

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



**Role Nrf2 u vybraných modelů poškození jater**

**Vojtěch Mezera**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program**  
*Fyziologie a patologická fyziologie*

**Hradec Králové**

**2015**

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

Autor: MUDr. Vojtěch Mezera  
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Školitel: Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.  
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Oponenti:  
Doc. MUDr. Radan Brůha, CSc.  
IV. interní klinika - klinika gastroenterologie a hepatologie, 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové a Všeobecná fakultní nemocnice  
U Nemocnice 2, 128 08, Praha 2

prof. MUDr. Jiří Ehrmann, PhD.  
přednosta Ústavu histologie a embryologie, Laboratoř molekulární patologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci  
Tř. Svobody 8, 771 26 Olomouc

Tato práce vznikla za podpory Vnitřního grantu Lékařské fakulty, dále grantů GA UK 668512, PRVOUK P37/02, SVV-2013-266901 a SVV-2014-260058.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Fyziologie a patologická fyziologie

# 1. Obsah

<b>2. SOUHRN</b> .....	<b>4</b>
<b>3. SUMMARY</b> .....	<b>5</b>
<b>4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY</b> .....	<b>6</b>
4.1 OXIDAČNÍ STRES .....	6
4.1.1. <i>Oxidační stres při toxickém poškození jater</i> .....	6
4.1.2. <i>Oxidační stres u ischemicko-reperfúzního poškození</i> .....	6
4.1.3. <i>Regenerace jater po parciální hepatektomii</i> .....	6
4.1.4. <i>Oxidační stres u nealkoholického ztukovatění jater (NAFLD)</i> .....	7
4.2 ANTIOXIDANTY.....	7
4.2.1. <i>Přímo působící antioxidanty</i> .....	7
4.2.2. <i>Nrf2 a nepřímo působící antioxidanty</i> .....	8
4.2.3. <i>Epigalokatechingalát</i> .....	8
4.3 VLIV GENOTYPU NA JÁTRA .....	8
4.3.1. <i>Role Nrf2</i> .....	8
4.3.2. <i>Apolipoprotein E a Nrf2</i> .....	8
<b>5. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
5.1. ČÁST PRVNÍ: VLIV EPIGALOKATECHINGALÁTU NA JÁTRA .....	9
5.2. ČÁST DRUHÁ: VLIV GENOTYPU APOLIPOPROTEINU E NA HEPATOTOXICITU.....	9
<b>6. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>9</b>
6.1. ČÁST PRVNÍ: VLIV EPIGALOKATECHINGALÁTU NA JÁTRA .....	9
6.1.1. <i>Protokol experimentu in vivo</i> .....	9
6.1.2. <i>Protokol experimentu in vitro</i> .....	11
6.2. ČÁST DRUHÁ: VLIV GENOTYPU APOLIPOPROTEINU E NA HEPATOTOXICITU.....	11
6.2.1. <i>Protokol experimentu in vitro</i> .....	11
<b>7. VÝSLEDKY</b> .....	<b>12</b>
7.1. ČÁST PRVNÍ: VLIV EPIGALOKATECHINGALÁTU NA JÁTRA .....	12
7.1.1. <i>Výsledky experimentu in vivo</i> .....	12
7.1.2. <i>Výsledky experimentu in vitro</i> .....	14
7.2. ČÁST DRUHÁ: VLIV GENOTYPU APOLIPOPROTEINU E NA HEPATOTOXICITU.....	16
7.2.1. <i>Výsledky experimentu in vitro</i> .....	16
<b>8. DISKUZE</b> .....	<b>17</b>
8.1. ČÁST PRVNÍ: VLIV EPIGALOKATECHINGALÁTU NA JÁTRA .....	17
8.2. ČÁST DRUHÁ: VLIV GENOTYPU APOLIPOPROTEINU E NA HEPATOTOXICITU.....	18
<b>9. ZÁVĚRY</b> .....	<b>18</b>
9.1. ČÁST PRVNÍ: VLIV EPIGALOKATECHINGALÁTU NA JÁTRA .....	18
9.2. ČÁST DRUHÁ: VLIV GENOTYPU APOLIPOPROTEINU E NA HEPATOTOXICITU.....	19
<b>10. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
<b>PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI</b> .....	<b>23</b>

## 2. Souhrn

### Role Nrf2 u vybraných modelů poškození jater

Oxidační stres provází řadu typů poškození jater, včetně jaterní resekce a toxického poškození jater. Dvoutřetinová parciální hepatektomie (PHx) je zavedený model pro studium regenerace jater po resekci. Sledovali jsme vliv epigalokatechingalátu (EGCG), antioxidantu ze zeleného čaje, na časnou fázi regenerace jater po PHx. Samcům potkanů kmene Wistar jsme aplikovali tři dny po sobě vodu pro injekce nebo EGCG, poté potkani podstoupili laparotomii nebo PHx. Zjistili jsme nižší inkorporaci bromdeoxyuridinu, což poukazuje na nižší syntézu DNA, u hepatektomovaných potkanů dostávajících EGCG v dávce 50 mg/kg než u potkanů dostávajících vodu. Aktivita kaspáz 3/7, exprese p-p53 a hladiny tkáňového IL-6 vykazovaly obdobný trend. EGCG v dávce 20 mg/kg tyto účinky neměl.

Další potkaní samci kmene Wistar podstoupili PHx nebo laparotomii. 24 hodin od výkonu byly izolovány hepatocyty a vystaveny různým koncentracím EGCG po dobu 24 hodin. Morfologická kritéria, testy buněčné viability a syntéza albuminu prokázaly toxicitu EGCG od koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$ . Syntéza DNA byla vyšší v hepatocytech izolovaných z potkanů po PHx a inhibována EGCG. Dále jsme zjistili, že EGCG zvyšoval aktivitu kaspáz 3 a 7, zejména v hepatocytech z potkanů po PHx.

Ve druhé části naší studie jsme se zabývali souvislostí mezi genotypem apolipoproteinu E (ApoE) a náchylností myších hepatocytů k toxicitě acetaminofenu (APAP). Nedávno byla popsána rozdílná exprese Nrf2 u myší s genotypy ApoE3 a ApoE4. Nrf2 je transkripční faktor důležitý pro zmírnění oxidačního stresu v játrech a dalších orgánech, a detoxikaci hepatotoxických látek včetně APAP. Porovnávali jsme toxicitu APAP na primární kulturu hepatocytů izolovaných z transgenních myší s lidskou alelou ApoE3 nebo ApoE4 nebo z wild-type (WT) myší. APAP vedl k toxicitě, která byla na dávce závislá ve všech testovaných kmenech. Toxicita byla nejméně vyjádřená u WT myší a nejvíce u ApoE3 myší. Zároveň jsme pozorovali pokles mitochondriálního membránového potenciálu, zejména v případě ApoE3 hepatocytů. Tvorba reaktivních forem kyslíku po 24hodinové inkubaci s 2,5 mmol/l APAP vykazovala nejvyšší nárůst u hepatocytů z ApoE3 myší. Kaspázy 3 a 7 nebyly aktivované expozicí APAP. U hepatocytů z obou transgenních kmenů jsme zjistili akumulaci lipidů, která byla vyšší než u WT kontrol. Exprese Nrf2-dependentních genů byla vyšší u ApoE3 než u ApoE4 hepatocytů.

### 3. Summary

#### The role of Nrf2 in selected models of liver injury

Oxidative stress accompanies various forms of liver injury, including liver resection and toxic liver injury. Two-thirds partial hepatectomy (PHx) is an established model for the study of liver regeneration after resection. We tested the effect of epigallocatechin gallate (EGCG), a green tea antioxidant, on the early phase of liver regeneration after PHx. Male Wistar rats received either water for injections or EGCG for 3 consecutive days and then were subjected either to laparotomy or hepatectomy. We observed a lower accumulation of bromodeoxyuridine pointing to lower DNA synthesis in hepatectomized rats receiving EGCG in a dose of 50 mg/kg than in hepatectomized rats treated with water. The activity of caspases 3/7, expression of p-p53 and tissue levels of IL-6 displayed a similar trend. EGCG in a dose of 20 mg/kg had no such effects.

Next, male Wistar rats were subjected either to PHx or laparotomy. Twenty-four hours after the surgery, hepatocytes were isolated and treated with various concentrations of EGCG for 24 h. Morphological criteria, cell viability tests, and albumin synthesis revealed toxicity starting at 10  $\mu$ mol/L. DNA synthesis was higher in hepatocytes isolated from rats after PHx and inhibited by EGCG. Furthermore, EGCG increased the activity of caspases 3 and 7, more in hepatocytes from rats after PHx.

In the second part of our study, we investigated the association between apolipoprotein E (ApoE) genotype and susceptibility of mice hepatocytes to the toxicity of acetaminophen (APAP). Recently, an association between ApoE genotype and Nrf2 expression was described. Nrf2 is a transcription factor, important for combating oxidative stress in the liver and other organs and detoxification of hepatotoxic drugs, including APAP. We compared the toxicity of APAP on primary culture hepatocytes isolated from transgenic mice carrying two different human ApoE alleles, ApoE3 or ApoE4, and wild-type (WT) controls. APAP led to a dose-dependent hepatotoxicity in all strains tested, least in WT mice and most in ApoE3 mice. Concurrently, there was a decline in mitochondrial membrane potential, especially in ApoE3 hepatocytes. The formation of reactive oxygen species after 24 hour incubation with 2.5 mM APAP was most increased in hepatocytes of the ApoE3 genotype. Caspases 3 and 7 were not activated upon APAP treatment. We observed higher lipid accumulation in hepatocytes isolated from both transgenic strains than in WT controls. The expression of Nrf2-dependent genes was higher in ApoE3 than in ApoE4 hepatocytes.

## 4. Úvod do problematiky

### 4.1 Oxidační stres

Oxidační stres je souhrn dějů, které se odehrávají v důsledku působení volných kyslíkových radikálů, též označovaných jako reaktivní formy kyslíku (ROS). Obecně se pod tímto pojmem myslí působení nepříznivé, vedoucí k poškození makromolekul a poškození až smrti buněk (Hayes a McLellan, 1999, Maiese et al., 2010, Knight et al., 2001).

ROS zahrnují zejména superoxidový radikál, hydroxylový radikál a peroxid vodíku. Tyto reaktivní částice vznikají v buňkách kontinuálně jako důsledek přenosu elektronů v mitochondriích. Dále mohou ROS vznikat činností některých enzymů nebo jako důsledek metabolické přeměny tělu cizích látek prostřednictvím cytochromu P450, či působením vlivů prostředí jako jsou velké množství solí železa či UV záření (Hayes a McLellan, 1999, Wallace, 2005). Ačkoliv je tedy kyslík nezbytný pro efektivní tvorbu ATP, je rovněž potenciálně toxický (Halliwell, 2001).

#### 4.1.1. Oxidační stres při toxickém poškození jater

Jak bylo uvedeno výše, mohou reaktivní formy kyslíku vznikat při biotransformaci cizorodých látek (Hayes a McLellan, 1999). Oxidační stres hraje významnou roli v toxicitě mnoha látek a je zde považován za příčinu i následek poškození (Jaeschke et al., 2002).

Toxické poškození jater může být sledováno v modelech *in vitro* (Merrill et al., 2002, Stankova et al., 2010) či *in vivo* (Kucera et al., 2011, Kucera et al., 2012b, Chilakapati et al., 2007).

