobném principu funguje řada obdobných substrátů tetrazoliových solí (MTT, XTT, MST, NBT) (212). Uvedené reakce jsou schopny pouze živé, metabolicky aktivní buňky. Tento test zachycuje rané změny v metabolismu buněk, které předcházejí narušení integrity buněčné membrány.

Stanovení probíhá na 96 jamkových kultivačních destičkách, v kterých jsou kultivovány hepatocyty podle návodu na přípravu primárních kultur v *monolayeru*. Sloupec č. 1 v tomto případě buňky neobsahuje a bude představovat absorpenci nemetabolizovaného substrátu (slepý vzorek). Po určené době kultivace je médium odstraněno a na jamky napipetováno 100  $\mu$ l WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1; Roche Diagnostics), zředěného kompletním Williams' E médiem bez FBS v poměru 1:10. Bezprostředně po přidání substrátu změříme na spektrofotometru (Tecan Infinite M200) absorpenci při 440 nm (čas  $t=0$ ). Následně destičku inkubujeme 60, případně 120, minut v podmínkách 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po této době stanovujeme spektrofotometricky výsledný produkt (čas  $t=60'$  resp.  $t=120'$ ). Hodnotíme nárůst absorpance za daný časový úsek.

#### 4.6.3. **Stanovení malondialdehydu (MDA)**

MDA je markerem lipoperoxidace a vzniká za patologických podmínek peroxidací lipidů (víceenasycených mastných kyselin) reaktivními sloučeninami kyslíku (213). Stanovení MDA je založeno na spektrofotometrickém měření absorpance kondenzačního produktu MDA a dvou molekul 2-thiobarbiturové kyseliny (TBA). Reakce probíhá za vysoké teploty a nízkého pH (214). Metoda je velmi citlivá, ale její specifita je nízká (214). TBA reaguje vyjma MDA s různými sloučeninami, např. kyselinou sialovou, prostaglandiny, deoxyribosou či jinými aldehydy. Sloučeniny reagující s TBA se souhrnně nazývají TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). Se stanovením interferují také proteiny a neutrální lipidy, čemuž lze předejít přidávkem trichloroctové kyseliny (TCA) do reakční směsi. Dalším problémem je autooxidace lipidů provázející samotné stanovení. MDA může také vznikat oxidací nelipidových látek a může být

metabolizován mitochondriemi neporušených buněk (180). Díky své nenáročnosti a citlivosti však zůstává frekventovanou metodou stanovení míry lipoperoxidace.

Do Eppendorfových zkumavek napipetujeme 250  $\mu$ l média odebraného z buněčné kultury a 250  $\mu$ l reakčního činidla (0,37 % TBA, 15 % TCA, 25 % 1M HCl v destilované vodě). Analogicky zacházíme s kalibračními roztoky o známé koncentraci MDA (0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 a 10  $\mu$ mol/l) a se slepým vzorkem (destilovaná voda). Vše promícháme a 15 minut temperujeme v termobloku na 100 °C. Po ochlazení reakční směsi následuje centrifugace (5 min., 1000 g). 150  $\mu$ l supernatantu z každé zkumavky přepipetujeme do 96 jamkových destiček a na UV/VIS spektrofotometru Tecan Infinite M200 měříme absorbanci při 535 nm oproti slepému vzorku.

#### 4.6.4. **Stanovení ROS**

Jedním z ukazatelů oxidačního stavu buňky je hodnocení tvorby ROS. Produkce ROS buňkami byla hodnocena pomocí acetyleru diacetátu 5- a 6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceinu (CM-H2DCFDA; Molecular Probes, USA). Hepatocyty byly kultivovány na 96 jamkových destičkách podle návodu na přípravu *monolayeru*. První sloupec destičky je ponechán bez buněk a slouží jako slepý vzorek. Po kultivaci byly buňky promyty William's E médiem a 45 minut inkubovány s 1  $\mu$ M CM-H2DCFDA v prostředí 95 % vzduchu, 5 % CO<sub>2</sub> a 37°C. Poté byla 96 jamková destička vyklepnuta, k buňkám přidáno 100  $\mu$ l William's E média bez suplementace a po 40 minut byla měřena intenzita fluorescence (TECAN Infinite M200, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 535 nm. Destička byla posléze vyklepnuta, hepatocyty pomocí mrazu a destilované vody lyzovány a v jamkách stanoveny proteiny metodou dle Bradfordové (215). Výsledky byly stanoveny z rozdílu intenzity fluorescence (40 minut – 0 minut).

#### 4.6.5. **Obsah glutathionu v hepatocytech**

Stanovení obsahu glutathionu uvnitř buněk je jedním z parametrů vypovídajícím o oxidačním stavu buňky, který často předchází změnám plazmatické membrány. Kultivované hepatocyty byly sklizeny, lyzovány ultrazvukem a přemístěny do ledové 10% kyseliny metafosforečné, promíchány a centrifugovány (20 000 x g, 10 min, 4 °C). Vlastní analýza probíhala modifikovanou spektrofluorimetrickou metodou vycházející z metodiky Hissina a Hilfa

(1976) (216, 217). Glutathion ze vzorku reaguje v prostředí fosfátového pufru s o-ftalaldehydem za vzniku sloučeniny, která je fluorimetricky detekována ( $\lambda_{Ex}=340$  nm,  $\lambda_{Em}=420$  nm).

#### 4.6.6. **Stanovení aktivity kaspázy 3**

Stanovení probíhá pomocí kinetické fluorimetrické metody založené na hydrolýze specifického peptidového substrátu pro kaspázu 3 - Ac-DEVD-AMC (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin). Produktem jeho štěpení je fluorimetricky stanovitelný volný AMC (7-amino-4-methylkumarin). Na 96 jamkových kultivačních destičkách je první sloupec ponechán bez buněk jako slepá kontrola měření (blank). Po kultivaci jsou buňky lyzovány mrazem (20 min,  $-80$  °C) a 50  $\mu$ l destilované vody. Do jamek destičky je následně přidáno 150  $\mu$ l výše zmíněného substrátu ředěného v testovacím pufru (na jamku připadá 0,33  $\mu$ l substrátu). K odečtení případného štěpení substrátu jinými látkami než kaspázou 3 byl použitý specifický inhibitor kaspázy 3 - Ac-DEVD-CHO (N-Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CH=O). Ihned poté je změřena fluorescence ( $\lambda_{Ex}=360$  nm;  $\lambda_{Em}=465$  nm) v čase 0, destička následně inkubována 30 minut (případně 60 minut) v prostředí 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>. Poté je na přístroji Tecan Infinite M200 naměřena fluorescence ( $\lambda_{Ex}=360$  nm;  $\lambda_{Em}=465$  nm) v čase 30 (resp. 60). Změna fluorescence minus slepý vzorek (blank) minus nespecifické štěpení substrátu odpovídá aktivitě kaspázy 3 ve vzorcích.

#### 4.6.7. **Produkce albuminu hepatocyty**

Albumin je plazmatický protein výhradně tvořený v játrech. Jeho stanovení odráží funkční kapacitu diferencovaných hepatocytů. Měření probíhá na principu sendvičové ELISA pomocí kitu Rat Albumin ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories). Do jamek napipetujeme 100  $\mu$ l zředěné ovčí protilátky proti potkanímu albuminu a inkubujeme 60 minut při laboratorní teplotě. Poté destičku vyklepneme a 5x promyjeme 300  $\mu$ l promývacího roztoku. Poté blokujeme nespecifická vazebná místa jamky 200  $\mu$ l blokovacího roztoku a inkubujeme 30 minut při laboratorní teplotě. Následuje 5 promytí 300  $\mu$ l promývacího roztoku. Do jamek napipetujeme 100  $\mu$ l standardů o známé koncentraci albuminu (v ředícím roztoku na koncentrace 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95 a 0 ng/ml) a vzorky. Poté destičku inkubujeme 60 minut při pokojové teplotě, následně ji vyklepneme a 5x promyjeme 300  $\mu$ l promývacího roztoku. Do jamek napipetujeme 100  $\mu$ l zředěné protilátky proti albuminu značené křenovou peroxidázou. Po 60minutové inkubaci, vyklepnutí destičky a promytí následuje přidavek 100  $\mu$ l

připraveného substrátového roztoku. Destičku inkubujeme při laboratorní teplotě 15 minut ve tmě. Poté ke stávajícímu obsahu jamek přidáme 100 µl zastavovacího roztoku a změříme absorbanci (Tecan Infinite M200) při 450 nm. Vzorky před použitím ředíme tak, aby spadaly do lineární části sigmoidální kalibrační křivky.

<b>Vázací pufr</b>	Uhličitano-hydrogenuhličitanový pufr 50 mM; pH=9,6 Tímto pufrém je ředěna vázaná protilátka
<b>Promývací roztok</b>	50 mM Tris pufr + 0,05% Tween 20; pH=8
<b>Blokovací roztok</b>	50 mM Tris pufr, 1% BSA; pH=8
<b>Ředící roztok</b>	50 mM Tris pufr, 1% BSA, 0,05% Tween 20; pH=8
<b>Substrátový roztok</b>	Roztok TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin) smícháme v poměru 1:1 s peroxidázovým roztokem B
<b>Zastavovací roztok</b>	2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Protilátka proti albuminu</b>	Ovčí protilátka proti potkanímu albuminu ve vázacím pufru v poměru 1:100
<b>Protilátka značená HRP</b>	Ovčí protilátka proti potkanímu albuminu značená křenovou peroxidázou v ředícím roztoku v poměru 1:30000

**Tabulka č. 3 – Složení a případná příprava roztoků využívaných při stanovení albuminu.** Všechny potřebné reagensie jsou součástí kitu Rat Albumin ELISA Quantitation Kit (BETHYL)

#### 4.6.8. Produkce urey hepatocyty

Močovina je konečným produktem metabolismu bílkovin a aminokyselin. Urea je syntetizována výhradně hepatocyty, stanovení její produkce slouží jako marker funkční kapacity diferencovaných hepatocytů. K její spektrofotometrické detekci v médiu je využívána reakce urey s diacetylmonoximem za vzniku barevného diazinu.

Ze zásobního standardu o koncentraci 0,5 g/l připravíme ředěním v destilované vodě jednotlivé standardy o koncentraci 0; 4,6875; 9,375; 18,75; 37,5; 75; 150 a 300 mg/l. Smísením směsného kyselého činidla, směsného barevného činidla a destilované vody v poměru 1:1:1 získáme vlastní reakční směs. Do 96jamkové mikrotitrační destičky napipetujeme 10 µl slepého vzorku, standardy a vzorky. Přidáme 300 µl reakční směsi a destičku uložíme do inkubátoru na destičky vytemperovaného na 95 °C a zapneme třepání. Po ustálení teploty inkubujeme 30

minut. Pro zastavení reakce destičku vložíme do ledové tříště a chladíme 15 minut. Následně je na spektrofotometru Tecan Infinite M200 měřena absorbance při 540 nm.

<b>Zásobní kyselý roztok</b>	0,25 g hexahydrátu FeCl <sub>3</sub> (Riedel - de Haen) + 7,5 ml destilované vody + 5 ml 10% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)
<b>Směsné kyselé činidlo</b>	200 ml destilované vody + 50 ml koncentrované H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) + 150 µl zásobního kyselého roztoku
<b>Barevné činidlo A</b>	2% roztok diacetylmonoximu (Fluka) v destilované vodě
<b>Barevné činidlo B</b>	0,5% roztok thiosemkarbazidu (Fluka) v destilované vodě
<b>Směsné barevné činidlo</b>	7 ml barevného činidla A + 7 ml barevného činidla B + doplnit destilovanou vodou do 100 ml
<b>Zásobní standard</b>	Roztok urey (Fluka) v 0,1% roztoku kyseliny benzoové (Sigma-Aldrich) o výsledné koncentraci 0,5 g/l

**Tabulka č. 4 – Složení zásobních roztoků pro stanovení urey metodou s diacetylmonoximem**

#### 4.6.9. **Obsah triacylglycerolů v hepatocytech**

K určení míry steatózy v kultuře slouží stanovení obsahu TAG v hepatocytech pomocí kitu *Triglyceride Colorimetric Assay Kit* (Cayman Pharma). Stanovení je založeno na principu štěpení TAG enzymem lipázou na volné mastné kyseliny a glycerol. Uvolněný glycerol je dále glycerolkinázou fosforylován na glycerol-3-fosfát. Ten je následně glycerol-fosfát oxidázou oxidován na dihydroxyacetonfosfát a peroxid vodíku. Peroxidázový rozklad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za přítomnosti 4-aminoantipyrinu (4-AAP) a N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)-*m*-anisidinu (ESPA) je doprovázen vznikem fialového produktu, který lze spektrofotometricky stanovit.

Ke stanovení TAG jsou použity 6jamkové kultivační destičky s denzitou 1 milion buněk/jamku. Po kultivaci je médium staženo a přichycené buňky propláchnuty Williams' E médiem. Do každé jamky napipetujeme 1,5 ml 10 x ředěného PBS pufru (komerčně dodaný PBS 10x je ředěn na pracovní roztok PBS 1x) a buňky mechanicky odloučíme. Obsah jamky je stažen do Eppendorfovy zkumavky a centrifugován (10 min, 4 °C, 2000 g). Sedlina je resuspendována ve 100 µl ředícího roztoku (součást kitu, viz [tabulka č. 5](#)). Hepatocyty v této suspenzi jsou rozrušeny sonifikací (20x při 1 s „burst“; vzorky udržujeme v chladu). Z tohoto vzorku stanovujeme proteiny dle Bradfordové (5 - 10x ředíme). Následuje centrifugace (10 min, 4 °C,



10 000 g), supernatant je stáhnut do chladných Eppendorfových zkumavek a uchován při -80°C do vlastní analýzy.

Připravíme si roztoky podle [tabulky č. 5](#), všechny reagenty jsou součástí kitu. Připravíme standardy o koncentraci TAG 0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 a 200 mg/dl. Do destičky pipetujeme 10 µl standardů a vzorky a přidáme 150 µl připravené enzymové směsi, promícháme na třepačce a 15 minut inkubujeme ve tmě při laboratorní teplotě. Změříme absorbanci na přístroji Tecan Infinite M200 při 540 nm.

<b>Ředící roztok</b>	Roztok solí je 5x naředěn v destilované vodě pro HPLC užití
<b>Fosfátový pufr</b>	Dodanou lahvičku fosfátu sodného (4 ml, 250 mM, pH=7,2) zředíme 16 ml dest. vody pro HPLC užití na 50 mM; pH=7,2
<b>Směs enzymů</b>	lyofilizovanou směs enzymů (lipáza, glycerolkináza, glycerol-fosfát oxidáza, peroxidáza) rozpustíme v 1 ml destilované vody pro HPLC užití a následně zředíme 14 ml fosfátového pufru
<b>Zásobní TAG standard</b>	Připravený k použití, o koncentraci 1000 mg/dl

**Tabulka č. 5 – Příprava roztoků pro stanovení TAG pomocí kitu *Triglyceride Colorimetric Assay Kit* (Cayman Pharma).** Všechny potřebné chemikálie jsou součástí kitu.

#### 4.6.10. **Obsah proteinů**

K vyjádření WST-1 testu, tvorby MDA, ROS, obsahu glutathionu a TAG, aktivity kaspázy 3 a produkce albuminu a urey kultivovanými buňkami je třeba vzít v úvahu aktuální počet buněk na kultivační misce. V praxi se osvědčilo vztažení naměřených hodnot na obsah proteinů pocházejících ze stejné jamky kultivační destičky. V případě hodnocení obsahu TAG jsme hodnoty vztáhli ke koncentraci proteinů měřené ze vzorku po sonifikaci.

V naší laboratoři stanovujeme proteiny metodou dle Bradfordové (215), která je založena na principu adsorpce barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu. Adsorpce probíhá především na bazické (arginin) a aromatické aminokyseliny. Tato metoda tedy není vhodná pro proteiny s minimálním obsahem těchto aminokyselin. Problémem může být interference některých detergentů (Triton, SDS – sodium dodecyl sulfát) se stanovením.

Po odsátí média je destička uložena na 15 minut do -80 °C. Po lýze buněk mrazem je do jamek přidán adekvátní objem destilované vody shodný s objemem kultivačního média a buňky jsou ze dna mechanicky odloučeny. Ředěním BSA (Sigma-Aldrich) v destilované vodě si připravíme standardy o koncentraci 0; 25; 50; 100; 200; 300; 400 a 500 mg/l. K 10 µl standardu

či vzorku přidáme 300 µl Bradford činidla (50 mg Brilliant blue G-250 + 25 ml 95% ethanolu + 50 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%), doplněné destilovanou vodou do 500 ml) a inkubujeme 15 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Měříme absorbanci při 595 nm na spektrofotometru Tecan Infinite M200.

## 4.7. Mikroskopické hodnocení buněk a speciální barvení

### 4.7.1. Mikroskopické hodnocení buněk ve fázovém kontrastu

Pro posouzení morfologických znaků hepatocytů používáme invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem Olympus CK 40, případně Olympus IX51, digitální fotografie byly pořízeny pomocí digitálního fotoaparátu Olympus Digital Camera E-600. Hodnocen je vzhled živých neobarvených buněk, jejichž pozorování je výhodnější ve fázovém kontrastu (180).

Následkem izolace hepatocyty ztrácejí svůj typický polygonální tvar. Čerstvě izolované hepatocyty jsou kulaté nebo oválné buňky. Většina hepatocytů se nachází samostatně, vzácněji můžeme v suspenzi pozorovat dublety či triplety. Neporušené buňky vykazují vysoký kontrast mezi buňkou a okolím, mají zřetelnou jadernou membránu, nízký stupeň granulace cytoplazmy a ostře viditelné jádro s jadérky (180). Během izolace dochází k poškození buněk, děje se tak působením hypoxie, mechanickým poškozením či vlivem kolagenázy. Narušení se nezdá projevuje tvorbou výběžků cytoplazmatické membrány tzv. „blebs“. Tento proces je reverzibilní, za vhodných podmínek se během krátké doby cytoplazmatická membrána stabilizuje a „blebs“ vymizí (180).

V primárních kulturách dochází k obnovení polygonálního tvaru hepatocytů. Viabilní buňky se přichytávají ke kolagenu, mají neporušenou plazmatickou membránu, nízkou granulovanou cytoplazmu, ostře ohraničené jádro s několika jadérky a tvoří mezibuněčné kontakty. Často nalézáme buňky s obsahem dvou jader. Hepatocyty se začínají diferencovat na krevní a žlučový pól. Mrtvé buňky se zakulacují a odlučují od podkladu, kontrast mezi buňkou a okolním prostředím slábne, cytoplazma vykazuje vyšší stupeň granulace, jádro se kondenzuje, jadérka přestávají být patrná a objevují se diskontinuity plazmatické membrány (180).

#### 4.7.2. **Vizualizace membránového potenciálu mitochondrií pomocí JC-1**

Principem metody je schopnost kationického karbocyaninového barviva JC-1 (5,59,6,69-tetramethylbenzimidazolcarbocyanine iodide; Molecular Probes, USA) vstupovat do hepatocytu, kde se akumuluje v mitochondriích v závislosti na membránovém potenciálu. Emisní vlnové délky tohoto fluorescenčního barviva závisí na jeho koncentraci, jež je závislá na velikosti mitochondriálního membránového potenciálu (MMP). Při nízkém MMP se JC-1 vyskytuje jako monomer, jež vyzařuje fluorescenci zelené barvy ( $\lambda_{em}$  525nm). Při vyšších membránových potenciálech JC-1 tvoří tzv. "J-agregáty" ( $\lambda_{em}$  590 nm), které emitují světlo v červené oblasti. Mikroskopie takto obarvených kultur může být vyhodnocena jak kvalitativně, tak kvantitativně.

Hepatocyty na 6, 12 či 24jamkové destičce jsou po kultivaci propláchnuty čistým William's E médiem bez suplementace a dále 60 minut inkubovány v 10  $\mu$ M roztoku JC-1 ve William's E médiu v prostředí 95 % vzduchu, 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C. Poté je barvivo z kultury vymyto opakovaným proplachem čerstvým Williams' E médiem bez suplementů. K vizualizaci MMP je použit fluorescenční mikroskop Olympus IX51 (Olympus) doplněný o digitální fotoaparát Olympus E600 (Olympus). Na mikroskopu zapneme fluorescenční výbojku, zavřeme světelnou clonu, otevřeme fluorescenční clonu a nastavíme filtr U-MWB2 (Fluorescence Mirror Units, Olympus). Pořízené fotografie lze kvantitativně vyhodnotit. Výsledky jsou poté vyjádřeny jako procento hepatocytů s vysokým membránovým potenciálem ze všech hepatocytů.

#### 4.7.3. **Barvení tukových kapének pomocí olejové červeně O**

Olejová červeně O (Oil Red O) je lipofilní barvivo schopné vizualizovat tuky v buňce. V naší laboratoři je využíván komerčně dodávaný kit *Steatosis Colorimetric Assay Kit* (Cayman Pharma).

Všechny součásti kitu *Steatosis Colorimetric Assay Kit* včetně přípravy roztoků jsou popsány v [tabulce č. 6](#). K určení lokalizace a pořízení fotografií byly použity hepatocyty kultivované na 6, 12 či 24jamkových destičkách. Pro kvantitativní stanovení v tucích akumulovaného barviva byly použity 96jamkové destičky. Objemy přidávaných roztoků platí pro 96jamkovou destičku, pro ostatní destičky je adekvátní objem přepočítán na plochu jamky (24 WP: 1,9 cm<sup>2</sup>; 12 WP: 3,9 cm<sup>2</sup>; 6 WP: 9,6 cm<sup>2</sup>) viz [tabulka č. 2](#). Po kultivaci je obsah jamek propláchnut čistým Williams' E médiem a buňky 15 minut fixovány 75  $\mu$ l fixačního roztoku při laboratorní teplotě. Následuje promytí 100  $\mu$ l promývacího roztoku, probíhá 2x za sebou vždy

na 5 minut. Jamky jsou poté vysušeny vysoušečem vlasů a následně je do nich na 20 minut přidáno 75 µl pracovního roztoku Oil Red O. Poté je destička několikrát promyta destilovanou vodou a 2x promývacím roztokem, který je v jamkách ponechán pokaždé 5 min. Následně jamky vysušíme pomocí vysoušeče vlasů. Nyní můžeme kulturu pozorovat pod mikroskopem nebo kvantitativně spektrofotometricky stanovit intenzitu akumulovaného barviva.

A) Vizualizace tukových kapének: pro lepší orientaci v kultuře můžeme obarvit jádra hepatocytů hematoxylinem. Do každé jamky napipetujeme 50 µl hematoxylinu a ihned destičku promyjeme kohoutkovou vodou. Barvivo necháme pod vodou vyvíjet 10 minut, poté destičku vyklepneme a pozorujeme pod světelným mikroskopem Olympus IX51 (Olympus, Japan) doplněným o digitální fotoaparát Olympus E600 (Olympus, Japan).

B) Kvantifikace akumulace Oil Red O v lipidech: do vysušených jamek včetně slepého vzorku bylo přidáno 100 µl extrakčního činidla a destička byla na 30 minut umístěna na třepačku, kde docházelo k opatrnému neustálému promíchávání. Poté byla spektrofotometricky (Tecan Infinite M200) měřena absorbance při 500 nm oproti slepému vzorku.

<b>Fixační roztok</b>	Bezprostředně před analýzou zředíme obsah 1:10 v PBS 1x
<b>Promývací roztok</b>	Připravený k použití
<b>Roztok Oil Red O</b>	Bezprostředně před analýzou zředíme v destilované vodě v poměru 6:4, použít do 1 hodiny
<b>Extrakční činidlo</b>	Připraveno k použití
<b>Hematoxylin</b>	Připravený k použití

Tabulka č. 6 – Roztoky dodávané ke kitu Steatosis Colorimetric Assay Kit (Cayman Pharma) a jejich ředění

#### 4.8. Statistické hodnocení dat

Po zhodnocení normality dat probíhalo statistické zpracování dat 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:

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

## 5. VÝSLEDKY

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

Nejprve bylo nutné na našem pracovišti sendvičovou kultivaci zavést a optimalizovat. Bylo nezbytné stanovit vhodné koncentrace použitého kolagenu na spodní i vrchní vrstvu, čas tuhnutí a případnou nutnost neutralizace kyselého roztoku kolagenu. Jelikož v naší laboratoři s úspěchem používáme standardní *monolayer* s kolagenem o koncentraci **0,3 mg/ml**, zdálo se nám pro porovnání se sendvičovou kultivací přínosné tuto koncentraci na spodní vrstvě zachovat.

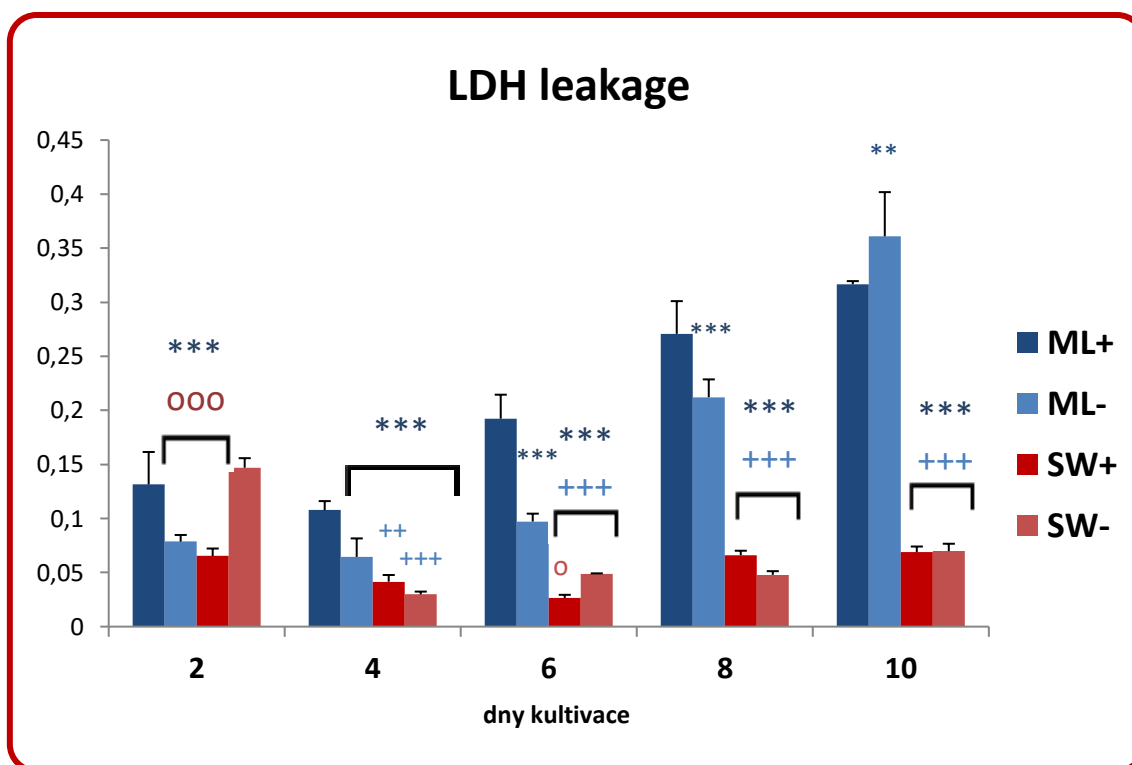
Objem a koncentrace kolagenu na horní vrstvu byly stanoveny experimentálně, volené varianty se opíraly o literární data. Na přichycené hepatocyty bylo aplikováno 140  $\mu$ l roztoku kolagenu o koncentraci 0,4; 0,8 či 1 mg/ml. Tento roztok byl připraven ze zásobního kolagenu ve 20 mM kyselině octové o koncentraci 4 mg/ml a bezprostředně před použitím ředěn Williams' E médiem. U výsledné koncentrace kolagenu 0,4 a 0,8 mg/ml postačovala k neutralizaci kyselého rozpouštědla pouze pufrační síla média, kolagen o koncentraci 1 mg/ml bylo nutné neutralizovat přidávkem přibližně 5  $\mu$ l 0,2M NaOH. Poté byl sendvič ponechán v prostředí 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C ke ztuhnutí. Optimální koncentrace kolagenu na vrchní vrstvu sendviče byla stanovena na **0,8 mg/ml**. Tento výběr podporovala také metodicky přívětivá příprava kultury. Jako dostatečná doba k ztuhnutí kolagenu bez nežádoucího poškození buněk nedostatkem vlhkosti a živin byla vyhodnocena délka inkubace trvající **3 hodiny**.

Ke kultivaci bylo použito 1,5 ml Williams' E média se suplementy s obsahem 6 % fetálního bovinního séra (FBS), resp. bez FBS. Kultivační médium bylo každý den měněno za čerstvé a kultury byly takto udržovány po dobu 10 dní. Každý den byla pořízena fotodokumentace, každý druhý den bylo médium sbíráno na biochemickou analýzu a buňky zpracovány na stanovení intracelulárních analytů.

Hodnoceny byly následující parametry:

- a) Viabilita hepatocytů pomocí LDH leakage
- b) Míra lipoperoxidace na základě tvorby malondialdehydu
- c) Funkční stav hepatocytů produkcí albuminu (sendvičová ELISA)
- d) Morfologie buněk

**Graf č. 1 - Vývoj LDH leakage během kultivace hepatocytů v sendviči a v *monolayeru* s, resp bez obsahu FBS v médiu. Kultivace probíhala 10 dní s denní výměnou média za čerstvé.**



\*\*\* vs ML+; +++ vs ML-; ooo vs SW-

ML+: hepatocyty kultivované v *monolayeru* s 6 % FBS ve Williams' E kultivačním médiu

ML-: hepatocyty kultivované v *monolayeru* bez obsahu FBS ve Williams' E kultivačním médiu

SW+: hepatocyty kultivované v sendviči s 6 % FBS ve Williams' E kultivačním médiu

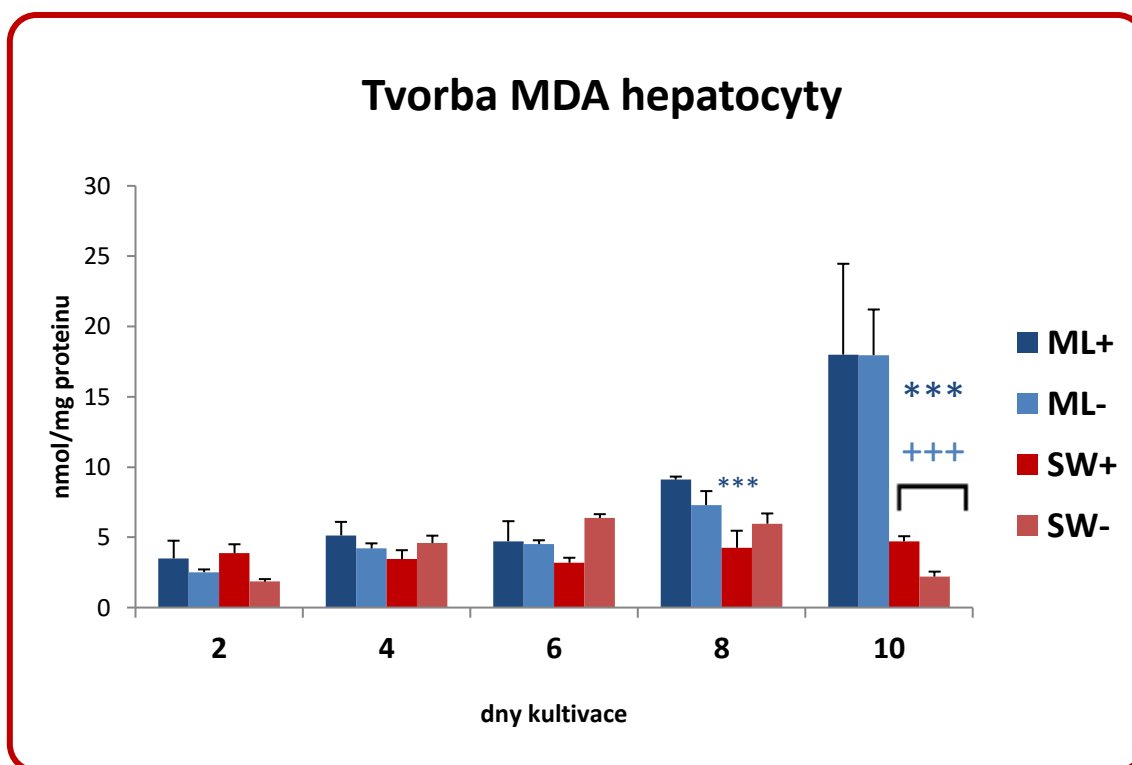
SW-: hepatocyty kultivované v sendviči bez obsahu FBS ve Williams' E kultivačním médiu

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

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 ( $p < 0,001$ ). 4. den jsme zaznamenali nejvyšší nárůst úniku LDH z buněk u hepatocytů kultivovaných v *monolayeru* s obsahem FBS. U obou sendvičů byl LDH leakage signifikantně nižší než u *monolayerů* ( $p < 0,001$ ). 6., 8. a 10. kultivační den vykazovaly oba sendviče nižší LDH leakage než hepatocyty kultivované v *monolayerech* ( $p < 0,001$ ). Po většinu kultivačních dní jsme našli nejvyšší hladinu LDH leakage u hepatocytů kultivovaných v *monolayeru* s obsahem 6 % FBS v médiu ( $p < 0,001$ ), pouze 10. den jsme zaznamenali nejvyšší únik LDH z buněk kultivovaných v *monolayeru* bez FBS ( $p < 0,01$ ). Oproti tomu hepatocyty kultivované sendvičovou technikou nevykazovaly oproti 2. dni výrazně vyšší poškození buněčné membrány ani poslední den kultivace (Graf č. 1).

**Graf č. 2** - Vývoj tvorby malondialdehydu (MDA) během kultivace hepatocytů v sendviči a v *monolayeru* s, resp bez obsahu FBS v médiu. Kultivace probíhala 10 dní s denní výměnou média za čerstvé.



