

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: Postgraduální doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: *Farmakologie a toxikologie*



PharmDr. Dalibor Černý

**Studium nitrobuněčných signálních molekul oxidu uhelnatého a oxidu
dusnatého v hepatocytech v souvislosti s hepatotoxickými a
hepatoprotektivními účinky vybraných látek**

Study on intracellular signal molecules of carbon monoxide and nitric oxide
related to hepatotoxic and hepatoprotective effects of selected substances

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc.

Praha, 2012

Identifikační záznam:

ČERNÝ, Dalibor. *Studium nitrobuněčných signálních molekul oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého v hepatocytech v souvislosti s hepatotoxickými a hepatoprotektivními účinky vybraných látek. [Study on intracellular signal molecules of carbon monoxide and nitric oxide related to hepatotoxic and hepatoprotective effects of selected substances]*. Praha, 2012. 120 s, 6 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Farmakologický ústav. Školitel: Farghali, Hassan

Abstrakt

Zdůvodnění a cíle: Léčba akutního fulminantního jaterního poškození vzniklého následkem různých vlivů (ischemicko-reperfuzní příčina, toxická příčina, infekční příčina, cholestatická příčina apod.) zůstává dosud velkým klinickým otazníkem. V současné době nemáme k dispozici klinicky ověřené, farmakologicky účinné a dostatečně univerzální látky v oblasti léčby akutního jaterního poškození různé etiologie. Cílem mé práce bylo tedy testovat na poli preklinického výzkumu účinnost vybraných látek ze skupiny cytoprotektiv s určitým hepatoprotektivním účinkem a zároveň najít nebo naznačit mechanismus tohoto jejich účinku, který jsem zkoumal v oblasti intracelulárních plyných signálních molekul NO a CO resp. enzymů klíčových pro jejich vznik NOS/HO. Mé doktorské studium mělo dva hlavní směry: 1) Experimentální sledování vzájemného vztahu systémů HO/CO a NOS/NO v prostředí hepatotoxických látek *in vitro* v izolovaných primárních potkaních hepatocytech a *in vivo* na potkaním modelu; 2) Hodnocení cytoprotektivního efektu vybraných látek na poškozené potkaní hepatocyty a zkoumat tento účinek v kontextu změn ve vybraných parametrech cytotoxicity/cytoprotektivity, antioxidačních parametrech, genové expresi mRNA u vybraných genů a na změnách v histologického stavu buněk/tkání/orgánů.

Metodika: Jako biochemické markery poškození/funkceschopnosti hepatocytů byly měřeny jaterní transaminázy (ALT, AST, α GST) dále urea a bilirubin. Jako markery lipoperoxidace byly měřeny konjugované dieny a malonyldialdehyd (TBARS). Jako markery antioxidační kapacity byly měřeny kataláza a redukovaný glutathion. V rámci studia systému NOS-2/NO byla měřena celková koncentrace dusitanů odrážející tvorbu NO a pomocí RT-PCR genová exprese mRNA pro gen NOS-2. V rámci studia systému HO-1/CO byly tkáňový CO a aktivita hemoxygenázy měřeny pomocí GC-UV a s pomocí RT-PCR genová exprese mRNA pro gen HO-1. Histologie byla hodnocena imunohistochemicky s použitím Annexin-V/propidium jodidu. Ke statistickému hodnocení byla používána analýza rozptylu s jednoduchým tříděním s následným mnohonásobným porovnáváním pomocí Bonferroniho nebo Tukey-Kramerova testu.

Výsledky: Všechny námi používané toxicitní modely způsobily významnou aktivaci systémů NOS-2/NO i HO-1/CO. Dále jsme na experimentech *in vitro* a *in vivo* prokázali histologicky i biochemicky cytoprotektivní účinek resveratrolu a kurkuminu, přičemž u obou bylo prokázáno oproti pozitivní kontrole snížení aktivity systému NOS-2/NO. U systému HO-1 bylo pozorováno snížení aktivity při resveratrolovém předlěčení (*in vitro* a *in vivo*) a naopak zvýšení aktivity při kurkuminovém předlěčení (*in vivo*). Předlěčení kurkuminem a resveratrolelem také snížilo intenzitu lipoperoxidace.

Závěry: Stejně jako ve studii *in vitro*, tak i *in vivo* vykázaly látky resveratrol a kurkumin silný hepatoprotektivní efekt (při použití proti tBH a/nebo LPS/D-GalN stimulované jaterní toxicitě) spojený s inhibičním účinkem na systém NOS-2/NO, který na základě literárních dat můžeme velmi dobře vysvětlit. Nicméně jednotný vliv na systém HO-1/CO z našich experimentů jednoznačně neplyne. Nelze tudíž ani s jistotou prokázat, že hepatoprotektivní účinek resveratrolu je přímo závislý na modulaci HO-1/CO systému. Můžeme pouze diskutovat, zda tento systém byl inhibován ve spojení se systémem NOS-2/NO. Budou nutné další studie s použitím inhibitorů a induktorů HO-1 a NOS-2, aby mohly být nastíněny jasnější mechanistické závěry, týkající se role gasotransmiterů v experimentálních hepatotoxických modelech.

Klíčová slova: játra, kurkumin, resveratrol, hemoxygenáza, syntáza oxidu dusnatého, oxid uhelnatý, oxid dusnatý, lipoperoxidace, hepatoprotektivita, hepatotoxicita, *tert*-butylhydroperoxid, D-galaktosamin, lipopolysacharid

Abstract

Background and aims: Treatment of acute fulminant liver damage arising as a result of various origins (ischemia-reperfusion injury, toxic shock, an infectious cause or cholestasis) still remains a major clinical problem. We currently do not have available clinically proven, pharmacologically effective and universal compound for the treatment of acute liver injury. The main aim of my research work was, therefore, to test the potential hepatoprotective effect of selected cytoprotective drugs and try to find out or suggest their mechanism of action, which we have examined in the systems for the intracellular gaseous signaling molecules NO and CO, where the key enzymes for their formation are NOS / HO respectively.

My PhD study had two main directions: 1) Experimental study of the relationship between HO / CO and NOS / NO systems in the environment of hepatotoxic substances on isolated primary rat hepatocytes and in rat model, 2) Evaluation of ameliorative effect of selected substances in the hepatotoxicity models and to test the relationship of this effect on changes in some parameters of cytotoxicity / cytoprotection, antioxidant parameters, gene expression of mRNA for selected genes and histological changes in the state of cells / tissues / organs.

Methods: We measured urea, bilirubin and liver transaminases ALT, AST, α GST as the markers of hepatocyte damage/viability. We estimated conjugated dienes and malonyldialdehyde as the markers of lipid peroxidation. We further measured catalase and reduced glutathione as the markers of antioxidant capacity. To test the NOS-2/NO system, we measured total nitrite concentration in plasma or perfusion medium and the mRNA gene expression for NOS-2 gene. To test the HO-1/CO system, we measured total tissue CO and hemoxygenase activity by gas chromatography with UV detection and also the mRNA gene expression for HO-1 gene. Morphological analysis was performed immunohistochemically with the use of Annexin-V/propidium iodide. For statistical evaluations, we used one way-ANOVA with multiple comparison Bonferroni or Tukey-Kramer tests.

Results: All the toxicity models, we used, caused significant induction of both NOS-2/NO and HO-1/CO systems. Furthermore, we demonstrated significant ameliorative effect of resveratrol and curcumin in our experiments, verified biochemically and/or morphologically. Both resveratrol and curcumin were able to decrease activity of NOS-2/NO system related to respective positive control group. On the other hand, we demonstrated the decrease of HO-1/CO system activity in resveratrol pretreatment but an increase of HO-1/CO system activity in curcumin pretreatment compared with positive control group. Both resveratrol and curcumin were able to decrease the intensity of lipid peroxidation.

Conclusions: Both *in vitro* and *in vivo* studies demonstrated the significant hepatoprotective effect of resveratrol and curcumin (when used in tBH and/or LPS/D-GalN toxicity model) and this effect was associated with inhibitory effects on NOS-2/NO system. This effect is also demonstrated in previous studies in literature. However, similar effects on the HO-1/CO system do not apply to our experiments. Consequently, we can not prove that the hepatoprotective effect of resveratrol is directly dependent on the modulation of HO-1/CO system. We can only argue whether this system was inhibited in association with the NOS-2/NO. It is necessary to carry out further studies using inhibitors and inducers of HO-1 and NOS-2 to shed more light on the mechanistic aspects of the role of these gas transmitters in experimental hepatotoxic models.

Key words: liver, curcumin, resveratrol, heme oxygenase, nitric oxide synthase, carbon monoxide, nitric oxide, lipid peroxidation, hepatoprotectivity, hepatotoxicity, *tert*-butylhydroperoxide, D-galactosamine, lipopolysaccharide

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 16. 7. 2012

PharmDr. Dalibor Černý

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto vyjádřil hluboce své poděkování následujícím lidem a to jmenovitě:

zejména svému školiteli **prof. Dr. Hassanu Farghali, DrSc.** za přátelský přístup, motivaci, neustálou podporu, pomoc, cenné rady a připomínky v průběhu celého mého postgraduálního studia;

paní **MUDr. Nikolíně Kutinové-Canové, Ph.D.** za obrovskou podporu – především na počátku, ale i v průběhu mého studia – za naučení základních laboratorních dovedností, technik, metod a mnoho dobrých rad ohledně Ph.D. studia a v neposlední řadě i velmi vřelé přijetí do pracovního kolektivu;

panu **Ing. Aleši Hořínkovi**, který mi umožnil pracovat v laboratoři molekulární biologie Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK, naučil mě metodiku práce při stanovování genové exprese a umožnil využívat přístrojové vybavení pro PCR metody;

celému týmu Hepatologické laboratoře 1. LF UK a VFN v čele s **prof. MUDr. Liborem Vítkem, Ph.D., MBA**, zejména pak **Ing. Kateřině Váňové** za naučení metodiky a pomoc s měřením oxidu uhelnatého v tkáních a buněčných kulturách, a dále **MUDr. Lucii Muchové, Ph.D.** za podnětné a konstruktivní konzultace výsledků mé práce;

panu **prof. MUDr. Jindřichu Martínkovi, DrSc.** z Ústavu embryologie a histologie 1. LF UK velice děkuji za časově náročnou pomoc při aplikaci imunohistochemických metod detekce markerů apoptózy a za interpretaci výsledků morfologických technik;

paní **PhDr. Květě Šubrtové** za jazykovou korekturu této práce.

Dále chci poděkovat celému kolektivu pracovníků Farmakologického ústavu 1. LF UK za vytvoření vynikajících pracovních podmínek a mnohostrannou pomoc, zde musím jmenovat především **prof. MUDr. Františka Perlíka, DrSc., MUDr. et Mgr. Jiřího Hodise, Ph.D.**, laborantky **Janu Buckovou, Alenu Hlouškovou, Libuši Šlehobrovou, Evu Prchlíkovou a Zdeňku Chmelíčkovou** a sekretářku ústavu paní **Lenku Liškovou**.

Závěrem patří moje poděkování také manželce **Bc. Janě Černé**, dceři **Klárce** a rodině za jejich trpělivost, povzbuzování, podporu, zkrátka, za vytvoření dokonalého zázemí během celého mého studia.

Tato práce by nevznikla bez podpory následujících finančních zdrojů:

- **granty** - GAČR 305/09/0004, GAČR 305/07/0061 a IGA MZ NR/9379-3/2007;
- **výzkumné záměry** - VZ MSM 0021620807, PRVOUK P25/LF1/2;
- **projekty** - SVV-2010-260512 a SVV-2011-262513.