Mezi hepatotoxické látky, kde hraje oxidační stres roli v jaterním poškození, patří acetaminofen, též zvaný paracetamol (Jaeschke et al., 2003a, Jaeschke et al., 2003b), galaktosamin (Liu et al., 2013, Abe et al., 2005) a thioacetamid (Kucera et al., 2011, Pallottini et al., 2006).

Toxicita zprostředkovaná oxidačním stresem může být snížena aktivací transkripčního faktoru Nrf2, jak bylo doloženo pracemi s jeho indukci na podkladě genetické modifikace (Mobasher et al., 2013, Ni et al., 2012b, Liu et al., 2013) či farmakologicky (Reisman et al., 2009a, Kwak a Kensler, 2010).

#### 4.1.2. Oxidační stres u ischemicko-reperfučního poškození

Oxidační stres hraje rovněž roli v rozvoji ischemicko-reperfučního poškození. Uzávěr cév, který se používá při jaterních resekcích k prevenci krvácení, způsobuje ischemicko-reperfuční poškození. Ischémie vede k poklesu koncentrace nitrobuněčného ATP, selhání Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPázy, zvětšení objemu buněk a nahromadění nitrobuněčného vápníku. Reperfuze v játrech pak zvyšuje poškození buněk prostřednictvím oxidačního stresu a zánětlivé reakce (Bahde a Spiegel, 2010, Jaeschke a Lemasters, 2003).

#### 4.1.3. Regenerace jater po parciální hepatektomii

Játra mají unikátní schopnost regenerovat po odstranění jejich části. Hepatocyty mají za normálních podmínek nízkou proliferační aktivitu a dlouhou životnost. Po parciální hepatektomii jsou však schopny proliferovat a vykonat jedno nebo více synchronizovaných buněčných dělení, než se vrátí do klidového stavu, za současného zachování své funkce (Yamada et al., 1997, Michalopoulos, 2007). Velkou výhodou parciální hepatektomie jako

modelu pro studium regenerační odpovědi je to, že po chirurgickém odstranění příslušných jaterních laloků zůstává zbylá jaterní tkáň nepoškozená. Na rozdíl od modelů toxických poškození jater není v případě regenerace po PHx přítomno poškození tkáně a zánětlivá reakce, navíc je začátek regenerace přesně definován časem odstranění laloků. Na rozdíl od jiných orgánů schopných regenerace, jako je kůže a kostní dřev, nejsou játra závislá na kmenových nebo progenitorových buňkách. Místo toho dochází k proliferaci všech diferencovaných buněk: v první řadě hepatocytů, ale také epitelii žlučových kanálků, sinusoidálních endotelií, Kupfferových buněk a Itoových buněk (též nazývaných hvězdicové buňky) (Michalopoulos, 2014).

Regenerace jater sama o sobě byla shledána jako stav zvýšené tvorby ROS (Han et al., 2006, Frances et al., 2007, Ronco et al., 2002). Nadměrné zvýšení oxidačního stresu, které nastalo u myši s knockoutem genu pro transkripční faktor Nrf2, vedlo k významnému zpomalení jaterní regenerace. Mechanismem tohoto zpomalení je rezistence na inzulin a inzulinu podobný růstový faktor IGF-1 (Beyer et al., 2008). Vliv antioxidantů na regeneraci jater po parciální hepatektomii zůstává kontroverzní: někteří autoři popsali urychlenou regeneraci jater po parciální hepatektomii (Ronco et al., 2002, Kimura et al., 2010, Uzun et al., 2009). Některé antioxidanty popř. hepatoprotektiva však vykazovaly inhibiční efekt, jak bylo ukázáno ve studiích s resveratolem (Kirimlioglu et al., 2008), kurkuminem (Seehofer et al., 2010) a S-adenosylmethioninem (Kohoutek et al., 2010).

#### **4.1.4. Oxidační stres u nealkoholického ztukovatění jater (NAFLD)**

Nealkoholové ztukovatění jater (NAFLD, z anglického non-alcoholic fatty liver disease) patří mezi nejrozšířenější nemoci jater, zejména v rozvinutých zemích. NAFLD zahrnuje široké spektrum postižení jater od prosté steatózy přes nealkoholovou steatohepatitidu (NASH), fibrózu až po jaterní cirhózu. Patogeneze NAFLD není zcela objasněna, ale oxidační stres zde hraje významnou roli (Gambino et al., 2011). Mezi možné mechanismy zvýšené tvorby ROS u NAFLD patří nedostatek mitochondriální ATP-syntázy a nízký obsah redukovaného glutathionu (GSH) v intramitochondriálním kompartmentu (Vendemiale et al., 2001).

## **4.2 Antioxidanty**

Reaktivní formy kyslíku jsou tvořeny v malém množství i za fyziologických podmínek a jsou vychytávány endogenním antioxidačním systémem. Ten zahrnuje enzymy superoxidodismutázu (SOD), glutathionperoxidázu, katalázu a neenzymové systémy, které zahrnují malé molekuly, jako jsou vitamín C, vitamín E (Maiese et al., 2010) a glutathion (Dinkova-Kostova a Talalay, 2008). Kromě uvedených tělu vlastních molekul má antioxidační účinek řada látek přírodních (Surh et al., 2008, Aggarwal a Shishodia, 2006, Kumar et al., 2014) i syntetických (Habeos et al., 2008, Hiranuma et al., 2007, Reisman et al., 2009a). Antioxidanty mohou být rozděleny na přímo a nepřímo působící, byť mnohé jsou schopny působit jedním i druhým způsobem (Dinkova-Kostova a Talalay, 2008).

### **4.2.1. Přímě působící antioxidanty**

Přímě působící antioxidanty jsou obvykle molekuly o malé hmotnosti (např. vitamín C, E, glutathion, redukovaná forma koenzymu Q10). Mohou vstoupit do redoxních reakcí a vychytat reaktivní formy kyslíku či dusíku. Přímě působící antioxidanty mají několik charakteristik: jsou aktivní v redoxních reakcích, jsou spotřebovány či chemicky pozměněny během jejich antioxidačního působení, a nakonec musí být doplněny či obnoveny (Dinkova-

Kostova a Talalay, 2008). Navzdory uvedeným limitacím prokázaly přímo působící antioxidanty prospěšný účinek v některých modelech jaterního poškození, a to např. při regeneraci jater po parciální hepatektomii (Ronco et al., 2002, Kimura et al., 2010, Uzun et al., 2009), ischemicko-reperfúzním poškození (Hiranuma et al., 2007) či toxickém poškození jater (Campo et al., 2001, Jeong et al., 2002).

#### **4.2.2. Nrf2 a nepřímo působící antioxidanty**

Nepřímo působící antioxidanty se vyznačují následujícími rysy: nemusí vykazovat redoxní aktivitu a jejich účinek je zprostředkován upregulací cytoprotektivních proteinů. Většinu reakcí katalyzovaných těmito proteiny lze označit jako biotransformaci. Mechanismem aktivace je uvolnění transkripčního faktoru Nrf2 z jeho inhibitoru Keap1, translokace Nrf2 do jádra a ovlivnění genové exprese (Dinkova-Kostova a Talalay, 2008).

Mezi nepřímo působící antioxidanty patří resveratrol (Khurana et al., 2013), sulforafan (Kleszczynski et al., 2013) a epigalokatechingalát (Sahin et al., 2010).

#### **4.2.3. Epigalokatechingalát**

Epigalokatechingalát (EGCG) je polyfenol ze zeleného čaje, který vykazuje přímý i nepřímý antioxidační účinek (Lambert a Elias, 2010). Z látek obsažených v zeleném čaji je EGCG nejúčinnější složkou (Tipoe et al., 2010). Jeho protektivní účinek byl prokázán na různých modelech toxického poškození jater (Chen et al., 2004, Yasuda et al., 2009, Tipoe et al., 2010), nealkoholové steatózy a steatohepatitidy (Fiorini et al., 2005, Kuzu et al., 2008, Chung et al., 2012), jakož i na modelu ischemicko-reperfúzního poškození (Fiorini et al., 2005, Giakoustidis et al., 2010). Účinek EGCG na regeneraci jater po parciální hepatektomii nebyl v době přípravy našeho projektu popsán a bude předmětem popisovaného výzkumu.

Výtažky ze zeleného čaje však nejsou zcela bez rizika. Opakovaně byly popsány případy akutního poškození jater způsobeného těmito přípravky (Molinari et al., 2006, Mazzanti et al., 2009, Chen et al., 2010). Výtažky ze zeleného čaje se tak dostaly do online databáze hepatotoxických látek (NIDDK, 2014).

### **4.3 Vliv genotypu na játra**

#### **4.3.1. Role Nrf2**

Expres Nrf2 je nejvyšší v játrech a ledvinách, které mají biotransformaci jako jednu ze svých funkcí (Lewis et al., 2010, Kumar et al., 2014). Práci zabývajících se vlivem Nrf2 na jaterní funkce u člověka je zatím poskrovnu. Nrf2 pravděpodobně přispívá k aktivaci jaterního CYP2C9 fenytoinem (Chaudhry et al., 2010).

Myši s vyřazením genu pro Nrf2 vykazují vyšší náchylnost k celé řadě poškození jater, například poškození brompropanem či chronickou konzumací etanolu (Kumar et al., 2014). Nadměrné zvýšení oxidačního stresu u myši s knockoutem genu pro Nrf2 vedlo ke zpomalení regenerace jater po parciální hepatektomii (Beyer et al., 2008, Dayoub et al., 2013). Nrf2-KO myši byly rovněž náchylnější k poškození jater acetaminofenem. Naproti tomu myši s knock-down genu pro Keap1 a z toho vyplývající upregulací Nrf2 byly méně náchylné (Reisman et al., 2009b).

#### **4.3.2. Apolipoprotein E a Nrf2**

Nedávno byla popsána souvislost mezi genotypem apolipoproteinu E (ApoE) a expresí



Nrf2 skupinou Graeser et al. (2011). Ti popsali nižší množství Nrf2 v buněčném jádře a nižší expresi Nrf2-dependentních genů u transgenních myši nesoucích lidskou alelu ApoE4 než u myši nesoucích alelu ApoE3.

U pacientů s primární biliární cirhózou představoval genotyp ApoE4 riziko závažnější choroby a horší odpověď na léčbu než genotyp ApoE3 (Corpechot et al., 2001). Na druhou stranu, genotyp ApoE4 vykazoval v epidemiologických studiích nižší riziko NAFLD než genotyp ApoE3 (Demirag et al., 2007, De Feo et al., 2012). Vliv genotypu apolipoproteinu E na citlivost vůči acetaminofenu (paracetamolu) dosud popsán nebyl a bude předmětem druhé části této práce.

## **5. Cíle disertační práce**

### **5.1. Část první: vliv epigalokatechingalátu na játra**

Cílem první části práce je zjistit, zda epigalokatechingalát (EGCG) podpoří regeneraci jater potkanů po 70% parciální hepatektomii. Rovněž budeme hodnotit vybrané signální dráhy. Součástí tohoto cíle bude i vyhodnocení účinku EGCG na hepatocyty potkana *in vitro*.

### **5.2. Část druhá: vliv genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu**

Cílem druhé části práce je porovnat citlivost primárních myších hepatocytů k acetaminofenu (paracetamolu). K tomu budou použity transgenní myši s implantovaným genem pro lidský apolipoprotein E3, myši s genem pro apolipoprotein E4 a wild-type myši. Rovněž porovnáme účinek acetaminofenu na mitochondriální membránový potenciál, markery oxidačního stresu, a nakonec i expresi vybraných genů dependentních na transkripčním faktoru Nrf2.