\*\*\* vs ML+; +++ vs ML-

**ML+:** hepatocyty kultivované v *monolayeru* s 6 % FBS ve Williams' E kultivačním médiu

**ML-:** hepatocyty kultivované v *monolayeru* bez obsahu FBS ve Williams' E kultivačním médiu

**SW+:** hepatocyty kultivované v sendviči s 6 % FBS ve Williams' E kultivačním médiu

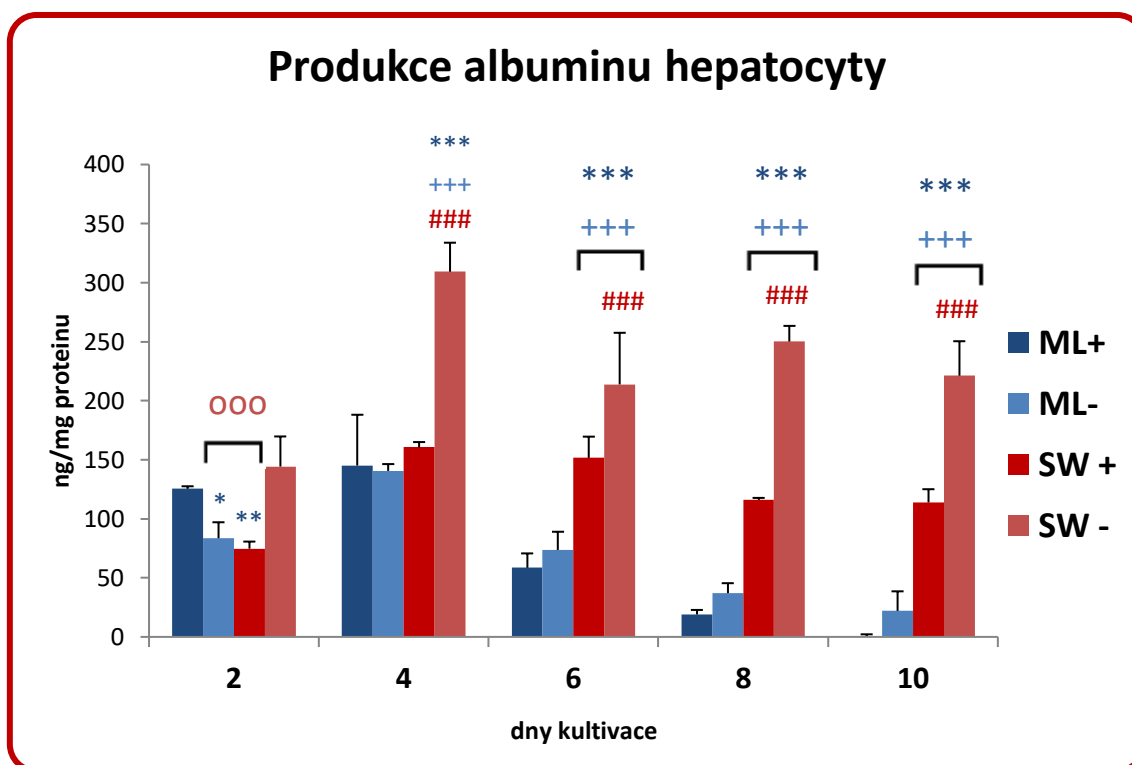
**SW-:** hepatocyty kultivované v sendviči bez obsahu FBS ve Williams' E kultivačním médiu

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

Statistické porovnání skupin probíhalo vždy v rámci jednoho kultivačního dne

Až do 6. kultivačního dne nebyly mezi skupinami v produkci MDA nalezeny signifikantní rozdíly. V 8. dni kultivace jsme u hepatocytů kultivovaných v sendviči s obsahem FBS v médiu našli oproti hepatocytům v *monolayeru* s přidavkem FBS významně nižší produkci MDA ( $p < 0,001$ ). V 10. dni kultivace byla u hepatocytů kultivovaných v *monolayeru* zjištěna vyšší míra lipoperoxidace než u sendvičů ( $p < 0,001$ ), oproti tomu u sendvičových kultur se hladina malondialdehydu po všechny dny výrazněji neměnila a oxidační stres s délkou kultivace nenarůstal (Graf č. 2).

**Graf č. 3 - Vývoj produkce albuminu hepatocytů během jejich kultivace v sendviči a v *monolayeru* s, resp bez obsahu FBS v médiu. Kultivace probíhala 10 dní s denní výměnou média za čerstvé.**



\*\*\* vs ML+; +++ vs ML-; ### vs SW+; ooo vs SW-

ML+: hepatocytů kultivované v *monolayeru* s 6 % FBS ve Williams' E kultivačním médiu

ML-: hepatocytů kultivované v *monolayeru* bez obsahu FBS ve Williams' E kultivačním médiu

SW+: hepatocytů kultivované v sendviči s 6 % FBS ve Williams' E kultivačním médiu

SW-: hepatocytů kultivované v sendviči bez obsahu FBS ve Williams' E kultivačním médiu

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

Statistické porovnání skupin probíhalo vždy v rámci jednoho kultivačního dne

Graf č. 3 dokumentuje, že produkce albuminu byla ve 2. kultivačním dni nejnižší u hepatocytů v *monolayeru* bez FBS a u sendvičů s přídavkem FBS v médiu. Ve 4., 6., 8. a 10. dni kultivace jsme zaznamenali signifikantně nejvyšší produkci albuminu u hepatocytů kultivovaných sendvičovou technologií bez obsahu FBS v médiu ( $p < 0,001$ ). Ve dnech 6, 8 a 10 měly hepatocytů kultivované v sendviči s obsahem FBS v médiu oproti hepatocytům v *monolayeru* významně vyšší produkci albuminu ( $p < 0,001$ ).

#### Fotografická dokumentace:

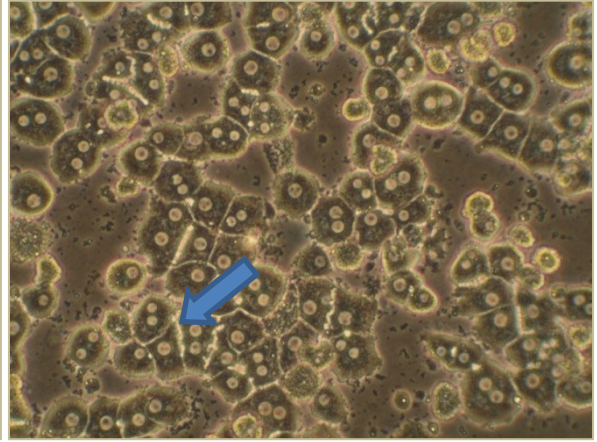
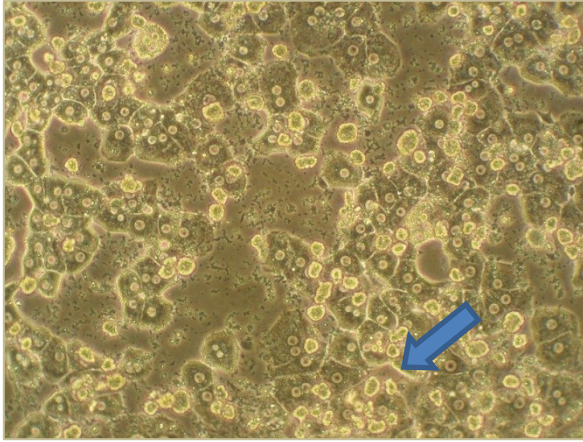
Každý den byla provedena fotografická dokumentace kultur. Rozdíly mezi kulturami s fetálním bovinním sérem (FBS+) a bez (FBS-) nebyly patrné, proto je uvedena pouze varianta bez fetálního bovinního séra 1., 2., 4., 6., 8. a 10. den kultivace.



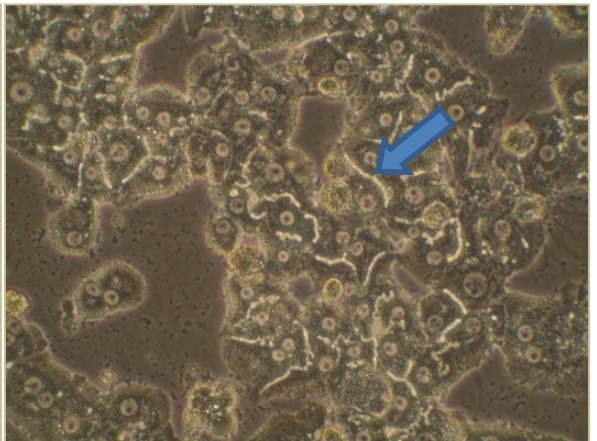
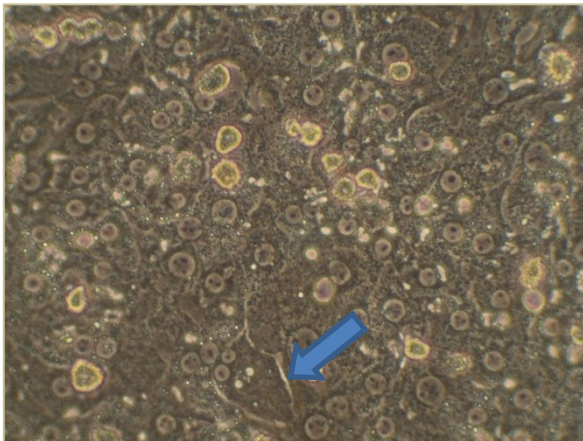
Monolayer FBS-

Sendvič FBS-

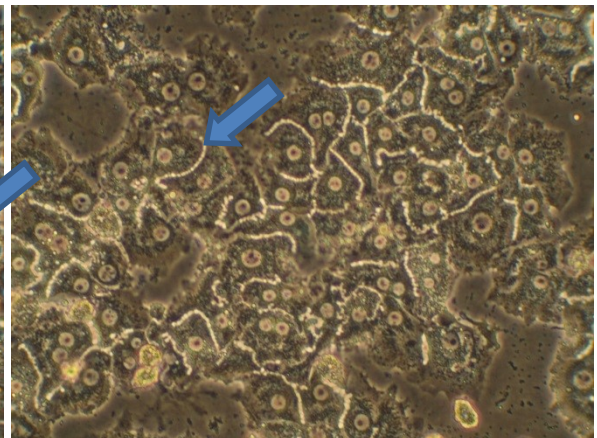
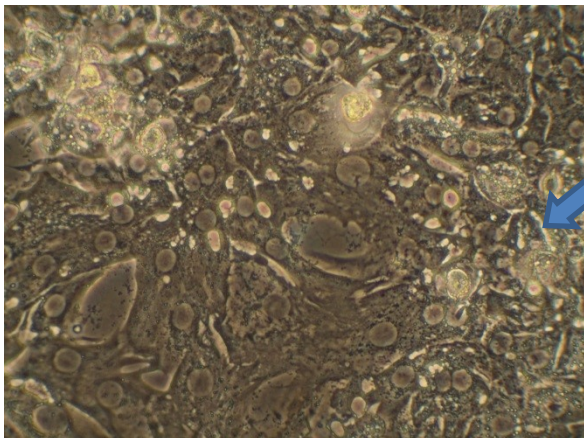
1. den



2. den



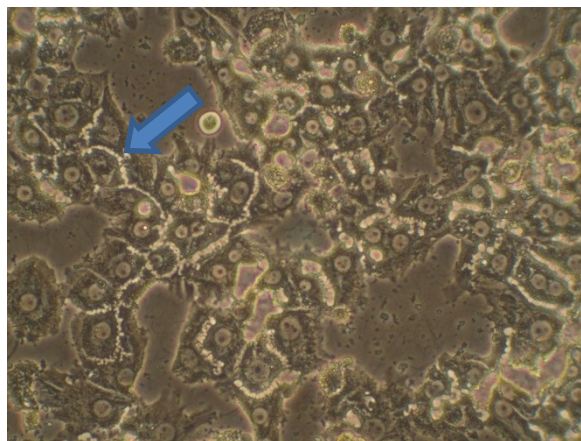
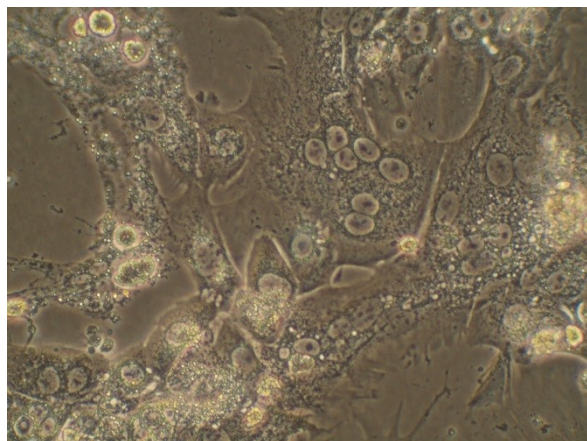
4. den



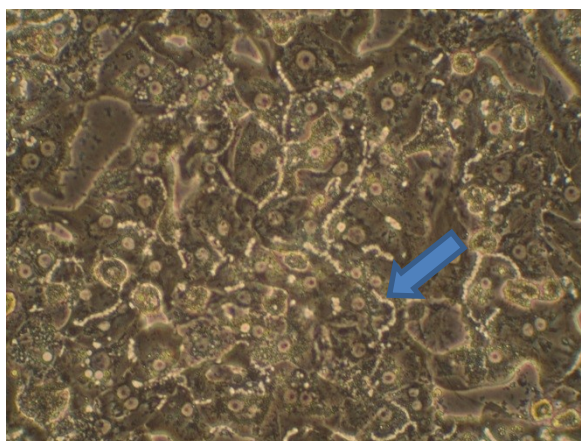
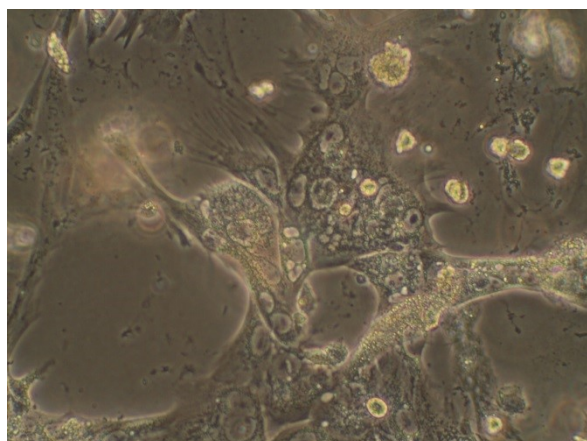
Monolayer FBS-

Sendvič FBS-

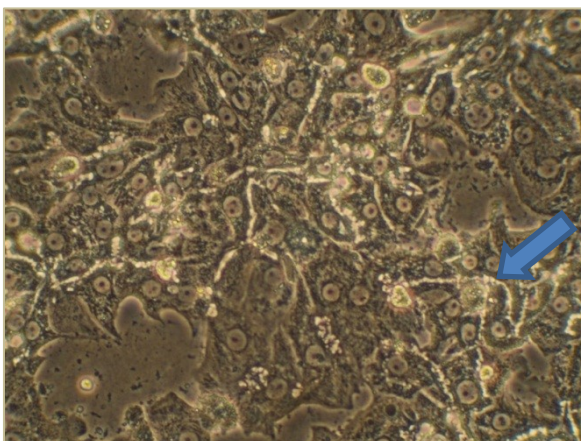
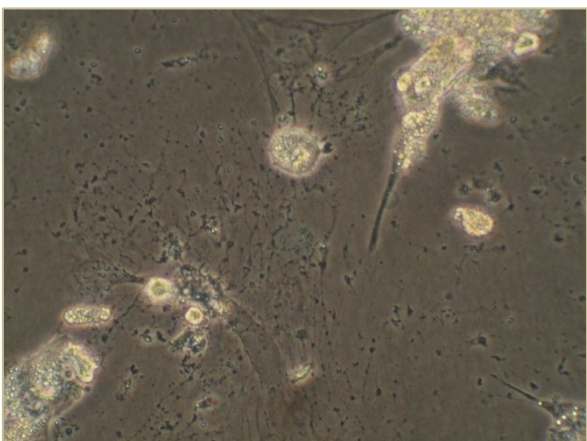
6. den



8. den



10. den



**Obrázek č. 15** – Porovnání kultur hepatocytů v sendviči a v *monolayeru* kultivovaných 10 dní s denní výměnou média (zvětšení objektivu 20 x). Šipka označuje přítomné žlučové kanálky.

První den se *monolayeru* a sendviče výrazněji neliší - vykazují polygonální tvar a kontakty mezi buňkami. Počínaje druhým dnem můžeme u sendvičů vidět výraznější tvorbu žlučových kanálků (šipka), které jsou v *monolayeru* patrné jen ojedinelé. Čtvrtý den hepatocyty

v *monolayeru* získávají fibroblastům podobný tvar a pomalu se z kultury odlučují. 10. den lze v *monolayeru* pozorovat jen ojedinělé buňky, zatímco hepatocyty kultivované sendvičově stále pokrývají téměř celou plochu destičky, zachovávají polygonální tvar a přítomnost kanálků.

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

Po přichycení hepatocytů na kolagen kultivačních destiček (utvoření *monolayeru*) 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 obsahem bovinního sérového albuminu (BSA) o odpovídající koncentraci uvedené v [tabulce č. 7](#) bez obsahu mastných kyselin. Z [tabulky č. 7](#) vyplývá, že ke každé celkové koncentraci mastných kyselin náleží kontrola o odpovídajícím obsahu BSA.

c MK [mmol/l]	0,125	0,25	0,5	0,75	1	2
c BSA [%]	0,15625	0,3125	0,625	0,9375	1,25	2,5

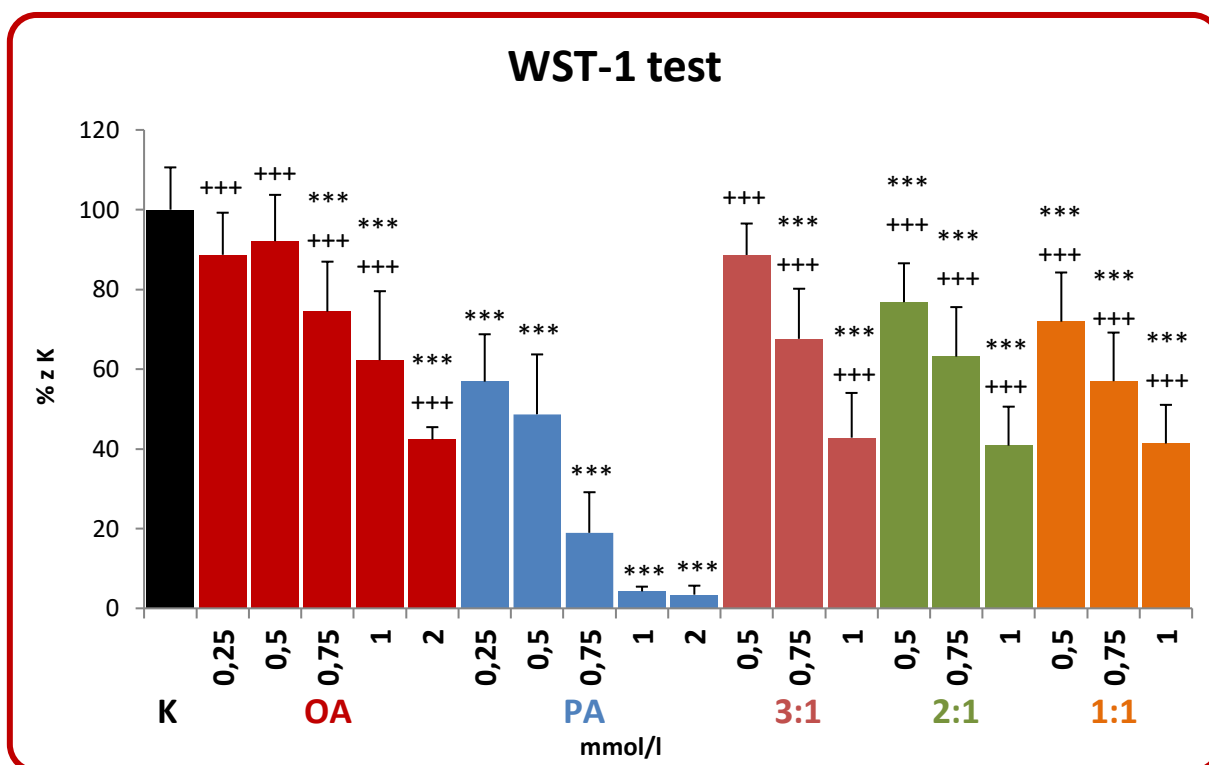
**Tabulka č. 1**

Následně byly buňky 24 hodin kultivovány v inkubátoru za podmínek 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Poté bylo médium staženo na biochemická stanovení a buňky zpracovány na zhodnocení intracelulárních analytů. Barvení kultur pomocí Oil Red O či JC-1 probíhalo na destičkách určených pouze k barvení. Výsledky jsou z důvodu dat získaných z min. 3 izolací hepatocytů a z důvodu rozdílné kontroly pro dané koncentrace mastných kyselin (Williams' E médium s příslušným obsahem BSA bez mastných kyselin) vyjádřeny jako % z příslušných kontrol.

Hodnocena byla:

- Aktivita buněčných dehydrogenáz pomocí WST-1 testu
- Viabilita buněk pomocí LDH leakage
- Fotografie pořízené ve fázovém kontrastu ke zhodnocení morfologie buněk
- Barvení pomocí Oil Red O ke zhodnocení intracelulární distribuce lipidových kapének
- Obsah TAG k určení míry steatózy
- Stanovení aktivity kaspázy 3 k určení míry apoptózy
- Stanovení ROS k detekci oxidačního stresu
- Stanovení albuminu ke zhodnocení funkční kapacity buněk
- Barvení pomocí JC-1 k vizualizaci mitochondriálního membránového potenciálu

**Graf č. 4 – WST-1 test** hodnocený 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

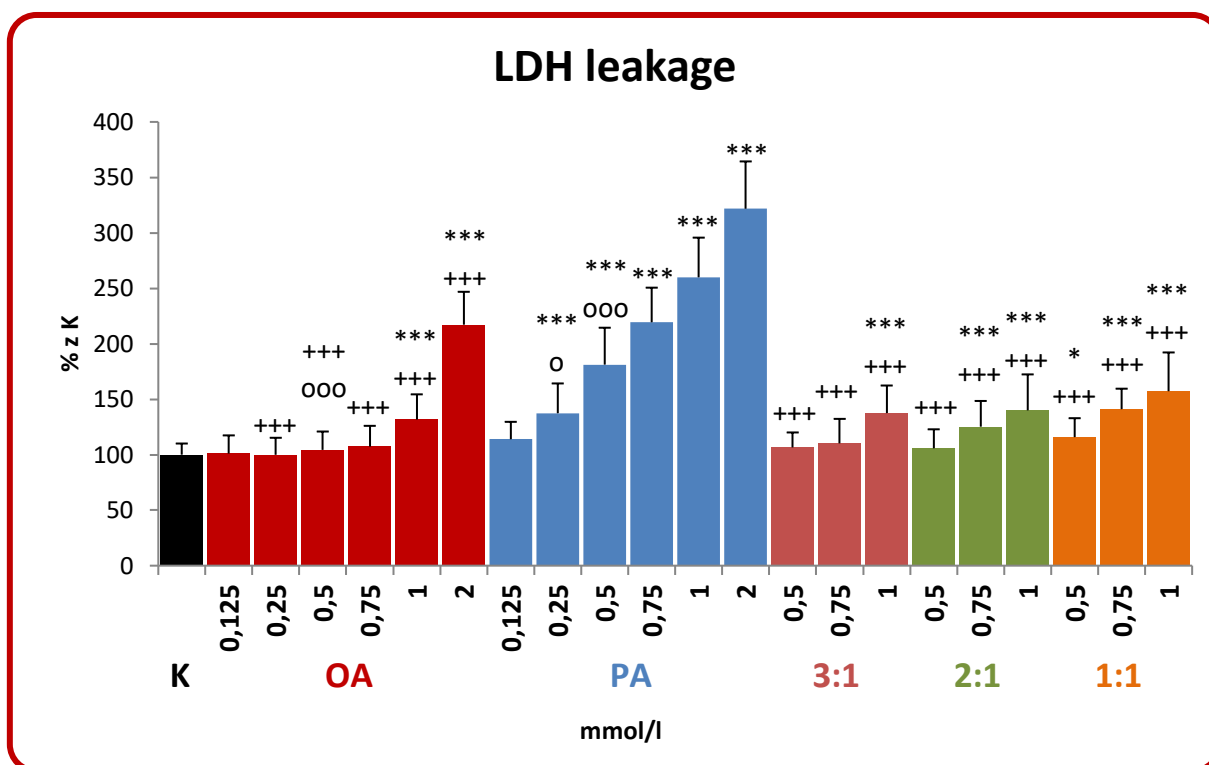
K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované ve Williams' E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin

OA; PA; 3:1; 2:1 a 1:1: hepatocyty 24 hod.n kultivované v médiu s obsahem mastných kyselin v mmol/l, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7)

\*\*\*: ( $p < 0,001$ ); \*\*: ( $p < 0,01$ ); \*: ( $p < 0,05$ );  $n \geq 12$

Signifikantní pokles aktivity buněčných dehydrogenáz (WST-1 test) testu vůči kontrole jsme zaznamenali od 0,75 mM olejové kyseliny a od 0,25 mM palmitové kyseliny ( $p < 0,001$ ). Kombinace OA:PA 3:1 v celkové koncentraci 0,5 mmol/l byla ze všech testovaných kombinací jediná, která nebyla signifikantní vůči kontrole. Kombinace 3:1 o celkové koncentraci 0,75 a 1 mmol/l a kombinace 2:1 a 1:1 ve všech třech celkových koncentracích měly oproti kontrole významně nižší WST-1 test ( $p < 0,001$ ). Všechny použité koncentrace OA a všechny testované koncentrace všech kombinací OA:PA měly v porovnání se samotnou palmitovou kyselinou o shodné celkové koncentraci signifikantně vyšší výsledky WST-1 testu ( $p < 0,001$ ) (graf č. 4).

**Graf č. 5 – LDH leakage hodnocený 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

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované ve Williams´ E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin

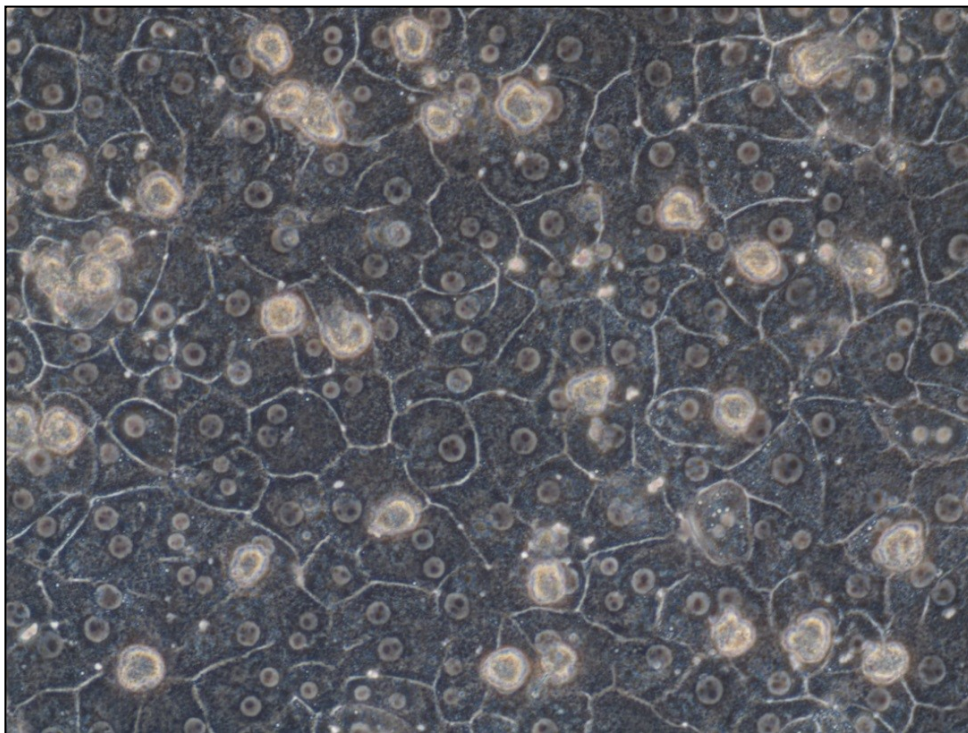
OA; PA; 3:1; 2:1 a 1:1: hepatocyty 24 hodin kultivované v médiu s obsahem mastných kyselin v mmol/l, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7)

\*\*\*: (p<0,001); \*\*: (p<0,01); \*: (p<0,05); n≥24

Významně zvýšený LDH leakage jsme našli od 0,25 mM koncentrace palmitové kyseliny a od 1 mM koncentrace olejové kyseliny (p<0,001). Použitá kombinace OA:PA 3:1 měla vůči kontrole vyšší LDH leakage pouze v celkové koncentraci 1 mmol/l (p<0,001), kombinace 2:1 vykazovala zvýšený únik LDH do extracelulárního prostředí v koncentraci 0,75 a 1 mmol/l (p<0,001) a kombinace 1:1 ve všech testovaných celkových koncentracích mastných kyselin (0,5 mM (p<0,05); 0,75 a 1 mM (p<0,001)). U 0,25 – 2 mM koncentrace OA a u všech koncentrací všech kombinací OA:PA jsme pozorovali nižší nárůst LDH leakage než u samotné palmitové kyseliny ve shodné celkové koncentraci (p<0,001). Použití samotné palmitové kyseliny o koncentraci 0,25 a 0,5 mmol/l mělo za následek větší navýšení úniku LDH do média než kombinace OA:PA 1:1 o 2x vyšší celkové koncentraci (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)) (graf č. 5).