OBSAH

1	PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA	9
1.1	SEZNAM PUBLIKACÍ IN EXTENSO, JEŽ JSOU PODKLADEM TÉTO DIZERTAČNÍ PRÁCE	9
1.2	SEZNAM ABSTRAKT TÝKAJÍCÍCH SE PŘÍMO DIZERTAČNÍ PRÁCE	9
1.3	SEZNAM ABSTRAKT PŘÍBUZNÝCH TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	10
1.4	OSTATNÍ PUBLIKACE A ABSTRAKTA BEZ VZTAHU K TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	11
1.5	MONOGRAFIE BEZ VZTAHU K TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE	11
2	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	12
	TEORETICKÝ ÚVOD DO PROBLEMATIKY.....	16
2.1	INTRACELULÁRNÍ PLYNNÉ SIGNÁLNÍ MOLEKULY CO A NO	16
2.1.1	<i>Oxid uhelnatý – CO</i>	18
2.1.2	<i>Oxid dusnatý – NO</i>	22
2.2	STUDOVANÉ MARKERY HEPATOCYTŮ	30
2.2.1	<i>Biochemické markery hepatocytárních funkcí</i>	30
2.2.2	<i>Markery antioxidační kapacity</i>	32
3	CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	33
4	MATERIÁL A METODY	34
4.1	CHEMIKÁLIE A TESTOVACÍ SOUPRAVY (KITY)	34
4.2	MĚŘENÍ GENOVÉ EXPRESE HO-1 A NOS-2 POMOCÍ REAL TIME PCR.....	34
4.3	MĚŘENÍ BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ TÝKAJÍCÍCH SE NOS/NO SYSTÉMU.....	36
4.3.1	<i>Přímé měření extracelulárního NO₂</i>	36
4.4	MĚŘENÍ BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ TÝKAJÍCÍCH SE HO/CO SYSTÉMU	37
4.4.1	<i>Měření CO pomocí plynové chromatografie s UV detekcí</i>	37
4.4.2	<i>Měření biliverdinu/bilirubinu jako vedlejších produktů syntézy CO</i>	37
4.5	MĚŘENÍ BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ VIABILITY/POŠKOZENÍ HEPATOCYTŮ.....	38
4.5.1	<i>Měření ALT</i>	38
4.5.2	<i>Měření urey</i>	39
4.5.3	<i>Měření alfa GST</i>	39
4.6	HODNOCENÍ BUNĚČNÉ MORFOLOGIE HEPATOCYTŮ	39
4.6.1	<i>Imunohistochemické barvení komplexem Annexin V / propidium jodidem</i>	39
4.7	METODY MĚŘENÍ PARAMETRŮ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY	40
4.7.1	<i>Přímá měření</i>	40
4.7.2	<i>Nepřímá měření</i>	40
4.8	STANOVENÍ CELKOVÉHO PROTEINU (TP).....	42
4.9	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	42
5	POUŽITÉ LÁTKY A EXPERIMENTÁLNÍ MODEL Y	44
5.1	ZVÍŘATA, TKÁŇOVÉ KULTURY A BIOREAKTOR	44
5.2	VYBRANÉ HEPATOTOXICITNÍ MODEL Y	46
5.2.1	<i>D-galaktosaminová toxicita jako model fulminantní hepatitidy in vivo i in vitro</i>	46
5.2.2	<i>In vitro toxicita vyvolaná tert-butylhydroperoxidem jako model radikálového poškození</i>	47
5.2.3	<i>Imunomodulace lipopolysacharidy vedoucí k akutní toxicitě in vivo</i>	48
5.2.4	<i>Kombinace LPS/D-GalN</i>	49
5.3	VYBRANÉ LÁTKY S PROTEKTIVNÍMI ÚČINKY NA HEPATOCYTY	49
5.3.1	<i>Silymarin</i>	52
5.3.2	<i>Resveratrol</i>	55
5.3.3	<i>Kurkumin</i>	57
6	VÝSLEDKY	59
6.1	PREINKUBACE RESVERATROLEM A SILYMARINEM NA MODELU POŠKOZENÍ KYSLÍKOVÝMI RADIKÁLY: BIOREAKTOR S IZOLOVANÝMI PRIMÁRNÍMI HEPATOCYTY	59
6.1.1	<i>Biochemické výsledky</i>	59

6.1.2	<i>Výsledky real time-PCR</i>	62
6.1.3	<i>Histologické nálezy</i>	64
6.2	PREMEDIKACE RESVERATROLEM NA MODELU FULMINANTNÍ HEPATITIDY NAVOZENÉ KOMBINACÍ LIPOPOLYSACHARIDU A D-GALAKTOSAMINU: IN VIVO STUDIE NA POTKANÍM MODELU	67
6.2.1	<i>Biochemické výsledky</i>	67
6.2.2	<i>Výsledky real time PCR</i>	74
6.2.3	<i>Histologické nálezy</i>	76
6.3	PREMEDIKACE KURKUMINEM NA MODELU FULMINANTNÍ HEPATITIDY NAVOZENÉ KOMBINACÍ LIPOPOLYSACHARIDU A D-GALAKTOSAMINU: IN VIVO STUDIE NA POTKANÍM MODELU	80
6.3.1	<i>Účinek na jaterní funkce</i>	80
6.3.2	<i>Účinek na aktivitu HO, expresi HO-1 a celkové tkáňové množství CO</i>	81
6.3.3	<i>Účinek na lipoperoxidaci, aktivitu enzymů oxidativního stresu a aktivaci NOS-2/NO systému</i> .	85
7	DISKUZE	89
8	SHRNUTÍ A ZÁVĚRY	102
9	SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ	104
10	PŘÍLOHA-PUBLIKACE I-IV.	119

1 PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA

1.1 Seznam publikací in extenso, jež jsou podkladem této dizertační práce

Černý D, Canová N, Martínek J, Hořínek A, Kmoníčková E, Zídek Z and Farghali H, Effects of resveratrol pretreatment on *tert*-butylhydroperoxide induced hepatocyte toxicity in immobilized perfused hepatocytes: Involvement of inducible nitric oxide synthase and hemoxygenase-1, *Nitric Oxide Biology and Chemistry* 20 (1), 1-8, 2009

Farghali H, Černý D, Kameníková L, Martínek J, Hořínek A, Kmoníčková E and Zídek Z, Resveratrol attenuates lipopolysaccharide-induced hepatitis in D-Galactosamine sensitized rats: role of nitric oxide synthase 2 and heme oxygenase-1, *Nitric Oxide Biology and Chemistry* 21 (3-4), 216-225, 2009

Černý D, Lekić N, Váňová K, Muchová L, Hořínek A, Kmoníčková E, Zídek Z, Kameníková L, Farghali H., Hepatoprotective effect of curcumin in lipopolysaccharide/D-galactosamine model of liver injury in rats: relationship to HO-1/CO antioxidant system, *Fitoterapia*, 82 (5), 786-791, 2011

Lekić N, Černý D, Hořínek A, Provazník Z, Martínek J, Farghali H., Differential oxidative stress responses to D-galactosamine-lipopolysaccharide hepatotoxicity based on real time PCR analysis of selected oxidant/antioxidant and apoptotic gene expressions in rat, *Physiological Research* 60 (3), 549-558, 2011

1.2 Seznam abstrakt týkajících se přímo dizertační práce

Černý D., Stiaková Z., Kmoníčková E., Zídek Z., Kutinová-Canová N., Farghali H. Caspase-3 and other markers in hepatocyte apoptotic and necrotic studies, *Chemické listy* 101 (S), 177-179, 2007

Farghali H, Cerny D., Canova NK, et al., Protective activity of resveratrol on tert-butylhydroperoxide and D-galactosamine induced hepatocyte apoptosis and necrosis *in vitro* and *in vivo*, Journal Of Hepatology 48 (Suppl. 2), 163-164, 2008

Lekić N, Cerny D, Farghali, Real Time PCR Analysis of Selected Oxidant/Antioxidant and Apoptotic Genes in D-Galactosamine-Lipopolysaccharide Hepatotoxicity in Rat, Drug Metabolism Reviews 42 (Suppl. 1), 169, 2010

Farghali H, Cerny D, Kamenikova L, Lekic N, Heme oxygenase 1/carbon monoxide and nitric oxide synthase 2/nitric oxide systems in cytotoxicity and cytoprotection: Application to experimental liver research, Toxicology Letters 205 (Suppl.1), 182, 2011

1.3 Seznam abstrakt příbuzných tématu dizertační práce

Zelenka J, Muchova L, Cerny D, et al., Metabolism of Bilirubin in Liver Cells Exposed to Oxidative Stress, Free Radical Biology and Medicine 45 (Suppl. 1), 93, 2008

Muchova Lucie, Zelenka Jaroslav, Lenicek Martin, Vanova Katerina, Juklova Miroslava, Cerny Dalibor, Farghali Hassan, Wong Ronald J., Vreman Hendrik J., Vitek Libor, Heme Oxygenase Activity In Estrogen Induced Cholestasis: A Cross-talk Between Estrogens And Bile Acids, Hepatology 48 (Suppl. S), 801, 2008

Muchova L, Vanova K, Zelenka J, Cerny D. et al., Opposite Effects Of Bile Acids And Estrogens On Heme Oxygenase Activity: Implications For Ethinylestradiol-Induced Cholestasis, Journal Of Hepatology 50 (Suppl. 1), 677, 2009

Muchova L, Vanova K, Lenicek M, Petr T, Micuda S, Brackova E, Fuksa L, Cerny D, Farghali H, Wong RJ, Vreman HJ, Vitek L, Heme Oxygenase-1 In Estrogen-Induced Cholestasis: A Potential Therapeutic Target?, Hepatology 52 (4S), 668A, 2010

Muchova L, Vanova K, Petr T, Smid V, Lenicek M, Micuda S, Brackova E, Fuksa L, Cerny, D, Farghali H, Wong RJ, Vreman HJ, Vitek L, Protective Effects Of Heme Oxygenase-1 In Ethinylestradiol-Induced Cholestasis In Rats, Hepatology 54 (Suppl.1), 773A, 2011

1.4 Ostatní publikace a abstrakta bez vztahu k tématu dizertační práce

Horinek A., Panczak, A. , Rocinova, K., Mokrejsova M., Korabecna M., Cerny D., Tesar V., Quantification of Free Plasma DNA and Assessment of Selected Express Profiles in Haemodialysis Patients, *Kidney & Blood Pressure Research* 33 (4), 320, 2010

Černý D, Poněšický J, Lerchová P, Baštářová H, Kolombo I, Halačová M, Toběrný M, Zkušenost s kombinovanou intrakavernózní léčbou těžké erektilní dysfunkce použitím trojkombinace vazoaktivních látek, *Urologie pro praxi* 13 (1), 20-22, 2012

1.5 Monografie bez vztahu k tématu dizertační práce

Černý D, Předepisování léčivých přípravků pro studenty lékařských oborů, Nakladatelství Karolinum 2010, 120 stran, formát A4, ISBN 9788 0246 1839 5

2 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACH	acetylcholin
AG	aminoguanidin
AK	aminokyselina/-y
ALT	alaninaminotransferáza
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
ANOVA	analýza rozptylu
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
BR	biliverdin reduktáza
BSA	bovinní (hovězí) sérový albumin
c	koncentrace
Ca ²⁺	vápenatý kationt
(Ca _i ²⁺)	intracelulární koncentrace vápenatých kationtů
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAT	kataláza
CD	konjugované dieny
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
cNOS	konstitutivní forma syntázy oxidu dusnatého
CNS	centrální nervový systém
CO	oxid uhelnatý
CO ₂	oxid uhličitý
CoA	koenzym A
CoASH	starší synonymní zkratka označující také koenzym A
COX-1	konstitutivní forma cyklooxygenázy
COX-2	inducibilní forma cyklooxygenázy
CsA	cyklosporin A
CYP450	cytochrom P450
CYP 3A4	izoforma 3A4 cytochromu P450
Cyt C	cytochrom c