## **6. Materiál a metodika**

### **6.1. Část první: vliv epigalokatechingalátu na játra**

První část projektu byla zaměřena na vliv epigalokatechingalátu (EGCG) na játra potkanů, a to nejprve v podmínkách *in vivo*, posléze *in vitro*. Statistické metody se v první a druhé části práce nelišily, jsou proto popsány na konci metod druhé části.

#### **6.1.1. Protokol experimentu *in vivo***

V tomto experimentu byli použiti samci potkanů kmene Wistar (BioTest, Konárovice, Česká republika) s počáteční hmotností  $248 \pm 13$  g. V souladu s platnou legislativou České republiky byly jak péče o zvířata, tak i experimentální protokol schváleny Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat působící při Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Potkani podstoupili laparotomii (LAP, kontrolní skupina) nebo 70% parciální hepatektomii (PHx) v celkové eterové anestezii (Higgins a Anderson, 1931). Aqua pro injectione (AI) nebo EGCG v dávce 20 či 50 mg/kg tělesné

hmotnosti byly aplikovány 3 po sobě jdoucí dny s tím, že třetí dávka byla aplikována bezprostředně po operaci. Pokusná zvířata byla rozdělena do následujících pěti skupin:

- (I – AI+LAP) Aqua pro injectione a laparotomie, n=6;
- (II – EGCG50+LAP) EGCG v dávce 50 mg/kg a laparotomie, n=6;
- (III – AI+PHx) Aqua pro injectione a parciální hepatektomie, n=6;
- (IV – EGCG20+PHx) EGCG v dávce 20 mg/kg a parciální hepatektomie, n=6;
- (V – EGCG50+PHx) EGCG v dávce 50 mg/kg a parciální hepatektomie, n=5.

Potkani byli usmrceni v celkové anestezii vykrvácením z břišní aorty, a to 24 hodin po operaci (tj. 4. den experimentu). BrdU pro určení syntézy DNA byl aplikován intraperitoneálně v dávce 50 mg/kg 1 hodinu před usmrcením. Část jater byla fixována ve 4% neutrálním formaldehydu pro histologická barvení.

Míra růstu jater byla vypočítána podle následujících vzorců:

$$\text{HRR hepatic regeneration rate (HRR)} = [C - (A - B)] / A \times 100 [\%]$$

kde A je odhadovaná celková hmotnost jater v době parciální hepatektomie, B je hmotnost odstraněných jater (resekátu) a C je váha regenerujících jater na konci experimentu (Selzner a Clavien, 2000).

$$\text{Liver regeneration rate (LRR)} = [C - (A - B)] / C \times 100 [\%]$$

kde A je odhadovaná celková hmotnost jater v době parciální hepatektomie, B je hmotnost odstraněných jater (resekátu) a C je váha regenerujících jater v době usmrcení zvířat (Murata et al., 2007).

Sérové koncentrace glukózy, celkového a konjugovaného bilirubinu, aktivity enzymů alanin aminotransferázy (ALT), aspartát aminotransferázy (AST) a alkalické fosfatázy u všech potkanů byly měřeny v automatických analyzátoch P800 Modular na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové. U hepatektomovaných zvířat (skupiny III, IV a V) byly měřeny rovněž plazmatické hladiny malondialdehydu (MDA).

Část jater byla zhomogenizována v 10% ledové kyselině metafosforečné. Následovala centrifugace při 20 000 g po dobu 10 min ve 4°C. Redukovaný glutathion (GSH) v takto získaném supernatantu byl měřen fluorimetrickou metodou (Rousar et al., 2012a). Oxidovaný glutathion (GSSG) byl měřen po alkalické hydrolyze stejným způsobem jako GSH.

Míra peroxidace lipidů v supernatantech z jaterních homogenátů byla hodnocena metodou TBARS, tj. měřením látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (Ohkawa et al., 1979).

Měření tkáňových cytokinů předcházela homogenizace části jater v RIPA pufru, centrifugace při 10 000 g a kvantifikace celkového obsahu proteinů dle Bradforda (Bradford, 1976). V takto získaném supernatantu byla měřena koncentrace cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-1 a TGF- $\beta$ 1 příslušnými ELISA kity.

Aktivita kaspáz 3 a 7 byla měřena za použití kitu Caspase-Glo™ 3/7 od firmy Promega (Madison, WI, USA).

Expres genů p21, p-p27, p-p53 a Bcl-2 na úrovni proteinu byla měřena metodou Western Blot. Shodný obsah proteinu byl potvrzen reinkubací s protilátkami proti  $\beta$ -aktinu.

Expres genů hemoxygenázy-1 (Hmox1) a NAD(P)H-chinon-oxidoreduktázy-1 (Nqo1) na úrovni mRNA byla měřena dle dřívějšího popisu (Hirsova et al., 2012) s tím rozdílem, že celková RNA z jaterní tkáně byla izolována metodou fenol-chloroformové extrakce.

Parafínové řezy byly barveny hematoxylinem-eozinem. Byly kontrolovány známky steatózy a zánětu. Dále byla hodnocena přítomnost apoptotických tělísek (Seabra et al., 2012). Imunohistochemické barvení na bromdeoxyuridin (BrdU) bylo provedeno jako v předchozích studiích (Bader et al., 2011).

### 6.1.2. Protokol experimentu *in vitro*

Dále jsme pokračovali, i s ohledem na zásadu 3R, v experimentech *in vitro*. Potkani podstoupili buď parciální hepatektomii nebo laparotomii. 24 hodin od operace byly provedeny izolace hepatocytů. K izolaci hepatocytů byla použita metoda dvoustupňové kolagenázové perfúze (Berry et al., 1991, Kucera et al., 2012a). Viabilita byla určena pomocí Trypanové modři (Trypan blue exclusion test); ve všech izolacích byla vyšší než 90%. Suspenze hepatocytů byla naředěna kultivačním médiem Williams E obohaceným o 6% fetální hovězí sérum a buňky nasázeny na kolagenem pokryté kultivační a mikrotitrační destičky. Po přichycení buněk (3 hodiny) bylo odstraněno medium a vyměněno za nové Williams E (bez séra) s různými koncentracemi EGCG od 1  $\mu\text{mol/l}$  do 15  $\mu\text{mol/l}$ .

Snímky ve fázovém kontrastu byly zhotoveny při 400násobném zvětšení po 24hodinové kultivaci. Hodnotili jsme známky buněčného poškození, zejména uvolnění buněk z kolagenu, kulovitý tvar buněk, tzv. „blebbing“ plazmatické membrány, granulaci cytoplazmy a ztrátu viditelnosti jádra (Kucera et al., 2012a).

Jako testy buněčné viability byly použity testy WST-1 a LDH leakage, funkční kapacita hepatocytů byla hodnocena podle produkce albuminu. WST-1 je test hodnotící aktivitu nitrobuněčných dehydrogenáz; v našem experimentu byla měřena po 24 hodinách kultivace. Aktivita laktátdehydrogenázy (LDH) byla měřena v médiu i v buněčeném lyzátu. Poměr extracelulární aktivity LDH (tj. v kultivačním médiu) a celkové LDH aktivity je dále označován jako LDH leakage, doslova tedy únik LDH. Hladina albuminu byla měřena metodou ELISA.

Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) byla měřena pomocí fluorescenční próby dichlorodihydrofluoresceindiacetátu (DCFDA). Měření malondialdehydu (MDA) v médiu využívalo princip TBARS (Ohkawa et al., 1979).

Aktivita kaspáz 3 a 7 byla měřena pomocí kitu Caspase Glo 3/7 od firmy Promega. K buňkám na mikrotitrační destičce s 50  $\mu\text{l}$  kultivačního média bylo přidáno po 50  $\mu\text{l}$  Caspase Glo Reagent a měřena uvolněná luminiscence.

Syntéza DNA byla měřena pomocí kitu BrdU Cell Proliferation ELISA Kit.

Expres proteinů p-p53, Bcl-2 a DR5 byla hodnocena metodou Western Blot. Předcházela lýza buněk pomocí lyzačního pufru obohaceného o inhibitory proteáz a fosfatáz.  $\beta$ -aktin a barvení Ponceau Red byly použity jako kontroly stejné koncentrace bílkovin.

## 6.2. Část druhá: vliv genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu

Ve druhé části práce jsme se zabývali vlivem genotypu apolipoproteinu E (ApoE) na hepatotoxicitu acetaminofenu (APAP) u transgenních myší. Na rozdíl od první části, především z důvodu mimořádné finanční náročnosti, jsme zde provedli pouze *in vitro* experimenty.

### 6.2.1. Protokol experimentu *in vitro*

Samice myší s nahrazeným endogenním (myším) genem pro apolipoprotein E (dále jen ApoE) lidským ApoE3 (n=2) nebo ApoE4 (n=3) genem na genetickém pozadí C57Bl/6 background byly objednány od firmy Taconic (Hudson, NY, USA). Samice C57Bl/6 stejného věku a hmotnosti (n=3), zakoupené od firmy Velaz (Únětice, Česká republika), byly použity jako wild-type (WT) kontroly. Experiment byl schválen Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat působící při Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové a Ministerstvem zemědělství České republiky. Myši byly narkotizovány éterem a poté jim byla aplikována intraperitoneálně směs ketaminu a xylazinu

rozpuštěné ve vodě pro injekce (aqua pro injectione). Hepatocyty byly izolovány metodou dvoustupňové kolagenázové perfúze, jak popsali Bajt et al. (2004).

Buněčná viabilita byla určena pomocí Trypanové modři a ve všech izolacích byla vyšší než 80%. Suspenze hepatocytů byla naředěna kultivačním médiem Williams E medium obohaceným o 6% fetální hovězí sérum a buňky nasázeny na kolagenem pokryté kultivační a mikrotitrační destičky. Po přichycení buněk (2 hodiny) bylo odstraněno medium a vyměněno za nové Williams E (bez séra) s různými koncentracemi APAP od 0,5 mmol/l do 4 mmol/l.

Snímky ve fázovém kontrastu byly pořízeny po 4hodinové a 24hodinové inkubaci. Pro semi-kvantifikaci přítomnosti lipidů jsme použili kit Steatosis Colorimetric Assay, který je založený na barvení olejovou červení (Oil Red O). Mitochondriální membránový potenciál byl hodnocen pomocí barvení JC-1 (Kučera et al., 2014).

Jako testy buněčné viability byly použity testy WST-1 a LDH leakage. Aktivita kaspáz 3 a 7 byla měřena po 4hodinové a 24hodinové kultivaci s APAP pomocí kitu Caspase Glo 3/7.

Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) byla i zde měřena pomocí fluorescenční próby dichlorodihydrofluoresceindiacetátu (DCFDA). Určení malondialdehydu (MDA) bylo založeno na měření látek reagujících s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS) v kultivačním médiu (Ohkawa et al., 1979).

Obsah redukovaného glutathionu (GSH) byl měřen po 4hodinové a 24hodinové inkubaci s APAP modifikovanou fluorimetrickou metodou (Rousar et al., 2012a). Koncentrace konjugátu APAP-SG byla měřena hmotností spektrometrií (Rousar et al., 2012b).

Expresí proteinů Mcl-1, Bcl-2, CYP2E1 a fosforylovaného 4E-BP1 byla měřena metodou Western Blot.  $\beta$ -aktin byl použit jako kontrola stejné koncentrace bílkovin. K určení density proužků byl použit software Quantity One 4.6.