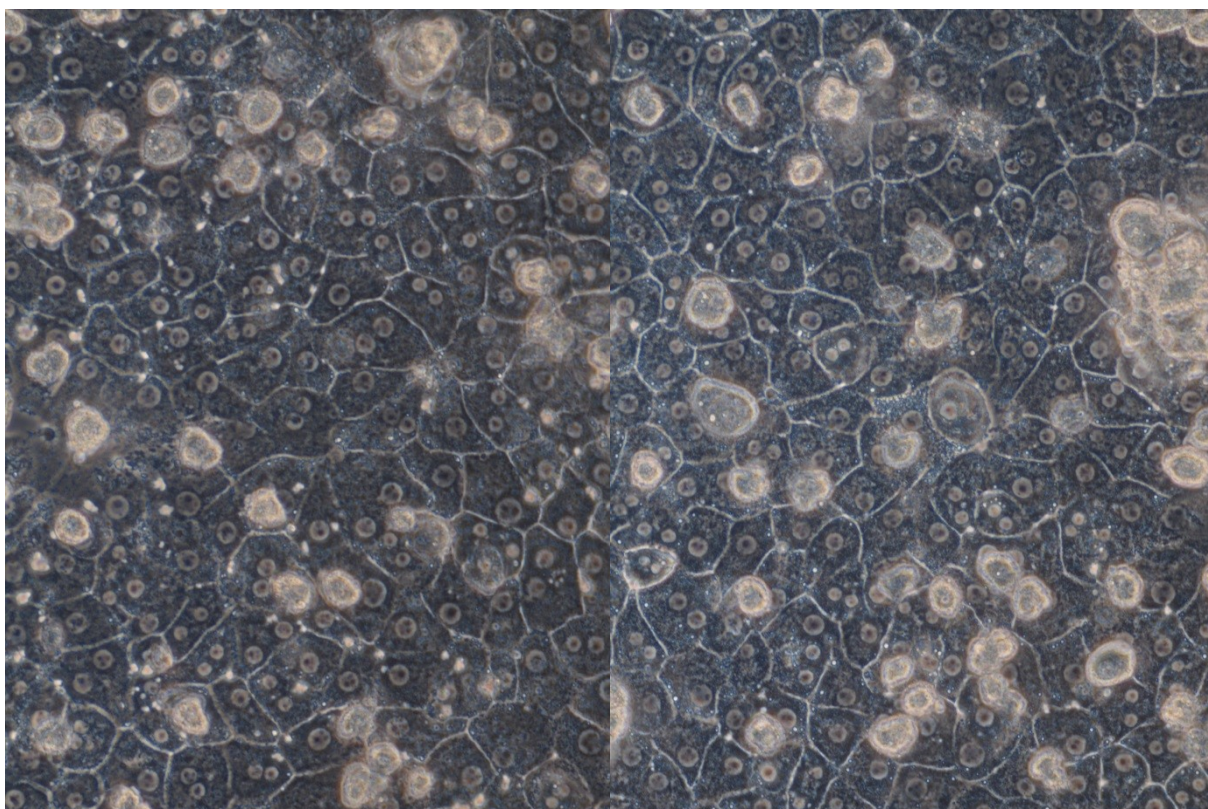
**Obrázek č. 16 – Morfologie hepatocytů po jejich 24hodinové kultivaci s olejovou či palmitovou kyselinou o koncentraci 0,25 - 2 mmol/l. Fotografie pořízeny ve fázovém kontrastu při zvětšení objektivu 40 x.**

**K**



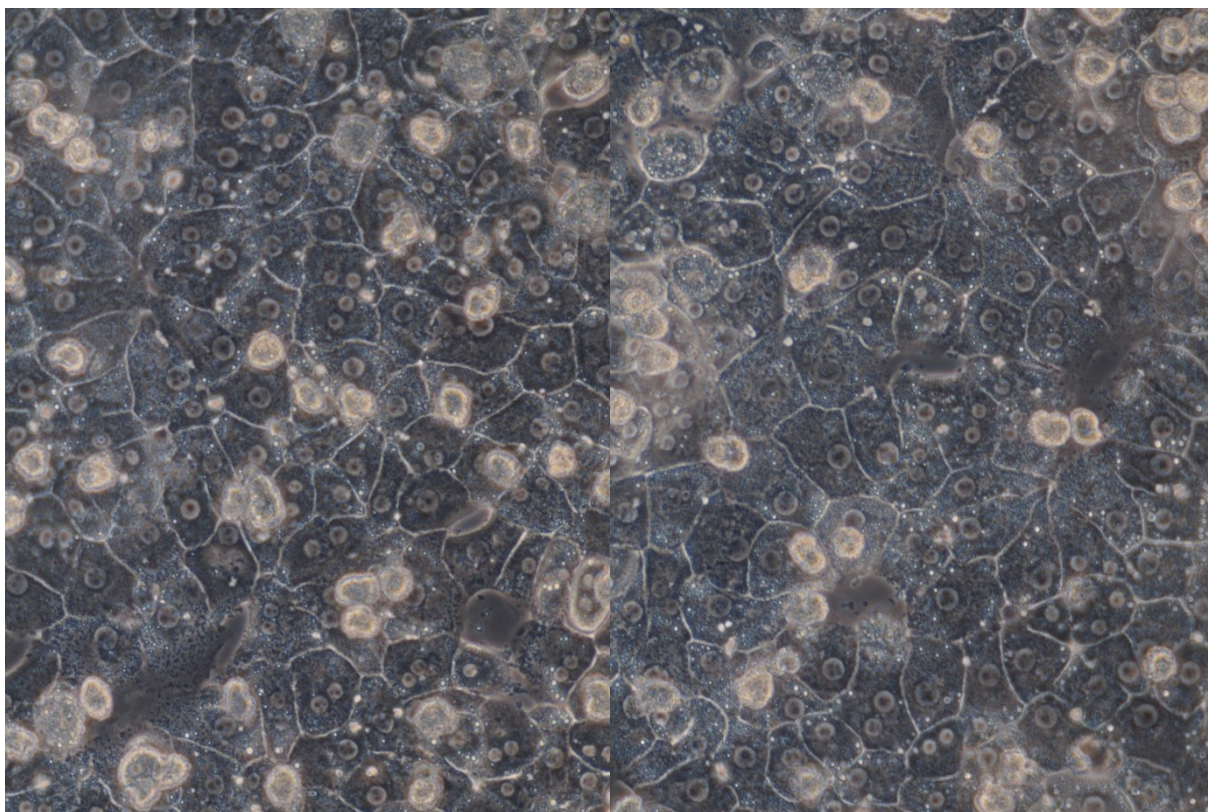
**0,25 mM OA**

**0,25 mM PA**



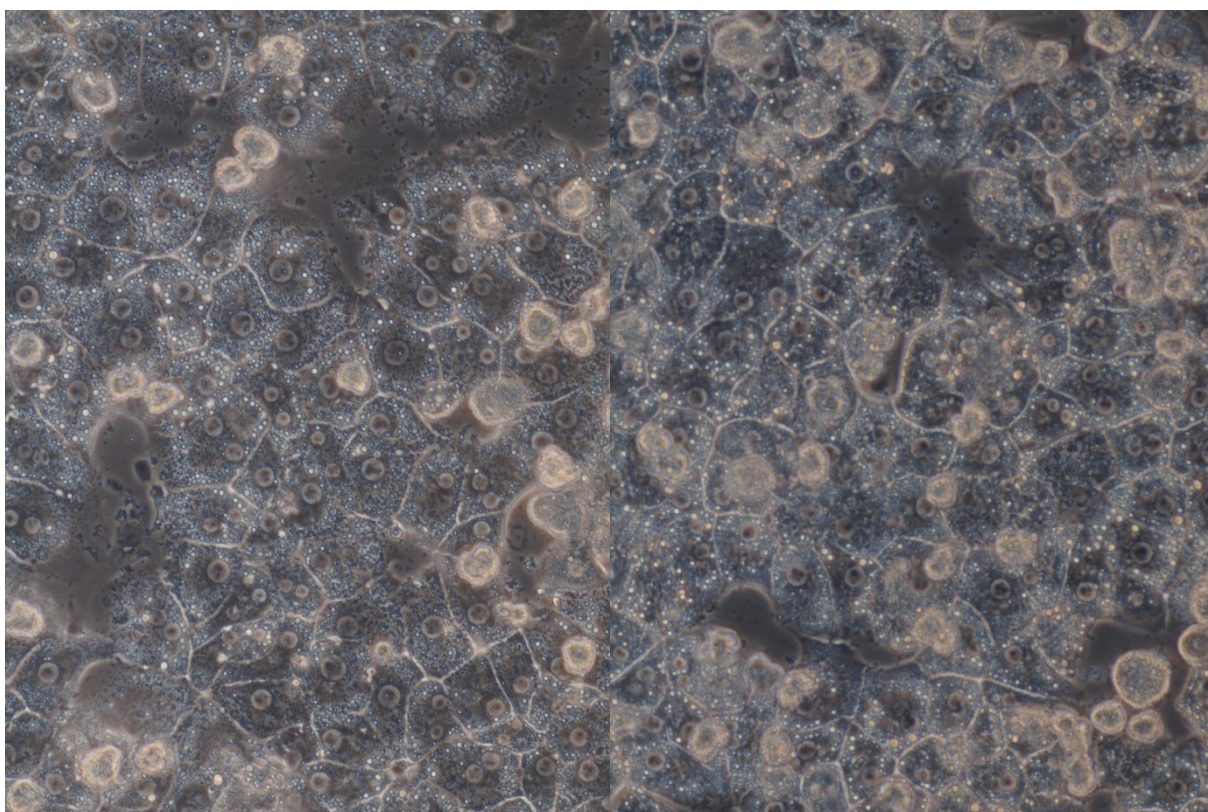
**0,5 mM OA**

**0,5 mM PA**



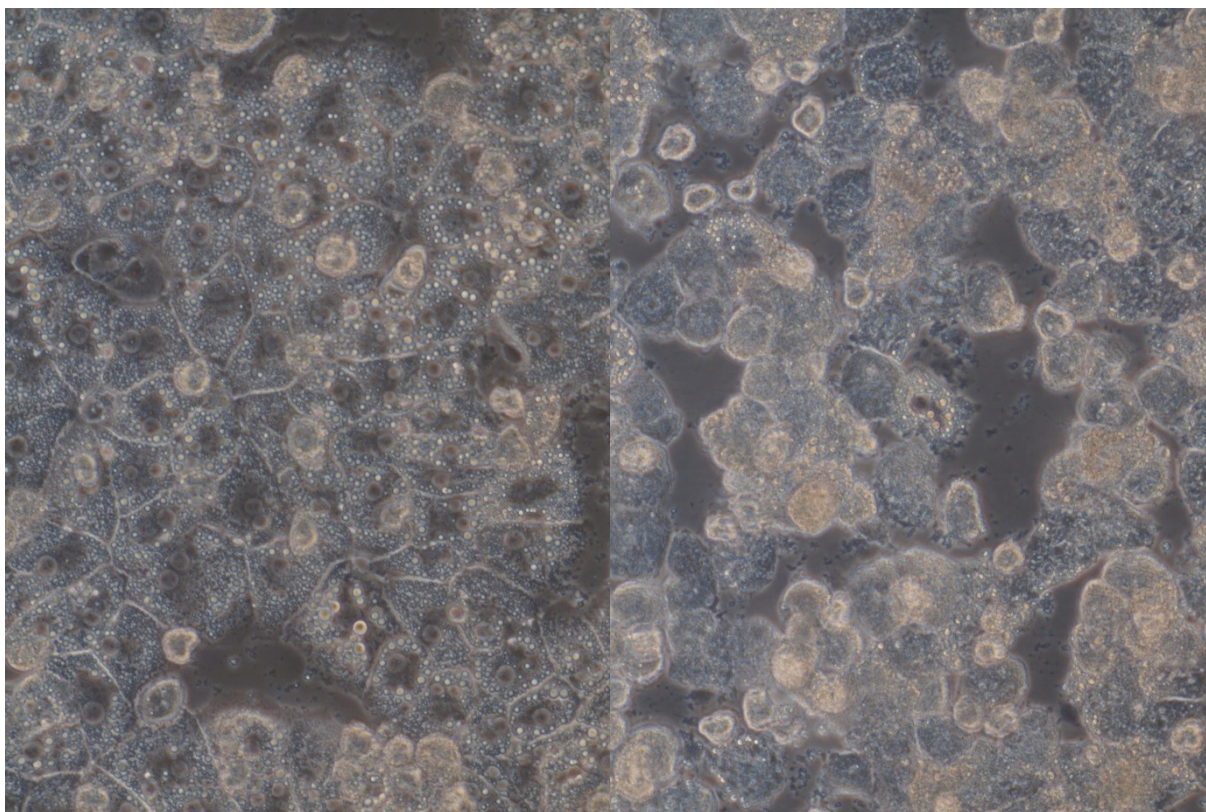
**1 mM OA**

**1 mM PA**



2 mM OA

2 mM PA



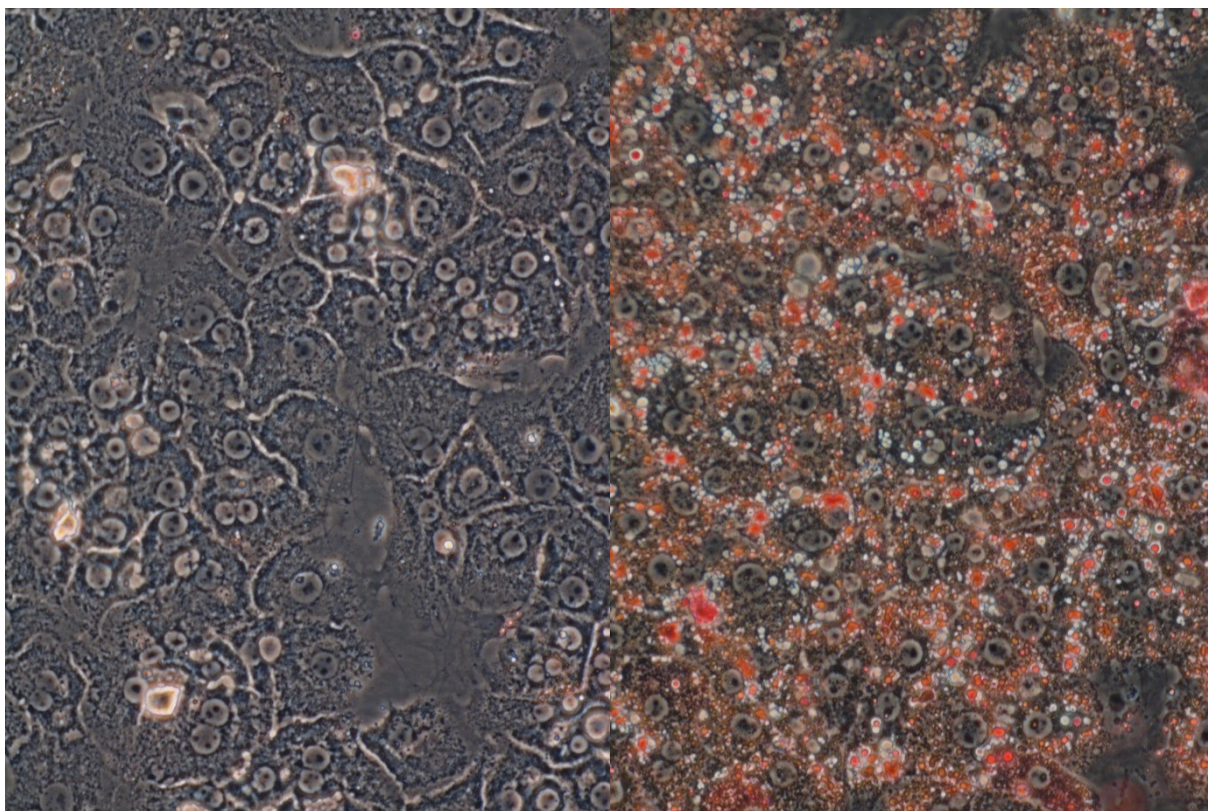
Na [obrázku č. 16](#) můžeme pozorovat morfolonii hepatocytů a tvorbu tukových kapének. Při použití 0,25 mM koncentrace mastných kyselin je hodnocení výskytu steatózy diskutabilní, od 0,5 mM koncentrace mastných kyselin můžeme v kultuře spatřit vzniklé tukové vakuoly, které jsou s přibývajícím koncentrací mastné kyseliny výraznější. Hepatocyty po inkubaci s 0,25 mM OA či PA mají jasně viditelné jádro, jsou ostře ohraničené, tvoří mezibuněčné kontakty a nevykazují výrazné poškození. Se vzrůstající koncentrací můžeme především u palmitové kyseliny pozorovat snížení kontrastu mezi buňkou a okolím a přibývajícím počtem odumřelých hepatocytů.



**Obrázek č. 17** – barvení lipidových vakuol v hepatocytech pomocí olejové červě O a jader pomocí hematoxylinu. Po 24hodinové kultivaci hepatocytů 0,75mM OA byla kultura barvena dle návodu v kitu Steatosis Colorimetric Assay Kit a pořízeny fotografie ve fázovém kontrastu a zvětšení objektivu 40 x. Kontrolu představují hepatocyty kultivované ve Williams´ E médiu s obsahem BSA a bez obsahu mastných kyselin.

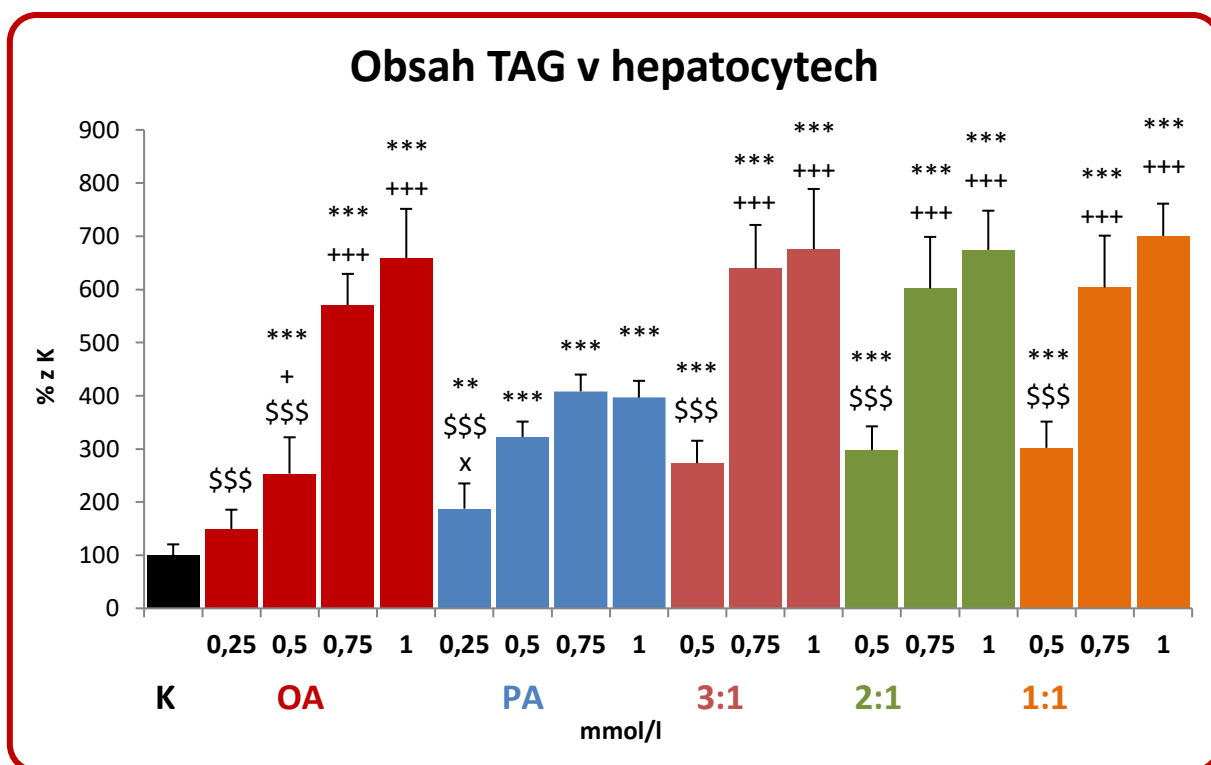
K

0,75 mM OA



**Obrázek č. 17** dokumentuje intracelulární uložení tukových kapének u hepatocytů s 0,75mM OA. Uvnitř hepatocytů vidíme několik menších lipidových vakuol, které nijak neutiskují jádra. Pro naše účely test sloužil především k potvrzení steatózy. Mezi OA a PA nebyly patrné větší rozdíly, proto pro ilustraci uvádím pouze OA.

**Graf č. 6 – Obsah TAG v hepatocytech hodnocený 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; \$\$\$ 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 ve Williams' E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin

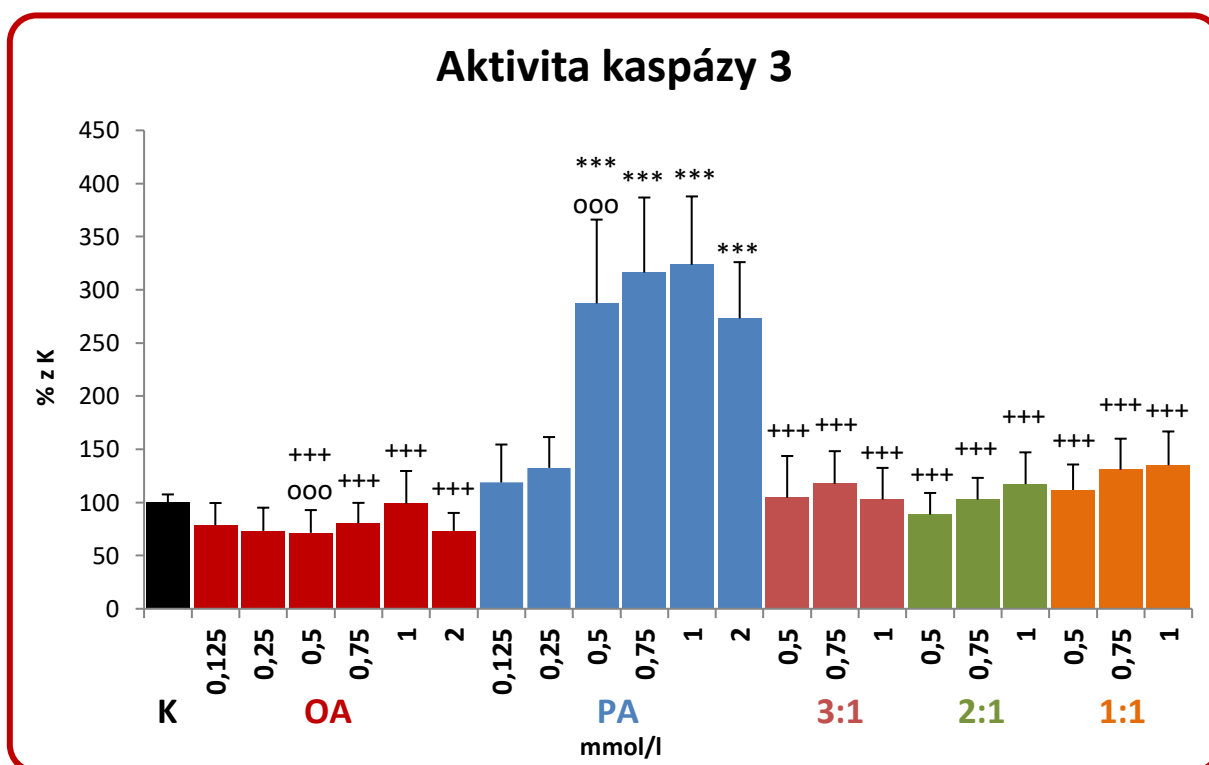
OA; PA; 3:1; 2:1 a 1:1: hepatocyty 24 hod. kultivované v médiu s obsahem příslušné koncentrace mastných kyselin v mmol/l, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7)

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

V grafu č. 6 je hodnocen obsah TAG v hepatocytech. Významné zvýšení obsahu TAG jsme zaznamenali po kultivaci hepatocytů s kyselinou olejovou od koncentrace 0,5 mmol/l ( $p < 0,001$ ) a s kyselinou palmitovou od koncentrace 0,25 mmol/l ( $p < 0,01$ ). U buněk inkubovaných s 0,5 mM olejovou kyselinou byl nalezen signifikantně nižší obsah TAG než u hepatocytů kultivovaných s 0,5 mM palmitovou kyselinou ( $p < 0,05$ ). Mezi obsahem TAG u všech kombinací o koncentraci 0,5 mmol/l a 0,5 mM PA nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Signifikantně nejnižší obsah TAG u skupin o celkové koncentraci mastných kyselin 0,75 a 1 mmol/l byl nalezen u palmitové kyseliny ( $p < 0,001$ ), zatímco mezi skupinami OA, 3:1, 2:1 a 1:1 nebyl nalezen rozdíl. Kultivace hepatocytů s mastnými kyselinami o celkové koncentraci 0,75 a 1 mmol/l měla za následek vyšší akumulaci TAG než u celkových koncentrací 0,25 a 0,5 mmol/l ( $p < 0,001$ ). Jedinou výjimkou byla palmitová kyselina, kde mezi obsahem TAG po 0,5 a 0,75 či 1

mM PA nebyl nalezen signifikantní rozdíl. 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.

**Graf č. 7 – Aktivita kaspázy 3 hodnocená 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

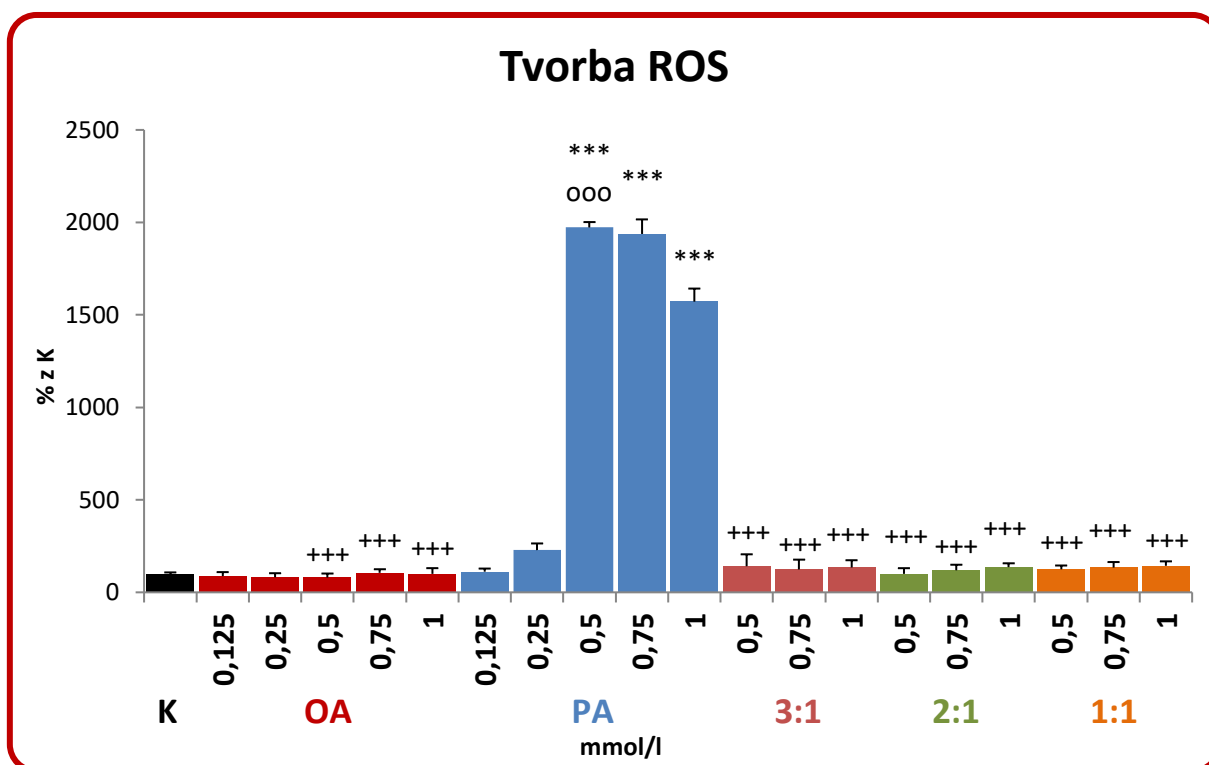
K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované ve Williams' E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin

OA; PA; 3:1; 2:1 a 1:1: hepatocyty 24 hod. kultivované v médiu s obsahem příslušné koncentrace mastných kyselin v mmol/l, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7)

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

Z grafu č. 7 je patrné, že aktivita kaspázy 3 se signifikantně zvyšovala pouze po inkubaci hepatocytů s kyselinou palmitovou o koncentraci 0,5 mmol/l a vyšší ( $p < 0,001$ ), zatímco po kultivaci buněk s žádnou testovanou koncentrací olejové kyseliny či kombinacemi OA:PA nedošlo ke zvýšení aktivity kaspázy 3. Po 0,5 mM palmitové kyselině byla zaznamenána signifikantně vyšší ( $p < 0,001$ ) aktivita kaspázy 3, než po inkubaci hepatocytů s kombinací OA:PA 1:1 o dvojnásobné celkové koncentraci mastných kyselin.

**Graf č. 8 – Tvorba ROS hodnocená 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

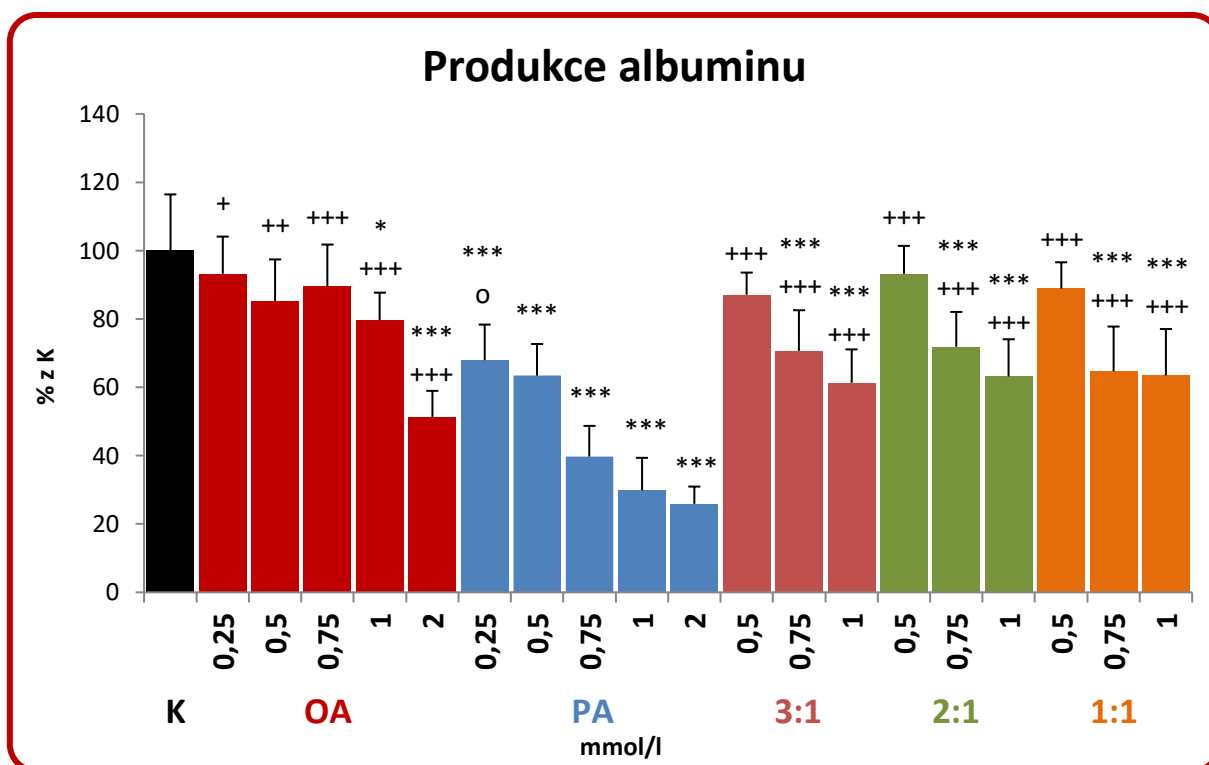
K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované ve Williams´ E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin

OA; PA; 3:1; 2:1 a 1:1: hepatocyty 24 hod. kultivované v médiu s obsahem příslušné koncentrace mastných kyselin v mmol/l, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7)

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

K signifikantně zvýšené tvorbě ROS došlo pouze po inkubaci hepatocytů s kyselinou palmitovou o koncentraci 0,5 mmol/l a vyšší (p<0,001). Po kultivaci buněk s kyselinou olejovou ani s kombinacemi OA:PA nedošlo ke zvýšené tvorbě ROS. 0,5 mM kyselina palmitová způsobila signifikantně vyšší (p<0,001) produkci ROS než kombinace OA:PA 1:1 o dvojnásobné celkové koncentraci mastných kyselin (graf č. 8).

**Graf č. 9 -** Produkce albuminu hodnocená 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

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované ve Williams´ E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin

OA; PA; 3:1; 2:1 a 1:1: hepatocyty 24 hod. kultivované v médiu s obsahem příslušné koncentrace mastných kyselin v mmol/l, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7)

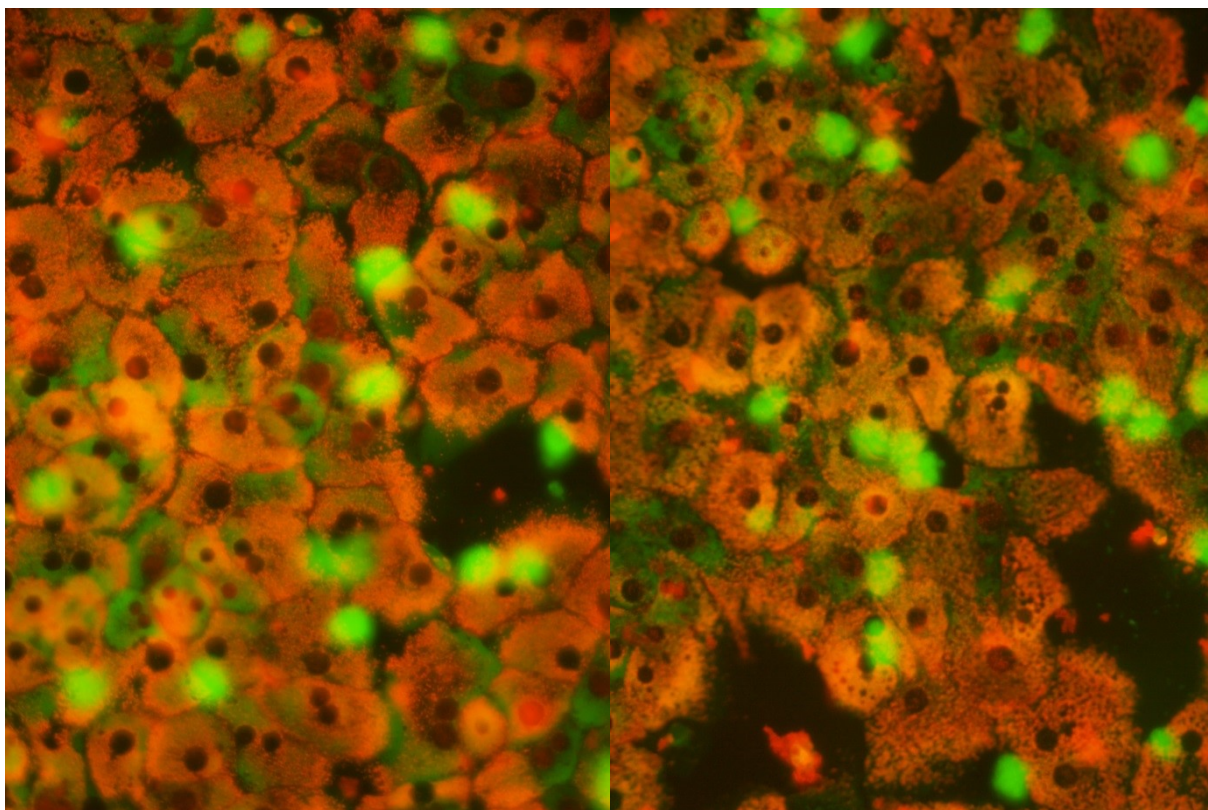
\*\*\*: (p<0,001); \*\*: (p<0,01); \*: (p<0,05); n≥6

Produkce albuminu signifikantně klesala u hepatocytů kultivovaných se všemi testovanými koncentracemi palmitové kyseliny (p<0,001), zatímco u hepatocytů inkubovaných s kyselinou olejovou byl zaznamenán signifikantní pokles produkce albuminu u koncentrací 1 (p<0,05) a 2 (p<0,001) mmol/l. U kombinací OA:PA 3:1, 2:1 a 1:1 významně klesala tvorba albuminu u 0,75 a 1 mM celkových koncentrací mastných kyselin (p<0,001). Po 0,25 mM palmitové kyselině byla nalezena signifikantně nižší (p<0,05) tvorba albuminu, než po kombinaci OA:PA 1:1 o dvojnásobné celkové koncentraci mastných kyselin (graf č. 9).

Obrázek č. 18 – Vizualizace membránového potenciálu mitochondrií pomocí JC-1. Zvětšení objektivu 40x.