D-GalN	D-galaktosamin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTNB	5,5'-dithio-2-nitrobenzoová kyselina
EDRF	endotelový relaxační faktor
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
eNOS	endoteliální forma syntázy oxidu dusnatého, někdy též nazývaná NOS-3
ER	endoplazmatické retikulum
FAD	flavinadenindinukleotid
Fas	antigen CD95
FasL	ligand antigenu CD95 = Fas ligand
FBS	fetální bovinní sérum
FFA	volné mastné kyseliny („free fatty acids“)
FMB	membránový deskový bioreaktor („flat membrane bioreactor“)
sGC	solubilní guanylylcykláza
GSH	redukovaný glutathion
α -GST	alfa glutathion-S-tranferáza
HEM	železnatý protoporfyrin IX
HO	hemoxygenáza
HO-1	inducibilní forma hemoxygenázy (viz též Hsp 32)
HO-2	konstitutivní forma hemoxygenázy
HO-3	konstitutivní forma hemoxygenázy
Hsp	bílkovina teplotního šoku (heat shock protein)
Hsp 32	jiné označení pro hemoxygenázu-1 (bílkovina teplotního šoku 32)
IFN	interferon
I κ B	inhibiční protein nukleárního faktoru- κ B
IKK	I κ B kináza
IL	interleukin
IL-2R	receptor pro interleukin 2
iNOS	indukovatelná forma syntázy oxidu dusnatého
I-R	ischemicko-reperfuzní
IRF-1	interferonový regulační faktor-1
KHB	Krebs-Henseleitův pufr
KM	kompletní médium

KUR	kurkumin
L-NAME	N-nitro-L-argininmethylester
L-NMMA	N-monomethyl-L-arginin
LPS	lipopolysacharidy ve standardizované směsi získané z <i>Escherichia coli</i>
5-LOX	5-lipooxygenáza
MAPK	mitogenem aktivované proteinové kinázy
MARS	„molecular adsorbent recirculating system“
MDA	malonyldialdehyd
MPT	„mitochondrial permeability transition“
mtNOS	mitochondriální forma syntázy oxidu dusnatého
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2,5-difenyltetrazolium bromid
mRNA	informační („messenger“) ribonukleová kyselina
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukována forma nikotinamidadeninudinukleotidu
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF-AT	nukleární faktor aktivovaných T lymfocytů
NF-κB	nukleární faktor κB
NK	nukleová/-é kyselina/-y
iNOS	inducibilní forma syntázy oxidu dusnatého, běžněji nazývaná NOS-2
nNOS	neuronální forma syntázy oxidu dusnatého, též nazývaná NOS-1
NO	oxid dusnatý
NO ⁺	nitrosoniový kationt
NO ⁻	nitroxylový aniont
NO ₂ ⁻	nitritový anion = dusitanový anion
NO ₃ ⁻	nitrátový anion = dusičnanový anion
NOHLA	N-hydroxy-L-arginin
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NOS-1	neuronální forma syntázy oxidu dusnatého, též nazývaná nNOS
NOS-2	inducibilní forma syntázy oxidu dusnatého, někdy též nazývaná iNOS
NOS-3	endoteliální forma syntázy oxidu dusnatého, někdy též nazývaná eNOS
O ₂ ⁻	superoxidový aniont
OH ⁻	hydroxylový radikál
ONOO ⁻	peroxynitritový aniont
PBS	fosfátový pufr

PKA	protein kináza A
PKG	protein kináza G
PPAR	nukleární receptor aktivovaný peroxizomovými proliferátory
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RES	resveratrol
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní sloučeniny dusíku
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
RT	reverzní transkripce
SEM	standardní chyba průměru
SIRT-1	Silent Information Regulator Two – 1. podtyp
SM	silymarin
SOD-1	superoxiddismutáza-1
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamin
TAG	triacylglyceroly
TBA	kyselina thiobarbiturová
TCA	kyselina trichloroctová
TBARS	látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou – hl. látkou je MDA
TGF	transformující růstový faktor
Th	pomocný T lymfocyt
TNF	tumor nekrotizující faktor
TP	celková bílkovina
UDP	uridindifosfát
VR	volné radikály

TEORETICKÝ ÚVOD DO PROBLEMATIKY

2.1 Intracelulární plynné signální molekuly CO a NO

Volné radikálové plyny oxid uhelnatý (CO) a oxid dusnatý (NO) jsou v přírodě poměrně běžně zastoupené molekuly, které mají zcela odlišné biologické vlastnosti podle toho, zda působí uvnitř či vně živých organismů. Oxid dusnatý je velmi nestabilní látka, jež podléhá spontánní fotooxidaci na toxický oxid dusičitý NO₂. Oxid uhelnatý je stabilnější molekula, která podléhá podobné oxidaci na oxid uhličitý, ovšem ne tak snadno. V atmosféře jsou obě tyto látky považovány za nežádoucí produkty především lidské civilizace – spalování ropy, zemního plynu, biomasy, odpadu, kouření atd. Neprůmyslovou cestou se dostává NO do ovzduší prostřednictvím blesku či lesních požárů a CO díky sopečné činnosti nebo uhelnatění některých organických látek.

Na druhé straně je ovšem dávno známo, že tyto molekuly mají i biologický původ. Vznikají jako přirozené produkty některých bakterií a zajišťují jim tak nezbytné podmínky pro přežití. Mezi anaerobní bakterie produkující NO spolu s N₂O patří některé kmeny *Pseudomonas spp.* či *Alcaligenes spp.* a z aerobních autotrofů je to například *Nitrosomonas europaea*. CO je pak přirozeným produktem některých archaebakterií i eubakterií – např. známý *Proteus vulgaris* a mnoha mořských řas.

Exogenní působení těchto radikálů či jejich produktů způsobuje prokazatelné poškození zdraví člověka i ostatních živočichů. Akutní expozice oxidu dusičitému, oxidačnímu produktu oxidu dusnatého, způsobuje nekrózy alveolárních buněk a edém plic. Ještě těžší poškození vyvolává samotný NO, protože pravděpodobnou reakcí se superoxidem způsobuje větší oxidační stres a nekrózu alveolů v masivnějším měřítku. Co se týče působení na rostliny, i tam byl jednoznačně prokázán fytotoxický efekt, projevující se zmenšeným růstem a produktivitou. Oxid uhelnatý je někdy přezdíván „tichým zabijákem“ z důvodu vysoké a spolehlivé toxicity a zároveň zrádné nenápadnosti – je bezbarvý, nedráždivý, bez zápachu. Jeho toxikologický profil je všeobecně známý a vychází z principu, že CO se oproti kyslíku váže s 250 krát vyšší afinitou na hemoglobin, přičemž vzniká karbonmonoxyhemoglobin A (HbCO A), který následně není schopen plnit funkci přenašeče kyslíku. Hlavním důsledkem působení CO je tak tkáňová hypoxie a dále reakce CO s ostatními hemoproteiny, jako cytochrom P450, cytochrom C oxidáza, katalázy či myoglobin. Nejzranitelnějšími orgány akutně navozenou hypoxií jsou mozek a srdce. Další

prognóza intoxikovaného je pak závislá na délce expozice CO a následné poskytnuté pomoci (např. intenzivní reoxygenace v hyperbarické komoře). Hovoříme-li o chronické expozici oxidu uhelnatému, pak je s jistotou prokázána hypertrofie obou komor srdečních, zvýšení hematokritu, změny v anatomii cévního zásobení srdce a v architektuře cévní stěny.

Endogenní nitrobuněčná produkce těchto molekul a jejich zapojení do transmitterových systémů buněčné signalizace je známa zhruba od osmdesátých let 20. století. Stejně jako byly studovány mnohé jiné intracelulární mechanismy, tak i „gasotransmitery“, jak jsou tyto plynné radikály někdy nazývány, sehrály svou úlohu. Za nejvýznamnější gasotransmitery se dnes považují tři typické molekuly - oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sulfan (H_2S).

Gasotransmitery mají následující společné vlastnosti [1]:

- 1) Jsou to malé plynné molekuly.
- 2) Jsou volně prostupné všemi membránami. Jejich účinek není závislý na membránových receptorech. Mohou mít endokrinní, parakrinní i autokrinní účinek. V rámci jejich endokrinního působení se mohou například uvolnit do systémové cirkulace, být pomocí scavengerů dopraveny k cílovému místu účinku, zde být uvolněny a modulovat funkce cílového místa.
- 3) Jsou endogenně a enzymaticky tvořeny a jejich tvorba je regulována.
- 4) Mají dobře definované specifické funkce při fyziologických koncentracích, ale jakékoliv změny v těchto koncentracích vyvolají i změny fyziologie.
- 5) Jejich endogenní funkce mohou být zamaskovány jiným exogenním působením.
- 6) Jejich působení v buňce může, ale také nemusí být zprostředkováno jinými posly, ale musí mít v buňce vždy specifické molekulárně-biologické cíle.

Zvláště o oxidu dusnatém dnes víme, že hraje roli při regulaci nejrůznějších fyziologických a patofyziologických procesů jako jsou: hypertenze, diabetes, ischemická choroba srdeční, zánět, erektilní dysfunkce, stárnutí, menopauza, hyperlipidemie, ateroskleróza, ontogeneze, drogová závislost, motilita gastrointestinálního traktu, poruchy paměti a učení, anorexie, obezita, tuberkulóza či solární dermatitida. V roce 1998 Robert Furchgott, Louis Ignarro a Ferid Murad obdrželi Nobelovu cenu za fyziologii právě za objevy v oblasti oxidu dusnatého. CO je molekula oproti NO intracelulárně zkoumaná kratší dobu, ale očekává se od ní minimálně stejný přínos jako od molekuly „sesterské“. Příklady srovnání (ne kompletní výčet) parametrů obou molekul jsou v tabulce 1.

	CO	NO
Hlavní substrát	Hem	L-arginin
Mateřský enzym	Hemoxygenáza	NO syntáza
Induktor	Volné radikály	ACH, endotoxin
Scavenger	Hemoglobin	Hemoglobin
Inhibitor	Zink-protoporfyrin IX	Nitro-L-arginin methyl ester
Buněčný cíl	cGMP, K _{Ca} kanály	cGMP, K _{Ca} kanály
Interakce s aminokyselinou	Histidin	Cystein
Poločas	minuty	Sekundy
Tkáňový zdroj produkce	◀Hladkosvalové buňky◀ a ▶endotheliální buňky▶	

Tabulka 1: Vzájemné porovnání vybraných vlastností CO a NO

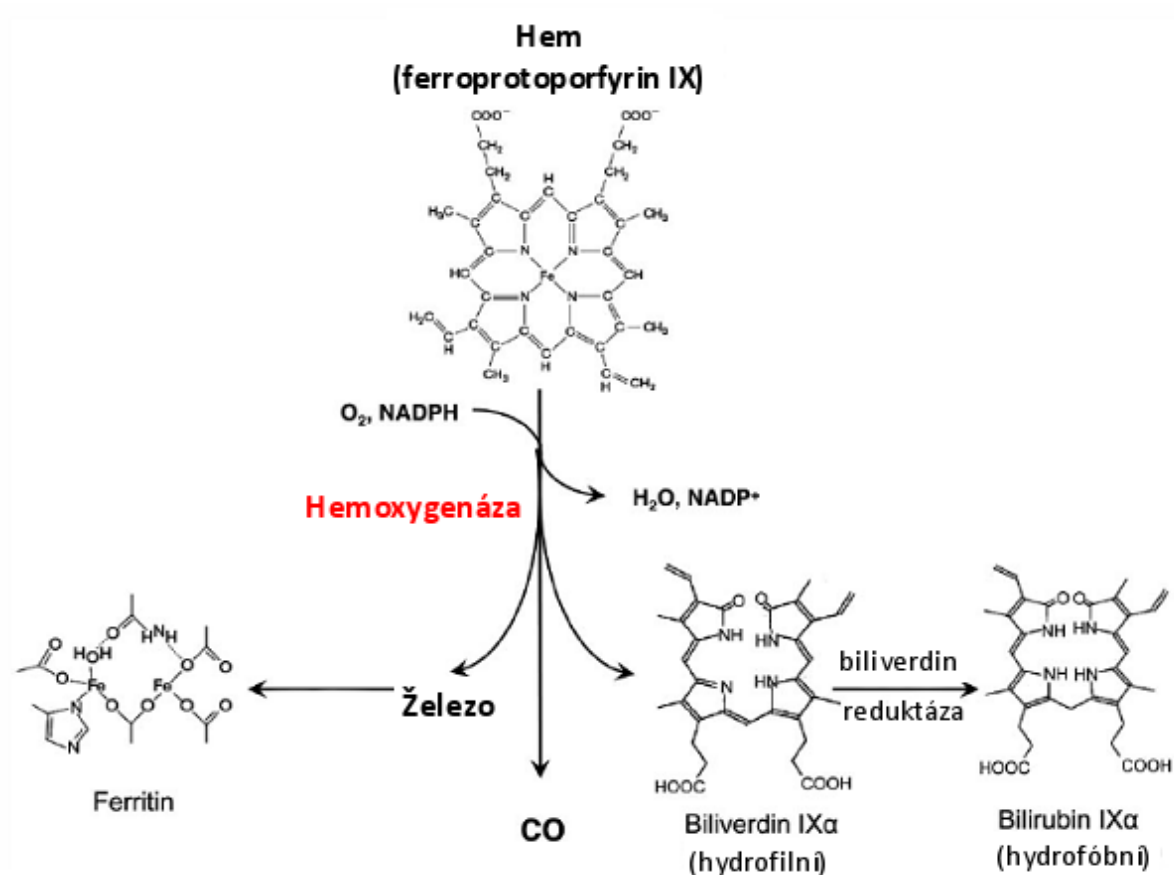
Obě dvě molekuly CO i NO a jejich význam v buněčných procesech budou hlavními tématy následujících kapitol.