Celková RNA ze 6jamkových kultivačních destiček exponovaných po dobu 24 hodin byla izolována metodou fenol-chloroformové extrakce. Poté byla RNA reverzně přepsána za pomoci oligo-dT primerů a M-MLV reverzní transkriptázy podle pokynů výrobců. Měřené geny byly glutathion S-transferáza 2 (Gsta2), hemoxygenáza-1 (Hmox1), NAD(P)H dehydrogenáza, chinon 1 (Nqo1); referenční (housekeeping) geny beta 2-mikroglobulin (B2m) a polypeptidová A RNA-polymeráza II (Polr2a). Kvantitativní real-time RT-PCR byla provedena na cykleru CFX96 Touch. Software REST 2009 V2.0.13 byl použit ke zhodnocení statisticky významných rozdílů v genové expresi a určení relativních poměrů exprese (Pfaffl et al., 2002).

Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí programu GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA, USA). Normalita dat byla testována pomocí Kolmogorov-Smirnoffova testu. Data s gaussovským rozdělením byla analyzována pomocí testu ANOVA a Tukeyho post-testu; data s negaussovským rozdělením pomocí Kruskal-Wallisova testu a Dunnova post-testu.  $p < 0,05$  byla považována za statisticky významnou.

## 7. Výsledky

### 7.1. Část první: vliv epigalokatechingalátu na játra

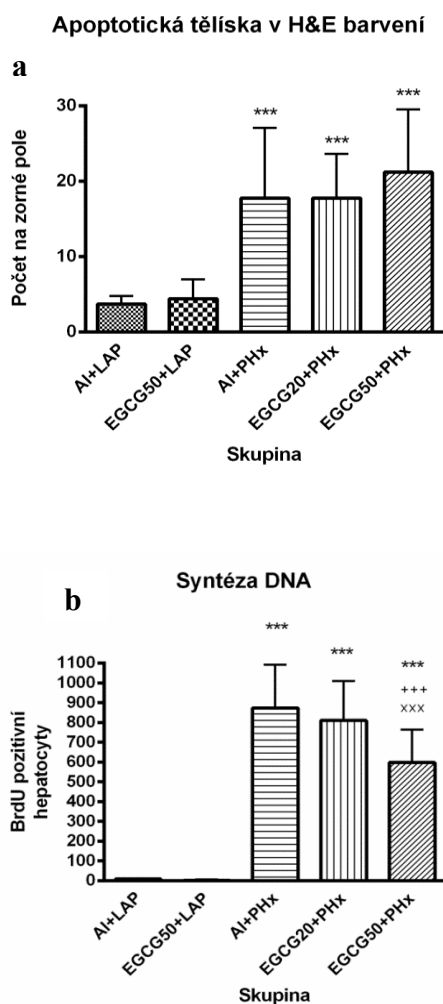
Nejprve budou popsány výsledky *in vivo*, poté *in vitro* experimentu s EGCG.

#### 7.1.1. Výsledky experimentu *in vivo*

Všichni potkani přežili experiment až do konce, tj. do usmrcení. V hepatektomovaných skupinách (III,IV,V) se jeví indexy jaterní regenerace nejvyšší ve skupině EGCG20+PHx,

tedy s nižší dávkou EGCG; nejednalo se však o statisticky významné rozdíly.

Při barvení hematoxylinem-eosinem jsme pozorovali viditelnou akumulaci lipidů v hepatektomovaných skupinách (III,IV,V). U žádného z potkanů jsme neprokázali známky zánětlivé reakce. Počet apoptotických tělísek byl významně vyšší u hepatektomovaných zvířat (III,IV,V) než u laparotomovaných (I,II) (Obrázek 1a).



Obrázek 1 – **a)** počet apoptotických tělísek v barvení hematoxylinem-eozinem, **b)** BrdU pozitivní buňky, imunohistochemické barvení; \*\*\*  $p < 0,001$  při porovnání s příslušnou laparotomovanou skupinou, +++  $p < 0,001$  oproti skupině AI+PHx, xxx  $p < 0,001$  oproti skupině EGCG20+PHx

U hepatektomovaných zvířat (III,IV,V) byla pozitivita bromdeoxyuridinu (BrdU) vysoká ( $p < 0,001$  oproti laparotomovaným kontrolám). Počet BrdU pozitivních buněk ve skupině EGCG50+PHx byl významně nižší než ve skupinách AI+PHx a EGCG20+PHx ( $p < 0,001$  pro obě porovnání, Obrázek 1b).

Glykémie byla vyšší ve skupině II (EGCG50+LAP) než ve skupině I (AI+LAP), nižší v hepatektomovaných skupinách dostávajících EGCG než ve skupině EGCG50+LAP. Aktivita alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) byla vyšší u hepatektomovaných potkanů než u laparotomovaných; statisticky významný rozdíl byl prokazatelný při srovnání skupin EGCG20+PHx a EGCG50+PHx oproti EGCG50+LAP. Celkový bilirubin byl vyšší ve skupině EGCG50+LAP než ve skupině AI+LAP, dále

u hepatektomovaných zvířat oproti laparotomovaným; významný rozdíl byl zjištěn pouze při porovnání skupiny AI+PHx se skupinou AI+LAP. Jak celkový, tak konjugovaný bilirubin dosáhly nejvyšších hodnot ve skupině EGCG50+PHx (Tabulka 1).

Tabulka 1 – biochemie séra

	AI+LAP	EGCG 50 + LAP	AI + PHx	EGCG 20 + PHx	EGCG 50 + PHx
Glykémie (mmol/l)	7,01±0,61	10,49±0,28 °	7,97±0,57	8,9±0,69 *	8,71±0,75 *
ALT (μkat/l)	1,01±0,57	0,64±0,06	4,08±4,76	2,7±1,38 **	5,44±4,95 **
AST (μkat/l)	3,2±1,99	1,89±0,37	7,05±6,34	6,33±2,57 **)	9,92±8,20 **)
ALP (μkat/l)	2,4±0,45	2,57±0,32	7,08±1,11 ***	6,8±1,29 ***	6,61±1,39 ***
Bilirubin celkový (μmol/l)	2,0±0,0	3,0±0,0	4,0±1,55 *	3,5±0,55	5,6±2,19
Bilirubin konjug. (μmol/l)	1,83±0,41	2,0±0,0	2,6±0,89	2,17±0,41	4,2±2,28 *

° p<0,05 při porovnání skupiny EGCG50+LAP se skupinou AI+LAP

\*, \*\*, \*\*\* p<0,05; p<0,01; p<0,001 oproti laparotomovaným kontrolám

Koncentrace IL-6 byla významně nižší ve skupině EGCG50+PHx než ve skupině AI+PHx (p<0,05). Trend k poklesu TNF-α u skupin IV a V oproti skupině III nebyl významný. Koncentrace TGF-β1 se mezi skupinami nelišila.

Nesignifikantní trend k nižším hodnotám tkáňového malondialdehydu (MDA), oxidovaného a redukováného glutationu, podobně jako plasmatického MDA byl viditelný při porovnání skupiny EGCG20+PHx se skupinami AI+PHx a EGCG50+PHx.

Po inkubaci s Caspase Glo Reagent byla aktivita kaspáz 3 a 7 nižší ve skupině EGCG50+PHx než ve skupinách AI+PHx a EGCG20+PHx (p<0,01 pro obě porovnání).

Expresí proteinů p21 a p-p27 se mezi hepatektomovanými skupinami nelišila. Rozdíl byl pozorován v expresi fosforylovaného proteinu p53 – jevila se nejvyšší ve skupině EGCG20+PHx a nejnižší ve skupině EGCG50+PHx. Protein Bcl-2 se nám nepodařilo zachytit, byl pod mez detekce metody.

Nepodařilo se prokázat rozdíl v expresi mRNA genů pro Nqo1 a Hmox1 mezi hepatektomovanými skupinami.

### 7.1.2. Výsledky experimentu *in vitro*

Jak vyplývá z testů WST-1, LDH leakage a syntézy albuminu, vykazoval EGCG u obou skupin, tj. hepatocytů izolovaných z potkanů po LAP i PHx, toxický účinek od koncentrace 10 μmol/l po 24hodinové inkubaci. V mikrofotografiích ve fázovém kontrastu jsme pozorovali známky buněčného poškození u hepatocytů z obou skupin při expozici EGCG o koncentracích 10 μmol/l a vyšších.

EGCG vedl k nárůstu aktivity kaspáz 3 a 7 při koncentraci 10 μmol/l a vyšší u hepatocytů izolovaných z potkanů po PHx a při koncentraci 10 μmol/l u hepatocytů po LAP. Nejvyšší aktivita byla naměřena u hepatocytů z potkanů po PHx exponovaných 15 μM EGCG

(Obrázek 2).

Produkce ROS měřená metodou DCFDA byla vyšší u hepatocytů z potkanů po LAP, zejména u kontrol a buněk exponovaných 1  $\mu\text{M}$  EGCG. Při vyšších koncentracích byla produkce ROS podobná u hepatocytů z obou skupin potkanů. Opačný trend byl viditelný u lipoperoxidace: vyšší hladiny MDA byly naměřeny u hepatocytů z potkanů po PHx než u těch po LAP. Lipoperoxidace byla nejvyšší u hepatocytů exponovaných vysokým dávkám EGCG.

Pozorovali jsme trend k vyšší syntéze DNA u hepatocytů izolovaných z potkanů po PHx ve srovnání s potkany po LAP, jak je patrné z inkorporace BrdU. EGCG vedl ke snížení syntézy DNA (Tabulka 2).

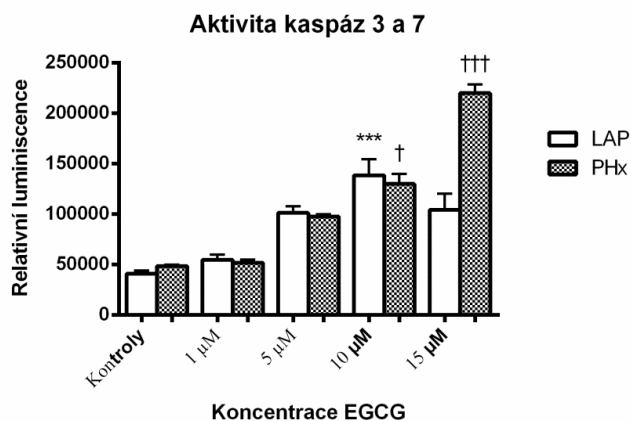
Protein Bcl-2 jsme nebyli schopni metodou Western Blot detekovat. Expres proteinů DR5 a fosforylovaného p53 se mezi skupinami nelišily.