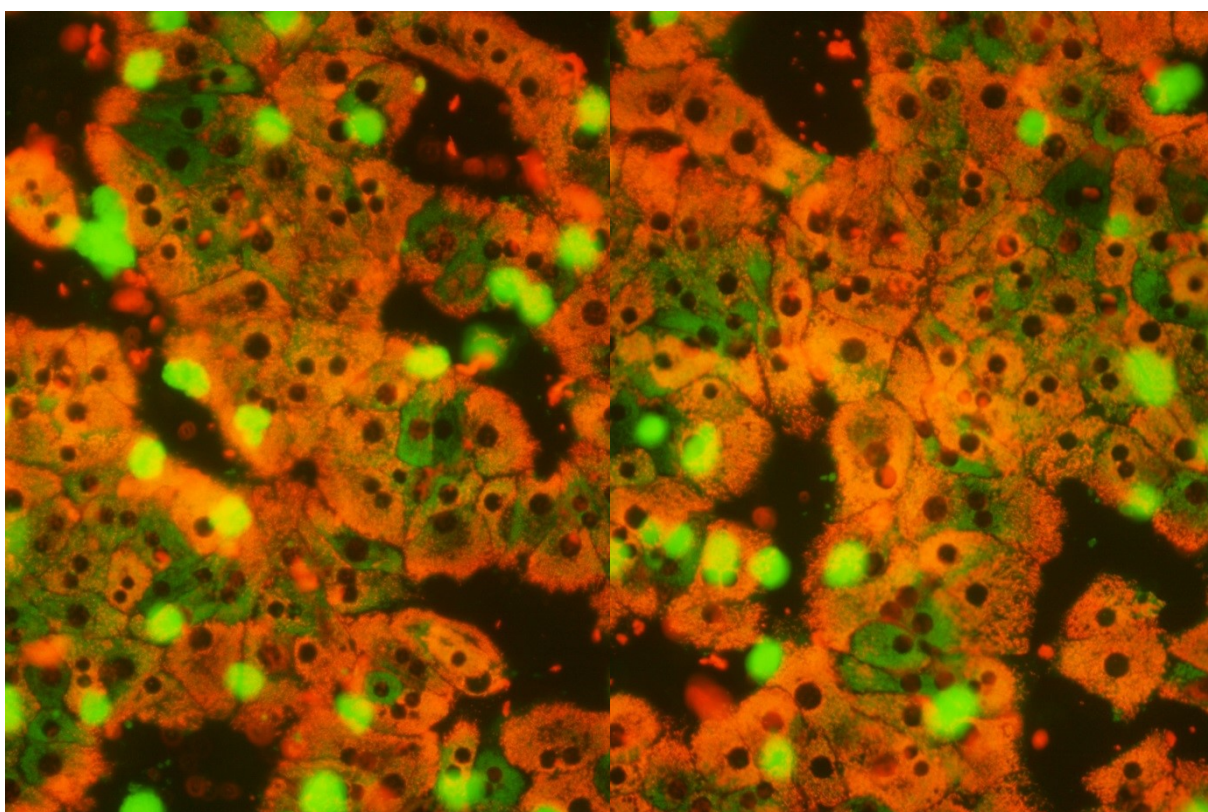
K

0,75 mM OA



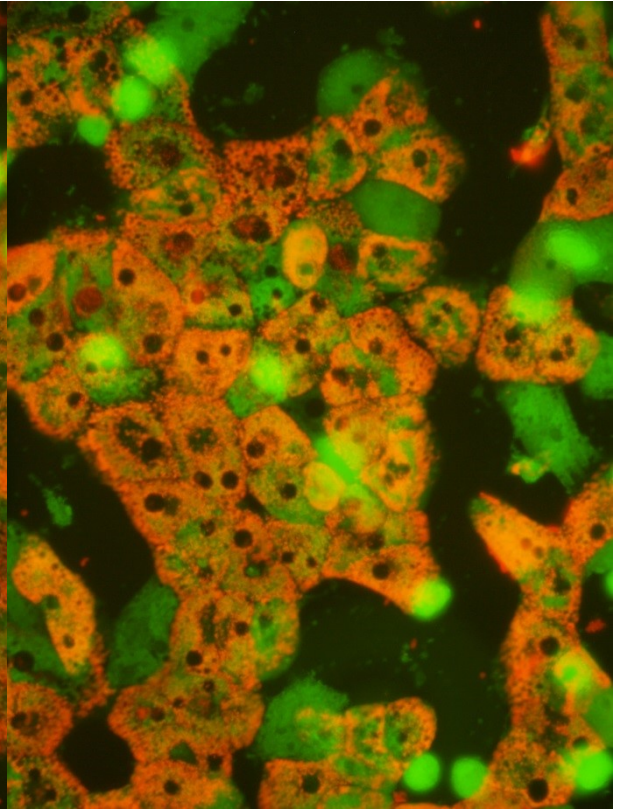
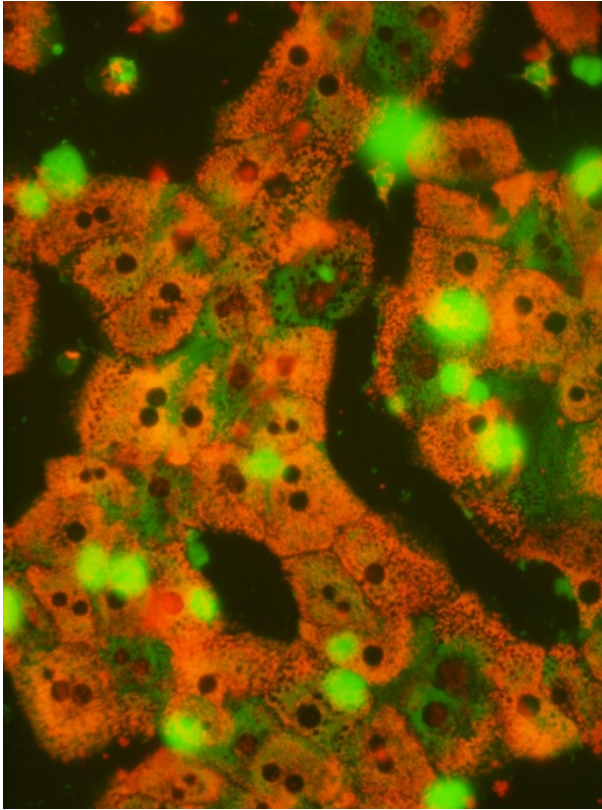
0,75 mM 3:1

0,75 mM 2:1



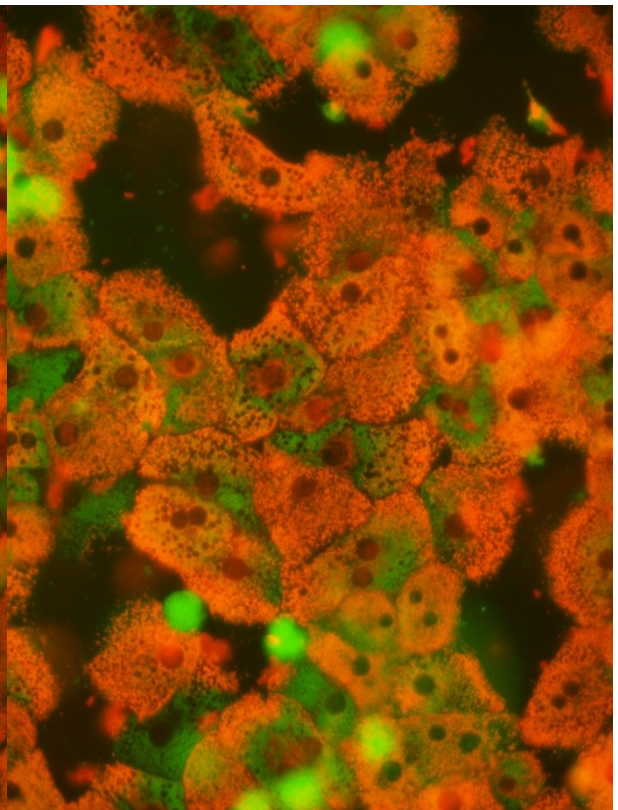
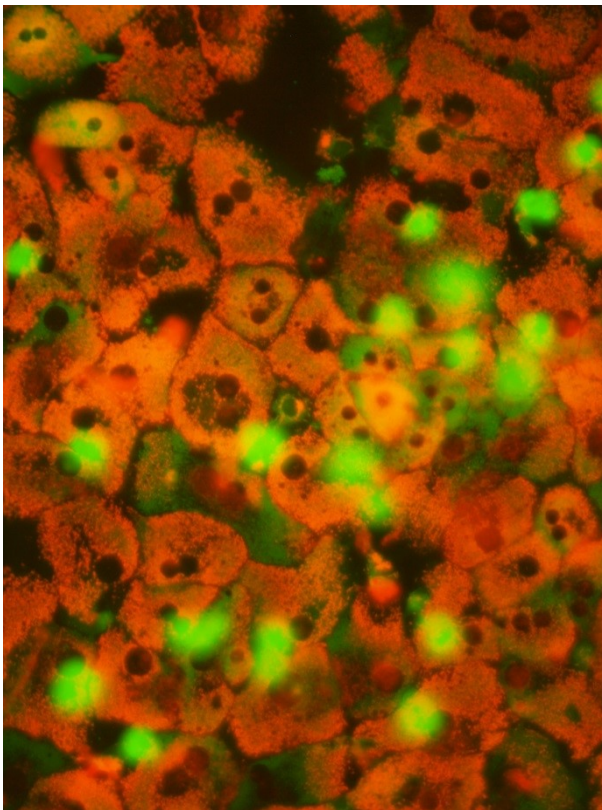
0,75 mM 1:1

0,75 mM PA



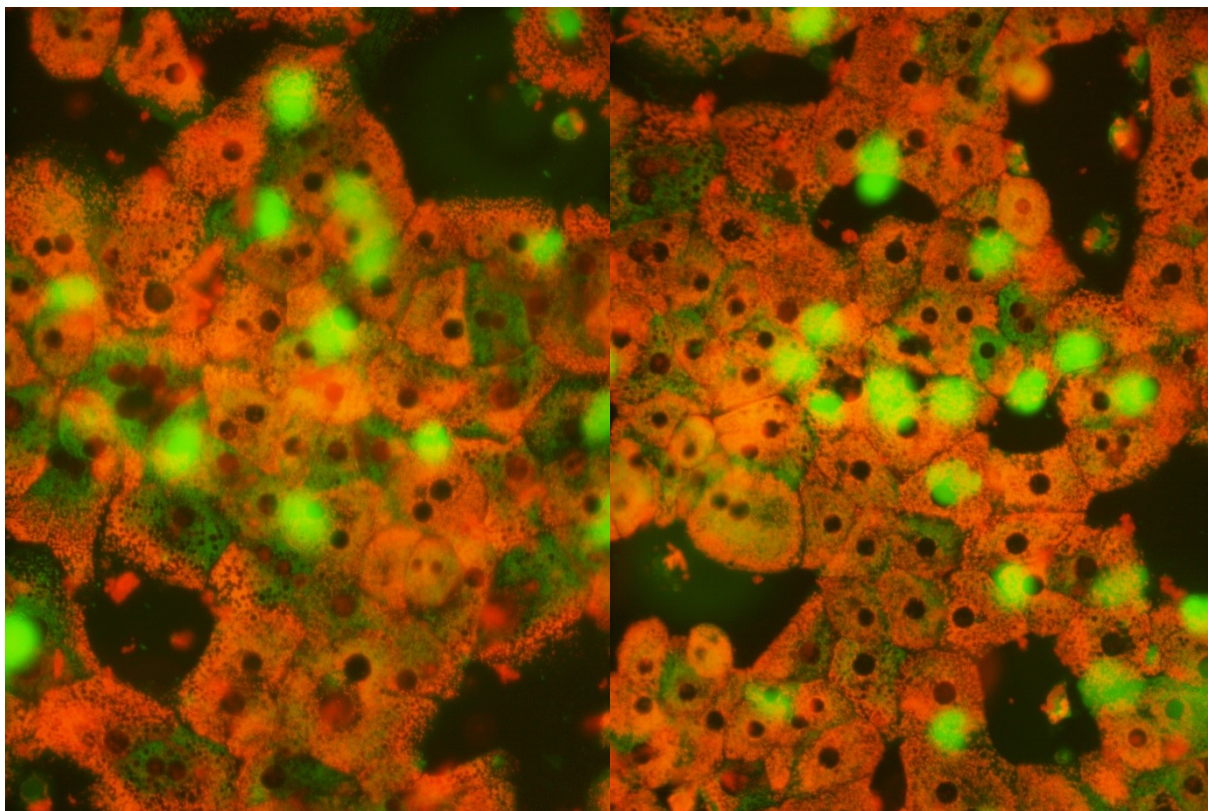
K

1 mM OA



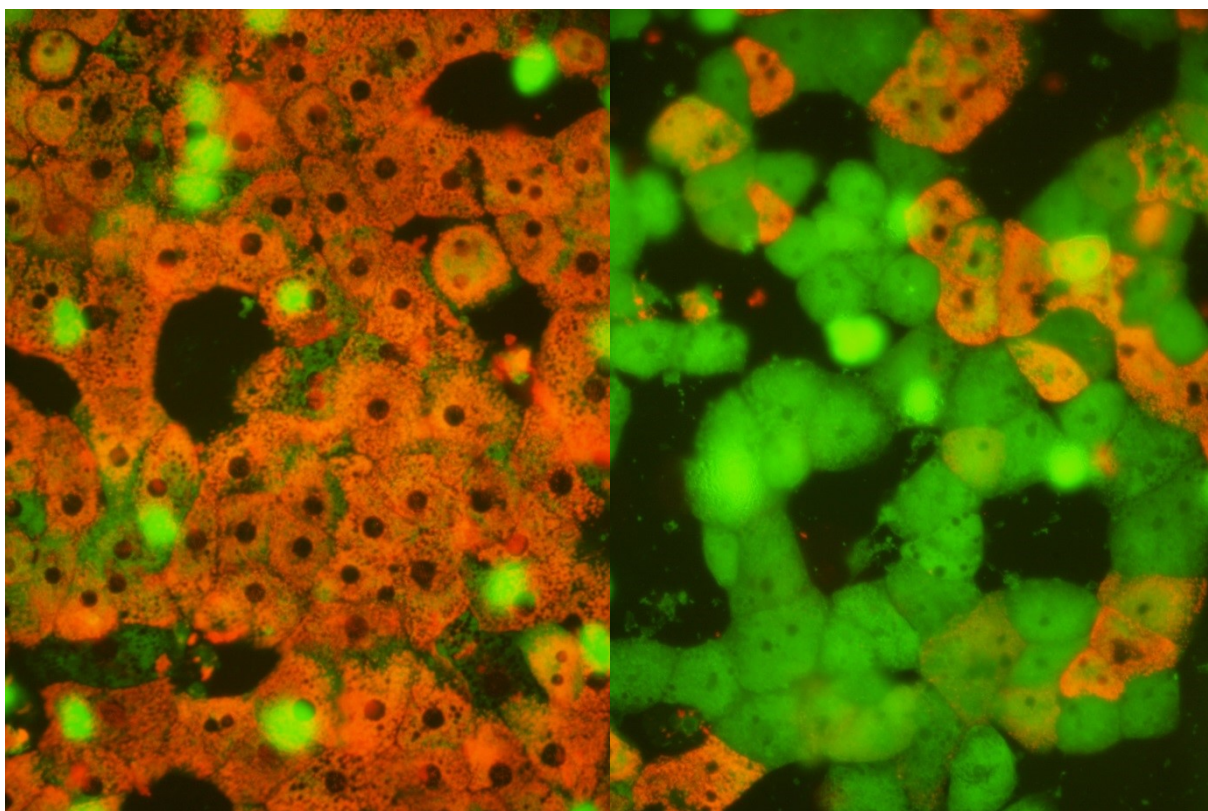
1 mM 3:1

1 mM 2:1



1 mM 1:1

1 mM PA

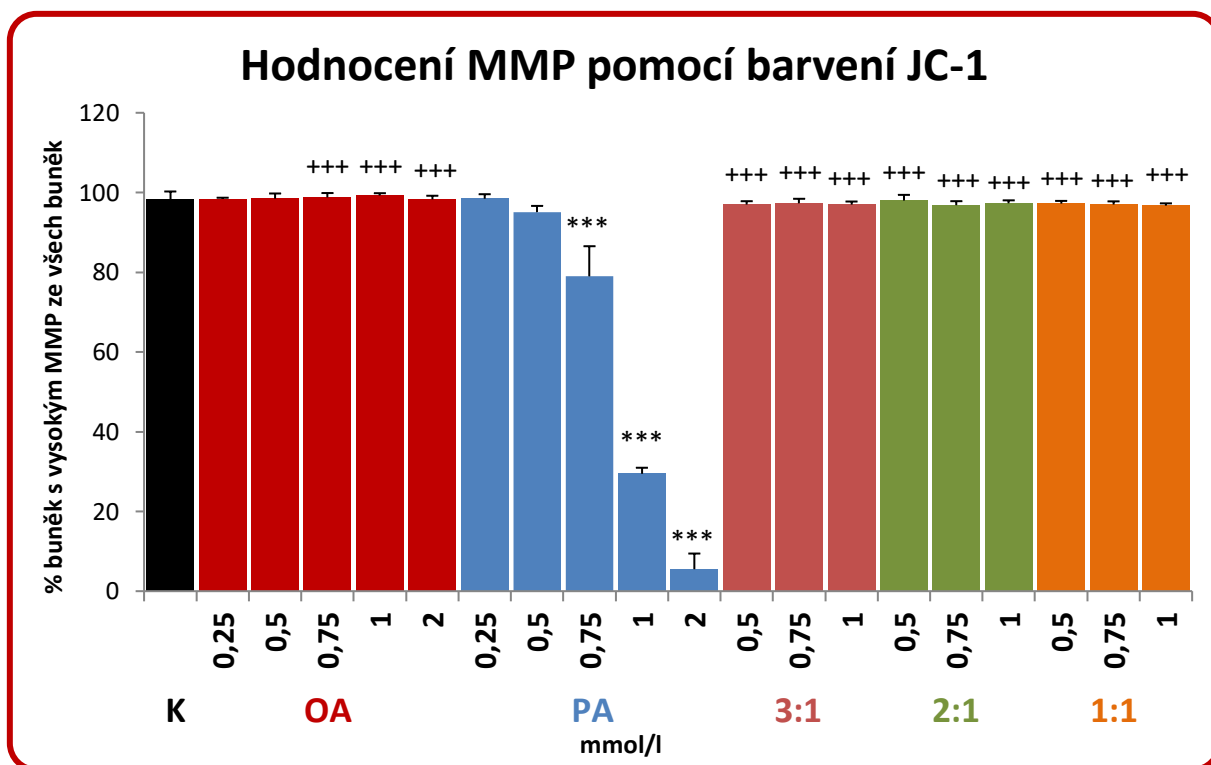


Obrázek č. 18 znázorňuje mitochondriální membránový potenciál vizualizovaný pomocí fluorescenční barvy JC-1. Do koncentrace mastných kyselin 0,5 mmol/l nebyly mezi jednotlivými



kulturami patrný žádné rozdíly, proto zde nejsou uvedeny. U hepatocytů kultivovaných s 0,75 mM PA pozorujeme u části hepatocytů pokles membránového potenciálu mitochondrií (obarveno sytě zeleně), zatímco u OA a všech testovaných kombinací OA:PA zůstává drtivá většina hepatocytů s energizovanými mitochondriemi (obarveno sytě oranžově). Po inkubaci hepatocytů s 1 mM kyselinou olejovou a kombinacemi OA:PA je zachován vysoký mitochondriální membránový potenciál, zatímco u 1 mM palmitové kyseliny pozorujeme výrazný pokles MMP téměř u všech hepatocytů v zorném poli.

**Graf č. 10** – Hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) hepatocytů pomocí barvení JC-1 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

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. Kultivované ve Williams' E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin

OA; PA; 3:1; 2:1 a 1:1: hepatocyty 24 hod. kultivované v médiu s obsahem příslušné koncentrace mastných kyselin v mmol/l, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7)

\*\*\*: (p<0,001); \*\*: (p<0,01); \*: (p<0,05); n=5

Graf č. 10 objektivizuje předchozí morfologické výsledky. Pokles MMP jsme zaznamenali pouze u hepatocytů kultivovaných s palmitovou kyselinou, a to od koncentrace PA 0,75 mmol/l (p<0,001). Po žádné z testovaných koncentrací kyseliny olejové ani žádné z testovaných kombinacích OA:PA nebyl pozorován pokles membránového potenciálu mitochondrií.

### 5.3. 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 24 hod. 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 pokusu. V intervalu koncentrací 1,25 – 10  $\mu\text{mol/l}$  EGCG nedošlo ke snížení WST-1 testu, zvýšení LDH leakage ani ke tvorbě MDA (výsledky nejsou součástí této práce).

#### 5.3.1. Současná kultivace hepatocytů s EGCG a 20 mM D-GalN po dobu 24 hodin

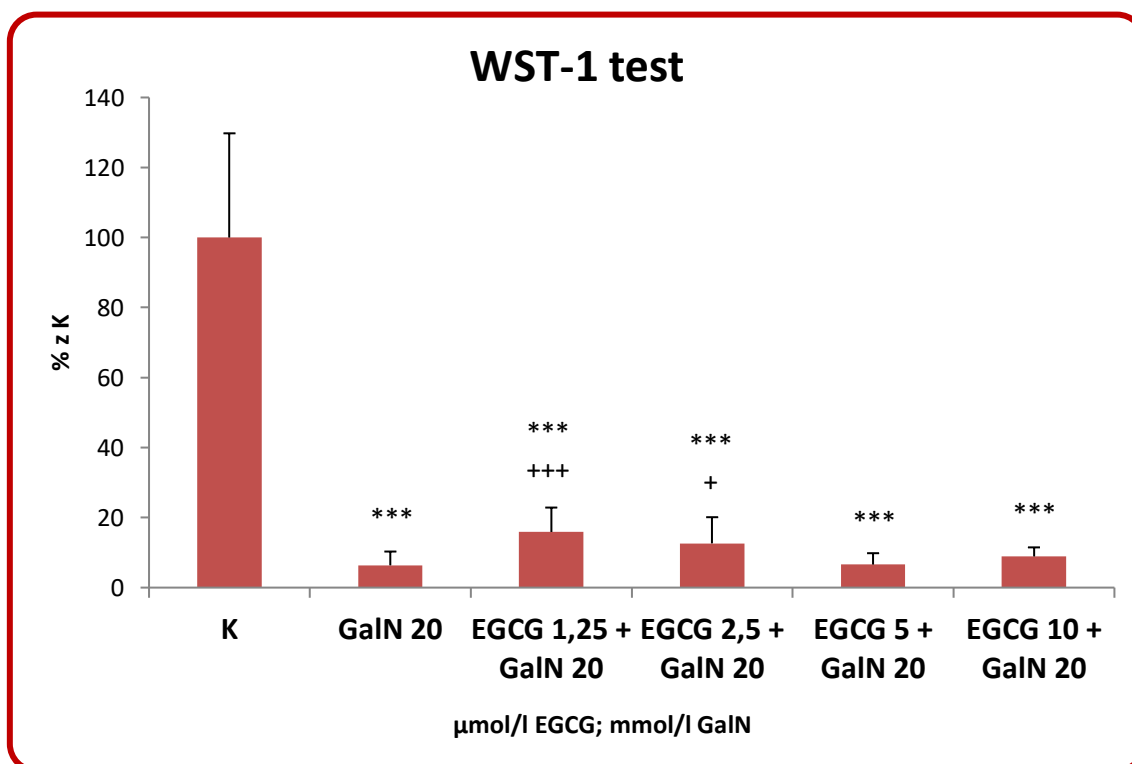
Byly připraveny kultury v *monolayeru* podle návodu v sekci „Metodiky“. Po přichycení hepatocytů na kolagen kultivačních destiček bylo k buňkám přidáno Williams' E médium s obsahem EGCG o koncentraci 1,25; 2,5; 5 a 10  $\mu\text{mol/l}$  a D-galaktosaminu o koncentraci 20 mmol/l. Jamky bez obsahu EGCG i D-GalN sloužily jako intaktní kontrola, jamky s obsahem samotného D-GalN představovaly kontrolu toxického poškození. Buňky byly 24 hod. 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. Výsledky jsou z důvodu dat získaných z min. 3 izolací hepatocytů vyjádřeny jako % z intaktních kontrol.

Hodnocena byla:

- Aktivita buněčných dehydrogenáz pomocí WST-1 testu
- Viabilita buněk pomocí LDH leakage
- Míra lipoperoxidace zhodnocením hladiny MDA

**Graf č. 11** - Aktivita buněčných dehydrogenáz (WST-1 test) hodnocená po 24hodinové kultivaci hepatocytů s D-GalN o koncentraci 20 mmol/l a EGCG o koncentraci 1,25 – 10  $\mu$ mol/l.



\*\*\* vs K; +++ vs GalN 20

**K:** kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované pouze ve Williams' E médiu se suplementy

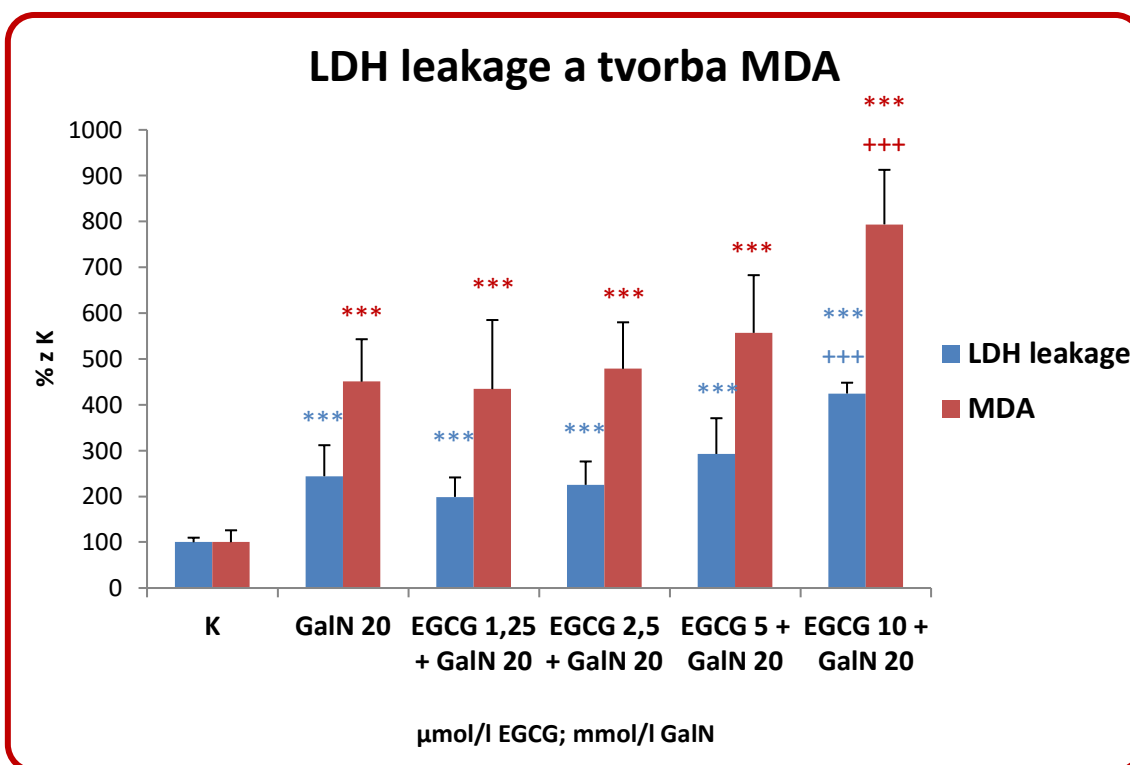
**GalN 20:** hepatocyty 24 hod. kultivované s D-GalN o koncentraci 20 mmol/l

**EGCG 1,25 + GalN 20; EGCG 2,5 + GalN 20; EGCG 5 + GalN 20; EGCG 10 + GalN 20:** hepatocyty 24 hodin kultivované v médiu s obsahem 20 mM D-GalN a přídávkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu$ mol/l

\*\*\*: ( $p < 0,001$ ); \*\*: ( $p < 0,01$ ); \*: ( $p < 0,05$ );  $n \geq 12$

Z grafu č. 11 je patrný signifikantní pokles aktivity buněčných dehydrogenáz ve všech skupinách, v nichž byl obsažen 20 mM D-galaktosamin ( $p < 0,001$ ). Přídávkem 1,25 ( $p < 0,001$ ) a 2,5  $\mu$ M EGCG ( $p < 0,05$ ) do směsi ke galaktosaminu se WST-1 test oproti toxické kontrole signifikantně zvýšil.

**Graf č. 12** - LDH leakage a produkce MDA hodnocené po 24hodinové kultivaci potkaních hepatocytů s 20 mM D-galaktosaminem a EGCG o koncentraci 1,25 – 10  $\mu\text{mol/l}$ .



\*\*\* vs K pro LDH leakage; +++ vs GalN 20 pro LDH leakage; \*\*\* vs K pro MDA; +++ vs GalN 20 pro MDA

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované pouze ve Williams' E médiu se suplementy

GalN 20: hepatocyty 24 hod. kultivované s D-GalN o koncentraci 20 mmol/l

EGCG 1,25 + GalN 20; EGCG 2,5 + GalN 20; EGCG 5 + GalN 20; EGCG 10 + GalN 20: hepatocyty 24 hodin kultivované v médiu s obsahem 20 mM D-GalN a přídávkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

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

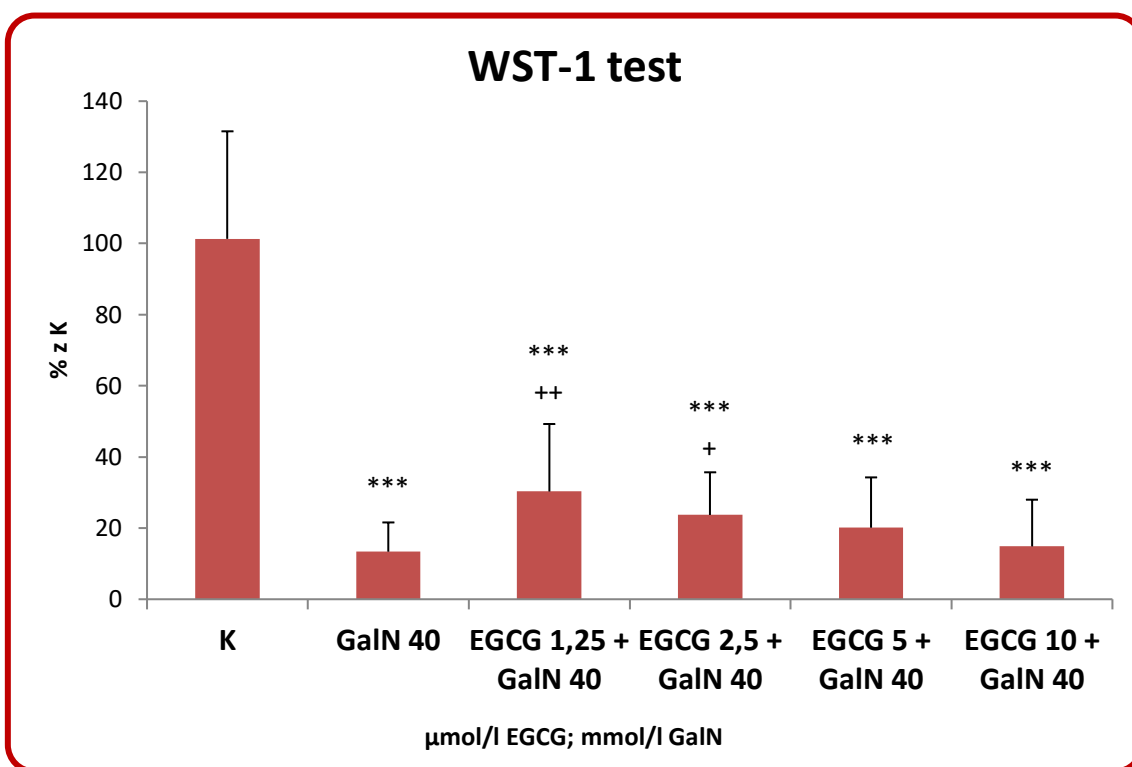
LDH leakage i tvorba MDA signifikantně vzrostly po přidavku samotného 20 mM D-galaktosaminu (kontrola toxického poškození), tak i po užití směsi 20 mM D-GalN a EGCG ( $p < 0,001$ ). Po přidavku žádné koncentrace EGCG do média ke D-GalN nebyl zaznamenán pokles LDH leakage či pokles formace malondialdehydu, naopak ve směsi galaktosaminu a 10  $\mu\text{M}$  EGCG jsme pozorovali vyšší nárůst LDH leakage a vyšší míru lipoperoxidace, než vykazoval samotný D-galaktosamin ( $p < 0,001$ ) (graf č. 12). Vzhledem k absenci protektivního účinku EGCG na tyto parametry jsme již další měření v tomto uspořádání experimentu neprováděli.

### 5.3.2. Kultivace hepatocytů s EGCG 24 hodin a následná 24-hod. kultivace s EGCG a 40 mM D-GalN

Byly zhotoveny kultury v *monolayeru* podle návodu v sekci „Metodiky“. Následně bylo k hepatocytům přidáno Williams' E médium s obsahem EGCG o koncentraci 1,25; 2,5; 5 a 10  $\mu\text{mol/l}$  a následovala 24hodinová kultivace v prostředí 37 °C a 5 %  $\text{CO}_2$ . Poté bylo médium vyměněno za čisté Williams' E médium se suplementy s obsahem EGCG o totožných koncentracích s přídatkem 40 mM D-galaktosaminu. Následovala další 24hodinová inkubace (37 °C a 5 %  $\text{CO}_2$ ). Jamky kultivované po oba dny pouze s médiem bez obsahu EGCG i D-GalN sloužily jako kontrola, jamky s obsahem média v prvních 24 hodinách a s obsahem samotného D-GalN ve druhých 24 hodinách představovaly kontrolu toxického poškození. Poté bylo médium sebráno na biochemická stanovení a buňky zpracovány na zhodnocení intracelulárních analytů. Výsledky jsou z důvodu dat získaných z min. 3 izolací hepatocytů vyjádřeny jako % z intaktních kontrol. Hodnocena byla:

- a) Aktivita buněčných dehydrogenáz pomocí WST-1 testu
- b) Viabilita buněk pomocí LDH leakage
- c) Míra lipoperoxidace zhodnocením hladiny MDA
- d) Antioxidační stav stanovením celkového glutathionu
- e) Schopnost produkce albuminu
- f) Schopnost produkce urey

**Graf č. 13** - Aktivita buněčných dehydrogenáz (WST-1 test) 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 přidavkem 40 mM D-GalN.