2.1.1 Oxid uhelnatý – CO

2.1.1.1 Syntéza CO a jeho stabilita

Hlavní intracelulární biosyntetický zdroj oxidu uhelnatého (CO) jsou tři izoformy enzymu hemoxygenáza (HO) [2] a dále vzniká při jiných procesech – metabolismus mikrosomálních lipidů (lipoperoxidace katalyzovaná železem a askorbovou kyselinou a doprovázená vznikem malonyldialdehydu - MDA - [3, 4]) a některých xenobiotik např. fenobarbital, diphenylhydantoin [5] nebo progesteron [6]. Endogenní produkce CO je díky lipoperoxidaci ubikvitární u mnoha typů buněk v mozku, ledvinách, slezině i krvi. Zajímavé je, že vznik CO díky lipoperoxidaci nebyl popsán u potkaních hepatocytů a kardiomyocytů [4], ale byl popsán u králíčích [7] a myších hepatocytárních mikrosomů [8].

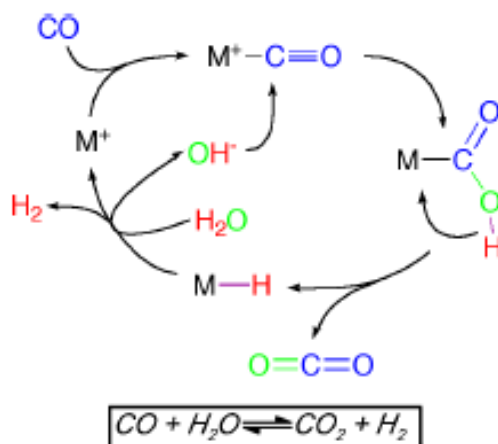
Dosud jsou známy tři základní izoformy hemoxygenázy HO-1, HO-2 a HO-3, přičemž HO-2 a HO-3 jsou konstitutivní a HO-1 inducibilní, později klasifikován jako savčí stresový protein primární buněčné obrany. Hemoxygenáza je klíčovým enzymem pro biodegradaci hemu. Při této NADPH dependentní oxidaci vzniká ekvimolární množství železa (Fe²⁺), biliverdinu a CO (viz obr. 1).



Obrázek 1: Hemoxygenáza je klíčovým enzymem pro odbourávání hemu. Rozkládá porfyrinový kruh na cílové produkty: biliverdin, volný ion železa Fe^{2+} a oxid uhelnatý (CO). U savců se biliverdin ihned následně přeměňuje na bilirubin pomocí biliverdin-reduktázy. (Upraveno dle [9].)

Na rozdíl od molekuly NO je molekula CO mnohonásobně stabilnější a proto jí lze velmi dobře měřit v plynné i rozpuštěné podobě a to i v poměrně dlouhém časovém odstupu. Molekula podléhá oxidaci díky cytochrom C oxidáze za vzniku CO_2 při současném uvolnění energie v mitochondriích [10]. Dále může být z organismu po průniku do systémové cirkulace v nezměněné formě vydechnuta [11], což je opět jeden z potenciálních neinvazivních měřitelných ukazatelů jeho produkce, vztaženo samozřejmě ještě k jiným ukazatelům, např. bilirubinu. Nejvíce se však molekula v organismu deponuje vazbou na hemoglobin v červených krvinkách za tvorby COHb (80 %), zbytek pojmu ostatní hemoproteiny [12]. Ačkoliv redistribuce CO za fyziologických podmínek nebyla dosud samostatně zkoumána, obecně platí, že biodegradční mechanismy pro CO jsou mnohem pomalejší než mechanismy biosyntetické [13]. U mikroorganismů existuje zvláštní rodina CO

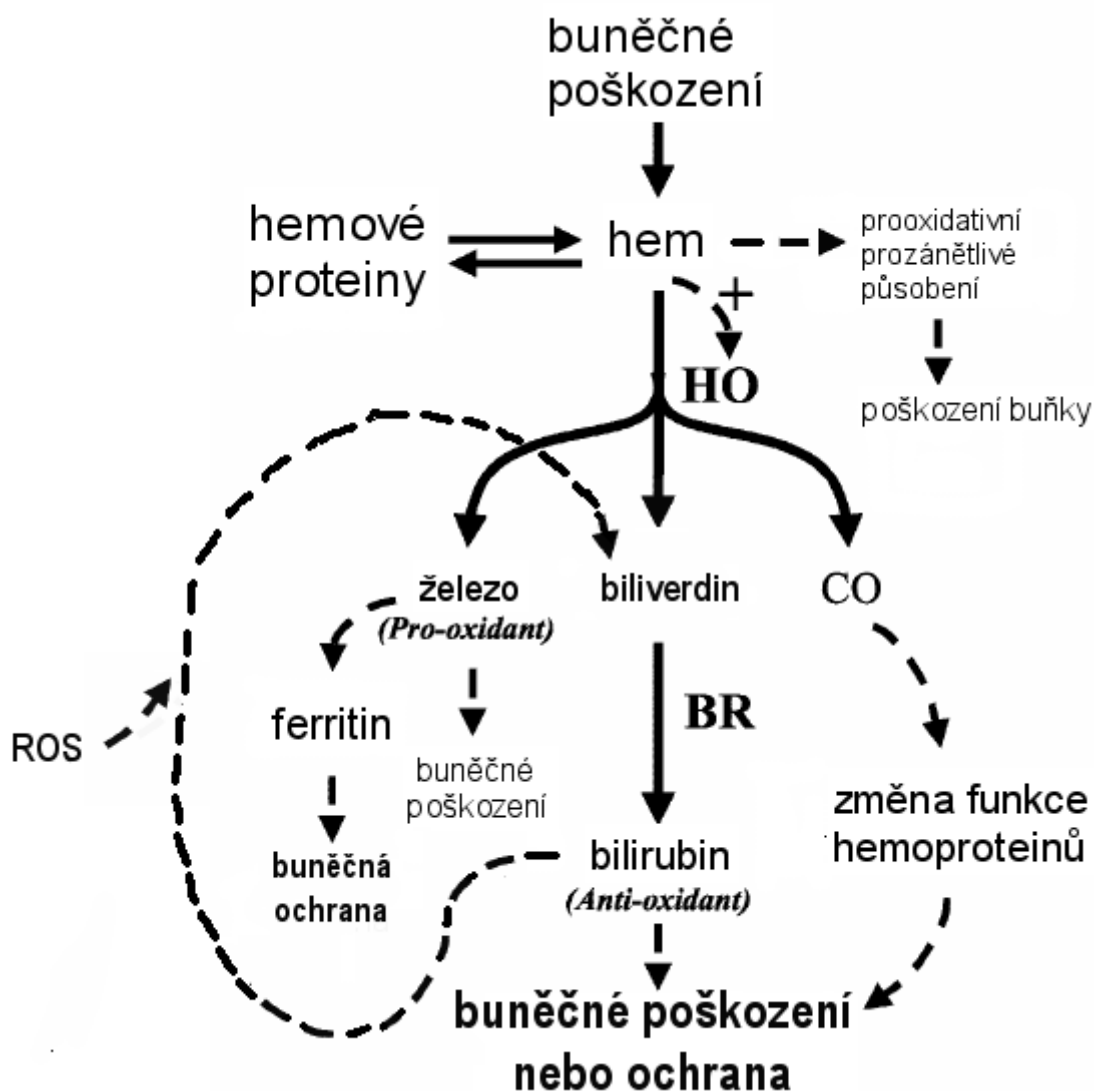
dehydrogenáz a acetylkoenzym A syntáz, které např. pomocí molekuly vody dokáží oxidovat CO na CO₂ a také redukovat zpět CO₂ na CO – obr. 2 [14].



Obrázek 2: Organometalická reakční kaskáda – přenos kyslíku z vody na CO a zpět katalyzovaný CO dehydrogenázami. M⁺ - kation kovu (nejčastěji Cu²⁺, Ni²⁺ či Zn²⁺)

2.1.1.2 Význam CO a ostatních produktů HO v cytoprotektivě

Indukce hemoxygenázy, hlavní biosyntetické cesty vzniku CO, ať už nějakou endogenní látkou nebo xenobiotikem, je většinou chápána jako příznivý proces pro cytoprotektivní účinek [15]. Existují však také publikace, které tuto skutečnost zpochybňují [16]. Hovoří o nadměrném vzniku železa, které se nestačí biologicky zpracovat a působí cytotoxicky. Nastává tedy paradoxní situace, kdy enzym, o kterém se všeobecně tvrdí, že působí díky svým produktům cytoprotektivně, nacházíme u některých cytoprotektivně působících látek downregulován, nebo naopak jeho hyperupregulace může vést k cytotoxicitě. Pak ovšem vyvstává další otázka, zda tento efekt souvisí s hemoxygenázou resp. s CO. Co se týče dalších produktů odbourávání hemu – biliverdinu/bilirubinu, ty patří mezi vynikající antioxidanty, a od jejich indukovaného množství při nejrůznějších jaterních onemocněních se očekává hepatoprotektivní efekt, který je pak chápán jako určitá forma defensivity hepatocytů (viz obr. 3.) [17].



Obrázek 3: Klíčová role hemoxygenázy (HO) v reakci na buněčné poškození u hepatocytů spočívá v ovlivnění degradace hemu, který má nitrobuněčné prozánětlivé a prooxidační vlastnosti. Jako produkt biodegradace vzniká biliverdin, který je velmi rychle následně přeměněn biliverdinreduktázou (BR) na silný antioxidant bilirubin, dále CO, u něhož se rovněž předpokládá cytoprotektivní efekt, ale také volné železo, které působí přesně antagonisticky oproti prvním dvěma látkám. Depozicí do ferritinu se jeho negativní vlastnosti potlačují. Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) mohou mj. oxidovat bilirubin zpět na biliverdin.

2.1.1.3 Využití CO signalizace ve vztahu k hepatocytům

Metabolismus biologicky aktivních xenobiotik probíhá převážně v játrech. Hepatobiliární exkrece, probíhající díky specifickým přenašečům na hepatocelulární membráně, zajišťuje detoxifikaci hepatocytů, což zmírňuje akutní zánětlivé procesy.