Tabulka 2 – porovnání vlivu EGCG na hepatocyty izolované z potkanů po PHx a LAP *in vitro*

	LAP + EGCG ( $\mu\text{mol/l}$ )					PHx + EGCG ( $\mu\text{mol/l}$ )				
	0	1	5	10	15	0	1	5	10	15
WST-1	100,0 $\pm 13,2$	120,5 $\pm 25,6$ *	81,7 $\pm 14,1$	54,1 $\pm 8,7$ ***	44,7 $\pm 4,8$ ***	79,5 $\pm 8,4$ ‡	85,9 $\pm 8,5$ ‡‡‡	75,7 $\pm 9,2$	53,0 $\pm 4,7$ ††	40,4 $\pm 2,0$ †††
LDH leakage	10,6 $\pm 0,3$	10,4 $\pm 0,6$	13,5 $\pm 0,7$	25,3 $\pm 1,6$ ***	25,3 $\pm 2,0$ ***	12,1 $\pm 1,4$	12,0 $\pm 1,1$	12,6 $\pm 1,4$	16,9 $\pm 2,6$ †††,‡‡‡ ‡	16,7 $\pm 2,4$ †††,‡‡‡ ‡
Albumin	7,01 $\pm 0,62$	7,26 $\pm 0,33$	5,18 $\pm 0,45$	2,37 $\pm 0,18$	1,95 $\pm 0,07$ *	7,60 $\pm 0,73$	8,10 $\pm 0,26$	7,94 $\pm 0,52$	3,92 $\pm 0,24$	3,40 $\pm 0,84$
ROS	100 $\pm$ 2	80 $\pm$ 3 ***	96 $\pm$ 4 ***	71 $\pm$ 8 ***	58 $\pm$ 3 ***	48 $\pm$ 2 ‡‡‡	42 $\pm$ 1 ‡‡‡	52 $\pm$ 3 ‡‡‡	71 $\pm$ 3 †††	65 $\pm$ 3 †††,‡
MDA	0,33 $\pm 0,08$	0,28 $\pm 0,03$	0,29 $\pm 0,06$	0,32 $\pm 0,02$	0,36 $\pm 0,05$	0,38 $\pm 0,04$	0,37 $\pm 0,04$	0,46 $\pm 0,06$ ‡‡‡	0,50 $\pm 0,08$ ††,‡‡‡	0,41 $\pm 0,05$
Syntéza DNA	95,5 $\pm 9,0$	83,8 $\pm 9,8$	66,6 $\pm 3,7$	20,6 $\pm 2,7$	14,3 $\pm 2,9$ *	126,8 $\pm 9,9$	126,3 $\pm 4,1$	95,1 $\pm 5,2$	62,0 $\pm 1,9$ †	34,3 $\pm 1,6$ ††

WST-1 test (% LAP kontrol), LDH leakage (%), hladina albuminu v médiu ( $\mu\text{g/ml}$ ), produkce ROS (% LAP kontrol), hladina malondialdehydu (MDA) v médiu ( $\mu\text{mol/l}$ ), syntéza DNA (% background kontroly).

\*,\*\*\*  $p < 0,05$ ; 0,001 vs. kontrolní LAP; †,††,†††  $p < 0,05$ , 0,01, 0,001 vs.kontrolní PHx; ‡,‡‡‡  $p < 0,05$ ; 0,001 vs.LAP o stejné koncentraci EGCG



Obrázek 2 – aktivita kaspáz 3 a 7 po 24hodinové inkubaci. \*\*\*  $p < 0,001$  proti kontrolní LAP; †, †††  $p < 0,05$ ;  $0,001$  proti kontrolní PHx

## 7.2. Část druhá: vliv genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu

### 7.2.1. Výsledky experimentu *in vitro*

Jak je patrné z aktivity extracelulární laktátdehydrogenázy (LDH), APAP vedl k toxicitě, která byla závislá na dávce a na délce expozice. Po 16hodinové inkubaci s 1 mM APAP jsme pozorovali signifikantní nárůst aktivity LDH v médiu u všech testovaných kmenů. Po 20 h byl vzestup nejvýraznější u hepatocytů ApoE3. Poškození po 24 hodinách expozice 0,75 mmol/l a 1 mmol/l APAP podle LDH leakage bylo nejzávažnější u hepatocytů z ApoE3 myši. Při expozici 4 mmol/l APAP dosáhl LDH leakage 90% ve všech skupinách, což poukazuje na nekrózu většiny buněk. V případě WST-1 testu byla aktivita buněčných dehydrogenáz významně nižší u hepatocytů vystavených 4 mmol/l APAP po dobu 24 h oproti kontrolám ve všech skupinách ( $p < 0,001$ ), nejvíce u ApoE3 hepatocytů. Při působení 4 mmol/l APAP po dobu 24 hodin byl viditelný nápadný pokles aktivit u všech genotypů, nejvíce v případě genotypu ApoE3.

Inkubace hepatocytů všech genotypů s 1 mmol/l APAP po dobu 24 hodin vedla ke známkám poškození při pozorování ve fázovém kontrastu. Dále jsme si povšimli nápadných nitrobuněčných vakuol připomínajících tukové kapénky u obou transgenních kmenů. Procento buněk pozitivních při barvení olejovou červení bylo vyšší u kontrolních hepatocytů z ApoE4 a ApoE3 myši než u kontrolních wild-type hepatocytů ( $p < 0,05$  pro ApoE4 a  $p < 0,001$  pro ApoE3). Po 24 hodinách byl významný pokles v MMP v případě buněk vystavených koncentraci APAP 1 mmol/l a vyšší u všech genotypů ( $p < 0,01$ ). MMP byl prakticky vymizelý v hepatocytech z ApoE3 myši vystavených 1 mmol/l APAP po dobu 24 hodin; u hepatocytů z WT a ApoE4 myši byl pokles MMP patrný až při expozici 2 mmol/l APAP. Koncentrace 0,5 mmol/l APAP neměla na MMP žádný vliv.

Produkce ROS hodnocená metodou DCFDA vykazovala signifikantní vzestup u obou transgenních kmenů při expozici 2,5 mmol/l APAP ( $p < 0,01$  pro ApoE4 a  $p < 0,001$  pro ApoE3) po 24hodinové kultivaci. Hladiny MDA v kultivačním médiu se mezi skupinami nelišily a nebyly významně ovlivněny expozicí APAP. Na dávce závislý pokles hladiny redukováného glutathionu (GSH) byl pozorován ve všech buňkách vystavených působení APAP. Po 24hodinové kultivaci s 1 mmol/l APAP byly koncentrace GSH nejnižší v hepatocytech



z ApoE3 myši. Koncentrace konjugátu APAP s glutathionem (APAP-SG) po 4hodinové kultivaci s 4 mmol/l APAP byly vyšší v obou transgenních kmenech než ve wild-type hepatocytech ( $p < 0,01$  pro ApoE4, nesignifikantní pro ApoE3).

Expres antiapoptického proteinu Bcl-2 byla down-regulována u hepatocytů vystavených 4 mmol/l APAP po dobu 4 hodin. Tento pokles byl více vyjádřen u hepatocytů z WT a ApoE4 myši než u těch z ApoE3 myši. Žádné výrazné změny jsme nezpozorovali v případě proteinu Mcl-1. U ApoE4 a méně i u ApoE3 hepatocytů byl pozorován pokles exprese fosforylovaného 4E-BP1, zejména v buňkách vystavených 4 mmol/l APAP. Hladiny izoformy 2E1 cytochromu P450 vykazovaly mírný pokles při expozici 4 mmol/l APAP u všech testovaných genotypů.

Hmox1, Nqo1 a Gsta2 vykazovaly vyšší expresi v kontrolních ApoE3 hepatocytech než v kontrolních ApoE4 hepatocytech, stejně tak v buňkách vystavených 0,5 mmol/l APAP po dobu 24 hodin. Při srovnání kontrolních buněk s buňkami vystavenými 0,5 mmol/l APAP byl pozorovatelný nárůst exprese Gsta2 a/nebo Hmox1 u všech testovaných genotypů.

## 8. Diskuze

### 8.1. Část první: vliv epigalokatechingalátu na játra

Navzdory řadě studií popisujících prospěšný vliv EGCG na játra v mnoha experimentálních modelech, v našem experimentu nebyl průkazný žádný přínos pro regeneraci jater po parciální hepatektomii. Dokonce jsme zaznamenali nižší syntézu DNA u potkanů dostávajících vyšší dávku EGCG.

Naše výsledky jsou v rozporu s týmem autorů Saito et al. (2014), kteří popsali stimulační účinek extraktu ze zeleného čaje na regeneraci jater po 90% parciální hepatektomii. Rozdílné výsledky mohou být dané jiným modelem (70% vs 90% parciální hepatektomie), jakož i cestou podání – Saito et al. (2014) podávali po dobu sedmi dnů vodu s 0,5% extraktem obsahující i další příměsi.

EGCG byl v některých pracích schopen snižovat produkci TNF- $\alpha$  (Yang et al., 1998) a IL-6 (Singh et al., 2011). Hladiny IL-6 byly v naší studii významně nižší ve skupině EGCG50+PHx oproti skupině AI+PHx.

V literatuře je popsána schopnost EGCG aktivovat kaspázy a zvýšit apoptózu (Smith et al., 2002, Roy et al., 2005, Shankar et al., 2007, Gupta et al., 2003). V naší studii jsme našli naopak nižší aktivitu kaspáz 3 a 7 v jaterním homogenátu z jater skupiny EGCG50+PHx než u homogenátů z jater potkanů AI+PHx. Řada dalších anti-proliferačních mechanismů EGCG byla popsána, např. změny v proteinkinázách, růstových faktorech a transkripčních faktorech (Singh et al., 2011). Ovlivnění exprese proteinů regulujících buněčný cyklus se v našem experimentu nepodařilo prokázat.

V navazující *in vitro* studii jsme prokázali toxický účinek EGCG na hepatocyty izolované z potkanů po parciální hepatektomii i laparotomii. Na rozdíl od jiných autorů (Galati et al., 2006), kteří popsali toxicitu od koncentrace 200  $\mu\text{mol/l}$ , jsme pozorovali mírnou, nicméně signifikantní toxicitu již při koncentraci EGCG 10  $\mu\text{mol/l}$  po 24hodinové kultivaci.

Nejen naše výsledky, ale i další studie doporučují opatrnost při užívání EGCG. Bylo popsáno několik případů akutního selhání jater způsobeného výtažky ze zeleného čaje (Molinari et al., 2006, Mazzanti et al., 2009, Chen et al., 2010). Farmakokinetické studie s EGCG u potkanů prokázaly maximální plazmatickou koncentraci EGCG 4,7  $\mu\text{g/ml}$  po nitrožilním podání 10 mg/kg tělesné hmotnosti. Distribucí do tkání poklesne plazmatická koncentrace EGCG o jeden řád během méně než 100 minut. Po podání EGCG žaludeční

sondou v dávce 75 mg/kg tělesné hmotnosti dosáhla maximální plazmatická koncentrace pouze 19,8 ng/ml (Chen et al., 1997). Koncentrace použité v našich *in vitro* experimentech se mohou objevit v krátkém intervalu po intravenózním podání EGCG. To může i vysvětlit známky toxicity při podání vyšší dávky EGCG (50 mg/kg) v uvedeném *in vivo* experimentu.

## 8.2. Část druhá: vliv genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu

V našich experimentech vedl acetaminofen (APAP) k toxicitě vůči hepatocytům všech genotypů. Náchylnost hepatocytů byla vyšší u obou transgenních kmenů oproti wild-type kontrolám a nejvíce vyjádřená u ApoE3 myši. Při expozici 4 mmol/l APAP po dobu 24 hodin vykazovaly téměř všechny buňky známky buněčné smrti nekrózou. Kaspázy 3 a 7 nebyly aktivované expozicí APAP. K vyšší toxicitě APAP u obou transgenních kmenů oproti wild-type kontrolám může zřejmě přispívat akumulace lipidů.

Podářilo se nám reprodukovat hlavní výsledky týmu Graeser et al. (2011), tj. vyšší expresi Nrf2-dependentních genů v kultivovaných hepatocytech získaných z ApoE3 myši než u těch z ApoE4 myši, alespoň tedy při nízkých dávkách APAP. Působením APAP došlo k aktivaci některých Nrf2-dependentních genů u všech testovaných genotypů, což je v souladu s výsledky jiných autorů (Mobasher et al., 2013).

