

ABSTRAKT

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 přísadků kyseliny olejové (OA), palmitové (PA) a jejich směsí do kultivačního média. V primární kultuře potkaních hepatocytů v *monolayeru* může každá z obou použitých mastných kyselin navodit signifikantní zvýšení obsahu triacylglycerolů (TAG), které je však v případě PA provázeno výrazným cytotoxickým (lipotoxickým) účinkem. Použití 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.