Endogenní CO tvořený v submikromolární koncentraci byl zaznamenán v perfuzátu z perfuzního modelu izolovaných jater [18]. Exprese konstitutivní HO-2 byla potvrzena nejen v hepatocytech, ale i v Kupfferových buňkách či endotheliálních buňkách, zatímco HO-1 je konstitutivně exprimována pouze v Kupfferových buňkách. Inducibilní HO-1 je pak exprimována jak v parenchymálních, tak v neparenchymálních buňkách jater [19]. Obecně je aktivita HO indukovatelná *in vivo* glukagonem, insulinem či adrenalinem [20]. Up-regulace exprese HO-1 snižuje ischemicko-reperfuzní poškození hepatocytů [21] a specifický inhibitor tohoto enzymu (zinkprotoporfyrin) tento efekt potlačuje [18]. Na buněčné úrovni je arteriální přítok kontrolován systémem HO/NOS a CO jako hlavní produkt HO aktivuje sGC v sinusoidálních pericytech, které kontrolují sinusoidální tonus a průtok, což umožňuje udržet dostatečný průtok portálním řečištěm i v různých patofyziologických případech [22]. CO reguluje rovněž kontraktilitu žlučovodů a tvorbu žluči [23]. Tento efekt má však určitou stropní mez [24]. Dále CO ovlivňuje influx HCO_3^- a K^+ iontů a právě ovlivnění K^+ kanálů je dosud považováno za jeden z mechanismů choleretického účinku tohoto plynného signálu.

2.1.2 Oxid dusnatý – NO

2.1.2.1 Syntéza NO a jeho stabilita

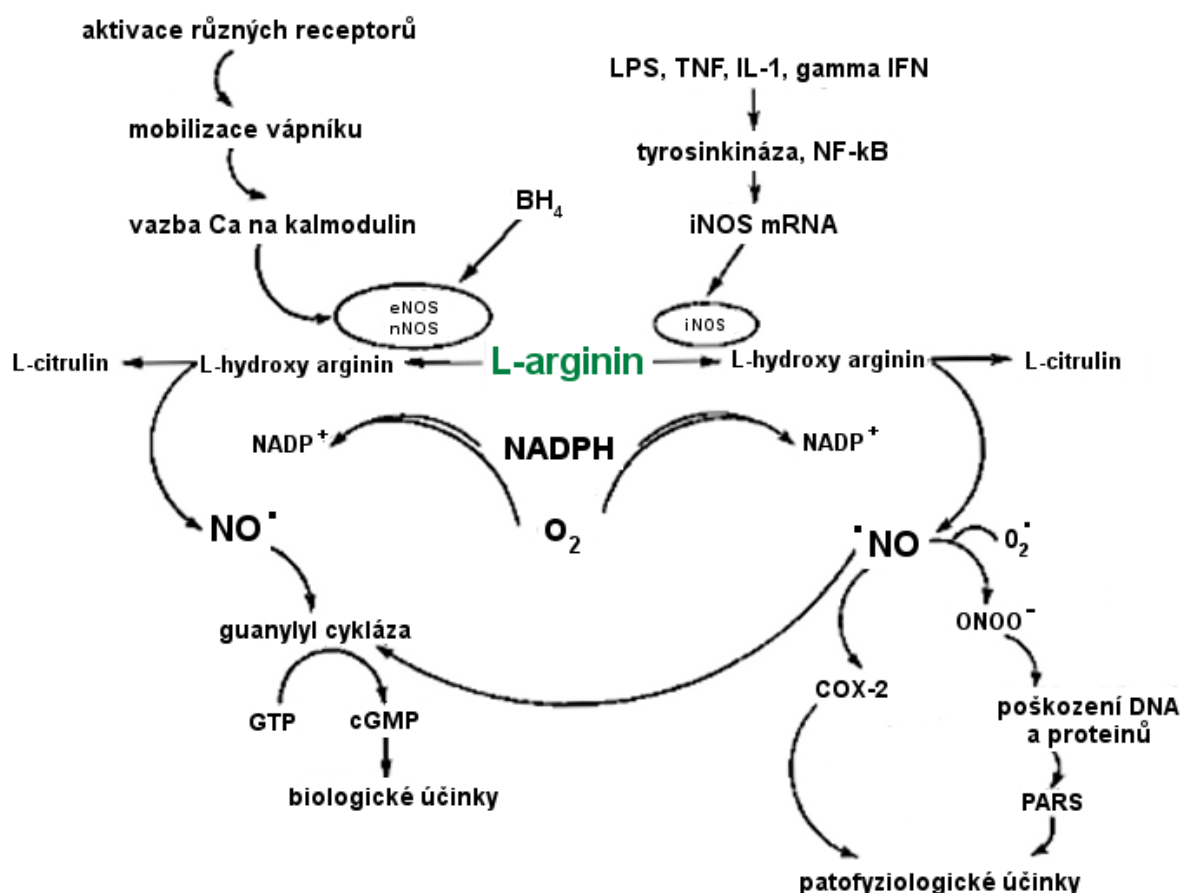
Oxid dusnatý (NO^\bullet nebo jednoduše NO) je vysoce difuzní plyn, syntetizovaný rodinou enzymů, které jsou společně nazývány syntázy NO (NOS). Byly identifikovány tři izoformy NOS: »inducibilní« forma, tvořená (v makrofázích, Kupfferových buňkách, hepatocytech, neutrofilech, fibroblastech, vaskulárním hladkém svalu a endoteliálních buňkách) v odpověď na patologické stimuly, a dvě tzv. “konstitutivní“ formy, které jsou přítomné za fyziologických podmínek v endotelu a v neuronech. Isoformy jsou označeny jako iNOS (nebo mNOS či NOS-2), eNOS (ecNOS, NOS-3) a nNOS (ncNOS, NOS-1); eNOS však není omezena pouze na endotel, ale je přítomna v kardiomyocytech, v ledvinných mesangiálních buňkách, osteoblastech a osteoklastech, a v malém množství v krevních destičkách. Konstitutivní enzymy generují malá (pikomolární) množství NO, zatímco aktivita iNOS je přibližně tisíckrát vyšší.

Tvorba oxidu dusnatého z L-argininu a donorů NO je znázorněna na obr. 3. Aktivace NOS – vstupem extracelulárního kalcia v případě konstitutivního enzymu nebo důsledkem aktivace inducibilní NOS cytokiny – vede k přeměně L-argininu na L-citrulin a NO.

Přeměna L-argininu na NO a L-citrulin je inhibována některými antagonisty argininu, jako je NG-monomethyl-L-arginin (L-NMMA); některé z antagonistů jsou specifickými inhibitory určitých izoform NOS a ostatní působí nespecificky. Některé donory NO, např. nitroprussid, vytvářejí ve vodných roztocích NO spontánně, kdežto ostatní donory jako furoxany a organické nitráty a nitrity (např. nitroglycerin) vyžadují k uvolnění NO přítomnost thiolové sloučeniny (např. cysteinu). Vzniklý NO reaguje s hemovou částí rozpustné guanylylcyklázy (sGC) a výsledkem je alosterická transformace a aktivace enzymu, která vede ke vzniku cGMP z GTP; aktivace rozpustné guanylylcyklázy oxidem dusnatým může být inhibována metylenovou modří. Afinita NO k železu je odpovědná i za jeho inhibiční působení na některé enzymy (NO reaguje s centrem těchto enzymů obsahujícím železo-síru). Je zajímavé, že oxid uhelnatý (CO), jiná plynná sloučenina tvořená endogenně při katabolismu hemu, má řadu podobných vlastností jako NO (aktivace rozpustné guanylylcyklázy), ale na rozdíl od NO (který má navíc jeden elektron) je molekula CO v přítomnosti kyslíku stabilní. Afinita NO k hemoglobinu je o několik řádů vyšší než afinita CO. NO podléhá jak oxidačním, tak redukčním reakcím, jejichž výsledkem je tvorba řady oxidů dusíku.

Velmi vysoké dávky L-argininu jsou za určitých patologických stavů (např. hypercholesterolemie aj.), při kterých je funkce endotelu poškozena, schopné endoteliální syntézu NO obnovit. Možným vysvětlením tohoto jevu je, že existuje určitý pool substrátu, který je pro enzym dosažitelný a který může být vyčerpán i při celkové vysoké koncentraci cytoplazmatického argininu; další možností je kompetice s endogenními inhibitory NOS, např. s asymetrickým dimethylargininem (ADMA), který může být při hypercholesterolemii zvýšen.

Jak bylo již uvedeno, je aktivita konstitutivních izoform NOS řízena intracelulárním kalcium-kalmodulinem, a nejdůležitější stimuly, které za fyziologických podmínek řídí v rezistentních cévách syntézu endoteliálního NO, jsou pravděpodobně stimuly mechanické (pulzní průtok). Mimoto jsou na endoteliálních buňkách receptory pro řadu vazodilatačních látek, jako je acetylcholin, substance P a bradykinin, a při jejich obsazení se rovněž zvyšuje obsah intracelulárního vápníku (Ca_i^{2+}) a stimuluje biosyntéza endoteliálního NO. Nezdá se ale, že by každý z těchto agonistů nacházel uplatnění za fyziologických podmínek (uvedené látky jsou významným nástrojem při studiu endoteliální funkce). Kalciové ionofory (např. A23187) a polykationty (např. poly-L-lysin) vyvolávají relaxaci závislou na endotelu [25].



Obrázek 4: Tvorba oxidu dusnatého různými izoformami NOS a jeho následné účinky

Zkratky: BH_4 - tetrahydrobiopterin; COX-2 - cyklooxygenáza typu 2; IFN - interferon; IL-1 - interleukin-1; LPS - lipopolysacharid; NF-kB - nukleární faktor-kB; PARS - syntáza polyadenosin difosfát ribózy; TNF - tumor necrosis faktor; isoformy NOS: nNOS - neuronální (NOS-1), iNOS - indukibilní (NOS-2), eNOS - endoteliální (NOS-3). Upraveno dle [25].

Také některá léčiva se základním účinkem na jiné tkáně (např. intravenózní anestetikum propofol, beta-adrenergní blokátor nebivolol aj.) vyvolávají zatím neznámými mechanismy uvolnění NO z cévního endotelu. Vazodilatace navozená tímto způsobem může přispívat jak k terapeutickým, tak také k nežádoucím účinkům těchto látek.

Na rozdíl od konstitutivních izoform NOS je aktivita NOS-2 nezávislá na zvýšení (Ca_i^{2+}). Ačkoli NOS-2 obsahují vazebné místo pro kalcium-kalmodulin, má toto vazebné místo ke svému ligandu velmi vysokou afinitu, což znamená, že NOS-2 je aktivována i při nízké hodnotě (Ca_i^{2+}), za klidového stavu. Enzym je indukován bakteriálním lipopolysacharidem (LPS) a/nebo cytokiny, které jsou syntetizovány v odpověď na LPS (především interferonem γ , u něhož tomuto účinku odpovídá jeho antivirové působení). Tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a interleukin 1 (IL-1) jsou na rozdíl od interferonu γ

samy v indukci exprese NOS-2 neúčinné, ale působí synergicky s interferonem. Indukce je inhibována glukokortikoidy a některými cytokiny, včetně transformujícího růstového faktoru β (TGF- β). Existují velmi významné druhové rozdíly v indukovatelnosti NOS-2 (např. u lidí je NOS-2 indukována méně snadno než u myši).

Oxid dusnatý reaguje s kyslíkem za tvorby N_2O_4 , který se dále spojuje s vodou za tvorby směsi dusitanových a dusičnanových aniontů. Dusitanové ionty jsou oxidovány na dusičnanové oxyhemoglobinem. Uvedené reakce vedou ke vzniku různých oxidů dusíku, jako je oxid dusný, oxid dusnatý, oxid dusitý, oxid dusičitý, nitrit a nitrát.

Oxid dusnatý je inaktivován hemem a volným radikálem superoxidem. Zhášeci, scavengery superoxidu, jako např. superoxid-dismutáza, chrání NO, zvyšují intenzitu jeho účinku a prodlužují jeho trvání. Naopak interakce oxidu dusnatého se superoxidem vede k tvorbě peroxynitritu ($ONOO^-$) a následnému poškození tkání; peroxynitrit má vysokou afinitu k sulfhydrylovým skupinám a inaktivuje některé klíčové enzymy obsahující sulfhydrylové skupiny. Účinek peroxynitritu je regulován obsahem glutathionu v buňce. Jestliže je glutathion hlavní intracelulární rozpustnou sulfhydrylovou sloučeninou, mohou mít závažné důsledky faktory, které mění jeho biosyntézu a rozklad. Za fyziologických podmínek reaguje glutathion s NO za vzniku S-nitrosoglutathionu, mnohem stabilnější formy NO. Nitrosoglutathion může sloužit jako látka nebo přenašeč NO s dlouhodobou životností. Obsah glutathionu v cévách je snížen při diabetes mellitus a ateroskleróze a jeho nedostatek při těchto stavech může být odpovědný za zvýšený výskyt kardiovaskulárních komplikací. Jinou situací je ischemie následovaná reperfuzí, u které je v důsledku zvýšené produkce volných radikálů porušena funkce endotelu a následně dochází ke snížení tvorby NO [27].