Naše nálezy poklesu mitochondriálního membránového potenciálu po působení APAP jsou v souladu s dříve publikovanou prací týmu Hwang et al. (2014). I tentokrát byl tento pokles nejvíce vyjádřen u hepatocytů z ApoE3 myši. Po 24hodinovém působení APAP byl pokles hladiny GSH nejvíce vyjádřen v ApoE3 hepatocytech. Tvorba reaktivních forem kyslíku po 24hodinové inkubaci s 2,5 mmol/l APAP vykazovala nejvyšší nárůst u hepatocytů z ApoE3 myši. Tyto nálezy byly poněkud mimo naše očekávání, neboť nositelé alely ApoE3 měli zjištěnu vyšší antioxidační schopnost než nositelé alely ApoE4 (Jofre-Monseny et al., 2008).

Nižší hladiny fosforylovaného 4E-BP1, efektoru mTOR, u obou transgenních kmenů po expozici 4 mmol/l APAP než u kontrol poukazují na aktivaci autofagie. Toto je v souladu s jinými autory (Ni et al., 2012a).

## 9. Závěry

### 9.1. Část první: vliv epigalokatechingalátu na játra

Podání EGCG v testovaných dávkách 20 mg/kg a 50 mg/kg nevedlo k urychlení regenerace jater po parciální hepatektomii potkanů. Vyšší dávka dokonce vedla ke snížení syntézy DNA. Ačkoliv provedené analýzy neobjasnily zcela mechanismus účinku, může být dán inhibicí produkce cytokinu IL-6, zřejmě však nikoliv indukci apoptózy ani aktivací proteinu p53.

Po 24hodinové kultivaci vykazoval EGCG v koncentraci 10  $\mu$ mol/l a vyšší toxické účinky na hepatocyty izolované jak z potkanů po laparotomii, tak z potkanů po parciální hepatektomii. Hepatocyty izolované z potkanů po parciální hepatektomii měly vyšší tendenci k apoptóze, zejména při vysokých koncentracích EGCG.

## 9.2. Část druhá: vliv genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu

Acetaminofen vedl k hepatotoxicitě u hepatocytů izolovaných z myši se všemi sledovanými genotypy ApoE3, ApoE4 i WT. Toxicita byla vyšší u obou transgenních kmenů oproti wild-type kontrolám a nejvíce vyjádřená byla u ApoE3 myši. Při expozici 4 mmol/l APAP po dobu 24 hodin vykazovaly téměř všechny buňky známky nekrózy bez ohledu na genotyp.

Na základě naší studie lze konstatovat, že pravděpodobně několik mechanismů může vést k horšímu poškození u ApoE3 myši oproti ApoE4 myším: vyšší produkce reaktivních forem kyslíku při působení vysokých dávek acetaminofenu, vyšší konzumpce glutathionu, vyšší náchylnost mitochondrií k poškození a zřejmě i rozdílná aktivace autofagie po expozici acetaminofenu. Zároveň jsme prokázali vyšší aktivaci Nrf2-dependentních genů u hepatocytů z ApoE3 myši než u hepatocytů z ApoE4 myši, alespoň tedy při nízkých koncentracích acetaminofenu.

*In vivo* studie by byly vhodné k potvrzení našich výsledků na celých zvířatech a k objasnění některých mechanismů.

## 10. Použitá literatura

1. 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. *Biomed Res*, 2005, **26**(5), 187-192.
2. AGGARWAL, B. B. & SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, 2006, **71**(10), 1397-1421.
3. BADER, A., PAVLICA, S., DEIWICK, A., LOTKOVA, H., KUCERA, O., DARSOW, K., BARTEL, S., SCHULZE, M., LANGE, H. A. & CERVINKOVA, Z. Proteomic analysis to display the effect of low doses of erythropoietin on rat liver regeneration. *Life Sci*, 2011, **89**(23-24), 827-833.
4. BAHDE, R. & SPIEGEL, H. U. Hepatic ischaemia-reperfusion injury from bench to bedside. *Br J Surg*, 2010, **97**(10), 1461-1475.
5. BAJT, M. L., KNIGHT, T. R., LEMASTERS, J. J. & JAESCHKE, H. Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine. *Toxicol Sci*, 2004, **80**(2), 343-349.
6. BERRY, M. N., EDWARDS, A. M. & BARRITT, G. J. (1991) High-yield preparation of isolated hepatocytes from rat liver. IN BURDON, R. H. & VAN KNIPPENBERG, P. H. (Eds.) *Isolated Hepatocytes Preparation, Properties and Application*. New York, Elsevier.
7. BEYER, T. A., XU, W., TEUPSER, D., AUF DEM KELLER, U., BUGNON, P., HILDT, E., THIERY, J., KAN, Y. W. & WERNER, S. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J*, 2008, **27**(1), 212-223.
8. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**248-254.
9. CAMPO, G. M., SQUADRITO, F., CECCARELLI, S., CALO, M., AVENOSO, A., CAMPO, S., SQUADRITO, G. & ALTAVILLA, D. Reduction of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by IRFI 042, a novel dual vitamin E-like antioxidant. *Free Radic Res*, 2001, **34**(4), 379-393.
10. CORPEchot, C., BENLIAN, P., BARBU, V., CHAZOUILLÈRES, O., POUPON, R. E. & POUPON, R. Apolipoprotein E polymorphism, a marker of disease severity in primary biliary cirrhosis? *Journal of Hepatology*, 2001, **35**(3), 324-328.
11. DAYOUB, R., VOGEL, A., SCHUETT, J., LUPKE, M., SPIEKER, S. M., KETTERN, N., HILDT, E., MELTER, M. & WEISS, T. S. Nrf2 activates augmenter of liver regeneration (ALR) via antioxidant response element and links oxidative stress to liver regeneration. *Mol Med*, 2013, **19**237-244.
12. DE FEO, E., CEFALO, C., ARZANI, D., AMORE, R., LANDOLFI, R., GRIECO, A., RICCIARDI, W., MIELE, L. & BOCCIA, S. A case-control study on the effects of the apolipoprotein e genotypes in nonalcoholic fatty liver disease. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(7), 7381-7388.

13. DEMIRAG, M. D., ONEN, H. I., KARAOGUZ, M. Y., DOGAN, I., KARAKAN, T., EKMEKCI, A. & GUZ, G. Apolipoprotein E gene polymorphism in nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*, 2007, **52**(12), 3399-3403.
14. DINKOVA-KOSTOVA, A. T. & TALALAY, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res*, 2008, **52 Suppl 1S128-138**.
15. FIORINI, R. N., DONOVAN, J. L., RODWELL, D., EVANS, Z., CHENG, G., MAY, H. D., MILLIKEN, C. E., MARKOWITZ, J. S., CAMPBELL, C., HAINES, J. K., SCHMIDT, M. G. & CHAVIN, K. D. Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl*, 2005, **11**(3), 298-308.
16. FRANCES, D., RONCO, M. T., OCHOA, E., ALVAREZ, M. L., QUIROGA, A., PARODY, J. P., MONTI, J., CARRILLO, M. C. & CARNOVALE, C. E. Oxidative stress in primary culture hepatocytes isolated from partially hepatectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2007, **85**(10), 1047-1051.
17. GALATI, G., LIN, A., SULTAN, A. M. & O'BRIEN, P. J. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med*, 2006, **40**(4), 570-580.
18. GAMBINO, R., MUSSO, G. & CASSADER, M. Redox balance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2011, **15**(5), 1325-1365.
19. GIAKOUSTIDIS, D. E., GIAKOUSTIDIS, A. E., ILIADIS, S., KOLIAKOU, K., ANTONIADIS, N., KONTOS, N., PAPANIKOLAOU, V., PAPAGEORGIOU, G., KALDRIMIDOU, E. & TAKOUDAS, D. Attenuation of liver ischemia/reperfusion induced apoptosis by epigallocatechin-3-gallate via down-regulation of NF-kappaB and c-Jun expression. *J Surg Res*, 2010, **159**(2), 720-728.
20. GRAESER, A. C., BOESCH-SAADATMANDI, C., LIPPMANN, J., WAGNER, A. E., HUEBBE, P., STORM, N., HOPFNER, W., WISWEDEL, I., GARDEMANN, A., MINIHANE, A. M., DORING, F. & RIMBACH, G. Nrf2-dependent gene expression is affected by the proatherogenic apoE4 genotype-studies in targeted gene replacement mice. *J Mol Med (Berl)*, 2011, **89**(10), 1027-1035.
21. GUPTA, S., HUSSAIN, T. & MUKHTAR, H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 2003, **410**(1), 177-185.
22. HABEOS, I. G., ZIROS, P. G., CHARTOUMPEKIS, D., PSYROGIANNIS, A., KYRIAZOPOULOU, V. & PAPAVALASSIOU, A. G. Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver. *J Mol Med (Berl)*, 2008, **86**(11), 1279-1285.
23. HALLIWELL, B. (2001) Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
24. HAN, S. Y., CHANG, E. J., CHOI, H. J., NAM, S. I., LEE, N. H., KWAK, C. S., PARK, S. B., KIM, H. C. & MUN, K. C. Total antioxidant status and oxygen free radicals during hepatic regeneration. *Transplant Proc*, 2006, **38**(7), 2214-2215.
25. HAYES, J. D. & MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*, 1999, **31**(4), 273-300.
26. HIGGINS, G. M. & ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.*, 1931, **12**186-202.
27. HIRANUMA, S., ITO, K., NODA, Y., OZASA, H., KOIKE, Y. & HORIKAWA, S. Amelioration of hepatic ischemia/reperfusion injury in the remnant liver after partial hepatectomy in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, **22**(12), 2167-2172.
28. HIRSOVA, P., KOLOUCHOVA, G., DOLEZELOVA, E., CERMANOVA, J., HYSPLER, R., KADOVA, Z. & MICUDA, S. Epigallocatechin gallate enhances biliary cholesterol secretion in healthy rats and lowers plasma and liver cholesterol in ethinylestradiol-treated rats. *Eur J Pharmacol*, 2012, **691**(1-3), 38-45.
29. HWANG, J., KIM, Y.-H., NOH, J.-R., GANG, G.-T., KIM, K.-S., CHUNG, H., TADI, S., YIM, Y.-H., SHONG, M. & LEE, C.-H. The protective role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 on acetaminophen-induced liver injury is associated with prevention of adenosine triphosphate depletion and improvement of mitochondrial dysfunction. *Archives of Toxicology*, 2014, 1-8.
30. CHAUDHRY, A. S., URBAN, T. J., LAMBA, J. K., BIRNBAUM, A. K., REMMEL, R. P., SUBRAMANIAN, M., STROM, S., YOU, J. H., KASPERAVICIUTE, D., CATARINO, C. B., RADTKE, R. A., SISODIYA, S. M., GOLDSTEIN, D. B. & SCHUETZ, E. G. CYP2C9\*1B promoter polymorphisms, in linkage with CYP2C19\*2, affect phenytoin autoinduction of clearance and maintenance dose. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, **332**(2), 599-611.
31. CHEN, G. C., RAMANATHAN, V. S., LAW, D., FUNCHAIN, P., CHEN, G. C., FRENCH, S., SHLOPOV, B., EYSSELEIN, V., CHUNG, D., REICHER, S. & PHAM, B. V. Acute liver injury induced by weight-loss herbal supplements. *World J Hepatol*, 2010, **2**(11), 410-415.