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

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

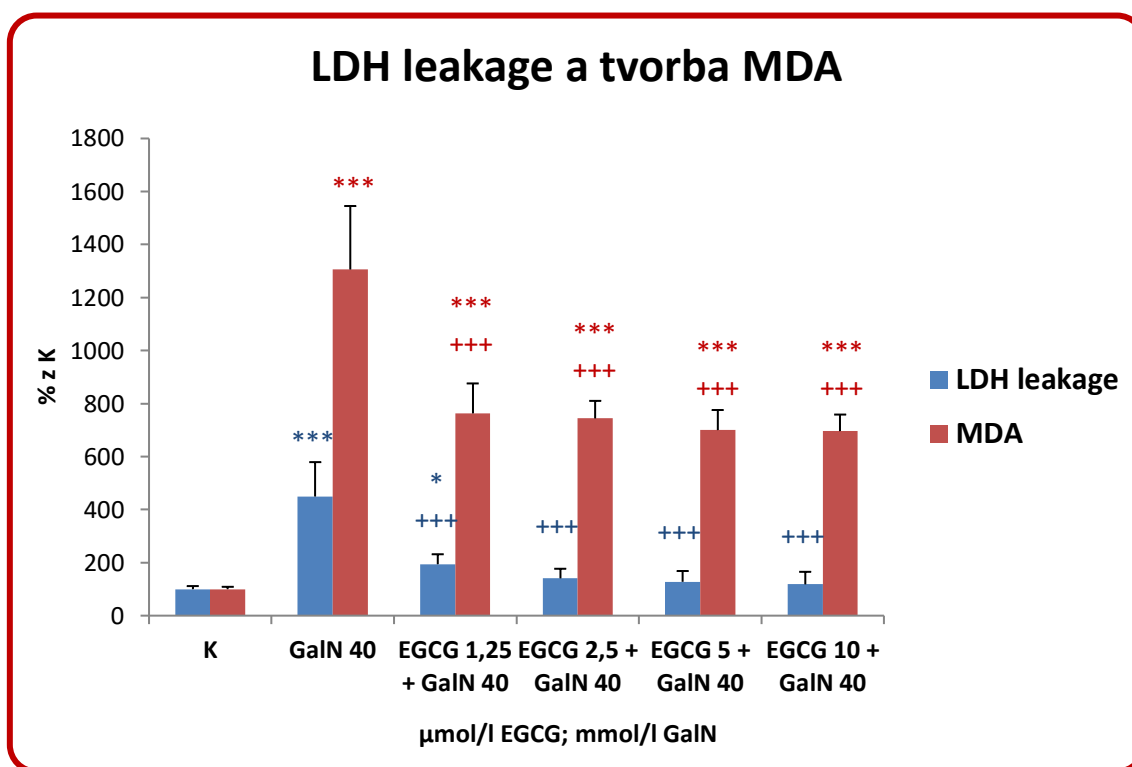
**GalN 40:** hepatocyty 24 hod. kultivované s Williams' E médiem a dalších 24 hodin s 40 mM D-GalN

**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

\*\*\*: ( $p < 0,001$ ); \*\*: ( $p < 0,01$ ); \*: ( $p < 0,05$ );  $n \geq 24$

Ve všech skupinách, v kterých byl obsažen 40 mM D-galaktosamin, došlo oproti intaktní kontrole k významnému poklesu aktivity buněčných dehydrogenáz ( $p < 0,001$ ). Přídavek 1,25 a 2,5  $\mu\text{M}$  koncentrace EGCG do směsi ke galaktosaminu měl za následek signifikantní zvýšení hodnoty aktivity buněčných dehydrogenáz oproti samotnému D-GalN (EGCG 1,25 + D-GalN 40 ( $p < 0,01$ ); EGCG 2,5 + D-GalN 40 ( $p < 0,05$ )) (graf č. 13).

**Graf č. 14** - LDH leakage a produkce MDA hodnocené po 24hodinové preinkubaci hepatocytů s EGCG o koncentraci 1,25 – 10  $\mu\text{mol/l}$  a následně 24hodinové kultivaci hepatocytů s příslušnou koncentrací EGCG a s přidavkem 40 mM D-GalN.



\*\*\* vs K pro LDH leakage; +++ vs GalN 40 pro LDH leakage; \*\*\* vs K pro MDA; +++ vs GalN 40 pro MDA

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

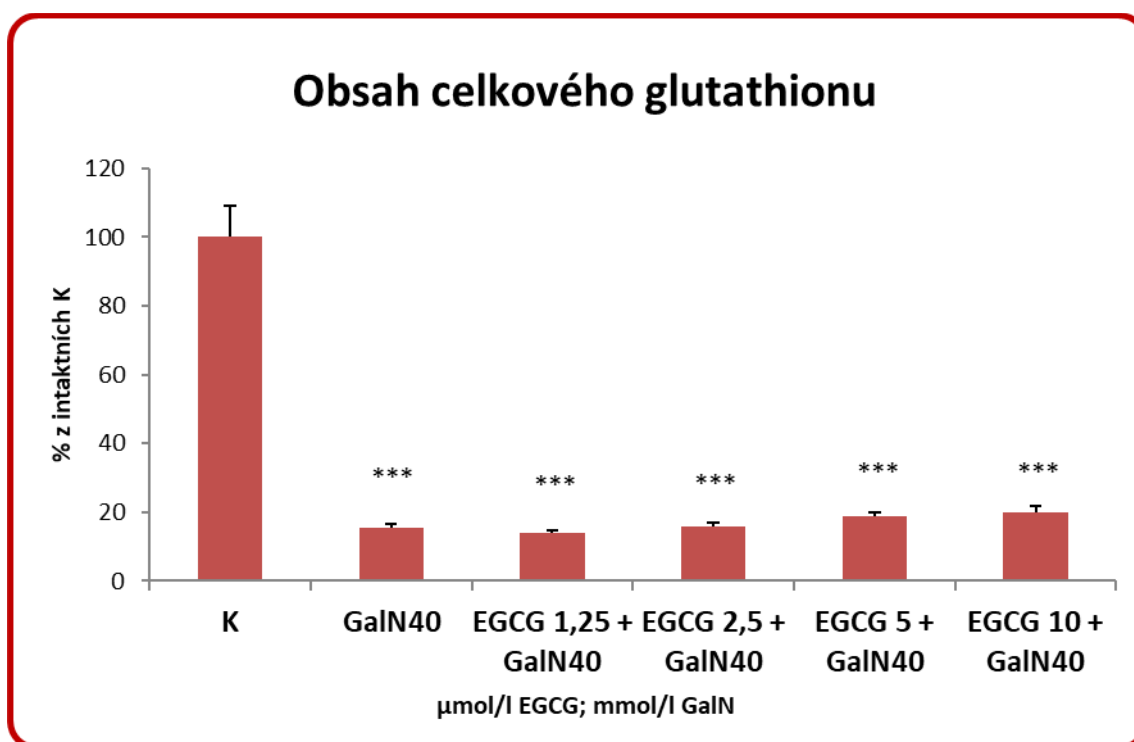
GalN 40: hepatocyty 24 hod. kultivované s Williams' E médiem a dalších 24 hod. s 40 mM D-GalN

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

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

LDH leakage i tvorba MDA signifikantně vzrostly po přidavku samotného 40 mM D-galaktosaminu (kontrola toxického poškození) ( $p < 0,001$ ). Po přidavku všech testovaných koncentrací EGCG do média ke D-GalN byl zaznamenán pokles LDH leakage i snížení tvorby malondialdehydu ( $p < 0,001$ ). 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 (graf č. 14).

**Graf č. 15** - Obsah celkového glutathionu v hepatocytech po jejich 24hodinové preinkubaci s EGCG o koncentraci 1,25 – 10  $\mu\text{mol/l}$  a následné 24hodinové kultivaci s příslušnou koncentrací EGCG a s přidavkem 40 mM D-GalN.



\*\*\* vs K

**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 hodin s 40 mM D-GalN

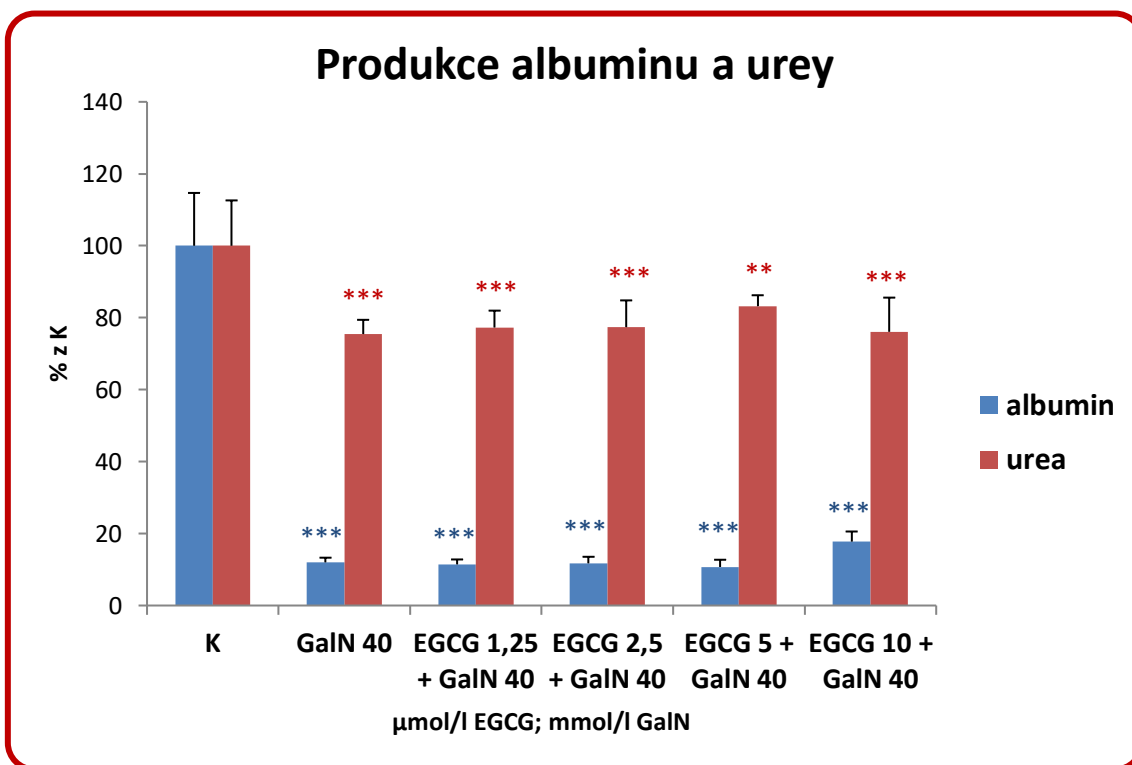
**EGCG 1,25 + GalN 40; EGCG 2,5 + GalN 40; EGCG 5 + GalN 40; EGCG 10 + GalN 40:** hepatocyty 24 hod. preinkubovány s uvedenou koncentrací EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  a dalších 24 hod. kultivované v médiu s obsahem příslušné koncentrace EGCG a 40 mM D-GalN

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

Obsah celkového glutathionu signifikantně ( $p < 0,001$ ) klesal ve všech hepatocytech kultivovaných s obsahem D-galaktosaminu v médiu. Mezi skupinami s obsahem D-GalN 40 a EGCG a samotným D-GalN 40 nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly (graf č. 15).



**Graf č. 16 -** Produkce albuminu a urey hodnocené 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 přidavkem 40 mM D-GalN.



\*\*\* vs K pro albumin; \*\*\* vs K pro ureu

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 hodin 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

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

Ve všech skupinách s přidavkem D-GalN v médiu jsme zaznamenali signifikantní pokles produkce albuminu a urey hepatocyty ( $p < 0,001$ ). Mezi skupinami s obsahem D-GalN 40 a EGCG a samotným D-GalN 40 nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly (graf č. 16).

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

Byly připraveny kultury v *monolayeru* podle návodu v sekci „Metodiky“. Následně bylo k hepatocytům přidáno Williams' E médium s obsahem olejové kyseliny (OA) či kombinace OA:PA v poměru 3:1 o koncentraci 0,75 mmol/l. Takto zvolené mastné kyseliny indukují steatózu bez výraznějšího poškození hepatocytů. Kontrolní nesteatotickou skupinu představovaly jamky s Williams' E médiem s obsahem BSA o odpovídající koncentraci 0,9375 % bez obsahu mastných kyselin (tabulka č. 7).

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-galaktosaminu 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. Výsledky jsou z důvodu porovnávání dat získaných z min. 3 izolací hepatocytů vyjádřeny jako % z ničím neovlivněné nesteatotické kontroly.

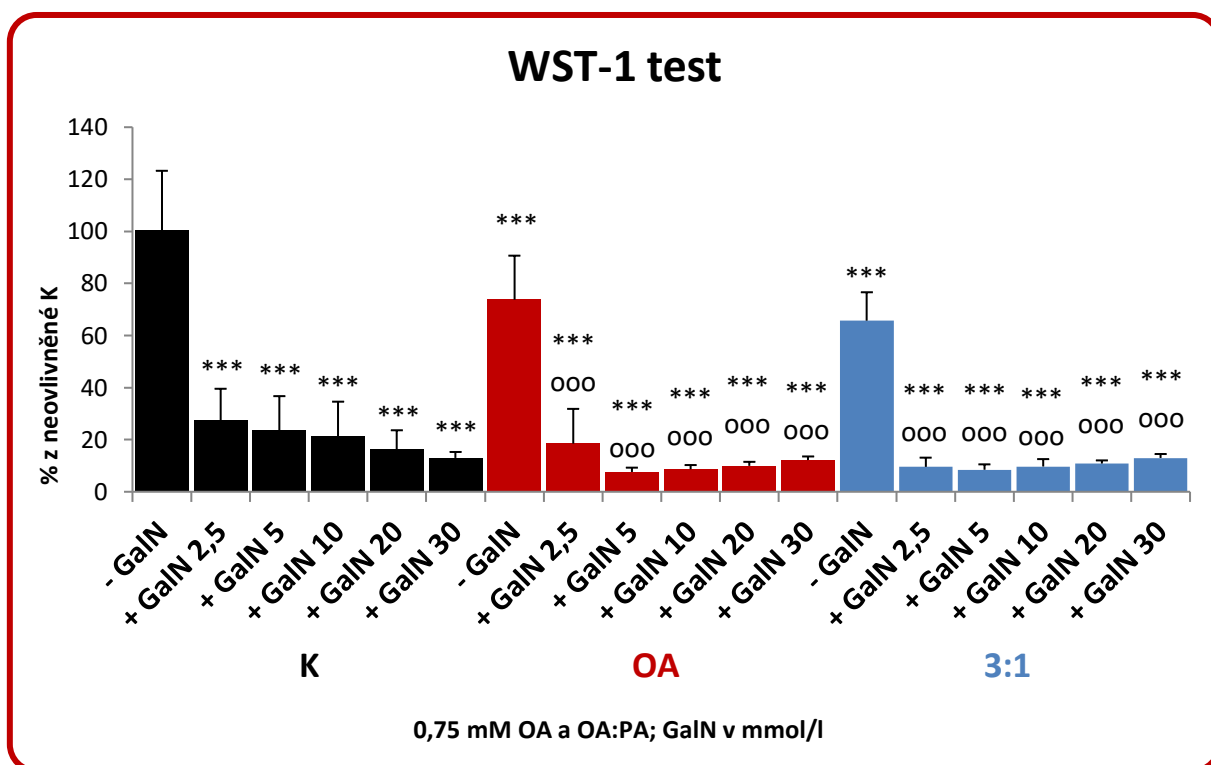
Skupina	Obsah D-GalN	Doba kultivace	
		Prvních 24 hodin	Dalších 24 hodin
K	-GalN	BSA	
	+GalN 2,5 – +GalN 30	BSA	Příslušný obsah GalN
OA	-GalN	0,75 mM OA + BSA	
	+GalN 2,5 – +GalN 30	0,75 mM OA + BSA	Příslušný obsah GalN
OA:PA 3:1	-GalN	0,75 mM OA:PA 3:1 + BSA	
	+GalN 2,5 – +GalN 30	0,75 mM OA:PA 3:1 + BSA	Příslušný obsah GalN

Tabulka č. 8 – uspořádání experimentu

Hodnocena byla:

- Aktivita buněčných dehydrogenáz pomocí WST-1 testu
- Viabilita buněk pomocí LDH leakage
- Aktivita kaspázy 3 k určení míry apoptózy
- Tvorba ROS k detekci oxidačního stresu

**Graf č. 17 –** Hodnocení WST-1 testu steatotických hepatocytů kultivovaných 24 hod. s mastnými kyselinami k navození steatózy *in vitro* a následně 24 hod. s D-GalN o koncentraci 2,5 – 30 mmol/l



\*\*\* vs ničím neovlivněná nesteatotická kontrola (K; - GalN); ooo vs příslušné steatotické hepatocyty neovlivněné D-GalN (samotná OA či samotná OA:PA 3:1)

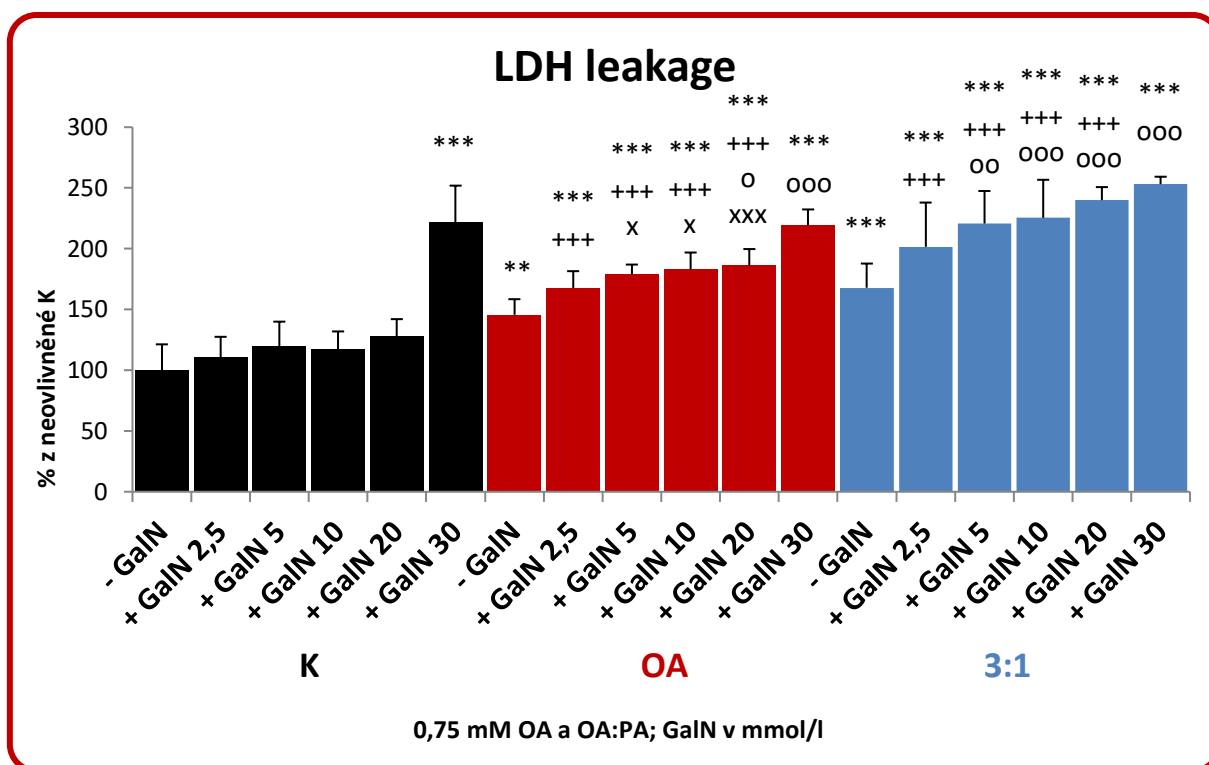
K: kontrolní hepatocyty 24 hodin kultivované ve Williams' E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin a dalších 24 hodin kultivované bez (- GalN) nebo s přídatkem uvedené koncentrace D-GalN v mmol/l

OA; 3:1: hepatocyty 24 hodin kultivované v médiu s obsahem 0,75 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7) a dalších 24 hodin kultivované bez (-GalN) nebo s přídatkem uvedené koncentrace D-GalN v mmol/l

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

Kultivace hepatocytů se samotnou kyselinou olejovou či OA:PA 3:1 měla za následek signifikantní pokles WST-1 testu ( $p < 0,001$ ). Přídavek D-GalN ke steatotickým i nesteatotickým hepatocytům způsobil signifikantní pokles aktivity buněčných dehydrogenáz vůči hepatocytům bez obsahu D-GalN. Mezi steatotickými a nesteatotickými hepatocyty s přídatkem D-GalN nebyl v aktivitě dehydrogenáz nalezen signifikantní rozdíl (graf č. 17).

**Graf č. 18** – LDH leakage steatotických hepatocytů kultivovaných 24 hod. s mastnými kyselinami k navození steatózy *in vitro* a následně 24 hod. s D-GalN o koncentraci 2,5 – 30 mmol/l



\*\*\* vs ničím neovlivněná nesteatotická kontrola (K; - GalN); +++ vs nesteatotické hepatocyty (K) se shodným přidavkem 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 přidavkem D-GalN

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované ve Williams´ E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin a dalších 24 hod. kultivované bez (- GalN) nebo s přidavkem uvedené koncentrace D-GalN v mmol/l

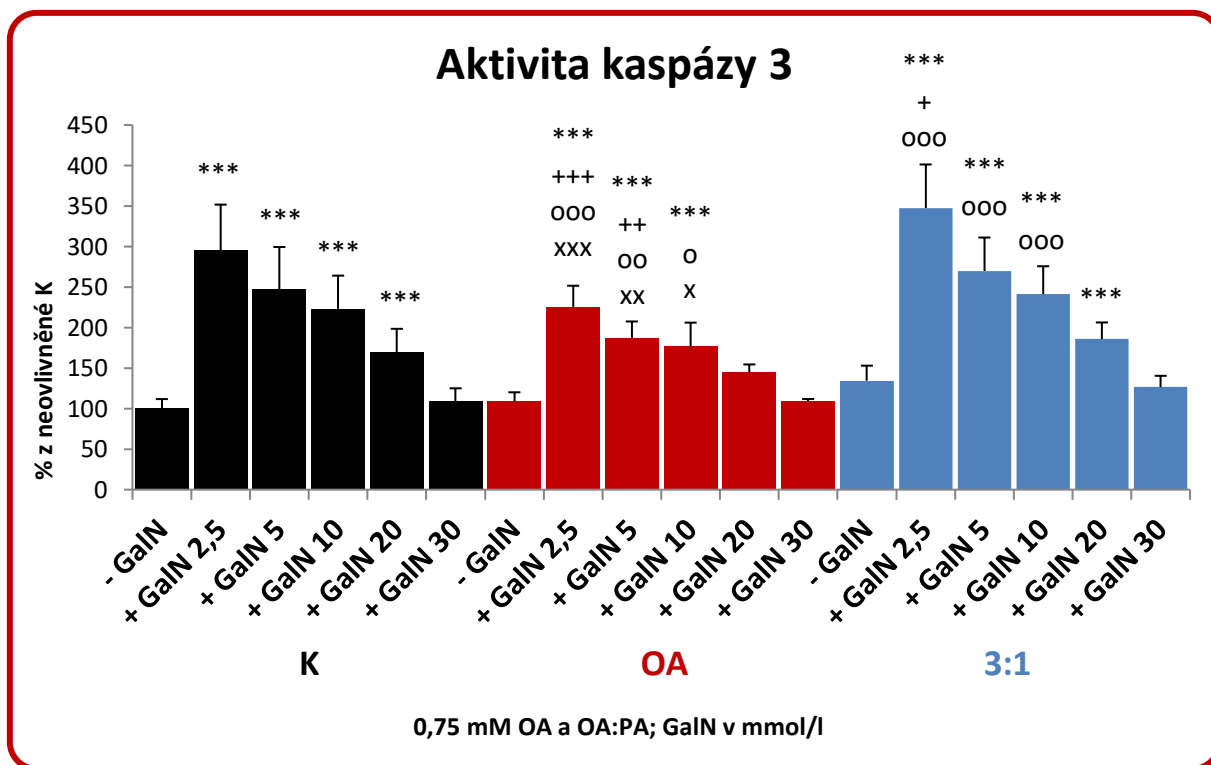
OA; 3:1: hepatocyty 24 hodin kultivované v médiu s obsahem 0,75 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7) a dalších 24 hodin kultivované bez (-GalN) nebo s přidavkem uvedené koncentrace D-GalN v mmol/l

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

Při kultivaci neztukovatělých hepatocytů s D-GalN došlo k signifikantnímu zvýšení LDH leakage po 30 mM D-GalN (p<0,001). U steatotických hepatocytů se intenzita LDH leakage po D-GalN lišila podle mastných kyselin užitých k navození steatózy. U modelu se steatózou navozenou 0,75 mM OA byl nárůst LDH leakage statisticky významný po 20 (p<0,05) a 30 (p<0,001) mM D-GalN, zatímco u modelu kombinujícího OA a PA (0,75 mM 3:1) došlo k signifikantnímu zvýšení po 5 (p<0,01); 10; 20 a 30 mM D-GalN (p<0,001). 2,5; 5; 10 a 20 mM D-GalN navodil u steatotických hepatocytů výraznější LDH leakage než v odpovídajících koncentracích u nesteatotických hepatocytů (p<0,001). 5; 10 (p<0,05) a 20 mM (p<0,001) D-

galaktosaminu vyvolal ve skupině se steatózou navozenou samotnou OA nižší únik LDH do média než u skupin se steatózou indukovanou směsí OA:PA 3:1 (graf č. 18).

**Graf č. 19** – Aktivita kaspázy 3 steatotických hepatocytů kultivovaných 24 hod. s mastnými kyselinami k navození steatózy *in vitro* a následně 24 hod. s D-GalN o koncentraci 2,5 – 30 mmol/l



\*\*\* vs ničím neovlivněná nesteatotická kontrola (K; - GalN); +++ vs nesteatotické hepatocyty (K) se shodným přidavkem 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 přidavkem D-GalN

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované ve Williams' E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin a dalších 24 hod. kultivované bez (- GalN) nebo s přidavkem uvedené koncentrace D-GalN v mmol/l

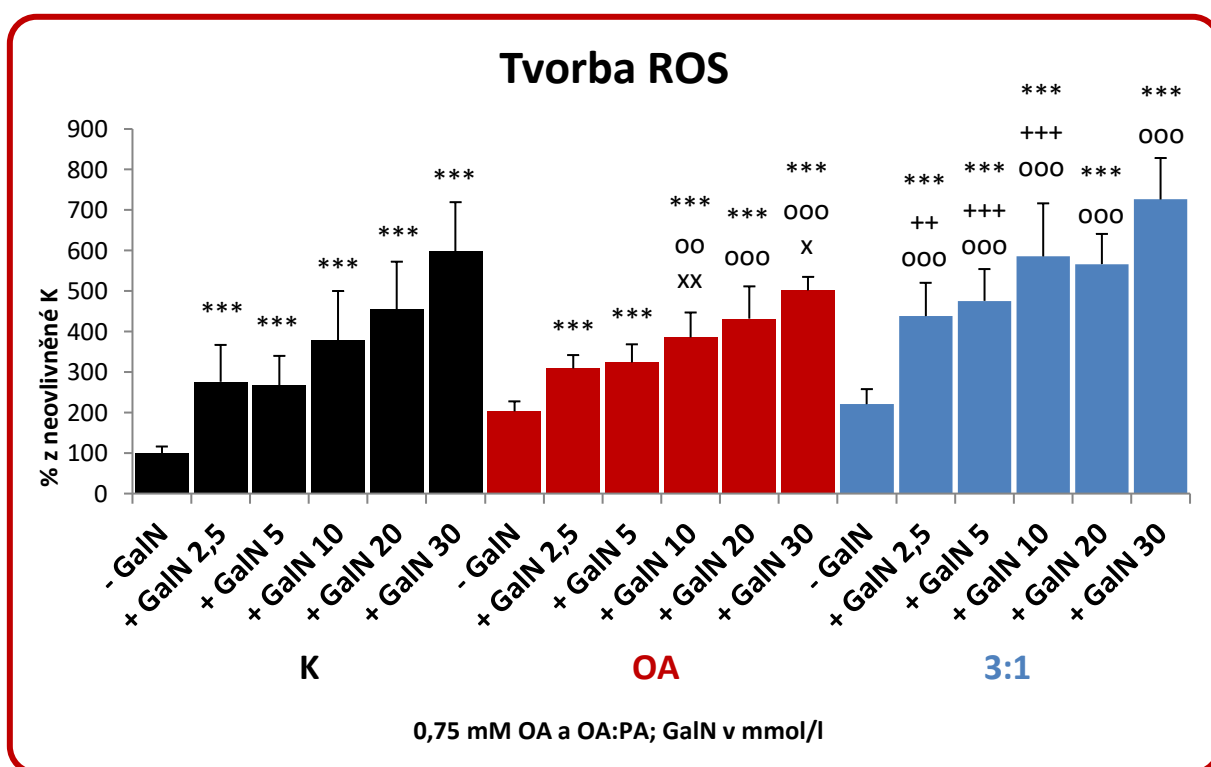
OA; 3:1: hepatocyty 24 hod. kultivované v médiu s obsahem 0,75 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7) a dalších 24 hod. kultivované bez (- GalN) nebo s přidavkem uvedené koncentrace D-GalN v mmol/l

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

Samotné navození steatózy pomocí OA a OA:PA 3:1 nemělo na aktivitu kaspázy 3 signifikantní vliv. Aktivita kaspázy 3 se u všech hepatocytů významně zvýšila po přidavku 2,5; 5 a 10 mM D-galaktosaminu (p<0,001). Nejvýraznější zvýšení aktivity kaspázy 3 bylo u všech skupin po 2,5 mM D-GalN. U nesteatotické skupiny a skupiny se steatózou navozenou pomocí kombinace OA:PA v poměru 3:1 způsobil signifikantní zvýšení aktivity kaspázy 3 rovněž přidavek 20 mM D-GalN (p<0,001). Přídavek 2,5 (p<0,001) a 5 (p<0,01) mM D-GalN k hepatocytům se

steatózou navozenou pomocí OA způsobil v porovnání s nesteatotickými hepatocyty se shodným obsahem D-GalN nižší aktivitu kaspázy 3. Oproti tomu u hepatocytů se steatózou indukovanou pomocí kombinace OA:PA 3:1 byla po přidavku 2,5 mM D-GalN zaznamenána vyšší aktivita kaspázy 3 než u nesteatotických hepatocytů se shodným přidavkem D-GalN ( $p < 0,001$ ). U hepatocytů se steatózou navozenou pomocí OA 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 u hepatocytů se steatózou indukovanou pomocí kombinace OA:PA 3:1 (graf č. 19).

**Graf č. 20** – Tvorba ROS steatotickými hepatocyty kultivovanými 24 hod. s mastnými kyselinami k navození steatózy *in vitro* a následně 24 hod. s D-GalN o koncentraci 2,5 – 30 mmol/l



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

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované ve Williams' E médiu s obsahem BSA (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin a dalších 24 hod. kultivované bez (- GalN) nebo s přidavkem 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 (obsah BSA ve vzorku je uveden v tabulce č. 7) a dalších 24 hod. kultivované bez (- GalN) nebo s přidavkem uvedené koncentrace D-GalN v mmol/l

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

Indukce steatózy pomocí mastných kyselin neměla na produkci ROS významný vliv. Tvorba ROS u všech skupin vzrůstala s přidavkem D-galaktosaminu do média. U skupiny s OA byl zaznamenán signifikantní vzestup tvorby ROS po přidavku 10 ( $p < 0,01$ ); 20 a 30 mM D-GalN ( $p < 0,001$ ). U hepatocytů se steatózou indukovanou pomocí kombinace OA:PA 3:1 se produkce ROS významně zvýšila u všech testovaných koncentrací D-GalN ( $p < 0,001$ ). Produkce ROS byla statisticky významnější působením 2,5 ( $p < 0,01$ ); 5 a 10 mM D-GalN ( $p < 0,001$ ) na hepatocyty se steatózou navozenou směsí 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 hepatocytů se steatózou indukovanou kombinací OA:PA 3:1 se stejným obsahem D-GalN (graf č. 20).

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

Byly připraveny 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 mmol/l 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 0,625 % BSA ve Williams' E médiu (viz tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin bez nebo s odpovídajícím přidavkem 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 porovnávání dat získaných z min. 3 izolací hepatocytů vyjádřeny jako % z ničím neovlivněné nesteatotické kontroly.