2.1.2.2 Význam NO v nitrobuněčné signalizaci a cytoprotektivě resp. cytotoxicitě

Farmakologické účinky NO byly zkoumány s použitím NO ve formě plynu rozpuštěného v solném roztoku, který byl dokonale deoxygenován inertním plynem, např. heliem. Mnohem vhodnější ke studiu jsou různé chemické donory NO jako nitroprussid nebo S-nitroso-acetylpenicillamin (»SNAP«) nebo S-nitrosoglutathion.

Oxid dusnatý může v buňkách, které jej produkují, aktivovat guanylylcyklázu a vyvolávat autokrinní účinek. Endoteliální produkce NO ovlivňuje autokrinně permeabilitu endotelu pro albumin a existují důkazy o autokrinním účinku rovněž u krevních destiček.

Obecněji však NO působí spíše jako parakrinní než jako autokrinní mediátor; difunduje z místa syntézy a aktivuje guanylylcyklázu v sousedních buňkách. Výsledné zvýšení cGMP působí na proteinkinázy, cyklické nukleotidfosfodiesterázy, iontové kanály a možné další proteiny. Tyto účinky vedou ke snížené (Ca_i^{2+}) odpovědi na kontraktilní a proagregační agonisty (zejména v hladkých svalech cév a krevních destičkách), aniž by došlo k významnému ovlivnění bazální hodnoty (Ca_i^{2+}). Následně vyvolává NO hyperpolarizaci hladké svaloviny cév (za některých okolností v důsledku aktivace K^+ kanálu). cGMP inhibuje adhezi a migraci monocytů a inhibuje proliferaci buněk hladkého svalu a fibroblastů, což jsou účinky, které přispívají k antiaterogenní úloze NO.

Velké množství NO (uvolněné v důsledku indukce NOS nebo vybrané stimulace NMDA (N-methyl-D-aspartátových receptorů v mozku) vyvolává cytotoxické účinky (buď přímo nebo cestou peroxynitritových aniontů). To přispívá k obraně hostitele, ale také k neuronálnímu poškození, které se objevuje v případě přílišné stimulace NMDA receptorů glutamátem.

2.1.2.3 Význam NO v nitrobuněčné signalizaci ve vztahu k apoptóze hepatocytů

Programovaná smrt buňky je široký pojem používaný pro smrt buňky, která se děje za podmínek slučitelných se životem. Každá buňka si nese speciální genetický aparát pro její realizaci. Tento proces je velmi významný např. pro formování organismu v ontogenezi, správnou funkci buněk imunitního systému, eliminaci buněk GIT a kůže atd., a jeho poruchy jsou příčinami mnohých patofyziologických stavů – autoimunitních poruch, onkologických onemocnění, malformací... Jedním z typů programované buněčné smrti je apoptóza, neboli buněčná sebevražda.

K základním spouštěčům apoptózy patří tzv. apoptotické signály, které mohou být původu endogenního (p53 - aktivuje se v okamžiku poškození DNA) či exogenního (apoptotické signální molekuly – glukokortikoidy, cytokiny IL-3 a IGF-I, ligandy receptorů smrti Fas, TNF α/β , granzym B). Na tyto signály navazují proapoptotické proteiny rodiny Bcl-2, resp. podrodiny Bax (Bax, Bcl-Xs, Bak), které jsou indukovány díky p-53 a podrodiny BH3 (Bad a Bid).

Podle dosavadních znalostí hrají kaspázy (cystein dependentní aspartát proteázy) klíčovou roli při spouštěcím mechanismu apoptotické exekuce.

Tyto enzymy se klasifikují do tří skupin:

Iniciační: casp-2, casp-8, casp-9, casp-10

Exekuční: casp-3, casp-6, casp-7

Zánětlivé: casp-1, casp-4, casp-5

V mechanismu apoptózy slouží iniciační kaspázy k aktivaci kaspáz exekučních, které následně štěpí tzv. substráty smrti (CAD/ICAD, PARP, laminy...). Tyto potom dále aktivují nukleázy a dochází k fragmentaci DNA [28]. Zánětlivé kaspázy nehrají roli v procesu apoptózy. Za klíčovou exekuční kaspázu se považuje kaspáza-3, která se aktivuje nejen při apoptóze, ale i při nekróze.

2.1.2.3.1 Dráhy indukce apoptózy

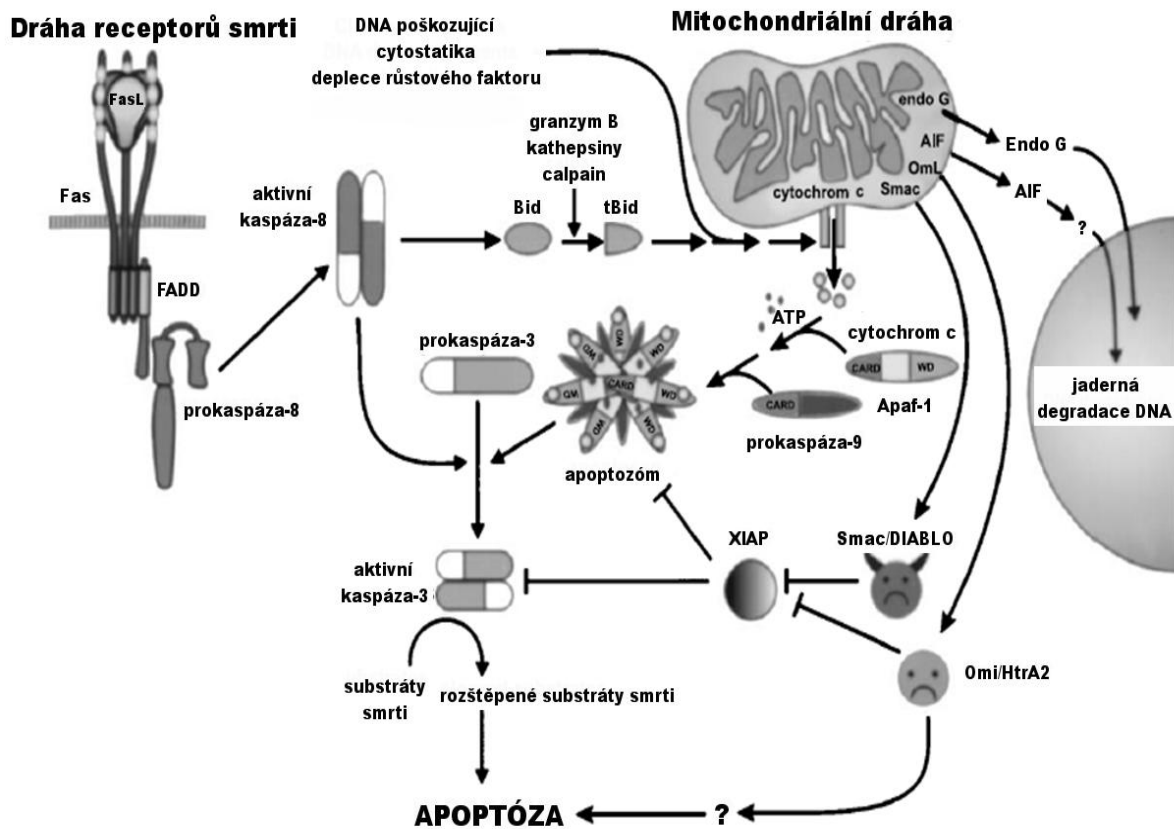
2.1.2.3.1.1 Mitochondriální dráha

Proapoptotické proteiny regulují permeabilitu membrány mitochondrií. Díky tomu dojde k uvolnění dalších proapoptotických faktorů např. cytochromu C do cytosolu. Tím je aktivována iniciační kaspáza 9, která následně aktivuje exekuční kaspázu 3 viz obr. 5A.

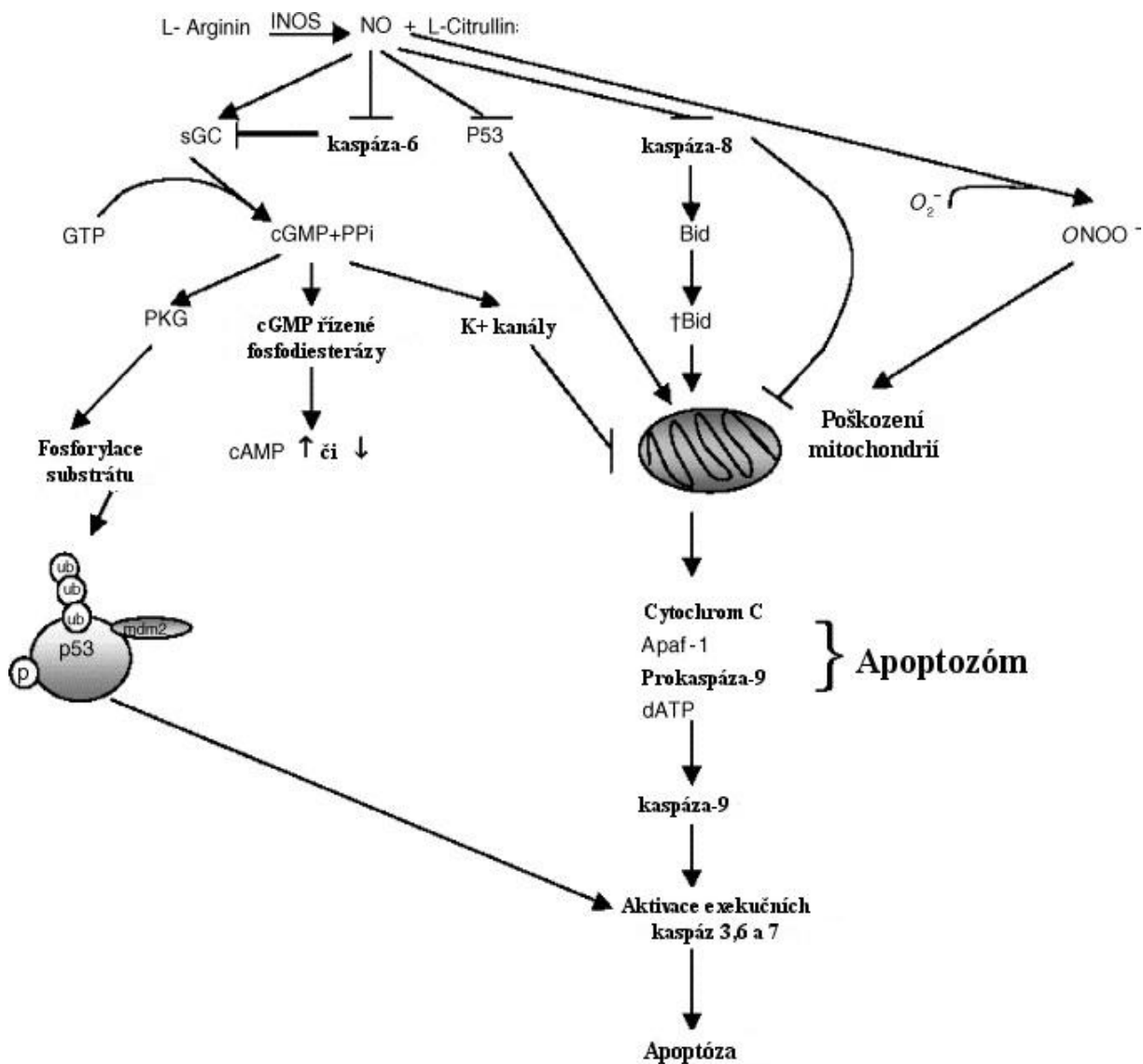
2.1.2.3.1.2 Dráha receptorů smrti

Interakcí receptorů smrti s jejich ligandy (Fas) dojde k vytvoření tzv. domény smrti, která umožňuje aktivovat iniciační kaspázy 8 a 10 s následnou aktivací kaspázy 3 viz obr. 5A.