32. CHEN, J. H., TIPOE, G. L., LIONG, E. C., SO, H. S., LEUNG, K. M., TOM, W. M., FUNG, P. C. & NANJI, A. A. Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-derived prooxidants. *Am J Clin Nutr*, 2004, **80**(3), 742-751.
33. CHEN, L., LEE, M. J., LI, H. & YANG, C. S. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos*, 1997, **25**(9), 1045-1050.
34. CHILAKAPATI, J., KORRAPATI, M. C., HILL, R. A., WARBRITTON, A., LATENDRESSE, J. R. & MEHENDALE, H. M. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology*, 2007, **230**(2-3), 105-116.
35. CHUNG, M. Y., PARK, H. J., MANAUTOU, J. E., KOO, S. I. & BRUNO, R. S. Green tea extract protects against nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice by decreasing oxidative and nitrative stress responses induced by proinflammatory enzymes. *J Nutr Biochem*, 2012, **23**(4), 361-367.
36. JAESCHKE, H., GORES, G. J., CEDERBAUM, A. I., HINSON, J. A., PESSAYRE, D. & LEMASTERS, J. J. Forum - Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 2002, **65**(2), 166-176.
37. JAESCHKE, H., KNIGHT, T. R. & BAJT, M. L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett*, 2003a, **144**(3), 279-288.
38. JAESCHKE, H., KNIGHT, T. R., LEMASTERS, J. J. & BAJT, M. Oxidant stress precedes liver injury after acetaminophen in cultured mouse hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 2003b, **72**10-10.
39. JAESCHKE, H. & LEMASTERS, J. J. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*, 2003, **125**(4), 1246-1257.
40. JEONG, H. G., YOU, H. J., PARK, S. J., MOON, A. R., CHUNG, Y. C., KANG, S. K. & CHUN, H. K. Hepatoprotective effects of 18beta-glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. *Pharmacol Res*, 2002, **46**(3), 221-227.
41. JOFRE-MONSENY, L., MINIHAINE, A. M. & RIMBACH, G. Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. *Mol Nutr Food Res*, 2008, **52**(1), 131-145.
42. KIMURA, M., WATANABE, M., ISHIBASHI, N., YANAGIDA, S. & OGIHARA, M. Acyclic retinoid NIK-333 accelerates liver regeneration and lowers serum transaminase activities in 70% partially hepatectomized rats, in vivo. *Eur J Pharmacol*, 2010, **643**(2-3), 267-273.
43. KIRIMLIOGLU, H., ECEVIT, A., YILMAZ, S., KIRIMLIOGLU, V. & KARABULUT, A. B. Effect of resveratrol and melatonin on oxidative stress enzymes, regeneration, and hepatocyte ultrastructure in rats subjected to 70% partial hepatectomy. *Transplant Proc*, 2008, **40**(1), 285-289.
44. KNIGHT, T. R., KURTZ, A., BAJT, M. L., HINSON, J. A. & JAESCHKE, H. Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci*, 2001, **62**(2), 212-220.
45. KOHOUTEK, L., CERVINKOVA, Z., KUCERA, O., ROUSAR, T., GARNOL, T., SILLER, J. & LOTKOVA, H. Effect of S-adenosylmethionine on liver regeneration induced by partial hepatectomy. *Gen Physiol Biophys*, 2010, **29**(1), 72-78.
46. KUCERA, O., AL-DURY, S., LOTKOVA, H., ROUSAR, T., RYCHTRMOC, D. & CERVINKOVA, Z. Steatotic rat hepatocytes in primary culture are more susceptible to the acute toxic effect of acetaminophen. *Physiol Res*, 2012a, **61** Suppl 2S93-101.
47. KUCERA, O., LOTKOVA, H., STANKOVA, P., PODHOLA, M., ROUSAR, T., MEZERA, V. & CERVINKOVA, Z. Is rat liver affected by non-alcoholic steatosis more susceptible to the acute toxic effect of thioacetamide? *Int J Exp Pathol*, 2011, **92**(4), 281-289.
48. KUCERA, O., ROUSAR, T., STANKOVA, P., HANACKOVA, L., LOTKOVA, H., PODHOLA, M. & CERVINKOVA, Z. Susceptibility of rat non-alcoholic fatty liver to the acute toxic effect of acetaminophen. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012b, **27**(2), 323-330.
49. KUČERA, O., ENDLICHER, R., ROUŠAR, T., LOTKOVÁ, H., GARNOL, T., DRAHOTA, Z. & ČERVINKOVÁ, Z. The Effect of tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes In Vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, **2014**1-12.
50. KUMAR, H., KIM, I. S., MORE, S. V., KIM, B. W. & CHOI, D. K. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural Product Reports*, 2014, **31**(1), 109-139.
51. KUZU, N., BAHCECIOGLU, I. H., DAGLI, A. F., OZERCAN, I. H., USTUNDAG, B. & SAHIN, K. Epigallocatechin gallate attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by high fat diet. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, **23**(8 Pt 2), e465-470.
52. KWAK, M. K. & KENSLER, T. W. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, **244**(1), 66-76.
53. LAMBERT, J. D. & ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys*, 2010, **501**(1), 65-72.

54. LEWIS, K. N., MELE, J., HAYES, J. D. & BUFFENSTEIN, R. Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity. *Integr Comp Biol*, 2010, **50**(5), 829-843.
55. LIU, J., WU, K. C., LU, Y. F., EJUASE, E. & KLAASSEN, C. D. Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, **2013**305861.
56. MAIESE, K., CHONG, Z. Z., HOU, J. & SHANG, Y. C. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Exp Gerontol*, 2010, **45**(3), 217-234.
57. MAZZANTI, G., MENNITI-IPPOLITO, F., MORO, P. A., CASSETTI, F., RASCHETTI, R., SANTUCCIO, C. & MASTRANGELO, S. Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009, **65**(4), 331-341.
58. MERRILL, C. L., NI, H., YOON, L. W., TIRMENSTEIN, M. A., NARAYANAN, P., BENAVIDES, G. R., EASTON, M. J., CREECH, D. R., HU, C. X., MCFARLAND, D. C., HAHN, L. M., THOMAS, H. C. & MORGAN, K. T. Etomoxir-induced oxidative stress in HepG2 cells detected by differential gene expression is confirmed biochemically. *Toxicol Sci*, 2002, **68**(1), 93-101.
59. MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. *J Cell Physiol*, 2007, **213**(2), 286-300.
60. MICHALOPOULOS, G. K. Advances in liver regeneration. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, **8**(8), 897-907.
61. MOBASHER, M. A., GONZALEZ-RODRIGUEZ, A., SANTAMARIA, B., RAMOS, S., MARTIN, M. A., GOYA, L., RADA, P., LETZIG, L., JAMES, L. P., CUADRADO, A., MARTIN-PEREZ, J., SIMPSON, K. J., MUNTANE, J. & VALVERDE, A. M. Protein tyrosine phosphatase 1B modulates GSK3beta/Nrf2 and IGFIR signaling pathways in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Cell Death Dis*, 2013, **4**e626.
62. MOLINARI, M., WATT, K. D., KRUSZYNA, T., NELSON, R., WALSH, M., HUANG, W. Y., NASHAN, B. & PELTEKIAN, K. Acute liver failure induced by green tea extracts: case report and review of the literature. *Liver Transpl*, 2006, **12**(12), 1892-1895.
63. MURATA, H., YAGI, T., IWAGAKI, H., OGINO, T., SADAMORI, H., MATSUKAWA, H., UMEDA, Y., HAGA, S., TAKAKA, N. & OZAKI, M. Mechanism of impaired regeneration of fatty liver in mouse partial hepatectomy model. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, **22**(12), 2173-2180.
64. NI, H. M., BOCKUS, A., BOGGESS, N., JAESCHKE, H. & DING, W. X. Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology*, 2012a, **55**(1), 222-232.
65. NI, H. M., BOGGESS, N., MCGILL, M. R., LEBOSKY, M., BORUDE, P., APTE, U., JAESCHKE, H. & DING, W. X. Liver-specific loss of Atg5 causes persistent activation of Nrf2 and protects against acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol Sci*, 2012b, **127**(2), 438-450.
66. NIDDK (2014) *DRUG RECORD - GREEN TEA (CAMELLIA SINESIS)* [online]. In: LiverTox - Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases. c2010, poslední revize 4.11.2014 [cit.2015-01-23]. Dostupné z <http://livertox.nlm.nih.gov/GreenTea.htm>
67. OHKAWA, H., OHISHI, N. & YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, **95**(2), 351-358.
68. PALLOTTINI, V., MARTINI, C., BASSI, A. M., ROMANO, P., NANNI, G. & TRENTALANCE, A. Rat HMGCoA reductase activation in thioacetamide-induced liver injury is related to an increased reactive oxygen species content. *J Hepatol*, 2006, **44**(2), 368-374.
69. PFAFFL, M. W., HORGAN, G. W. & DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(9), e36.
70. REISMAN, S. A., BUCKLEY, D. B., TANAKA, Y. & KLAASSEN, C. D. CDDO-Im protects from acetaminophen hepatotoxicity through induction of Nrf2-dependent genes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009a, **236**(1), 109-114.
71. REISMAN, S. A., CSANAKY, I. L., ALEKSUNES, L. M. & KLAASSEN, C. D. Altered disposition of acetaminophen in Nrf2-null and Keap1-knockdown mice. *Toxicol Sci*, 2009b, **109**(1), 31-40.
72. RONCO, M. T., DEALVAREZ, M. L., MONTI, J., CARRILLO, M. C., PISANI, G., LUGANO, M. C. & CARNOVALE, C. E. Modulation of balance between apoptosis and proliferation by lipid peroxidation (LPO) during rat liver regeneration. *Mol Med*, 2002, **8**(12), 808-817.
73. ROUSAR, T., KUCERA, O., LOTKOVA, H. & CERVINKOVA, Z. Assessment of reduced glutathione: comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Anal Biochem*, 2012a, **423**(2), 236-240.
74. ROUSAR, T., NYDLOVA, E., CESLA, P., STANKOVA, P., KUCERA, O., PARIK, P. & CERVINKOVA, Z. Purified acetaminophen-glutathione conjugate is able to induce oxidative stress in rat liver mitochondria. *Physiol Res*, 2012b, **61** Suppl 2S103-109.