Skupina	Obsah EGCG	Doba kultivace	
		Prvních 24 hodin	Dalších 24 hodin
K	-EGCG		BSA
	+EGCG 0,625 – +EGCG 5	Přísl. obsah EGCG	BSA a přísl. obsah EGCG
OA	-EGCG		0,5 mM OA + BSA
	+EGCG 0,625 – +EGCG 5	Přísl. obsah EGCG	0,5 mM OA + BSA a přísl. obsah EGCG
OA:PA 3:1	-EGCG		0,5 mM 3:1 + BSA
	+EGCG 0,625 – +EGCG 5	Přísl. obsah EGCG	0,5 mM 3:1 + BSA a přísl. obsah EGCG
PA	-EGCG		0,5 mM PA + BSA
	+EGCG 0,625 – +EGCG 5	Přísl. obsah EGCG	0,5 mM PA + BSA a přísl. obsah EGCG

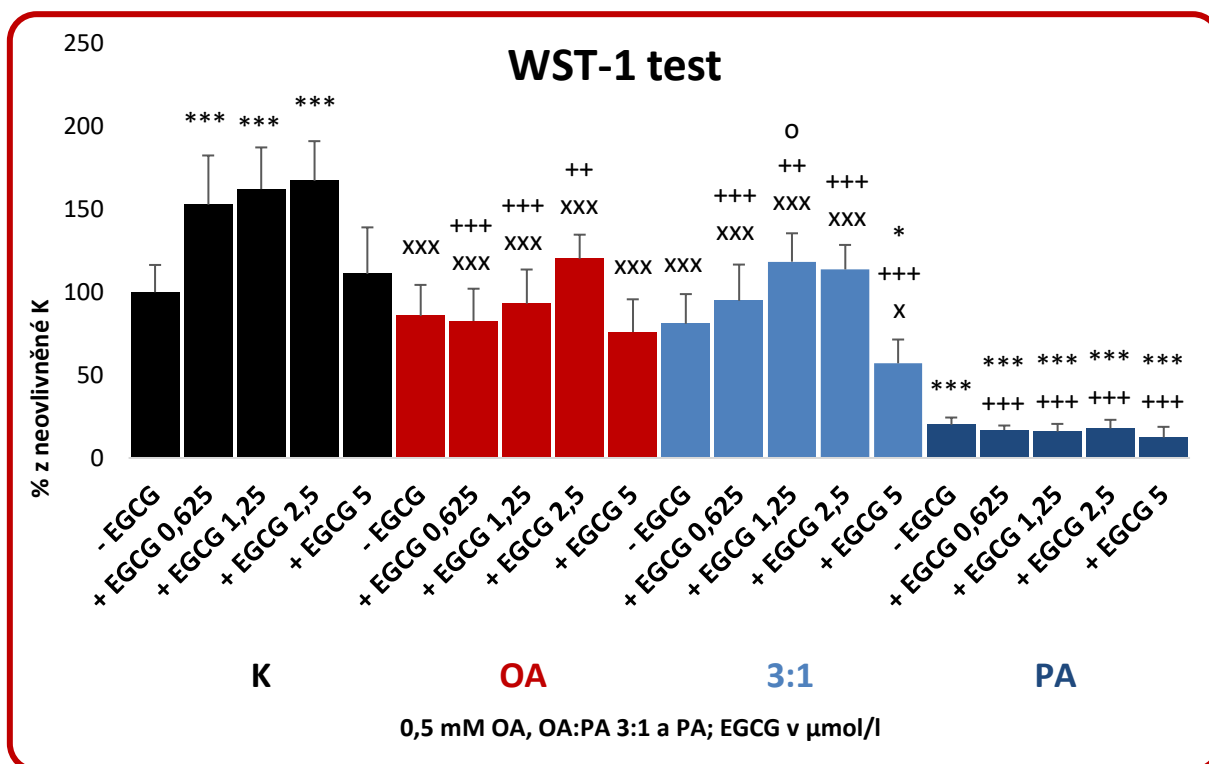
Tabulka č. 9 – uspořádání experimentu

Hodnocena byla:

- a) Aktivita buněčných dehydrogenáz pomocí WST-1 testu
- b) Viabilita buněk pomocí LDH leakage
- c) Aktivita kaspázy 3 k určení míry apoptózy
- d) Tvorba ROS k detekci oxidačního stresu
- e) Míra lipoperoxidace zhodnocením hladiny MDA
- f) Obsah TAG k určení míry steatózy
- g) Kvantitativní barvení Oil Red O k určení míry steatózy



**Graf č. 21** – Aktivita buněčných dehydrogenáz hodnocená po 24hodinové preinkubaci hepatocytů s EGCG o koncentraci 0,625 – 5  $\mu\text{mol/l}$  a následné 24hodinové kultivaci hepatocytů s EGCG ve shodné koncentraci a mastnými kyselinami o celkové koncentraci 0,5  $\text{mmol/l}$  k navození steatózy *in vitro*.



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

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  a dalších 24 hod. v 0,625% BSA ve Williams' E médiu (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

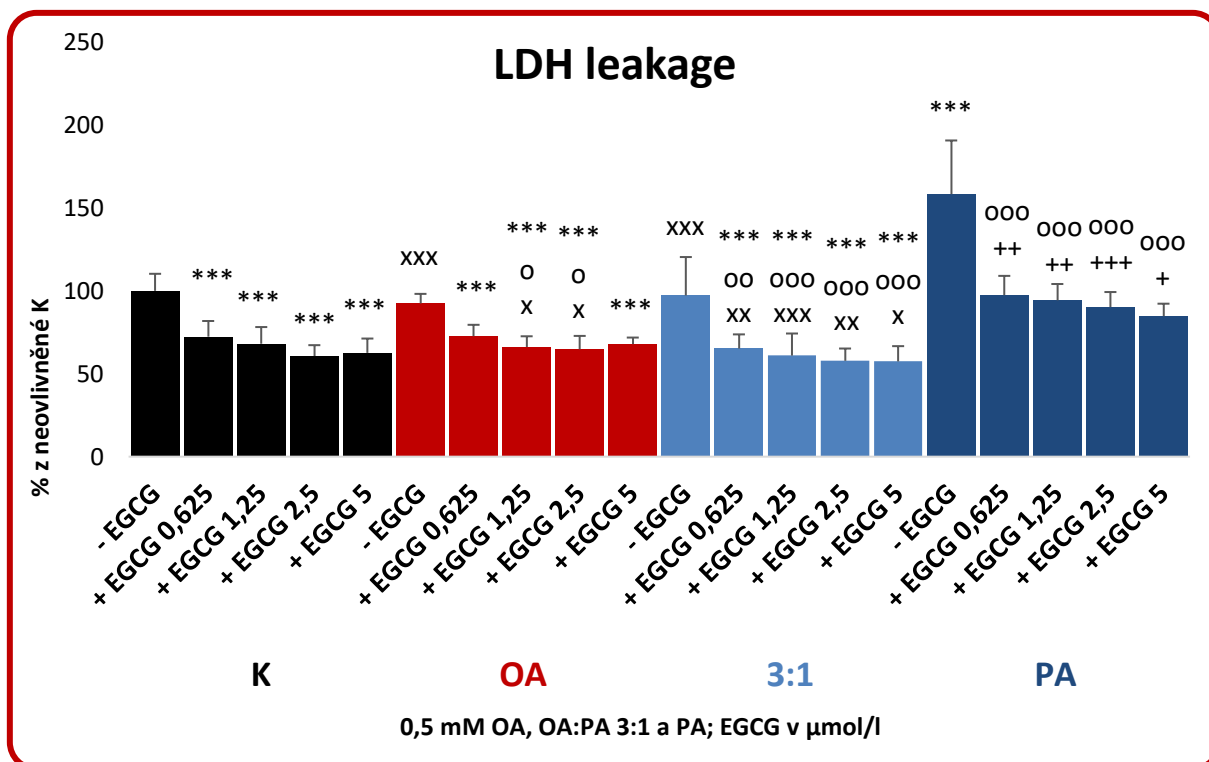
OA; 3:1; PA: hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  v médiu a dalších 24 hod. s obsahem 0,5 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je 0,625 %; tabulka č. 7) a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

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

V neztukovatělé skupině měla preinkubace s EGCG o koncentraci 0,625; 1,25 a 2,5  $\mu\text{mol/l}$  za následek zvýšení aktivity buněčných dehydrogenáz ( $p < 0,001$ ). WST-1 test klesal pod úroveň nižším neovlivněné kontroly u steatotické skupiny 3:1, která byla preinkubována s 5  $\mu\text{mol/l}$  EGCG ( $p < 0,05$ ) a u celé steatotické skupiny PA ( $p < 0,001$ ). Preinkubace steatotické skupiny 3:1 s 1,25  $\mu\text{M}$  EGCG způsobila zvýšenou aktivitu buněčných dehydrogenáz oproti skupině 3:1 bez obsahu EGCG ( $p < 0,05$ ), v ostatních steatotických skupinách neměla preinkubace s EGCG žádný statisticky významný vliv. Ve všech steatotických skupinách preinkubovaných s EGCG (s výjimkou skupiny OA s přidavkem EGCG 5  $\mu\text{mol/l}$ ) byl nalezen nižší

WST-1 test než tomu bylo u nesteatotických hepatocytů preinkubovaných s odpovídající koncentrací EGCG (OA s přidavkem 0,625 a 1,25  $\mu\text{M}$  EGCG; 3:1 s přidavkem 0,625; 2,5 a 5  $\mu\text{M}$  EGCG a celá skupina PA preinkubovaná s EGCG:  $p < 0,001$ ; OA s přidavkem 1,25  $\mu\text{M}$  EGCG a 3:1 s přidavkem 2,5  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,01$ ). Steatotické skupiny OA a 3:1 měly signifikantně vyšší WST-1 test než skupina PA s odpovídajícím přidavkem EGCG ( $p < 0,001$ ) (graf č. 21).

**Graf č. 22** – LDH leakage hodnocený po 24hodinové preinkubaci hepatocytů s EGCG o koncentraci 0,625 – 5  $\mu\text{mol/l}$  a následné 24hodinové kultivaci hepatocytů s EGCG ve shodné koncentraci a mastnými kyselinami o celkové koncentraci 0,5  $\text{mmol/l}$  k navození steatózy *in vitro*.



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

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  a dalších 24 hodin v 0,625% BSA ve Williams' E médiu (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

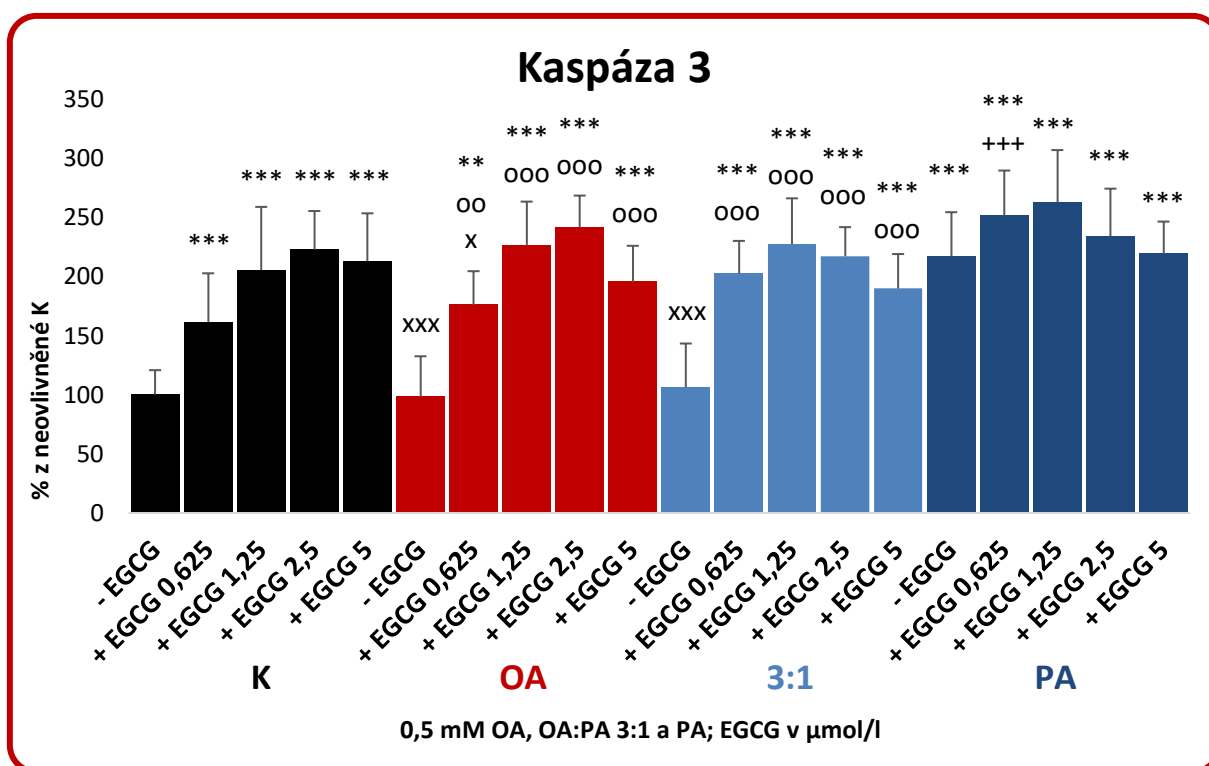
OA; 3:1; PA: hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  v médiu a dalších 24 hod. s obsahem 0,5 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je 0,625 %; tabulka č. 7) a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

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

LDH leakage byl oproti nižším neovlivněné kontrole signifikantně zvýšený pouze u skupiny PA bez přidavku EGCG ( $p < 0,001$ ). U skupiny s použitým steatogenním činidlem PA a

kombinace OA:PA 3:1 došlo přidavkem všech koncentrací EGCG k signifikantnímu poklesu LDH leakage oproti příslušným steatotickým hepatocytům bez přidavku EGCG ( $p < 0,001$ , pouze EGCG 0,625 ve skupině OA:PA 3:1 ( $p < 0,01$ )). U skupiny, kde byla jako steatogenní činidlo využita OA, došlo oproti skupině OA bez přidavku EGCG ke snížení LDH leakage po použití EGCG 1,25 a 2,5  $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,05$ ). Preinkubace EGCG o koncentraci 0,625 ( $p < 0,01$ ); 1,25 ( $p < 0,01$ ); 2,5 ( $p < 0,001$ ) a 5 ( $p < 0,05$ )  $\mu\text{mol/l}$  vedla u skupiny s PA k signifikantně vyššímu LDH leakage než tomu bylo u nesteatotické skupiny s preinkubací adekvátní koncentrací EGCG. Preinkubace EGCG o koncentraci 0,625 ( $p < 0,01$ ); 1,25 ( $p < 0,001$ ); 2,5 ( $p < 0,01$ ) a 5 ( $p < 0,05$ )  $\mu\text{mol/l}$  u skupiny s kombinací OA:PA 3:1 a EGCG o koncentraci 1,25 ( $p < 0,05$ ) a 2,5 ( $p < 0,05$ )  $\mu\text{mol/l}$  u skupiny s OA vedla k signifikantně nižšímu LDH leakage než tomu bylo u skupiny s PA s preinkubací adekvátní koncentrací EGCG (graf č. 22).

**Graf č. 23** – Aktivita kaspázy 3 hodnocená po 24hodinové preinkubaci hepatocytů s EGCG o koncentraci 0,625 – 5  $\mu\text{mol/l}$  a následné 24hodinové kultivaci hepatocytů s EGCG ve shodné koncentraci a mastnými kyselinami o celkové koncentraci 0,5  $\text{mmol/l}$  k navození steatózy *in vitro*.



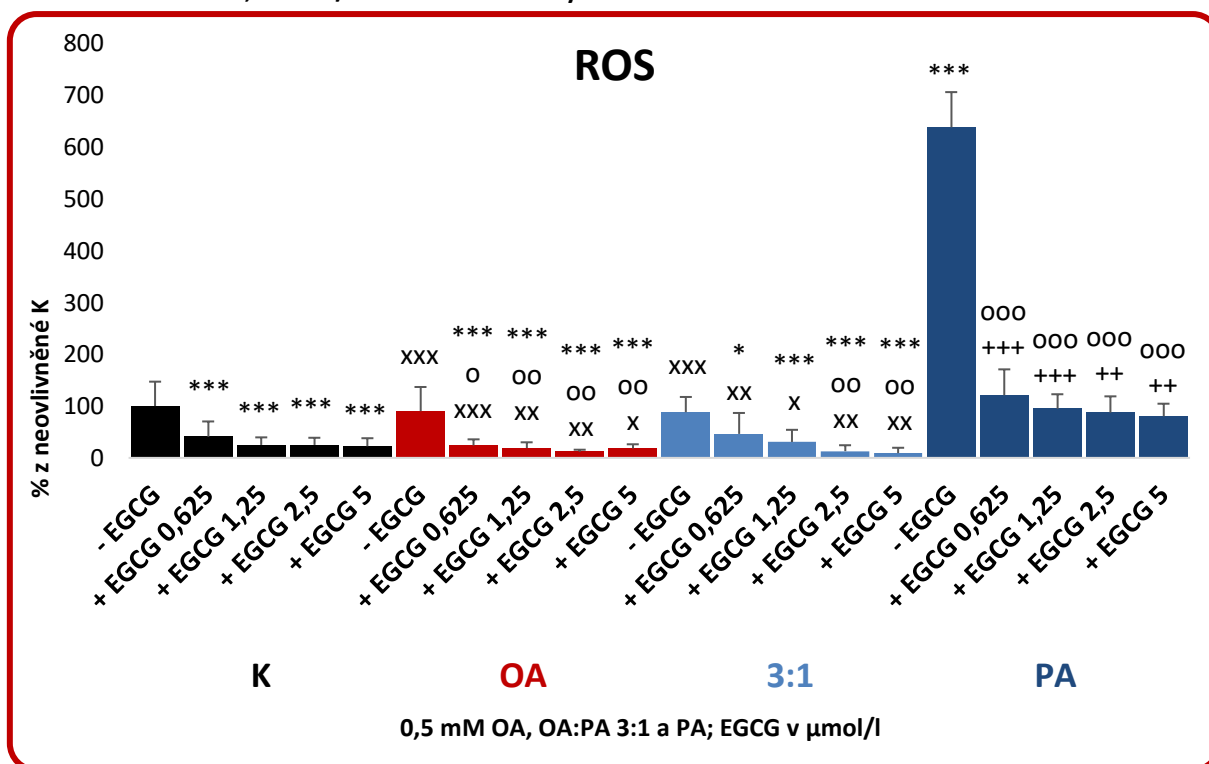
\*\*\* vs nižším neovlivněná nesteatotická kontrola (K; - EGCG); +++ vs nesteatotické hepatocyty (K) se shodným přidavkem EGCG; ooo vs příslušné steatotické hepatocyty neovlivněné EGCG (samotná OA, samotná OA:PA 3:1 či samotná PA); xxx vs PA se shodným přidavkem EGCG

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  a dalších 24 hodin v 0,625% BSA ve Williams' E médiu (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

OA; 3:1; PA: hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  v médiu a dalších 24 hod. s obsahem 0,5 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je 0,625 %; [tabulka č. 7](#)) a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$   
 \*\*\*: ( $p < 0,001$ ); \*\*: ( $p < 0,01$ ); \*: ( $p < 0,05$ );  $n \geq 6$

Jakýkoliv přidavek EGCG ke kulturám ve všech skupinách a samotná indukce steatózy pomocí PA měly za následek vzestup aktivity kaspázy 3 oproti ničím neovlivněné kontrole (OA + 0,625  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,01$ ; ostatní:  $p < 0,001$ ). Rovněž preinkubace s EGCG ve steatotických skupinách s OA a OA:PA 3:1 způsobila nárůst aktivity kaspázy 3 oproti příslušným steatotickým hepatocytům neovlivněných EGCG (OA + 0,625  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,01$ ; ostatní:  $p < 0,001$ ). Po preinkubaci s 0,625  $\mu\text{M}$  EGCG a následné indukci steatózy pomocí PA jsme zaznamenali vyšší aktivitu kaspázy 3 oproti nesteatotickým hepatocytům se shodným přidavkem EGCG ( $p < 0,001$ ) ([graf č. 23](#)).

**Graf č. 24** – Produkce ROS hodnocená po 24hodinové preinkubaci hepatocytů s EGCG o koncentraci 0,625 – 5  $\mu\text{mol/l}$  a následné 24hodinové kultivaci hepatocytů s EGCG ve 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 přidavkem EGCG; ooo vs příslušné steatotické hepatocyty neovlivněné EGCG (samotná OA, samotná OA:PA 3:1 či samotná PA); xxx vs PA se shodným přidavkem EGCG

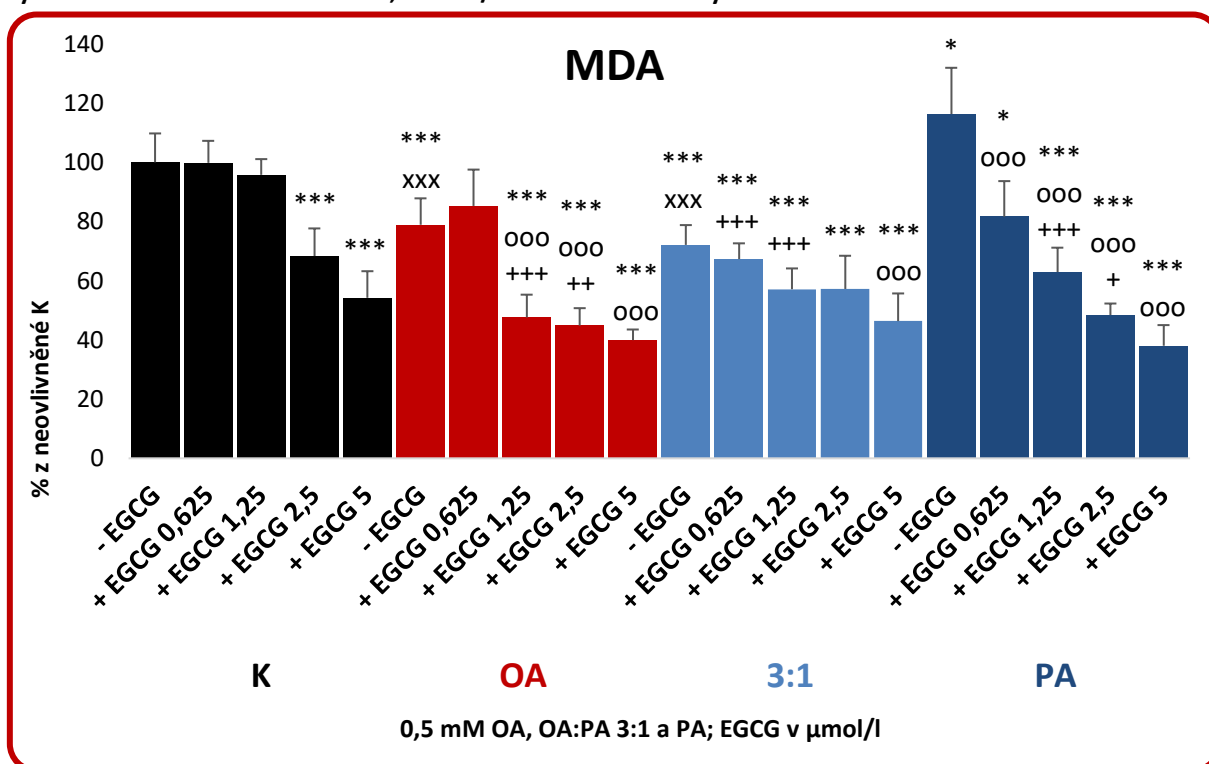
**K:** kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  a dalších 24 hodin v 0,625% BSA ve Williams' E médiu ([tabulka č. 7](#)) bez obsahu mastných kyselin a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

**OA; 3:1; PA:** hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  v médiu a dalších 24 hod. s obsahem 0,5 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je 0,625 %; [tabulka č. 7](#)) a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

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

Signifikantně vyšší produkce ROS oproti ničím neovlivněné kontrole byla zaznamenána pouze u steatotické skupiny s PA bez ovlivnění EGCG ( $p < 0,001$ ). Preinkubace této skupiny se všemi testovanými koncentracemi EGCG měla za následek pokles produkce ROS na úroveň ničím neovlivněné kontroly ( $p < 0,001$ ). Steatotické hepatocyty s PA preinkubované s EGCG vykazovaly vyšší produkci ROS než nesteatotické hepatocyty preinkubované se shodnými koncentracemi EGCG (PA + 0,625 a 1,25  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,001$ ; PA + 2,5 a 5  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,01$ ), zatímco mezi skupinou OA a 3:1 a nesteatotickou skupinou se shodným přidavkem EGCG nebyly nalezeny významný rozdíly. Preinkubace nesteatotické skupiny ( $p < 0,001$ ), skupiny s OA (OA + 0,625  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,05$ ; ostatní:  $p < 0,01$ ) a kombinací OA:PA 3:1 (3:1 + 0,625 a 1,25  $\mu\text{M}$  EGCG: bez statistické významnosti; 3:1 + 2,5 a 5  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,01$ ) s EGCG byla následována poklesem produkce ROS oproti příslušným hepatocytům neovlivněných EGCG. Steatotické hepatocyty, kde byla jako steatogenní činidlo použita OA nebo kombinace OA:PA 3:1, vykazovaly po preinkubaci s EGCG nižší produkci ROS než steatotické hepatocyty s PA o shodné koncentraci použitého EGCG (OA bez EGCG, 3:1 bez EGCG a OA + 0,625  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,001$ ; OA + 1,25 a 2,5  $\mu\text{M}$  EGCG a 3:1 + 0,625, 2,5 a 5  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,01$ ; OA + 5  $\mu\text{M}$  EGCG a 3:1 + 1,25  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,05$ ) ([graf č. 24](#)).

**Graf č. 25** – Tvorba malondialdehydu hodnocená po 24hodinové preinkubaci hepatocytů s EGCG o koncentraci 0,625 – 5  $\mu\text{mol/l}$  a následné 24hodinové kultivaci hepatocytů s EGCG ve shodné koncentraci a mastnými kyselinami o celkové koncentraci 0,5 mmol/l k navození steatózy *in vitro*.



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

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  a dalších 24 hodin v 0,625% BSA ve Williams' E médiu (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

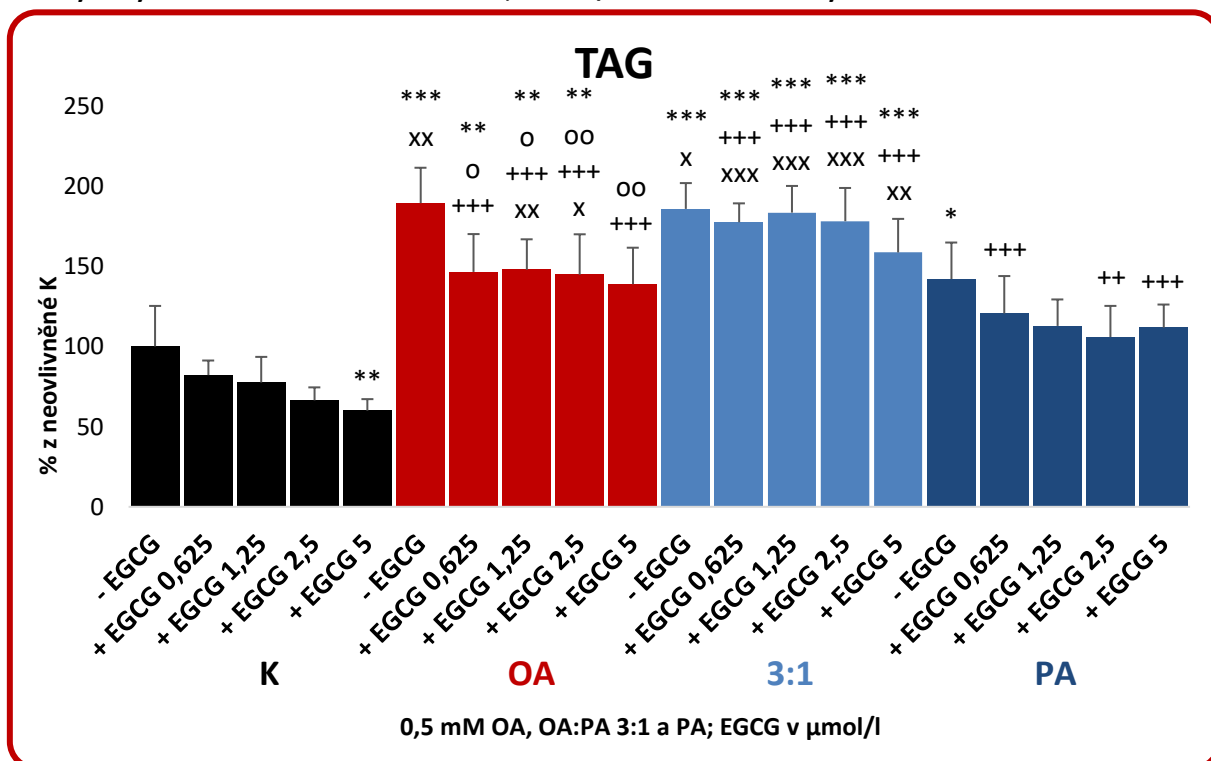
OA; 3:1; PA: hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  v médiu a dalších 24 hod. s obsahem 0,5 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je 0,625 %; tabulka č. 7) a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

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

Signifikantně vyšší tvorba MDA oproti ničím neovlivněné kontrole byla zaznamenána pouze u skupiny s PA bez ovlivnění EGCG ( $p < 0,05$ ). Po preinkubaci této skupiny se všemi testovanými koncentracemi EGCG jsme pozorovali nižší tvorbu MDA oproti ničím neovlivněné kontrole (PA + 0,625  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,05$ ; PA + ostatní koncentrace EGCG:  $p < 0,001$ ) i proti steatotické skupině obsahující pouze PA ( $p < 0,001$ ). Preinkubace steatotické skupiny s OA s 1,25; 2,5 a 5  $\mu\text{M}$  EGCG a steatotické skupiny s kombinací OA:PA 3:1 s 5  $\mu\text{M}$  EGCG měla za následek oproti příslušné steatotické skupině bez EGCG pokles tvorby MDA ( $p < 0,001$ ). Po přidavku 0,625  $\mu\text{M}$  EGCG ke skupině 3:1 ( $p < 0,001$ ); 1,25  $\mu\text{M}$  EGCG ke skupině OA, 3:1 a PA ( $p < 0,001$ ) a 2,5  $\mu\text{M}$  EGCG ke skupině OA ( $p < 0,01$ ) a PA ( $p < 0,05$ ) byla oproti nesteatotickým hepatocytům

s příslušným přídatkem EGCG nalezena nižší tvorba MDA. Preinkubace nesterotických hepatocytů s 2,5 a 5  $\mu\text{M}$  EGCG byla následována poklesem tvorby MDA ( $p < 0,001$ ) oproti ničím neovlivněné kontrole. Navození steatózy pomocí OA a kombinace OA:PA 3:1 vykazovala nižší tvorbu MDA než pomocí PA a než ničím neovlivněná kontrola ( $p < 0,001$ ) (graf č. 25).

**Graf č. 26** – Obsah triacylglycerolů v hepatocytech hodnocený po 24hodinové preinkubaci hepatocytů s EGCG o koncentraci 0,625 – 5  $\mu\text{mol/l}$  a následné 24hodinové kultivaci hepatocytů s EGCG ve shodné koncentraci a mastnými kyselinami o celkové koncentraci 0,5 mmol/l k navození steatózy *in vitro*.



\*\*\* vs ničím neovlivněná nesterotická kontrola (K; - EGCG); +++ vs nesterotické hepatocyty (K) se shodným přídatkem EGCG; ooo vs příslušné steatótické 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  $\mu\text{mol/l}$  a dalších 24 hodin v 0,625% BSA ve Williams' E médiu (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin a bez (- EGCG) nebo s přídatkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

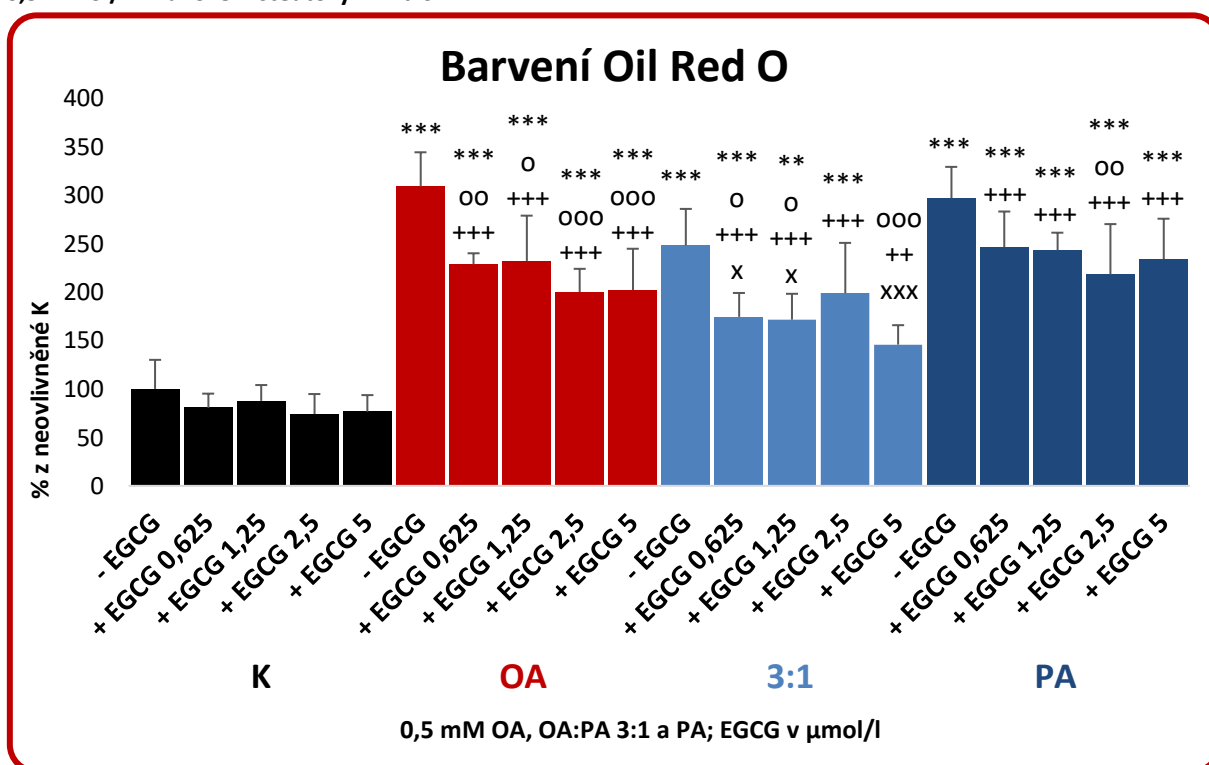
OA; 3:1; PA: hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přídatkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  v médiu a dalších 24 hod. s obsahem 0,5 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je 0,625 %; tabulka č. 7) a bez (- EGCG) nebo s přídatkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

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

Po přídatku 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 oproti kontrole. Pokud byla k navození steatózy použita OA ( $p < 0,01$ ) a kombinace OA:PA 3:1 ( $p < 0,05$ ), byl zjištěn vyšší obsah TAG než u PA. Preinkubace nesterotické skupiny s 5  $\mu\text{M}$  EGCG ( $p < 0,01$ ) a steatótické

skupiny, kde byla použita OA, s 0,625 ( $p < 0,05$ ); 1,25 ( $p < 0,05$ ); 2,5 ( $p < 0,01$ ) a 5 ( $p < 0,01$ )  $\mu\text{M}$  EGCG měla za následek snížení obsahu TAG v hepatocytech oproti příslušné skupině bez obsahu EGCG. U všech koncentrací EGCG použitých k preinkubaci hepatocytů s přidavkem OA a kombinace OA:PA 3:1 jsme zaznamenali vyšší obsah TAG než u nesteatotických hepatocytů se shodným přidavkem EGCG ( $p < 0,001$ ). V případě skupiny PA tomu tak bylo po preinkubaci s 0,625 ( $p < 0,001$ ); 2,5 ( $p < 0,01$ ) a 5 ( $p < 0,001$ )  $\mu\text{M}$  EGCG (graf č. 26).