Vztah NO signalizační molekuly ve vztahu v aktivaci kaspázových drah je popsán na následujícím obrázku 5B. Za určitých podmínek je ale paradoxně NO cytoprotektivní látkou [29]. Nízké koncentrace NO totiž mají příznivý efekt na hepatocyty, snižuje se například množství kaspáz [30]. Předpokládá se, že zvýšení produkce NO do určité hodnoty je v určitých podmínkách časná adaptační odpověď hepatocytů vůči jejich pozdějšímu poškození. Jakmile je ale tato dosud ne přesně stanovená hodnota překročena, uplatní se NO jako mediátor cytotoxicity [31]. Shrnuto: NO může mít tedy jak proapoptotický tak antiapoptotický efekt, který závisí na množství jeho produkce, typu buňky a interakcích s ostatními intracelulárními složkami, jako je železo, thioly, proteiny a reaktivní kyslíkové radikály (ROS) [32].



Obrázek 5A: Dráhy indukce apoptózy (*Fas*- transmembránový protein patří do rodiny TNF, *FADD*- *Fas*-Associated protein with Death Domain, *Apaf-1*- apoptotic protease activating factor 1). (Upraveno dle [28]).



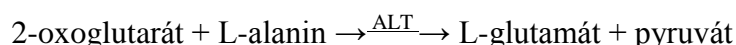
Obrázek 5B: Vliv NO na systém kaspázových drah u apoptózy. (Upraveno dle [33].)

2.2 *Studované markery hepatocytů*

2.2.1 Biochemické markery hepatocytárních funkcí

2.2.1.1 ALT

ALT (alaninaminotransferáza) též GPT (glutamát-pyruvát-transamináza) je cytoplasmatický enzym, katalyzující přenos aminoskupiny z L-alaninu na 2-oxoglutarát za vzniku pyruvátu a L-glutamátu.



Reakce je volně reverzibilní, uplatňuje se při syntéze, odbourávání i přeměně aminokyselin. Se svým koenzymem pyridoxalfosfátem se tak ALT podílí na metabolismu dusíku v organismu. Nejvíce je obsažen v hepatocytech, při poškození buňky se vyplavuje ve zvýšené míře do krve. Extracelulárně uvolněný enzym ALT (alanin aminotransferáza) patří k fundamentálním důkazům poškození jaterní tkáně už hodně let.

Alaninaminotransferáza je obsažena kromě cytoplasmy hepatocytů také v myokardu (4x menší koncentrace), ledvinách (10x menší koncentrace) a kosterní svalovině. Zvýšená hladina ALT má velmi vysokou senzitivitu při hepatocelulárním poškození. Při těžké akutní hepatocelulární nekróze se může hladina ALT v séru během 48 hodin zvýšit až na stonásobek normálu a může se držet v této hladině po několik dnů. Při chronickém procesu se koncentrace ALT v séru může držet kolem desetinásobku normy. Také primární nádory jater mohou být spojeny s velmi vysokou elevací ALT, jednak následkem nekrózy okolní tkáně, ale i v důsledku produkce isoenzymů přímo nádorovými buňkami [34]. Glukokortikoidy podávané ve vysokých dávkách (4 mg/kg) mohou zvýšit hladinu ALT během 14 dní na více než desetinásobek, zvýšená hladina může přetrvat ještě několik týdnů po vysazení [35]. Mnoho dalších léčiv zvyšuje hladinu ALT (fenobarbital ve vysokých dávkách 4,4mg/kg po 8 hod.) může zvýšit hladinu až 50 x oproti normálu u psích *in vivo* modelů [36].

2.2.1.2 Alfa GST

Tento vysoce citlivý marker je analogický k ALT s tím, že se uvolňuje již mnohem dříve než ALT a proto je ho možno považovat za časný marker hepatocytárního poškození. V některých publikacích se používá jako doplňkový marker k verifikaci hodnot ALT.

2.2.1.3 UREA

Urea je konečný produkt odbourávání bílkovin, přesněji dusíku aminokyselin. Je syntetizována v játrech a vylučována močí. Koncentrace urey v séru závisí na množství bílkovin přijímaných potravou, na stupni katabolismu exogenních i endogenních proteinů, na ureosyntetické schopnosti hepatocytů, na stavu hydratace a míře vylučování ledvinami. *In vivo* se stanovení koncentrace urey používá hlavně pro posouzení funkce ledvin a úrovně katabolismu proteinů. *In vitro* na izolovaných hepatocytech její produkce orientačně odpovídá míře funkceschopnosti těchto buněk.

2.2.1.4 Bilirubin

Bilirubin je metabolický produkt degradace hemoglobinu a jeden z nejlepších dosud objevených endogenních antioxidantů vůbec. Při odbourávání hemoglobinu díky hemoxygenáze vzniká spolu s ostatními látkami zelené barvivo biliverdin, které je okamžitě přeměněno enzymem biliverdinreduktázou na bilirubin, který je ve volné formě (nekonjugované) transportován do jater (vazba na albumin). V játrech je molekula konjugována s kyselinou glukuronovou a sekretována do žlučových kanálků (žluči). Konjugovaný bilirubin je rozpustný ve vodě, ale velmi špatně rozpustný v tucích (proto není zpětně ze střeva vstřebáván). V intestinu je bilirubin konvertován pomocí bakterií na urobilinogen a sterkobilinogen (způsobuje hnědou barvu stolice).

U těžké akutní difuzní hepatocelulární nekrózy během 1– 4 dnů stoupne hladina bilirubinu (*in vivo*) přibližně dvojnásobně a dále se zvyšuje dle vývoje choroby v závislosti na metabolické kapacitě zbylé nebo reparované jaterní tkáně [17].

2.2.2 Markery antioxidační kapacity

2.2.2.1 Markery lipoperoxidace

Jako ukazatele lipoperoxidace byly měřeny malonyldialdehyd a konjugované dieny. Malonyldialdehyd je považován za typický produkt peroxidace lipidů, který je mezi ostatními produkty hojněji zastoupen. Konjugované dieny jsou další běžné produkty lipoperoxidace. Za marker lipoperoxidace se však považuje i oxid uhelnatý (CO), neboť právě lipoperoxidace je vedle katabolické dráhy hemu jeho dalším intracelulárním zdrojem.

2.2.2.2 Antioxidační enzymy a substráty

Zaměřili jsme se především na měření katalázy a redukovaného glutathionu. Kataláza, patřící do rodiny antioxidačních enzymů, je běžný enzym vyskytující se téměř ve všech živých organismech vystavených kyslíku. Funguje jako katalyzátor rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Kataláza má jedno z nejvyšších čísel přeměny ze všech enzymů. Jediná molekula katalázy může převést na vodu a kyslík miliony molekul peroxidu vodíku za sekundu.

Redukovaný glutathion (GSH) se účastní obrany buňky mnoha způsoby. Díky své thiolové skupině má GSH silné antioxidační účinky, může proto odbourávat ROS buďto přímou reakcí s nimi nebo reakcí s oxidovanými substráty, které opět zredukuje. Samotný glutathion se pak mění na svou oxidovanou formu GSSG.

3 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cílem mé práce bylo testovat na poli preklinického výzkumu účinnost vybraných látek ze skupiny cytoprotektiv s určitým hepatoprotektivním účinkem a zároveň najít nebo naznačit mechanismus tohoto jejich účinku, který jsem zkoumal v oblasti intracelulárních plyných signálních molekul NO a CO resp. enzymů klíčových pro jejich vznik NOS/HO.

Mé doktorské studium mělo dva hlavní směry:

1) Experimentální sledování vzájemného vztahu systémů HO/CO a NOS/NO v prostředí hepatotoxických látek *in vitro* v izolovaných primárních potkaních hepatocytech a *in vivo* na potkaním modelu.

2) Hodnocení cytoprotektivního efektu vybraných látek na poškozené potkaní hepatocyty a zkoumat závislost tohoto efektu na změnách v parametrech cytotoxicity/cytoprotektivity, antioxidačních parametrech, genové expresi mRNA u vybraných genů a na změnách v histologického stavu buněk/tkání/orgánů.

Základní nosnou hypotézou bylo, že mezi těmito parametry existují pomyslné „spojené nádoby“ v podobě různých vzájemně propojených kompenzačních mechanismů, tj. zatímco na jedné straně je inhibován jeden systém, na druhé straně se může aktivovat jiný. Jak již bylo uvedeno v úvodu této práce, systém CO/HO se považuje spíše za protektivní systém, jehož aktivace vede k buněčné ochraně. Systém NO/NOS je při nízké aktivaci také považován za protektivní, při hyperaktivaci naopak vlivem toxických nitrosylových radikálů vykazuje více toxické vlastnosti [37, 38, 39]. Vlastnosti těchto systémů mohou být kompenzovány buď mezi sebou navzájem, tedy, že toxicita systému NO/NOS může být intracelulárně kompenzována protektivními vlastnostmi systému CO/HO, nebo se to děje jinými mechanismy v buňce např. antioxidačními systémy. Navíc existuje předpoklad, že mezi těmito systémy funguje určitý vzájemný vztah, který je však velmi nejednotný a rozporuplný. Bylo např. publikováno, že CO potencuje aktivitu NOS/NO systému [40], ale i inhibuje [41] např. potlačováním exprese NOS [42]. Z opačného hlediska také NO potencuje aktivitu HO/CO systému [43], ale také inhibuje [44].

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie a testovací soupravy (kity)

Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Praha. Všechny chemikálie pro analýzu byly pořízeny v min. 99% čistotě *pro analysis*. Chemikálie určené pro aplikaci zvířatům byly vždy v minimálně 95%ní čistotě s výjimkou kurkuminu, který byl v 80,1%ní čistotě (zbytek tvořily kurkuminoidy – demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin). Kalibrační plyn CO byl zakoupen od firmy Linde, Praha. Diagnostický kit pro stanovení α GST byl zakoupen od firmy Biotrin, Dublin, Irsko. Bio-Rad Protein Assay Kit pro stanovení celkové bílkoviny byl pořízen od firmy Bio-Rad, Praha. Kit pro stanovení dusitanů byl zakoupen od firmy Cayman Chemical Company, Neratovice. Reverzně transkriptázový kit a TaqMan polymerázové kity pro stanovení genové exprese jednotlivých genů byly získány od firmy Applied Biosystems, Praha. Kit na izolaci celkové RNA byl zakoupen od společnosti Bio-Consult Laboratoires, Praha. Kity pro měření ALT, AST, bilirubinu a močoviny byly získány od firmy Biocon Diagnostik, Vöhl-Marienhagen Německo.

4.2 Měření genové exprese *HO-1* a *NOS-2* pomocí real time PCR

Odběr vzorků

Všechny vzorky byly odebírány na začátku a na konci pokusu. Množství vzorku bylo vždy odebíráno tak, aby počet hepatocytů při každém odběru odpovídal vždy počtu hepatocytů použitých pro párové srovnání. Každý vzorek byl po odběru okamžitě umístěn do chladného RNA-stabilizačního pufru s přídavkem beta-merkaptetanolu.

Izolace celkové RNA

Po odebrání stanoveného množství živých buněk či tkáně byla provedena lýza vysokotlakým protlačením přes specifickou membránu v centrifuze při 20 000 g v RNA stabilizačním roztoku spolu s lyzačním činidlem a přídavkem beta-merkaptetanolu. Poté bylo provedeno odizolování nepotřebné genomové DNA protlačením skrz specifickou vysokoafinitní chromatografickou kolonku. Následovalo naředění 70% vodným roztokem

etanolu (v purifikované vodě prosté RNáz). Teprve nyní byla jinou specifickou vysokoafinitní chromatografickou kolonkou vyvázána celková RNA. Následovaly mnohočetné proplachy různými pufovanými činidly, až nakonec byla použita speciální RNáz prostá voda, kterou došlo k eluci purifikované celkové RNA. Ta byla ihned hluboko zamražena při -80°C .