75. ROY, A. M., BALIGA, M. S. & KATIYAR, S. K. 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.
76. SAITO, Y., MORI, H., TAKASU, C., KOMATSU, M., HANAOKA, J., YAMADA, S., ASANOMA, M., IKEMOTO, T., IMURA, S., MORINE, Y., UTSUNOMIYA, T. & SHIMADA, M. Beneficial effects of green tea catechin on massive hepatectomy model in rats. *Journal of Gastroenterology*, 2014, **49**(4), 692-701.
77. SEABRA, A. L., SAVASSI-ROCHA, P. R., VASCONCELOS, A. C., LIMA, A. S., RODRIGUES, K. C. & ALMEIDA, H. M. Ischemia/reperfusion injury after continuous or intermittent hepatic pedicle clamping in rabbits. *Arq Bras Cir Dig*, 2012, **25**(2), 105-109.
78. SEEHOFER, D., SCHIRMEIER, A., BENGMARK, S., CHO, S. Y., KOCH, M., LEDERER, A., RAYES, N., MENGER, M. D., NEUHAUS, P. & NUSSLER, A. K. Curcumin attenuates oxidative stress and inflammatory response in the early phase after partial hepatectomy with simultaneous intraabdominal infection in rats. *J Surg Res*, 2010, **159**(1), 497-502.
79. SELZNER, M. & CLAIVIEN, P. A. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology*, 2000, **31**(1), 35-42.
80. SHANKAR, S., SUTHAKAR, G. & SRIVASTAVA, R. K. Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell cycle and induces apoptosis in pancreatic cancer. *Front Biosci*, 2007, **12**5039-5051.
81. SINGH, B. N., SHANKAR, S. & SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 2011, **82**(12), 1807-1821.
82. SMITH, D. M., WANG, Z., KAZI, A., LI, L. H., CHAN, T. H. & DOU, Q. P. Synthetic analogs of green tea polyphenols as proteasome inhibitors. *Mol Med*, 2002, **8**(7), 382-392.
83. STANKOVA, P., KUCERA, O., LOTKOVA, H., ROUSAR, T., ENDLICHER, R. & CERVINKOVA, Z. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicol In Vitro*, 2010, **24**(8), 2097-2103.
84. SURH, Y. J., KUNDU, J. K. & NA, H. K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med*, 2008, **74**(13), 1526-1539.
85. TIPOE, G. L., LEUNG, T. M., LIONG, E. C., LAU, T. Y., FUNG, M. L. & NANJI, A. A. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl4)-induced liver injury in mice. *Toxicology*, 2010, **273**(1-3), 45-52.
86. UZUN, M. A., KOKSAL, N., KADIOGLU, H., GUNERHAN, Y., AKTAS, S., DURSUN, N. & SEHIRLI, A. O. Effects of N-acetylcysteine on regeneration following partial hepatectomy in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Surg Today*, 2009, **39**(7), 592-597.
87. VENDEMIALE, G., GRATTAGLIANO, I., CARACENI, P., CARACCIO, G., DOMENICALI, M., DALL'AGATA, M., TREVISANI, F., GUERRIERI, F., BERNARDI, M. & ALTOMARE, E. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology*, 2001, **33**(4), 808-815.
88. WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 2005, **39**359-407.
89. YAMADA, Y., KIRILLOVA, I., PESCHON, J. J. & FAUSTO, N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94**(4), 1441-1446.
90. YANG, F., DE VILLIERS, W. J., MCCLAIN, C. J. & VARILEK, G. W. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr*, 1998, **128**(12), 2334-2340.
91. YASUDA, Y., SHIMIZU, M., SAKAI, H., IWASA, J., KUBOTA, M., ADACHI, S., OSAWA, Y., TSURUMI, H., HARA, Y. & MORIWAKI, H. (-)-Epigallocatechin gallate prevents carbon tetrachloride-induced rat hepatic fibrosis by inhibiting the expression of the PDGFRbeta and IGF-1R. *Chem Biol Interact*, 2009, **182**(2-3), 159-164.

## Přehled publikační činnosti

### Původní články

1. Kučera O, Lotková H, Staňková P, Podhola M, Roušar T, Mezera V, Cervinková Z. Is rat liver affected by non-alcoholic steatosis more susceptible to the acute toxic effect of thioacetamide? *Int J Exp Pathol*. 2011 Aug;92(4):281-9. IF = 2.566 (r. 2011).

2. **Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Cervinková Z. Epigallocatechin gallate does not accelerate the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. Dig Dis Sci. 2014 May;59(5):976-85. IF = 2.550 (r. 2014)**
  3. **Mezera V, Kucera O, Moravcová A, Peterová E, Cervinková Z. The effect of epigallocatechin gallate on hepatocytes isolated from normal and partially hepatectomized rats. Can J Physiol Pharmacol. 2014 Jun;92(6):512-7. IF = 1.546 (r. 2014)**
  4. Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Lotková H. Antioxidative effect of epigallocatechin gallate against D-galactosamine-induced injury in primary culture of rat hepatocytes. Acta Medica (Hradec Kralove). 2014;57(1):3-8.
  5. Kucera O, Mezera V, Moravcova A, Endlicher R, Lotkova H, Drahota Z, Cervinková Z. In vitro toxicity of epigallocatechin gallate on rat liver mitochondria and hepatocytes. Oxid Med Cell Longev. 2015, 201510. IF = 3.363 (r. 2014)
- 

#### **V recenzním řízení:**

6. Mezera V, Kucera O, Moravcova A, Peterova E, Rousar T, Rychtrmoc D, Sobotka O, Cervinkova Z. Comparison of acetaminophen toxicity in primary hepatocytes isolated from transgenic mice with different apolipoprotein E alleles.
7. Xu M, Tchkonja T, Ding H, Pirtskhalava T, White TA, Stout MB, Thomou T, Sepe A, Mezera V, Giorgadze N, Jensen M, LeBrasseur NK, Kirkland JL. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age.
8. Pertlíček J, Stehlík J, Musil D, Sadovský P, Mezera V. Vliv podání kyseliny tranexamové na krevní ztráty po primární jednostranné náhradě kolenního kloubu. The effect of tranexamic acid on blood loss after primary unilateral total knee arthroplasty: a prospective, single-center study
9. Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Rychtrmoc D, Lotková H. The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture.

#### **Statě ve sbornících**

1. Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Červinková Z. Vliv epigalokatechin gallátu (EGCG) na regeneraci jater po částečné hepatektomii u potkanů. XLI. májové hepatologické dny; 15. – 17. 5. 2013, Karlovy Vary (přednáška), abstrakt publikován v časopise: Gastroenterologie a hepatologie 2013; 67 (Suppl 1); str 1S10
2. Kučera O, Moravcová A, Roušar T, Mezera V, Lotková H, Endlicher R, Červinková Z. Posouzení hepatoprotektivního a hepatotoxického účinku epigalokatechingalátu na hepatocyty potkana v primární kultuře. XLI. májové hepatologické dny; 15. – 17. 5. 2013, Karlovy Vary (poster), abstrakt publikován v časopise: Gastroenterologie a hepatologie 2013; 67 (Suppl 1); str 1S20
3. Endlicher R, Drahota Z, Kučera O, Mezera V, Červinková Z. Vliv epigalokatechingalátu na respiraci izolovaných hepatocytů potkana a jeho možný antioxidační účinek na t-butylhydroperoxidem indukovaný oxidační stres. XLI. májové hepatologické dny; 15. – 17. 5. 2013, Karlovy Vary (poster), abstrakt publikován v časopise: Gastroenterologie a hepatologie 2013; 67 (Suppl 1); str 1S18
4. Mezera V, Tchkonja T, Pirtskhalava T, White TA, Kirkland JL. Effect of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, on senescence phenotype in old mice. 9th Congress of the European Union Geriatric Medicine Society; 2. – 4. 10. 2013, Benátky – Lido, Itálie (poster), abstrakt publikován v časopise: European Geriatric Medicine 2013; 4 (Suppl 1), str S102
5. Stout MB, White TA, List EO, Pirtskhalava T, Palmer AK, Mezera V, Berryman DE, LeBrasseur NK, Kopchick JJ, Kirkland JL. FaGHRKO mice are protected from age-related frailty despite lifelong obesity. 66th Annual Scientific Meeting of The Gerontological Society of America, 20. – 24. 11. 2013, New Orleans, LA, USA; abstrakt publikován v časopise: The Gerontologist 2013; 53 (S1); str 275



6. Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Červinková Z. Vliv epigalokatechin galátu (EGCG) na hepatocyty z potkanů po částečné hepatektomii. XLII. májové hepatologické dny; 28. – 30. 5. 2014, Karlovy Vary (poster), abstrakt publikován v časopise: Gastroenterologie a hepatologie 2014; 68 (Suppl 1); str 1S33-34
7. Kučera O, Roušar T, Sobotka O, Mezera V, Moravcová A, Rychtrmoc D, Lotková H, Červinková Z. Porovnání citlivosti hepatocytů potkana a myši v primární kultuře vůči toxickému účinku acetaminofenu. XLII. májové hepatologické dny; 28. – 30. 5. 2014, Karlovy Vary (poster), abstrakt publikován v časopise: Gastroenterologie a hepatologie 2014; 68 (Suppl 1); str 1S6
8. Mezera V, Kucera O, Moravcová A, Peterová E, Rychtrmoc D, Sobotka O, Roušar T, Červinková Z. Comparison of acetaminophen toxicity in primary hepatocytes isolated from transgenic mice with different apolipoprotein E alleles. 50th Congress of the European Societies of Toxicology - Eurotox 2014; 7. – 10. 9. 2014, Edinburgh (poster), abstrakt publikován v časopise: Toxicology Letters 2014; 229S; str S246-247
9. Kucera O, Mezera V, Roušar T, Červinková Z. Comparison of acetaminophen toxicity in rat and mouse hepatocytes. 50th Congress of the European Societies of Toxicology - Eurotox 2014; 7. – 10. 9. 2014, Edinburgh (poster), abstrakt publikován v časopise: Toxicology Letters 2014; 229S; str S244-245
10. Mezera V, Kucera O, Moravcová A, Peterová E, Rychtrmoc D, Sobotka O, Roušar T, Červinková Z. The effect of acetaminophen on primary hepatocytes isolated from transgenic mice with different apolipoprotein E genotypes. AASLD The Liver Meeting; 7. – 11. 11. 2014, Boston, MA, USA (poster), abstrakt publikován v časopise: Hepatology 2014; S1; str 716A

### **Přednášky na odborných setkáních**

1. Mezera V, Hůlková M, Šafka V, Fejfar T, Jirkovský V, Hůlek P. Noncompliance of patients after TIPS - is it related to hepatic encephalopathy? XXXVIII. májové hepatologické dny; 12. – 14. 5. 2010, Karlovy Vary (poster)
2. Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Červinková Z. Vliv epigalokatechin gallátu (EGCG) na regeneraci jater po částečné hepatektomii u potkanů. XLI. májové hepatologické dny; 15. – 17. 5. 2013, Karlovy Vary (přednáška)
3. Mezera V, Tchkonja T, Pirtskhalava T, White T, Kirkland JL. Effect of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, on senescence phenotype in old mice. 9th Congress of the European Union Geriatric Medicine Society; 2. – 4. 10. 2013, Benátky – Lido, Itálie (poster)
4. Mezera V, Tchkonja T, Pirtskhalava T, White T, Kirkland JL. Effect of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, on senescence phenotype in old mice. 10th International Medical Postgraduate Conference; 21. – 22. 11. 2013, Hradec Králové (přednáška)
5. Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Červinková Z. Vliv epigalokatechin galátu (EGCG) na hepatocyty z potkanů po částečné hepatektomii. XLII. májové hepatologické dny; 28. – 30. 5. 2014, Karlovy Vary (poster)
6. Mezera V, Kucera O, Moravcová A, Peterová E, Rychtrmoc D, Sobotka O, Roušar T, Červinková Z. Comparison of acetaminophen toxicity in primary hepatocytes isolated from transgenic mice with different apolipoprotein E alleles. 50th Congress of the European Societies of Toxicology - Eurotox 2014; 7. – 10. 9. 2014, Edinburgh (poster)
7. Mezera V, Kucera O, Moravcová A, Peterová E, Rychtrmoc D, Sobotka O, Roušar T, Červinková Z. The effect of acetaminophen on primary hepatocytes isolated from transgenic mice with different apolipoprotein E genotypes. AASLD The Liver Meeting; 7. – 11. 11. 2014, Boston, MA, USA (poster)
8. Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Červinková Z. Vliv epigalokatechin gallátu (EGCG) na regeneraci jater u potkanů po parciální hepatektomii. XIX. vědecká konference Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové, 21. 1. 2015, Hradec Králové (přednáška)