**Graf č. 27** – Barvení hepatocytů pomocí Oil Red O a následná extrakce barviva a jeho spektrofotometrická detekce hodnocená po 24hodinové preinkubaci hepatocytů s EGCG o koncentraci 0,625 – 5  $\mu\text{mol/l}$  a následné 24hodinové kultivaci hepatocytů s EGCG ve shodné koncentraci a mastnými kyselinami o celkové koncentraci 0,5 mmol/l k navození steatózy *in vitro*.



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

K: kontrolní hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  a dalších 24 hodin v 0,625% BSA ve Williams' E médiu (tabulka č. 7) bez obsahu mastných kyselin a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

OA; 3:1; PA: hepatocyty 24 hod. kultivované bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$  v médiu a dalších 24 hod. s obsahem 0,5 mM koncentrace mastných kyselin, které byly rozpuštěny v BSA (obsah BSA ve vzorku je 0,625 %; tabulka č. 7) a bez (- EGCG) nebo s přidavkem uvedené koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$

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



Po přidavku OA, kombinace OA:PA 3:1 i PA do média kultivovaných hepatocytů jsme zaznamenali vzestup akumulace Oil Red O oproti kontrole ( $p < 0,001$ ). Preinkubace steatotické skupiny, kde byla použita OA, s 0,625 ( $p < 0,01$ ); 1,25 ( $p < 0,05$ ); 2,5 ( $p < 0,001$ ) a 5 ( $p < 0,001$ )  $\mu\text{M}$  EGCG, skupiny, kde byla použita kombinace 3:1, s 0,625 ( $p < 0,05$ ), 1,25 ( $p < 0,05$ ) a 5 ( $p < 0,001$ )  $\mu\text{M}$  EGCG a skupiny s PA s 2,5 ( $p < 0,01$ )  $\mu\text{M}$  EGCG měla za následek snížení akumulace Oil Red O v hepatocytech oproti příslušné skupině bez obsahu EGCG. U všech steatotických skupin preinkubovaných s EGCG jsme pozorovali vyšší akumulaci Oil Red O v hepatocytech než u nesteatotické skupiny preinkubované se shodnou koncentrací EGCG (skupina 3:1 + 5  $\mu\text{M}$  EGCG:  $p < 0,01$ ; ostatní:  $p < 0,001$ ) (graf č. 27).

## **6. DISKUSE A ZÁVĚRY**

### **6.1. 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 (195). Toto 2D uspořádání však má řadu omezení. Dochází k rychlé dediferenciaci hepatocytů a ztrátě jejich polaritu na krevní a žlučový pól (218, 219). Byl pozorován pokles aktivit enzymů I. a II. fáze biotransformace nezbytných pro metabolismus xenobiotik (cytochromy P450, glutathion-S-transferáza, sulfotransferáza) (218, 220). Kromě aktivity se snižuje také obsah CYP450 (211). Klesají rovněž aktivity antioxidantních enzymů jako je kataláza, superoxid dismutáza a glutathionperoxidáza. Naopak byl popsán nárůst proteinů akutní fáze, např. LPS vázající protein,  $\alpha$ -2-makroglobulin, ferritin, inhibitor serinové proteázy B, haptoglobin (218) a aktivity kaspáz 3 a 7 (195). V primární kultuře nastává také pokles funkční kapacity hepatocytů, který se zvyšuje s délkou kultivace (164). Dediferenciace hepatocytů je doprovázena ztrátou viability (182). Morfologicky lze postupně zaznamenat ztrátu kontaktů mezi buňkami, buňky tvarově připomínají fibroblasty a nakonec se odlučují od extracelulární matrix. Optimalizací kultivačních podmínek lze tento proces zpomalit. 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 urey a albuminu (221), nedochází tak rychle k poklesu aktivity biotransformačních enzymů (195, 222, 223). Otázkou je, zda již při kultivaci trvající 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. 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. Jedněmi z nejčastějších suplementů kultivačního média jsou hormony inzulin a glukagon, které se podílí na utilizaci a metabolismu glukózy. Inzulin je potřebný pro správnou produkci albuminu a zlepšuje přichycení a morfologii hepatocytů (196).

Glukagon stimuluje přežívání hepatocytů, aktivitu laktátdehydrogenázy, pyruvátkinázy a glukokinázy, tvorbu močoviny a glukoneogenezi. S použitím glukagonu je ovšem spojeno zvýšené odbourávání proteinů a snížená proteosyntéza a proto se využívá pouze v kombinaci s inzulinem (196). Proteosyntéza je podmíněna dostatkem aminokyselin, které se z tohoto důvodu také mohou přidávat do média. V protokolech jednotlivých experimentů se použité koncentrace inzulínu a glukagonu pohybuje ve velmi širokém rozmezí, 0,5-10 mg/l pro inzulín, 0,007-35 mg/l pro glukagon. Tento fakt velmi ztěžuje porovnávání výsledků (196).

Dalšími hormony často se vyskytujícími v suplementaci jsou glukokortikoidy (dexametazon, hydrokortizol). Glukokortikoidy zesilují odpověď buněk na inzulín a glukagon. Dexametazon napomáhá zachovat kanalikulární síti podobnou strukturu vytvořenou v *in vitro* podmínkách, podílí se na udržení polygonálního tvaru a zlepšuje mezibuněčnou komunikaci přes *gap junctions* (185). Podílí se tak na udržení specifických funkcí hepatocytů.

K prevenci mikrobiální kontaminace kultur jsou média suplementována antibiotiky a antitumorkovými látkami. Nejhojněji se využívá penicilin v kombinaci se streptomycinem. Dále se mohou média obohacovat o růstové faktory (např. epidermální růstový faktor), jejichž nevýhodou je především cena, o nikotinamid a antioxidanty (selen,  $\alpha$  tokoferol či kyselinu askorbovou). Nefyziologickými aditivami mohou být látky jako dimethylsulfoxid či různé induktory enzymů (fenobarbital) (185, 196).

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, jež se aktivují izolačním stresem, a tak zamezit poizolační autodegradaci buněk (224), některé studie uvádějí příznivější funkční kapacitu, lepší zachování aktivity biotransformačních enzymů, delší zachování morfologických znaků a polaritu hepatocytů u média bez jeho přídavku (185, 222).

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. Vzhledem k tomu, že sérum podporuje adhezi hepatocytů k podkladu při přípravě *monolayeru* nebo sendvičové kultury, bylo pro tento krok vždy použito. V dalších dnech byly buňky inkubovány v médiu s přídavkem FBS nebo bez něj. 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.

Viabilitu hepatocytů v kultuře jsme posuzovali podle LDH leakage. 2. kultivační den byl nejvyšší LDH leakage zaznamenán u kultur inkubovaných v *monolayeru* s FBS a u sendvičů bez FBS. Tyto hodnoty však znamenaly přibližně 15% únik intracelulárního LDH do média. Od 4. dne LDH leakage významně narůstal u *monolayerů* v porovnání se *sendviči*. 4., 6. a 8. kultivační den byl vůbec nejvyšší únik LDH do média pozorován u *monolayerů* s přidavkem FBS. 10. kultivační den unikla u *monolayerů* do média přibližně třetina LDH, zatímco u sendvičů zůstal LDH leakage nízký (cca 7 %); u *monolayerů* došlo zároveň ke zvýšené tvorbě malondialdehydu, markeru lipoperoxidace.

Funkční stav hepatocytů byl hodnocen z produkce albuminu hepatocyty. Od 4. kultivačního dne produkce albuminu v sendvičové kultuře bez FBS výrazně převyšovala syntézu v *monolayerech*, v případě sendviče s obsahem FBS tomu tak bylo od 6. dne. V *monolayeru* od 6. dne kultivace tvorba albuminu postupně ustávala, zatímco u sendvičů produkce setrvala na hodnotách převyšujících úroveň 2. dne. K podobným výsledkům dospěli i jiní autoři (225). Hepatocyty kultivované v sendviči si zachovávaly polygonální tvar, kontakty mezi buňkami a přítomnost žlučových kanálků i poslední den kultivace, zatímco hepatocyty v *monolayeru* počínaje 4. dnem získávaly tvar podobný fibroblastům a z kultury se postupně odlučovaly.

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* (222), 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 (222).

Od 4. dne již námi sledované parametry poukazují na výhody kultivace v sendviči, zejména v médiu bez přidavku séra. Výše zmínění autoři 4. den kultivace dokumentují LDH leakage nižší u kultur bez FBS (226) a následně do 10. dne LDH leakage převyšuje u *monolayerů* (195). Hodnocen byl rovněž obsah redukovaného glutathionu v kulturách. U *monolayerů* klesal s časem kultivace, u sendvičů naopak nejprve mírně vzrostl a mírně poklesl až okolo 10 kultivačního dne (222). Sendvičový typ kultivace tedy podporuje vyšší schopnost antioxidační obrany proti rozvoji oxidačního stresu, ke kterému dochází během kultivace (195, 226), 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. Kultivací v *monolayeru*, zejména se sérem, klesá aktivita enzymů I. i II. fáze biotransformace (222, 226-229). Sendvičová technika kultivace může omezit tento pokles, resp. udržet aktivitu relativně stabilní až 14 dní (222, 226, 230).

**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*.

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

NAFLD je charakterizována akumulací tuků v hepatocytech a histopatologický obraz onemocnění se pohybuje od prosté steatózy až po zánětlivé změny jater s fibrotizací tkáně (NASH), která je rizikovým faktorem vzniku cirhózy či hepatocelulárního karcinomu. Pro studium této problematiky je sice možné využít experimentální *in vivo* modely, jednou z nevýhod je však několikatydenní podávání diety indukující NAFLD, resp. NASH. Vzrůstá tak obliba použití *in vitro* modelů jako časově, legislativně a finančně přívětivějších, alespoň pro určitou fázi experimentů.

Literární údaje svědčí pro možnost indukce steatózy *in vitro* pomocí přidavku 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) (203, 231). V době, kdy tato naše studie vznikala, existoval omezený počet prací popisujících účinky těchto kyselin na myši (202, 204, 205), husí (206) či lidské (207) hepatocyty v primární kultuře a na hepatocelulární nádorové linie (203, 204, 208, 232-234). Nicméně uspokojivé údaje o dopadu na hepatocyty potkana, které bývají v modelech *in vitro* hojně využívány, nebyly nalezeny. Většina studií porovnávající účinky kyseliny palmitové (PA) a olejové (OA) se shodla v tom, že palmitová kyselina působí více cytotoxicky a proapoptoticky než olejová (202, 203, 208). V otázce, která z kyselin způsobuje vyšší akumulaci tuků v játrech, ovšem tyto práce jednotné nejsou. Na variabilitu výsledků mohla

mít vliv druhová specifita zkoumaných hepatocytů i použití rozmanitých koncentrací mastných kyselin. 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.

V naší práci vedl přídavek kyseliny palmitové i olejové k signifikantnímu nárůstu obsahu TAG v hepatocytech, který byl závislý na koncentraci mastných kyselin v médiu. Gómez-Lechón a kol. nenalezli mezi jednotlivými kyselinami v otázce míry ztukovatění hepatocytů signifikantní rozdíl (203). Ovšem Malhi et al. uvádí, že po kultivaci HepG2 s 0,2 mM kyselinou palmitovou byla steatóza výraznější než po stejně koncentrované kyselině olejové. Oproti tomu Ricchi et al. zaznamenali vyšší akumulaci TAG v HepG2, HuH7 a WRL-68 buňkách po inkubaci s kyselinou olejovou. V jejich práci však byly koncentrace obou kyselin vyšší, a to 0,66 mmol/l. Tyto poznatky se shodují s našimi výsledky, kde v 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.

Pan et al. (2010) na izolovaných husích hepatocytech hodnotil expresi enzymu DGAT, jež patří do skupiny enzymů podílejících se na syntéze TAG, která se s růstem koncentrace PA (0,9; 1,2 mM) postupně snižovala. Vzájemně rostoucí koncentrace PA tedy může mít dopad na útlum tvorby TAG. Fakt, že PA není schopna navodit inkorporaci mastných kyselin do TAG tak efektivně jako OA, byl dokumentován také na HepG2 a potkaních hepatomových buňkách H4IIEC3 (208, 235). Narušení syntézy TAG bylo pozorováno rovněž po expozici jiné nasycené mastné kyselině – stearové (232). Tvorba TAG indukovaná olejovou kyselinou může být alespoň zčásti vysvětlena zvýšením exprese lipogenních transkripčních faktorů SREBP-1 a PPAR  $\gamma$  (208).

Po inkubaci hepatocytů se směsí OA:PA v naší práci závisel obsah TAG na celkové koncentraci mastných kyselin. Dosažená hladina TAG po přídavku směsi OA:PA byla srovnatelná s hladinami TAG nalezenými po inkubaci hepatocytů s adekvátní koncentrací olejové kyseliny. Zvyšující se podíl olejové kyseliny ve směsi s PA stupeň ztukovatění dále neovlivnil.

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 (202, 236). Po vystavení hepatocytů PA klesal WST-1 test výrazně prudčeji než po OA. LDH leakage rostl v závislosti na dávce od 0,25 mM koncentrace PA, zatímco po OA se únik LDH do média zvyšoval od koncentrace 1 mmol/l. Zvýšený LDH leakage byl doprovázen sníženou funkční kapacitou hepatocytů oproti kontrolám.

Mezi mírou steatózy a rozsahem poškození buněk nebyla nalezená přímá úměra. Existuje představa, že inkorporace volných mastných kyselin do TAG může působit jako mechanismus vedoucí k ochraně jater před toxicitou volných mastných kyselin (208, 237, 238). 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. Tudíž syntéza TAG z mastných kyselin nemusí nutně znamenat ochranu před poškozením.

Cytotoxicita nasycených mastných kyselin je provázána apoptózou (202, 203, 208). 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 (208, 239, 240). Mechanismus proapoptotického působení PA není přesně znám. Jako významný faktor pro apoptózu navozenou saturevanými mastnými kyselinami vystupuje stres endoplazmatického retikula, při kterém dochází k úniku kalcia do cytosolu (235, 241, 242). Důležitou roli sehrávají mitochondrie. PA v komplexu s kalcielem navozuje otevření MPTP, což následně vede k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) a uvolnění proapoptotického cytochromu C (243, 244). Pro účast mitochondrií v aktivaci apoptózy svědčí i nález zvýšené aktivity kaspázy 9 po vystavení HepG2 buněk kyselině palmitové, zatímco olejová kyselina neměla vliv (203). Naše výsledky dokumentují pokles MMP po inkubaci hepatocytů s PA. Tento pokles vykazoval závislost na dávce. Od 1 mM PA jsme pozorovali takřka úplné vymizení MMP. 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 (245). 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 (236).

Důležitou otázkou bylo, zda dokáže současná přítomnost mononenasycené olejové kyseliny ochránit potkaní hepatocyty před cytotoxickým účinkem kyseliny palmitové (208). V naší práci vykazovala směs OA:PA v celkové koncentraci 0,5; 0,75 a 1 mmol/l nižší cytotoxicitu než samotná PA v odpovídajících koncentracích. Zajímavým zjištěním bylo, že ekvimolární směs OA:PA způsobovala signifikantně nižší cytotoxicitu než samotná PA o poloviční koncentraci. Tato směs OA:PA chránila buňky před produkcí ROS a aktivací kaspázy 3. Omezení cytotoxicity

bylo doprovázeno zachováním syntézy albuminu v potkaních hepatocytech. Tyto výsledky prokazují protektivní efekt mononenasyčené olejové kyseliny vůči poškození nasycenou palmitovou kyselinou. Tento významný protektivní účinek byl potvrzen jinými autory i později po publikaci našich výsledků (246). PA způsobuje pokles MMP, aktivaci apoptózy a buněčnou smrt, které jsou úzce asociovány se změnami ve skladbě buněčných fosfolipidů (235). V uvedené práci měl přídavek OA k PA za následek snížení inkorporace PA do buněčných fosfolipidů a zvýšení esterifikace TAG (235). K závěru, že nenasycené mastné kyseliny jsou schopny podpořit ukládání nasycených MK do TAG a zabránit tak jejich proapoptotickému působení, dospěli i další autoři (247, 248). V naší práci směs OA a PA v koncentraci 0,75 mM a 1 mM skutečně navodila vyšší tvorbu TAG než samotná PA v odpovídající koncentraci. S přibývajícím podílem PA ve směsi s OA však narůstal únik LDH z hepatocytů, i když se obsah TAG signifikantně neměnil, respektive závisel pouze na celkovém obsahu mastných kyselin. Jak bylo zmíněno výše, podpora produkce TAG pravděpodobně 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. V játrech jsou zastoupeny dvě izoformy JNK – JNK1 a JNK2. Zvýšená aktivita JNK byla nalezena u experimentálních zvířecích modelů obezity (249, 250) a rovněž u pacientů s NASH (251, 252). Enzym JNK je schopen spustit mitochondriální cestu aktivace apoptózy buď inhibiční fosforylací protiapoptotické rodiny Bcl2 (253) či stimulační fosforylací proapoptotické rodiny Bax (254). Navozením stresu endoplazmatického retikula by mohlo dojít k aktivaci JNK a následně k apoptóze závislé na mitochondriích (246). *In vitro* studie na HepG2 buňkách dokumentuje signifikantní efekt palmitové kyseliny na aktivaci JNK s následnou aktivací Bax a inhibicí Bcl2, což vyústilo v aktivaci exekutivního enzymu apoptotické kaskády kaspázy 3. OA byla schopna signifikantně potlačit efekt PA na JNK, Bax, Bcl2 i kaspázu 3 (246). Po přidání inhibitoru JNK ovšem nedošlo k potlačení toxického účinku PA tak efektivně, jako při přídavku OA. Vliv OA na JNK tedy vysvětluje protektivní efekt OA jen částečně (246). Inhibice apoptózy navozené mastnými kyselinami je dáována také do souvislosti s autofagií. Tento proces se jeví jako určitá ochrana buněk před toxickým účinkem mastných kyselin a souvisí také s dříve zmíněným poklesem intracelulárního obsahu TAG. Mechanismus jeho protektivního účinku popř. za jakých okolností může autofagie vést ke smrti buněk vlivem mastných kyselin není dobře známo. Uvažuje se, že autofagie může přispět ke zmírnění stresu endoplazmatického retikula (255), o přechodu buňky k apoptóze i v přítomnosti autofagického procesu rozhoduje



nejspíše stav proapoptotických proteinů Bax/Bak (241). Výše v literatuře popsany inhibiční efekt OA na Bax by tuto teorii mohl podpořit.

**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. Při volbě adekvátního modelu je nutné brát v úvahu jeho použití, resp. situaci, již má simulovat. Jako optimální k navození prosté steatózy se zachováním vysokého stupně viability buněk se jeví použití samotné OA, popř. OA v kombinaci s PA, avšak s vyšším podílem OA (3:1; 2:1) o celkové koncentraci 0,5 mM, případně 0,75 mM. Takový *in vitro* model by mohl být využit ke studiu mechanismů potenciálně zvýšené citlivosti hepatocytů s prostou steatózou vůči toxickému poškození. Pochopení zmíněných mechanismů je předpokladem pro možnou ochranu ztukovatělých hepatocytů před poškozením. Modely s vyšším podílem PA jsou provázeny apoptózou a vyšší cytotoxicitou a mohou se více přibližovat k *in vitro* simulaci podmínek NASH.

### **6.3. Hodnocení protektivního účinku EGCG na 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 (256). Jaterní poškození je často asociované s oxidačním stresem, který hraje významnou roli v indukcii smrti hepatocytů. Antioxidační terapie může v prevenci jaterních poškození představovat slibnou strategii. Experimentální studie potvrzují, že perorální příjem extraktů zeleného čaje, a především jeho hlavní složky – EGCG, může omezit hepatotoxicitu (257, 258). Vzdůstá ovšem i počet prací, které naznačují, že EGCG může působit naopak prooxidačně a k toxicitě tak vést (259, 260). Jeho hepatotoxicita může být důsledkem použití vysokých dávek extraktů zeleného čaje (259-261). Významnou roli hraje rovněž dávkování EGCG ve vztahu k expozici hepatotoxické látky (262). Extrakt zeleného čaje, který byl myším podán před toxickou dávkou acetaminofenu (APAP), měl

za následek snížení hepatotoxicity, zatímco podání extraktu zeleného čaje po vystavení APAP mělo opačný účinek (262).

Většina experimentů byla prováděna především na zvířatech po enterálním podání EGCG. Koncentrace EGCG ve tkáni po enterálním podání jsou nižší, než bychom očekávali podle celkové koncentrace EGCG v plazmě (263). Farmakokinetické vlastnosti katechinů jsou intenzivně studovaným problémem (263, 264). Významnou úlohu v nízké biodostupnosti katechinů může hrát jejich konjugace v tenkém střevě. Po i.v. podání mohou být tkáně vystaveny vyšším dávkám volného EGCG, než je tomu po enterálním podání. Volné EGCG tedy nejspíše vstupuje do tkání snadněji. Po enterální i intravenózní aplikaci byl ve tkáních skutečně nalezen především volný EGCG. Nadbytek volného EGCG ve tkáni může být způsoben také vylučováním konjugovaného EGCG ven z tkáně (263). Vztah mezi dávkou a procentuálním zastoupením konjugovaného vs. nekonjugovaného EGCG není přesně znám (265).

*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, a nebo byly hepatocyty 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  $\mu\text{mol/l}$  (259). Vliv na variabilní citlivost k EGCG mohl mít jiný druh použitých pokusných zvířat. Bylo zdokumentováno, že toxicita EGCG se liší i u různých kmenů myší, roli hrálo také pohlaví zvířat (266). 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 zmírnila poškození hepatocytů, zatímco simultánní podání EGCG a D-GalN selhalo.

Smrt hepatocytů způsobená D-GalN spojená s nárůstem oxidačního stresu a zvýšenou produkcí ROS byla popsána v *in vivo* (267, 268) i *in vitro* (269, 270) podmínkách. V našem 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 (271). D-GalN působí prooxidačně jednak indukcí lipoperoxidace a dále snížením obsahu GSH v hepatocytech (164, 272). Buňky reagují na lipoperoxidaci indukcí antioxidantních mechanismů (273). GSH je velmi podstatná molekula vystupující jako zhášec a eliminátor reaktivních metabolitů a ROS (262). Bylo zdokumentováno, že EGCG je k likvidaci lipoperoxidace využíván přednostně před GSH, čímž chrání před poklesem GSH a oxidačním poškozením (256, 274). V naší práci EGCG sice zmírnil lipoperoxidaci, nicméně účinek na zachování hladiny GSH nebyl potvrzen. Zelený čaj může zvýšit biosyntézu glutathionu (275). 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 antioxidantních mechanismů schopných redukce GSSG na GSH (276). Vzniklý GSSG také velice ochotně prochází membránou do kultivačního média (163), kde jsme koncentrace GSH a GSSG nestanovovali. Na izolovaných hepatocytech byla zaznamenána schopnost EGCG reagovat s GSH a způsobit tak jeho přechodný nedostatek (262, 277). Kultivace hepatocytů s EGCG a D-GalN (bez předcházejícího preinkubace s EGCG) mohla v protektivním účinku selhat díky prohloubení nedostatku GSH.

D-GalN ovlivňuje také metabolické funkce. V naší práci potlačoval syntézu albuminu a urey. Toxicita D-GalN je spojována s nedostatkem uridinu a narušení tvorby RNA a proteinů (278). Nejsou dostupné informace o tom, že by hladinu uridinu v hepatocytech narušoval i EGCG. Oxidační stres navozený D-GalN je doprovázen produkcí prozánětlivých cytokinů (267). Tyto cytokiny mohou zapříčinit změny v genové expresi v játrech, která může způsobit pokles syntézy albuminu (279-281). 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 (257, 267, 282), 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, zatímco podání EGCG pouze zároveň s hepatotoxinem selhalo. K ochraně plazmatické membrány mohla přispět redukce peroxidace lipidů přítomných v lipidové dvojvrstvě. Ačkoliv pozitivní efekt EGCG na produkci GSH nemůžeme vyloučit, oxidační stres indukovaný v naší práci nejspíše přesáhl schopnost antioxidantních mechanismů zvrátit nedostatek GSH v hepatocytech. Následkem

tohoto může být i fakt, že v naší studii nedošlo k zachování funkční kapacity hepatocytů. Slibnou strategií vedoucí k možnému prohloubení hepatoprotektivního účinku EGCG by mohlo být prodloužení doby preventivní expozice této látky.

#### **6.4. 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 (283, 284). Tento fenomén může být způsoben polypragmázií, která je frekventovaným problémem obézních a NAFLD pacientů, ale také jaterními změnami zapříčiněnými steatózou, které mohou citlivost hepatocytů k toxickým dopadům léčiv potencovat (285). I když se NAFLD může jevit jako poměrně benigní a reverzibilní onemocnění, je doprovázeno zvýšeným oxidačním stresem (286, 287), vyšší produkcí prozánětlivých cytokinů (288) a dysfunkcí mitochondrií (131, 289-291). To může být příčinou vyšší citlivosti hepatocytů k toxickému poškození (130-132, 292). Je pravděpodobné, že prosté ztukovatění jater bez klinických potíží často uniká diagnostice a vyvstává otázka, zda steatóza jater bez výraznějšího jaterního poškození může také měnit citlivost hepatocytů k toxickému poškození.

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.

Navození steatózy bylo dle očekávání s ohledem na předchozí výsledky provázeno poklesem WST-1 testu. D-GalN ve všech koncentracích výrazně snižoval aktivitu buněčných dehydrogenáz oproti kontrole i oproti příslušné steatotické skupině bez přídavku D-GalN. Signifikantní rozdíl mezi účinkem příslušné koncentrace D-GalN na ztukovatělé a neztukovatělé hepatocyty nebyl ve WST-1 testu nalezen. V našem experimentu samotná OA i kombinace OA:PA 3:1 bez přídavku D-GalN způsobila vyšší únik LDH do média ve srovnání s nesteatotickou kontrolou. V předchozí kapitole „Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové“ však nebyl vliv OA či kombinace OA:PA 3:1 o koncentraci 0,75 mmol/l na LDH leakage nalezen. Vliv může mít rozdílná celková doba kultivace. Zatímco při

zavádění steatotického modelu probíhal sběr vzorků po 24 hod. kultivace, u stávajícího pokusu byla inkubace kultur 48 hodinová – prvních 24 hodin s mastnými kyselinami a po výměně média dalších 24 hodin s Williams' E médiem s nebo bez přídatku D-GalN.

Přídavek D-GalN k nesteatotickým hepatocytům měl za následek zvýšení aktivity exekutivní kaspázy 3, a to v přítomnosti 2,5 - 20 mM D-GalN. Nejvyšší použitá koncentrace D-GalN, 30 mmol/l, již nezvyšovala aktivitu tohoto enzymu apoptotické kaskády, ale soudě z LDH leakage poškození hepatocytů získávalo nekrotický charakter. Oproti tomu u steatotických hepatocytů nekrotické změny přicházely již v nižších koncentracích D-GalN a lišily se s ohledem na přítomnost PA. U steatotických hepatocytů, kde bylo ztukovatění indukováno pomocí olejové kyseliny, působil D-GalN nekrózu od 20 mM a u hepatocytů se steatózou navozenou kombinací OA:PA 3:1 byl LDH leakage zvýšený již od 5 mM koncentrace D-GalN. Dále jsme po přídatku 2,5 - 20 mM D-GalN ke steatotickým skupinám pozorovali vyšší LDH leakage, než tomu bylo u přídatku shodných koncentrací D-GalN k neztukovatěným hepatocytům. Navíc po přídatku 5 - 20 mM D-GalN k hepatocytům se steatózou navozenou pomocí samotné OA se zvýšil LDH leakage méně, než když byla jako steatogenní činidlo použita směs OA:PA 3:1. Tyto 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 (293).

Oxidační stres přispívá k rozvoji toxického účinku D-GalN (270, 272, 294). Steatotické hepatocyty mohou být citlivější k navození produkce ROS a lipoperoxidace působením D-GalN (293). V naší práci přídavek D-GalN do média k hepatocytům se steatózou navozenou pouze olejovou kyselinou nezvyšoval oproti nesteatotickým hepatocytům se stejným přídatkem D-GalN produkci ROS ani aktivitu kaspázy 3. Jiná situace byla ovšem v případě, kde byla jako steatogenní činidlo použita kombinace OA:PA. Po přídatku 2,5 - 10 mM D-GalN k těmto hepatocytům byla oproti nesteatotickým hepatocytům se stejným obsahem D-GalN zaznamenána vyšší produkce ROS. Po přídatku 2,5 mM D-GalN byla nalezena rovněž vyšší aktivita kaspázy 3. Zvýšená produkce ROS navozuje dysfunkci mitochondrií a MPTP (42). 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.

## **6.5. Hodnocení potenciálního protektivního účinku EGCG na rozvoj steatózy a lipotoxicity indukované mastnými kyselinami v primární kultuře hepatocytů**

Vzhledem k tomu, že naše výše uvedené výsledky i literární data poukazují na možnost zvýšené citlivosti steatotických hepatocytů na toxické poškození, dále nás zajímalo, může-li EGCG snížit rozvoj steatózy a popř. tlumit lipotoxický účinek. EGCG je používán k redukcí hmotnosti, má patrně vliv na snížení absorpce mastných kyselin ze střeva, podporuje oxidaci mastných kyselin a inhibuje syntázu mastných kyselin (295-298). 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, v koncentraci 2,5 a 5  $\mu\text{M}$  utlumil lipoperoxidaci. O tom, že EGCG je schopno snížit koncentraci lipidových volných radikálů a tím zastavit iniciační a propagační fázi lipoperoxidace, jsme se již v předchozí diskusi zmiňovali. Pokud EGCG vstoupí do lipidové dvojvrstvy, tento protektivní efekt se může projevit v cytoplazmatické membráně (271). Schopnost snížit oxidační stres účinkem EGCG byla zjištěna i na modelu dietou navozené NASH (299).

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 obsah TAG i akumulace Oil Red O v hepatocytech, nicméně k úplnému potlačení rozvoje steatózy nedošlo. Pokud byla použita PA, ať samostatně nebo ve směsi s OA, potlačení obsahu TAG v hepatocytech nebylo pozorováno. Tento výsledek není ve shodě s aktuálním nálezem jiných autorů (300), kteří prokázali vliv EGCG na snížení TAG v hepatocytech se steatózou indukovanou PA spojený s poklesem exprese proteinů SREBP-1c a FAS významnými v lipogenezi. Je však třeba vzít v úvahu, že účinek testovali na HepG2 linii a použili nižší koncentraci PA a vyšší koncentraci EGCG. Nález zvýšené autofagie účinkem 40  $\mu\text{M}$  EGCG a poklesu intracelulárních lipidů byl studován na u Huh7 linii. Významným faktorem pro zahájení autofagie byla popsána AMPK (AMP-aktivovaná proteinová kinasa), jejíž fosforylaci EGCG podporuje (301). Při hodnocení steatózy barvením neutrálních tuků s použitím Oil Red O jsme v naší práci po inkubaci s EGCG u kombinace OA:PA 3:1 zjistili snížení steatózy (s výjimkou 2,5  $\mu\text{M}$  EGCG), u skupiny PA bylo snížení pozorováno po 2,5  $\mu\text{M}$  EGCG ( $p < 0,01$ ).

V předchozí kapitole „Model steatózy indukovaný v primární kultuře hepatocytů pomocí kyseliny olejové a palmitové“ jsme dokumentovali, že při použití 0,5 mM roztoků mastných kyselin došlo k nejvýraznějšímu nárůstu obsahu TAG v hepatocytech po PA. V aktuálně diskutovaném pokusu byl po použití PA k indukci steatózy nalezen nižší obsah TAG ve srovnání s OA či kombinací OA:PA. Vliv by mohlo mít rozdílné načasování kultivace. Zatímco při zavádění modelu steatózy probíhal sběr vzorků po 24 hod. kultivace s matnými kyselinami, u stávajícího pokusu byla inkubace kultur 48-hodinová – prvních 24 hodin bez a po výměně média dalších 24 hodin s mastnými kyselinami. Mezi steatogenými činidly nebyl nalezen žádný rozdíl v akumulaci tuků barvitelných olejovou červení O. To svědčí o navozené steatóze v tomto 48-hodinovém uspořádání, avšak na rozdíl od 24-hodinové kultivace nedomnuje inkorporace PA do TAG. Jak jsme již zmiňovali u samotného modelu steatózy, k inkorporaci PA do TAG nemusí docházet tak efektivně jako v případě OA (208, 235).

V naší práci EGCG navodil zvýšení aktivity kaspázy 3 jak v nesteatotických, tak steatotických hepatocytech. Úroveň navýšení byla srovnatelná. V literatuře je popsán antiproliferativní a proapoptotický vliv EGCG na nádorové buňky (302-304). EGCG má v nádorových buňkách schopnost aktivovat kaspázy a působí inhibičně na aktivovaný NF- $\kappa$ B (304). EGCG také zvýšil expresi proapoptotického p53 a Bax (305). Informací o účinku EGCG na nenádorové hepatocyty v literatuře není mnoho (306, 307). V naší laboratoři byl však již dříve pozorován proapoptotický efekt EGCG na primárních kulturách hepatocytů potkana (308). V tomto případě bylo pozorováno statisticky významné zvýšení aktivity kaspázy 3 od 10  $\mu$ M EGCG, byly ale použity vyšší koncentrace EGCG (od 5 – 100  $\mu$ mol/l). Obdobný nálezn jsme zaznamenali i na hepatocytech potkana izolovaných po parciální hepatektomii a kontrolní laparotomii, které byly dále 24 hod. kultivovány s EGCG (309). K indukci apoptózy účinkem EGCG dochází pravděpodobně vnější cestou (310). 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. Je tak patrné, že problematika apoptózy navozené EGCG vyžaduje hlubší analýzu i s ohledem na experimentální podmínky.

**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. Na limitaci EGCG poukazuje proapoptotický efekt EGCG na neztukovatělých i steatotických hepatocytech potkana. Vliv EGCG na indukci apoptózy v nenádorových buňkách vyžaduje však bližší studium.



## **POUŽITÁ LITERATURA**

1. Červinková Z. Funkce jater. In: Ehrmann J, Hůlek P, kolektiv. *Hepatologie*. Praha: Grada Publishing a.s.; 2010. p. 25-37.
2. Brodanová M, Kordač V. *Klinická hepatologie*: Grada; 1993. 552 p.
3. Wu Z, Han M, Chen T, Yan W, Ning Q. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2010;30(6):782-94.
4. Mallat A, Lotersztajn S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. *American journal of physiology Cell physiology*. 2013;305(8):C789-99.
5. Krejsek J. Játra, zánět obranný a poškozující. In: Krejsek J, Andrýs C, Krčmová I, kolektiv. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon s.r.o.; 2016. p. 174-81.
6. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *Journal of cellular physiology*. 2007;213(2):286-300.
7. Rappaport AM. The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *The Anatomical record*. 1958;130(4):673-89.
8. Jungermann K, Katz N. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology*. 1982;2(3):385-95.
9. Jungermann K, Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev*. 1989;69(3):708-64.
10. Trávníčková E. Fyziologie krve. In: Trojan S, kolektiv. *Lékařská fyziologie*, 4 vydání. Praha: Grada; 2003. p. 111-56.
11. Schlitt HJ, Schäfers S, Deiwick A, Eckardt KU, Pietsch T, Ebell W, et al. Extramedullary erythropoiesis in human liver grafts. *Hepatology*. 1995;21(3):689-96.
12. Mourek J, Koudelová J. Fyziologie výživy. In: Trojan S, kolektiv. *Lékařská fyziologie*, 4 vydání. Praha: Grada; 2003. p. 391-417.
13. Grant DM. Detoxification pathways in the liver. *J Inher Metab Dis*. 1991;14(4):421-30.
14. Tolman KG, Dalpiaz AS. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Ther Clin Risk Manag*. 2007;3(6):1153-63.
15. Červinková Z, Šperl J. Toxické poškození jater. In: Ehrmann J, Hůlek P, kolektiv. *Hepatologie*. Praha: Grada Publishing a.s.; 2010. p. 365-72.
16. Kahl R. Toxic liver injury. In: McIntyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzetto M, Rodes J, editors. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. 2. Sec ed. Oxford: Oxford Medica Publications; 1992. p. 906-18.
17. Bunchorntavakul C, Reddy KR. Review article: herbal and dietary supplement hepatotoxicity. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2013;37(1):3-17.
18. Daly AK, Day CP. Genetic association studies in drug-induced liver injury. *Drug metabolism reviews*. 2012;44(1):116-26.
19. Andrade RJ, Lucena MI, Alonso A, Garcia-Cortes M, Garcia-Ruiz E, Benitez R, et al. HLA class II genotype influences the type of liver injury in drug-induced idiosyncratic liver disease. *Hepatology*. 2004;39(6):1603-12.
20. Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Experimental and molecular pathology*. 1968;9(2):279-90.
21. Keppler D, Fröhlich J, Reutter W, Wieland O, Decker K. Changes in uridine nucleotides during liver perfusion with D-galactosamine. *FEBS letters*. 1969;4(4):278-80.
22. Anukarahanonta T, Shinozuka H, Farber E. Inhibition of protein synthesis in rat liver by D-galactosamine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1973;5(2):481-91.
23. Cuesta E, Boada J, Calafell R, Perales JC, Roig T, Bermudez J. Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Critical care medicine*. 2006;34(3):807-14.
24. Siendones E, Jiménez-Gómez Y, Montero JL, Gómez-Díaz C, Villalba JM, Muntané J. PGE1 abolishes the mitochondrial-independent cell death pathway induced by D-galactosamine in primary culture of rat hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2005;20(1):108-16.
25. Lee WM. Acetaminophen toxicity: changing perceptions on a social/medical issue. *Hepatology*. 2007;46(4):966-70.

26. Ambade A, Mandrekar P. Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease. *Int J Hepatol*. 2012;2012:853175.
27. Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(5):723-38.
28. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014;20(25):8082-91.
29. Sid B, Verrax J, Calderon PB. Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. *Free radical research*. 2013;47(11):894-904.
30. Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of toxicology*. 2009;83(6):519-48.
31. Low TY, Leow CK, Salto-Tellez M, Chung MC. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *Proteomics*. 2004;4(12):3960-74.
32. Stankova P, Kucera O, Lotkova H, Rousar T, Endlicher R, Cervinkova Z. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2010;24(8):2097-103.
33. Kucera O, Lotková H, Kandár R, Hézová R, Muzáková V, Cervinková Z. The model of D-galactosamine-induced injury of rat hepatocytes in primary culture. *Acta Medica*. 2006;49(1):59-65.
34. Lee J, Park JS, Roh YS. Molecular insights into the role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Archives of pharmacal research*. 2019;42(11):935-46.
35. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2004;106(3):261-8.
36. Woolbright BL, Jaeschke H. Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(36):4985-93.
37. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(11):26087-124.
38. Kaplowitz N. Biochemical and Cellular Mechanisms of Toxic Liver Injury. *Semin Liver Dis*. 2002;22(2):137-44.
39. Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochemical pharmacology*. 2009;77(8):1303-15.
40. Červinková Z. Toxické poškození jater. *Postgraduální medicína*. 1999;2:20-3.
41. Ramachandran A, Visschers RGJ, Duan L, Akakpo JY, Jaeschke H. Mitochondrial dysfunction as a mechanism of drug-induced hepatotoxicity: current understanding and future perspectives. *J Clin Transl Res*. 2018;4(1):75-100.
42. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;46(6):821-31.
43. Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen Toxicity: Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives. *Gene Expr*. 2018;18(1):19-30.
44. Song BJ, Akbar M, Abdelmegeed MA, Byun K, Lee B, Yoon SK, et al. Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications. *Redox biology*. 2014;3:109-23.
45. Yan M, Zhu P, Liu HM, Zhang HT, Liu L. Ethanol induced mitochondria injury and permeability transition pore opening: role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;13(16):2352-6.
46. Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab*. 2004;30(2):121-38.
47. Liu W, Baker RD, Bhatia T, Zhu L, Baker SS. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(10):1969-87.
48. Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews*. 2012;44(1):88-106.
49. Pessayre D, Fromenty B, Berson A, Robin MA, Letteron P, Moreau R, et al. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug metabolism reviews*. 2012;44(1):34-87.

50. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free radical biology & medicine*. 2004;37(6):755-67.
51. Korge P, John SA, Calmettes G, Weiss JN. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex II. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(24):9896-905.
52. Jaeschke H, Ramachandran A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. *Journal of hepatology*. 2011;55(1):227-8.
53. Begrich K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of hepatology*. 2011;54(4):773-94.
54. Sunny NE, Bril F, Cusi K. Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2017;28(4):250-60.
55. Younes RN, Poggetti RS, Fontes B, Itinoshe MM, Yoshida VM, Carvalho ME, et al. Obstructive jaundice induces early depression of mitochondrial respiration in rat hepatocytes. *Acta Cir Bras*. 2007;22(4):251-4.
56. Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT, Wei YH. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *Journal of biomedical science*. 2003;10(2):170-8.
57. Wang G, Shen H, Rajaraman G, Roberts MS, Gong Y, Jiang P, et al. Expression and antioxidant function of liver fatty acid binding protein in normal and bile-duct ligated rats. *European journal of pharmacology*. 2007;560(1):61-8.
58. Nadanaciva S, Bernal A, Aggeler R, Capaldi R, Will Y. Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2007;21(5):902-11.
59. Nadanaciva S, Dykens JA, Bernal A, Capaldi RA, Will Y. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. *Toxicology and applied pharmacology*. 2007;223(3):277-87.
60. Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie: Triton*; 2001.
61. Adams DH, Ju C, Ramaiah SK, Uetrecht J, Jaeschke H. Mechanisms of immune-mediated liver injury. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2010;115(2):307-21.
62. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
63. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014:360438.
64. Štípek S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada; 2000. 320 p.
65. Badu-Boateng C, Naftalin RJ. Ascorbate and ferritin interactions: Consequences for iron release in vitro and in vivo and implications for inflammation. *Free radical biology & medicine*. 2019;133:75-87.
66. Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. Apoptosis and necrosis in the liver. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(2):977-1010.
67. Iorga A, Dara L, Kaplowitz N. Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(5).
68. Hirsova P, Ibrahim SH, Gores GJ, Malhi H. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *Journal of lipid research*. 2016;57(10):1758-70.
69. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology*. 1999;117(3):669-77.
70. Kahraman A, Barreyro FJ, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Akazawa Y, et al. TRAIL mediates liver injury by the innate immune system in the bile duct-ligated mouse. *Hepatology*. 2008;47(4):1317-30.
71. Corazza N, Badmann A, Lauer C. Immune cell-mediated liver injury. *Seminars in immunopathology*. 2009;31(2):267-77.

72. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, et al. Bid, Bax, and Lipids Cooperate to Form Supramolecular Openings in the Outer Mitochondrial Membrane. *Cell*. 2002;111(3):331-42.
73. Landes T, Martinou JC. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(4):540-5.
74. Jourdain A, Martinou JC. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(10):1884-9.
75. Nirmala JG, Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell biology and toxicology*. 2019.
76. Jouan-Lanhouet S, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Martin-Chouly C, Le Moigne-Muller G, Van Herreweghe F, et al. TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell death and differentiation*. 2012;19(12):2003-14.
77. Columbano A, Ledda-Columbano GM, Coni PP, Faa G, Liguori C, Santa Cruz G, et al. Occurrence of cell death (apoptosis) during the involution of liver hyperplasia. *Lab Invest*. 1985;52(6):670-5.
78. Adachi M, Suematsu S, Kondo T, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, et al. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet*. 1995;11(3):294-300.
79. Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS, et al. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Science signaling*. 2010;3(110):ra13.
80. Cavallucci V, D'Amelio M. Physiological and Pathological Role of Apoptosis. In: Cecconi F, D'Amelio M, editors. *Apoptosome: An up-and-coming therapeutical tool*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. p. 1-26.
81. Columbano A, Ledda-Columbano GM, Rao PM, Rajalakshmi S, Sarma DS. Occurrence of cell death (apoptosis) in preneoplastic and neoplastic liver cells. A sequential study. *Am J Pathol*. 1984;116(3):441-6.
82. Ochi M, Ohdan H, Mitsuta H, Onoe T, Tokita D, Hara H, et al. Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice. *Hepatology*. 2004;39(5):1321-31.
83. Ueno Y, Ishii M, Yahagi K, Mano Y, Kisara N, Nakamura N, et al. Fas-mediated cholangiopathy in the murine model of graft versus host disease. *Hepatology*. 2000;31(4):966-74.
84. Schungel S, Buitrago-Molina LE, Nalapareddy P, Lebofsky M, Manns MP, Jaeschke H, et al. The strength of the Fas ligand signal determines whether hepatocytes act as type 1 or type 2 cells in murine livers. *Hepatology*. 2009;50(5):1558-66.
85. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*. 1994;76(6):969-76.
86. Batey RG, Wang J. Molecular pathogenesis of T lymphocyte-induced liver injury in alcoholic hepatitis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2002;7:d1662-75.
87. Liu ZX, Han D, Gunawan B, Kaplowitz N. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 2006;43(6):1220-30.
88. Tagami A, Ohnishi H, Moriwaki H, Phillips M, Hughes RD. Fas-mediated apoptosis in acute alcoholic hepatitis. *Hepato-gastroenterology*. 2003;50(50):443-8.
89. Janssen HL, Higuchi H, Abdulkarim A, Gores GJ. Hepatitis B virus enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cytotoxicity by increasing TRAIL-R1/death receptor 4 expression. *Journal of hepatology*. 2003;39(3):414-20.
90. Badmann A, Keough A, Kaufmann T, Bouillet P, Brunner T, Corazza N. Role of TRAIL and the pro-apoptotic Bcl-2 homolog Bim in acetaminophen-induced liver damage. *Cell death & disease*. 2011;2:e171.
91. Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut*. 2007;56(8):1124-31.
92. Kinnally KW, Peixoto PM, Ryu SY, Dejean LM. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(4):616-22.
93. Halestrap AP, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1787(11):1402-15.

94. Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(12):2463-72.
95. Bettermann K, Hohensee T, Haybaeck J. Steatosis and steatohepatitis: complex disorders. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(6):9924-44.
96. Knolle PA. Involvement of the liver in the induction of CD8 T cell tolerance towards oral antigen. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 2006;44(1):51-6.
97. Lazaridis KN, LaRusso NF. The Cholangiopathies. *Mayo Clinic proceedings*. 2015;90(6):791-800.
98. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of toxicology*. 2013;87(8):1315-530.
99. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26 Suppl 1:173-9.
100. Lee JY, Hwang DH. The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors. *Molecules and cells*. 2006;21(2):174-85.
101. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(2):785-97.
102. Nolan JP. Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury--an idea whose time has come again. *Hepatology*. 1989;10(5):887-91.
103. Nolan JP. The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology*. 1975;69(6):1346-56.
104. Nolan JP, Camara DS. Intestinal endotoxins as co-factors in liver injury. *Immunological investigations*. 1989;18(1-4):325-37.
105. Machado MV, Cortez-Pinto H. Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(4).
106. Rószter T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:816460.
107. Aoyama T, Paik YH, Seki E. Toll-like receptor signaling and liver fibrosis. *Gastroenterology research and practice*. 2010;2010.
108. Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology*. 1998;28(6):1597-606.
109. Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, et al. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology*. 1998;28(6):1607-15.
110. Champion SN, Johnson R, Aleksunes LM, Goedken MJ, van Rooijen N, Scheffer GL, et al. Hepatic Mrp4 induction following acetaminophen exposure is dependent on Kupffer cell function. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2008;295(2):G294-304.
111. Furst SM, Luedke D, Gaw HH, Reich R, Gandolfi AJ. Demonstration of a cellular immune response in halothane-exposed guinea pigs. *Toxicology and applied pharmacology*. 1997;143(2):245-55.
112. Christen U, Burgin M, Gut J. Halothane metabolism: Kupffer cells carry and partially process trifluoroacetylated protein adducts. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;175(1):256-62.
113. Bird GL, Williams R. Detection of antibodies to a halothane metabolite hapten in sera from patients with halothane-associated hepatitis. *Journal of hepatology*. 1989;9(3):366-73.
114. Shi H, Shi A, Dong L, Lu X, Wang Y, Zhao J, et al. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2016;35(6):1366-73.
115. Brenner DA. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2009;120:361-8.
116. Bethanis SK, Theocharis SE. Leptin in the field of hepatic fibrosis: a pivotal or an incidental player? *Digestive diseases and sciences*. 2006;51(10):1685-96.

117. Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2012;143(3):765-76.e1-3.
118. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology*. 2003;38 Suppl 1:S38-53.
119. George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *Journal of hepatology*. 2003;39(5):756-64.
120. Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(28):4850-60.
121. Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, et al. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology*. 2005;41(5):1074-84.
122. Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A, et al. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;194(3):1044-50.
123. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International journal of experimental pathology*. 2006;87(1):1-16.
124. Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2012;27 Suppl 2:65-8.
125. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *Journal of hepatology*. 2006;45(3):429-38.
126. Chu AS, Diaz R, Hui JJ, Yanger K, Zong Y, Alpini G, et al. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2011;53(5):1685-95.
127. Pettinelli P, Obregón AM, Videla LA. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Hosp*. 2011;26(3):441-50.
128. Matsuzaka T, Shimano H. Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance. *Journal of diabetes investigation*. 2011;2(3):170-5.
129. Amacher DE. The mechanistic basis for the induction of hepatic steatosis by xenobiotics. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2011;7(8):949-65.
130. 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.
131. 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.
132. 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.
133. Durazzo M, Belci P, Collo A, Grisoglio E, Bo S. Focus on therapeutic strategies of nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Hepatol*. 2012;2012(9).
134. Kanuri G, Bergheim I. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):11963-80.
135. Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2009;19(4):291-302.
136. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-46.
137. Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2001;281(6):G1333-9.

138. Lopez AM, Hendrickson RG. Toxin-induced hepatic injury. *Emergency medicine clinics of North America*. 2014;32(1):103-25.
139. Guarino MP, Cocca S, Altomare A, Emerenziani S, Cicala M. Ursodeoxycholic acid therapy in gallbladder disease, a story not yet completed. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19(31):5029-34.
140. Xiang Z, Chen YP, Ma KF, Ye YF, Zheng L, Yang YD, et al. The role of ursodeoxycholic acid in non-alcoholic steatohepatitis: a systematic review. *BMC gastroenterology*. 2013;13:140.
141. Dooley JS, Lok A, Burroughs AK, Heathcote J. *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*: Wiley; 2011.
142. Lieber CS, DeCarli LM, Mak KM, Kim CI, Leo MA. Attenuation of alcohol-induced hepatic fibrosis by polyunsaturated lecithin. *Hepatology*. 1990;12(6):1390-8.
143. Katuscak I, Hendrich F, Vldar L, Valentik M, Horakova M, Lauko L. [Essential phospholipids in the treatment of alcohol-induced steatosis and hepatitis]. *Casopis lekaru ceskych*. 1988;127(18):556-9.
144. Holoman J, Glasa J, Hlavaty I, Veningerova M, Prachar V, Lukacsova M. [Positive effects of essential phospholipids and improvement of life style in patients with toxic liver injury]. *Bratislavske lekarske listy*. 1998;99(2):75-81.
145. Jenkins PJ, Portmann BP, Eddleston AL, Williams R. Use of polyunsaturated phosphatidyl choline in HBsAg negative chronic active hepatitis: results of prospective double-blind controlled trial. *Liver*. 1982;2(2):77-81.
146. Visco G. [Polyunsaturated phosphatidylcholine in association with vitamin B complex in the treatment of acute viral hepatitis B. Results of a randomized double-blind clinical study]. *La Clinica terapeutica*. 1985;114(3):183-8.
147. Kalab M, Cervinka J. [Essential phospholipids in the treatment of liver cirrhosis]. *Casopis lekaru ceskych*. 1983;122(9):266-9.
148. Brůha R. Hepatoprotektivní látky v běžné praxi. *Remedia : farmakoterapeutický dvouměsíčník pro lékaře a farmaceuty*. 2011;21(5):376-9.
149. Pietrangelo A, Borella F, Casalgrandi G, Montosi G, Ceccarelli D, Gallesi D, et al. Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology*. 1995;109(6):1941-9.
150. Tuchweber B, Sieck R, Trost W. Prevention of silybin of phalloidin-induced acute hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*. 1979;51(2):265-75.
151. Faulstich H, Jahn W, Wieland T. Silybin inhibition of amatoxin uptake in the perfused rat liver. *Arzneimittel-Forschung*. 1980;30(3):452-4.
152. Lotkova H, Cervinkova Z, Kucera O. S-adenosylmethionin a játra. *Folia Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(4):150-6.
153. Cederbaum AI. Hepatoprotective effects of S-adenosyl-L-methionine against alcohol- and cytochrome P450 2E1-induced liver injury. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2010;16(11):1366-76.
154. Stramentinoli G, Di Padova C, Gualano M, Rovagnati P, Galli-Kienle M. Ethynylestradiol-induced impairment of bile secretion in the rat: protective effects of S-adenosyl-L-methionine and its implication in estrogen metabolism. *Gastroenterology*. 1981;80(1):154-8.
155. Galan AI, Munoz ME, Jimenez R. S-Adenosylmethionine protects against cyclosporin A-induced alterations in rat liver plasma membrane fluidity and functions. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1999;290(2):774-81.
156. Chawla RK, Watson WH, Eastin CE, Lee EY, Schmidt J, McClain CJ. S-adenosylmethionine deficiency and TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced hepatic injury. *The American journal of physiology*. 1998;275(1 Pt 1):G125-9.
157. Bray GP, Tredger JM, Williams R. S-adenosylmethionine protects against acetaminophen hepatotoxicity in two mouse models. *Hepatology*. 1992;15(2):297-301.
158. Wu J, Soderbergh H, Karlsson K, Danielsson A. Protective effect of S-adenosyl-L-methionine on bromobenzene- and D-galactosamine-induced toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology*. 1996;23(2):359-65.
159. McClain CJ, Hill DB, Song Z, Chawla R, Watson WH, Chen T, et al. S-Adenosylmethionine, cytokines, and alcoholic liver disease. *Alcohol*. 2002;27(3):185-92.

160. Lu SC, Tsukamoto H, Mato JM. Role of abnormal methionine metabolism in alcoholic liver injury. *Alcohol*. 2002;27(3):155-62.
161. Lu SC, Martinez-Chantar ML, Mato JM. Methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in alcoholic liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2006;21 Suppl 3:S61-4.
162. Song Z, McClain CJ, Chen T. S-Adenosylmethionine protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmacology*. 2004;71(4):199-208.
163. 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.
164. 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.
165. Frezza M, Surrenti C, Manzillo G, Fiaccadori F, Bortolini M, Di Padova C. Oral S-adenosylmethionine in the symptomatic treatment of intrahepatic cholestasis. A double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology*. 1990;99(1):211-5.
166. Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, et al. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut*. 2002;50(2):241-7.
167. Akriyadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1637-48.
168. De BK, Gangopadhyay S, Dutta D, Baksi SD, Pani A, Ghosh P. Pentoxifylline versus prednisolone for severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled trial. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009;15(13):1613-9.
169. Li W, Zheng L, Sheng C, Cheng X, Qing L, Qu S. Systematic review on the treatment of pentoxifylline in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids in health and disease*. 2011;10:49.
170. Farghali H, Canova NK, Zakhari S. Hepatoprotective properties of extensively studied medicinal plant active constituents: possible common mechanisms. *Pharmaceutical biology*. 2015;53(6):781-91.
171. Jaeschke H. Herbal extracts as hepatoprotectants against acetaminophen hepatotoxicity. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(19):2448.
172. Mereles D, Hunstein W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: more pitfalls than promises? *International journal of molecular sciences*. 2011;12(9):5592-603.
173. 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.
174. Eng QY, Thanikachalam PV, Ramamurthy S. Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *J Ethnopharmacol*. 2018;210:296-310.
175. 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.
176. Marinovic MP, Morandi AC, Otton R. Green tea catechins alone or in combination alter functional parameters of human neutrophils via suppressing the activation of TLR-4/NFkappaB p65 signal pathway. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2015;29(7):1766-78.
177. Liu D, Perkins JT, Hennig B. EGCG prevents PCB-126-induced endothelial cell inflammation via epigenetic modifications of NF-κB target genes in human endothelial cells. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2016;28:164-70.
178. Lee SJ, Jia Y. The effect of bioactive compounds in tea on lipid metabolism and obesity through regulation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Current opinion in lipidology*. 2015;26(1):3-9.
179. Zeilinger K, Freyer N, Damm G, Seehofer D, Knöspel F. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental biology and medicine*. 2016;241(15):1684-98.



180. Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ, Grivell MB. *Isolated Hepatocytes: Preparation, Properties and Applications*: Elsevier; 1991. 460 p.
181. Kučera O, Lotková H, Křiváková P, Roušar T, Červinková Z. Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro. *Cesk Fysiol*. 2006;55(3):103-10.
182. 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.
183. Červinková Z, Lotková H, Kučera O, Drahotka Z, Houšťek J. Hodnocení energetického metabolismu izolovaných hepatocytů pomocí oxygrafie. *Acta Medica*. 2002;45(Suppl 1):65-76.
184. 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.
185. 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.
186. LeCluyse EL, Bullock PL, Parkinson A, Hochman JH. Cultured rat hepatocytes. *Pharmaceutical biotechnology*. 1996;8:121-59.
187. De Bruyn T, Chatterjee S, Fattah S, Keemink J, Nicolai J, Augustijns P, et al. Sandwich-cultured hepatocytes: utility for in vitro exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2013;9(5):589-616.
188. Hamilton GA, Jolley SL, Gilbert D, Coon DJ, Barros S, LeCluyse EL. Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell Tissue Res*. 2001;306(1):85-99.
189. Treyer A, Müsch A. Hepatocyte polarity. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(1):243-87.
190. Grant MH, Melvin MA, Shaw P, Melvin WT, Burke MD. Studies on the maintenance of cytochromes P-450 and b5, monooxygenases and cytochrome reductases in primary cultures of rat hepatocytes. *FEBS letters*. 1985;190(1):99-103.
191. Hamilton GA, Westmorel C, George AE. Effects of medium composition on the morphology and function of rat hepatocytes cultured as spheroids and monolayers. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2001;37(10):656-67.
192. Skett P. Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism/metabolism-based toxicity testing-Solutions? *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 1994;8(3):491-504.
193. Skett P, Bayliss M. Time for a consistent approach to preparing and culturing hepatocytes? *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 1996;26(1):1-7.
194. Papeleu P, Elaut G, Rogiers V, Vanhaecke T. Cell cultures as in vitro tools for biotransformation studies. . In: Pandalai SG, editor. *Recent research developments in drug Kerala: Transworld Research Network*; 2002.
195. 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.
196. 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.
197. Lauschke VM, Shafagh RZ, Hendriks DFG, Ingelman-Sundberg M. 3D Primary Hepatocyte Culture Systems for Analyses of Liver Diseases, Drug Metabolism, and Toxicity: Emerging Culture Paradigms and Applications. *Biotechnol J*. 2019;14(7):e1800347.
198. 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.
199. 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.
200. 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.

201. 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.
202. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(17):12093-101.
203. 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.
204. Tang Y, Bian Z, Zhao L, Liu Y, Liang S, Wang Q, et al. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and experimental immunology.* 2011;166(2):281-90.
205. Niklas J, Bonin A, Mangin S, Bucher J, Kopacz S, Matz-Soja M, et al. Central energy metabolism remains robust in acute steatotic hepatocytes challenged by a high free fatty acid load. *BMB reports.* 2012;45(7):396-401.
206. 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.
207. 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.
208. 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.
209. 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.
210. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in cell biology.* 1976;13:29-83.
211. Guillouzo A. Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect.* 1998;106(Suppl 2):511-32.
212. Wyllie A, Donahue V, Fischer B, Hill D, Keeseey J, Manzow S. Apoptosis and cell proliferation. 2 ed. Mannheim Germany: Roche Molecular Biochemicals; 1998. 142 p.
213. Fenaille F, Mottier P, Turesky RJ, Ali S, Guy PA. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *Journal of chromatography A.* 2001;921(2):237-45.
214. 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.
215. 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.
216. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry.* 1976;74(1):214-26.
217. 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.
218. 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.
219. 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.
220. den Braver-Sewradj SP, den Braver MW, Vermeulen NP, Commandeur JN, Richert L, Vos JC. Inter-donor variability of phase I/phase II metabolism of three reference drugs in cryopreserved primary human hepatocytes in suspension and monolayer. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA.* 2016;33:71-9.
221. 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.

222. 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.
223. 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.
224. Berry MN, Edwards AM. *The Hepatocyte Review*: Kluwer Academic Publishers; 2000. 605 p.
225. Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1989;3(2):174-7.
226. 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.
227. Rogiers V, Vandenberghe Y, Callaerts A, Verleye G, Cornet M, Mertens K, et al. Phase I and phase II xenobiotic biotransformation in cultures and co-cultures of adult rat hepatocytes. *Biochemical pharmacology*. 1990;40(8):1701-6.
228. Coecke S, Mertens K, Segaert A, Callaerts A, Vercruyse A, Rogiers V. Spectrophotometric measurement of flavin-containing monooxygenase activity in freshly isolated rat hepatocytes and their cultures. *Analytical biochemistry*. 1992;205(2):285-8.
229. McMillan JM, Shaddock JG, Casciano DA, Arlotto MP, Leakey JE. Differential stability of drug-metabolizing enzyme activities in primary rat hepatocytes, cultured in the absence or presence of dexamethasone. *Mutation research*. 1991;249(1):81-92.
230. 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.
231. 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.
232. Mantzaris MD, Tsianos EV, Galaris D. Interruption of triacylglycerol synthesis in the endoplasmic reticulum is the initiating event for saturated fatty acid-induced lipotoxicity in liver cells. *The FEBS journal*. 2011;278(3):519-30.
233. Rogue A, Antherieu S, Vluggens A, Umbdenstock T, Claude N, de la Moureyre-Spire C, et al. PPAR agonists reduce steatosis in oleic acid-overloaded HepaRG cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014;276(1):73-81.
234. Swagell CD, Henly DC, Morris CP. Expression analysis of a human hepatic cell line in response to palmitate. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;328(2):432-41.
235. 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.
236. 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.
237. 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.
238. Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1801(3):299-310.
239. 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.
240. 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.

241. 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.
242. Zhang Y, Xue R, Zhang Z, Yang X, Shi H. Palmitic and linoleic acids induce ER stress and apoptosis in hepatoma cells. *Lipids in health and disease*. 2012;11:1.
243. Belosludtsev K, Saris NE, Andersson LC, Belosludtseva N, Agafonov A, Sharma A, et al. On the mechanism of palmitic acid-induced apoptosis: the role of a pore induced by palmitic acid and Ca<sup>2+</sup> in mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2006;38(2):113-20.
244. Belosludtsev KN, Belosludtseva NV, Agafonov AV, Astashev ME, Kazakov AS, Saris NE, et al. Ca(2+)-dependent permeabilization of mitochondria and liposomes by palmitic and oleic acids: a comparative study. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1838(10):2600-6.
245. 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.
246. 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.
247. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(6):3077-82.
248. Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, Kohno S, et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *Journal of hepatology*. 2010;52(4):586-93.
249. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, et al. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2006;43(1):163-72.
250. Wang PX, Ji YX, Zhang XJ, Zhao LP, Yan ZZ, Zhang P, et al. Targeting CASP8 and FADD-like apoptosis regulator ameliorates nonalcoholic steatohepatitis in mice and nonhuman primates. *Nature medicine*. 2017;23(4):439-49.
251. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, et al. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134(2):568-76.
252. Cazanave SC, Mott JL, Elmi NA, Bronk SF, Werneburg NW, Akazawa Y, et al. JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipoapoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(39):26591-602.
253. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(12):8469-78.
254. Kim BJ, Ryu SW, Song BJ. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(30):21256-65.
255. 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.
256. 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.
257. 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.
258. Mahmoud Mona F FA, Auf Marwa A. Evaluation of the hepatoprotective effect of green tea extract and selenium on CCL4-induced fibrosis. *e-SPEN2012*. p. e23-e9.
259. 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.
260. Lambert JD, Kennett MJ, Sang S, Reuhl KR, Ju J, Yang CS. Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2010;48(1):409-16.

261. Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E, Davidovich A, Bausch J. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2006;44(5):636-50.
262. 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.
263. Lambert JD, Lee MJ, Lu H, Meng X, Hong JJ, Seril DN, et al. Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. *The Journal of nutrition*. 2003;133(12):4172-7.
264. Cai Y, Anavy ND, Chow HH. Contribution of presystemic hepatic extraction to the low oral bioavailability of green tea catechins in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2002;30(11):1246-9.
265. Lambert JD, Lee MJ, Diamond L, Ju J, Hong J, Bose M, et al. Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human colon cancer cells and mouse plasma and tissues. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2006;34(1):8-11.
266. Goodin MG, Bray BJ, Rosengren RJ. Sex- and strain-dependent effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and epicatechin gallate (ECG) in the mouse. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2006;44(9):1496-504.
267. 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.
268. 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.
269. 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.
270. 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.
271. Saffari Y, Sadrzadeh SM. Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life sciences*. 2004;74(12):1513-8.
272. 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.
273. 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.
274. 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.
275. 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.
276. 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.
277. 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.

278. Keppler D RJ, Bischoff E, Decker K. The trapping of uridine phosphates by D-galactosamine, D-glucosamine and 2-deoxy-D-galactose. A study of the mechanism of galactosamine hepatitis. *Eur J Biochem.* 1970;17:246-53.
279. 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.
280. 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.
281. 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.
282. 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.
283. 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.
284. 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.
285. Fromenty B. Drug-induced liver injury in obesity. *Journal of hepatology.* 2013;58(4):824-6.
286. Gambino R, Musso G, Cassader M. Redox balance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling.* 2011;15(5):1325-65.
287. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free radical biology & medicine.* 2004;37(9):1499-507.
288. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2012;18(8):727-35.
289. Berthiaume F, Barbe L, Mokuno Y, MacDonald AD, Jindal R, Yarmush ML. Steatosis reversibly increases hepatocyte sensitivity to hypoxia-reoxygenation injury. *The Journal of surgical research.* 2009;152(1):54-60.
290. Garnol T, Endlicher R, Kucera O, Drahota Z, Cervinkova Z. Impairment of mitochondrial function of rat hepatocytes by high fat diet and oxidative stress. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* 2014;63(2):271-4.
291. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology.* 2001;33(4):808-15.
292. Kon K, Ikejima K, Okumura K, Arai K, Aoyama T, Watanabe S. Diabetic KK-A(y) mice are highly susceptible to oxidative hepatocellular damage induced by acetaminophen. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2010;299(2):G329-37.
293. 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.
294. 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.
295. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *The Journal of nutrition.* 2008;138(9):1677-83.
296. Klaus S, Pultz S, Thone-Reineke C, Wolfram S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *International journal of obesity (2005).* 2005;29(6):615-23.
297. Wang X, Tian W. Green tea epigallocatechin gallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase. *Biochemical and biophysical research communications.* 2001;288(5):1200-6.

298. Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2003;14(6):326-32.
299. 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.
300. 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.
301. 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.
302. 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.
303. 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.
304. 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.
305. 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.
306. 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).
307. 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.
308. 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.
309. 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.
310. Abou El Naga RN, Azab SS, El-Demerdash E, Shaarawy S, El-Merzabani M, Ammar el SM. Sensitization of TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by phytochemicals. *Life sciences*. 2013;92(10):555-61.