Reverzní transkripce z RNA do cDNA

Následnou procedurou byl přepis celkové RNA do cDNA. Na to byl použit univerzální kit GeneAmp[®] RNA PCR používající reverzní transkriptázu MuL_v (murine leukemia virus), což je RNA-dependentní DNA polymeráza. Jako templát používá jednořetězcovou RNA a přítomnosti vhodných primerů je schopna nasyntetizovat komplementární DNA. Další komponenty reverzně transkriptázové reakce byly MgCl₂, dNTP, hexamery, RNázový inhibitor, voda prostá RNAáz a to vše v prostředí RT pufru. Po smísení všech těchto složek v přesném poměru stanoveném výrobcem kitu byla spuštěna reverzní transkripce, která se sestávala ze třech fází: 10 minut při 25°C – enzymová aktivace RT, 30 minut při 48°C – vlastní amplifikace, 5 minut při 95°C denaturace. Po zchlazení byly všechny vzorky uchovávány při -20°C .

Real time PCR

Expresí genů pro HO-1 a NOS-2 byla vyhodnocena z výsledků polymerázové řetězcové reakce s cDNA prováděné v reálném čase (RT-PCR). Celkem se vyhodnocovaly čtyři geny – pro HO-1, NOS-2 jako cíleně zkoumané geny a dále beta-2-mikroglobulin a beta-aktin jako endogenní kontroly (housekeepingové geny), které při pokusech vykazovaly vysokou stabilitu ve své expresi [45].

RT-PCR byla realizována systémem ABI PRISM 7900. Směs obsahovala 5 μl cDNA, 6 μl standardizované směsi TagMan master mixu, 0,6 μl směsi primerů a fluorescenčně značených MGB prób specifických pro HO-1/NOS-2 geny a 0,4 μl purifikované vody.

Teplotní podmínky při RT-PCR reakci sestávaly ze tří fází: 10 minut při 90°C – aktivace DNA polymerázy, 15 sekund při $95\text{--}99^{\circ}\text{C}$ – denaturace DNA a 1 minuta při 60°C pro annealing.

Hlavní hodnoty naměřené při PCR reakci byly hodnoty CT. Tyto hodnoty určují čas, kdy dochází ke zlomovému navýšení fluorescence uvolněných fluorescenčních sond z prób (treshold), což je klíčový čas k počítání poměru mezi počátkem a koncem experimentu a poté k výpočtu relativní exprese jednotlivých genů – poměr mezi expresí cíleně hodnocených genů

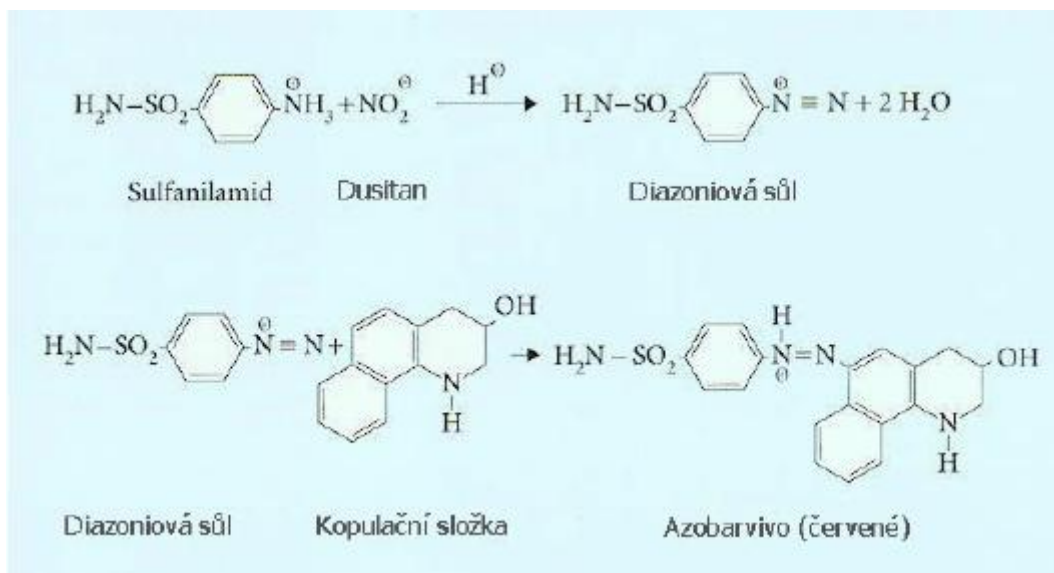
a endogenních kontrol. Čím dříve nastane čas bodu zlomu, tím větší množství genu je exprimováno (v poměru k housekeepingovým genům) [46].

4.3 Měření biochemických parametrů týkajících se NOS/NO systému

4.3.1 Přímé měření extracelulárního NO₂⁻

Množství iontů NO₂⁻ – hlavního stabilního produktu po oxidaci NO – v mediu tkáňových kultur nebo bioreaktoru byla po převedení na barevnou diazoniovou sůl měřena spektrofotometricky při 540nm na mikroděstičce. Na toto stanovení byl použit kit of firmy Cayman Chemical Company. Ionty NO₃⁻, které také mohly v průběhu pokusu z NO vznikat, byly před vlastním stanovením převedeny nitrátreduktázou na NO₂⁻. K diazotační reakci bylo použito Griessovo činidlo z kitu (1% sulfanilamid, 0,1% naftyletylendiamin, 2,5% kyselina fosforečná). Hodnoty absorbancí byly porovnávány se standardní kalibrační křivkou NaNO₂.

Dle našich zkušeností množství NO₂⁻ iontů, které vznikly redukcí z NO₃⁻ nepřesahovalo zpravidla více než 5 %.



4.4 Měření biochemických parametrů týkajících se HO/CO systému

4.4.1 Měření CO pomocí plynové chromatografie s UV detekcí

Plynová chromatografie s UV detekcí umožňuje využít měření CO jednak pro stanovení množství CO v jaterní tkáni a dále pro stanovení hemoxygenázy, kdy po přidání definovaného množství hemu vytvořený CO odráží její aktivitu. Princip detekce CO na konci chromatografické kolony je založen na jeho přirozených redukčních vlastnostech. Dochází zde k redukci oxidu rtuťnatého (HgO) na elementární rtuť (Hg), jejíž páry jsou detekovány v UV spektru.

Vzorky definovaného množství hepatocytů nebo jaterní tkáně určené pro měření aktivity HO byly homogenizovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru. Vzniklé homogenáty byly inkubovány 15 minut s hemem (1,5 mM hem v 0,15 mM vodném roztoku albuminu) a NADPH při 37°C ve speciálních CO prostých zkumavkách uzavřených CO prostými pryžovými zátkami. Reakce byla přesně po 15 minutách ukončena přidáním 60% kyseliny sulfosalicylové, čímž došlo k denaturaci veškerých proteinů ve směsi a uvolnění CO. V případě stanovování tkáňového CO v jaterním homogenátu byla kyselina sulfosalicylová přidána již hned na začátku, čímž došlo k uvolnění veškerého tkáňového CO.

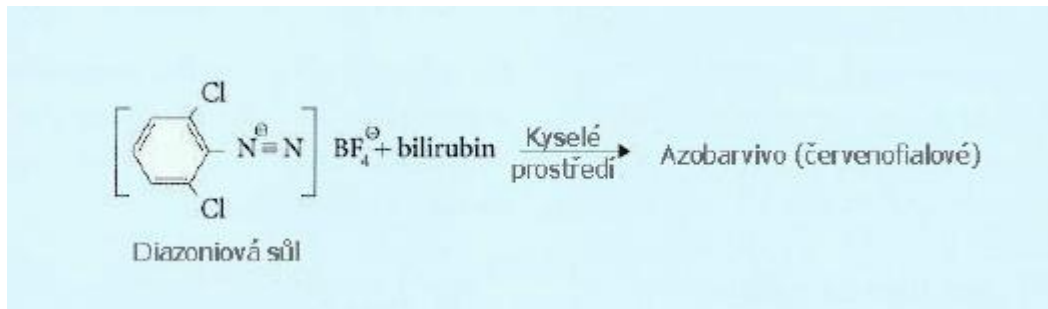
Vlastní nástřik plynného obsahu a kolonu proběhl pro proplachu každé zkumavky nosným plynem (dusík). Přístroj, který byl používán pro plynovou analýzu, byl pořízen od firmy Trace Analytical (Menlo Park, Kalifornie, USA). Pro kalibraci přístroje byla použita standardizovaná směs oxidu uhelnatého a dusíku. Aktivita HO byla vyjádřena v jednotkách pmolCO/hod/mg celkové bílkoviny a tkáňové množství CO bylo vyjádřeno v pmolCO/mg celkové bílkoviny.

Tato metoda je do detailů popsána v samostatné publikaci [47].

4.4.2 Měření biliverdinu/bilirubinu jako vedlejších produktů syntézy CO

Bilirubin lze měřit specifickým kitem založeným na principu daném následující diazotační reakcí, biliverdin se přímo (např. ELISA kitem) většinou neměří, ale nechá se

zredukovat biliverdin reduktázou a pak se měří výsledný produkt bilirubin, nebo ho lze stanovit ekvimolárním výpočtem ze spotřeby biliverdinreduktázy:



Vzorek séra pro stanovení bilirubinu je v temnu stabilní při 4°C přibližně 7 dní. Sluneční světlo snižuje koncentraci ve vzorku každou hodinu přibližně o 50 %. Falešně zvýšené hodnoty dostáváme při lipémii a hemolýze [48].

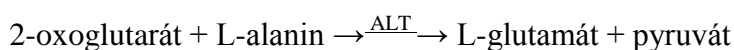
4.5 Měření biochemických parametrů viability/poškození hepatocytů

4.5.1 Měření ALT

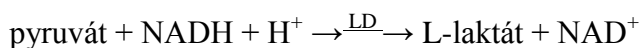
Koncentrace ALT v médiu byla měřena specifickým diagnostickým kitem za dodržení instrukcí výrobce.

Princip metody:

Využívá se přirozené vlastnosti tohoto enzymu. Nechá se proběhnout reakce:



Na ní navazuje standardizovaná reakce katalyzovaná laktátdehydrogenázou:



Potom se měří UV spektrofotometricky úbytek NADH, který odpovídá vlastní aktivitě ALT.

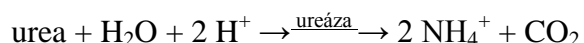
Falešně zvýšenou hladinu ALT v séru můžeme získat při lipémii nebo při posuzování výrazně hemolytického séra. Poločas rozpadu ALT v krevní plasmě je přibližně 1-2 dny. Stabilita hladiny ALT v séru je při pokojové teplotě přibližně 1 den (při 4°C do 7 dnů).

4.5.2 Měření urey

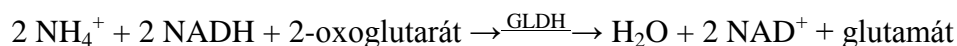
Koncentrace ALT v médiu byla rovněž měřena specifickým diagnostickým kitem za dodržení instrukcí výrobce.

Princip metody:

Urea je hydrolyzována v přítomnosti ureázy za současného vzniku amoniaku a oxidu uhličitého:



Na ní navazuje standardizovaná reakce katalyzovaná glutamátdehydrogenázou:



Potom se měří UV spektrofotometricky úbytek NADH, který odpovídá koncentraci urey.

4.5.3 Měření alfa GST

Měření bylo prováděno pomocí ELISA kitu (Biotrin, Dublin, Irsko) založeného na reakci alfa-GST se specifickou fluorescenčně značenou protilátkou. Všechna stanovení probíhala za přísného dodržení podmínek stanovených výrobcem.

4.6 Hodnocení buněčné morfologie hepatocytů

4.6.1 Imunohistochemické barvení komplexem Annexin V / propidium jodidem

Po promytí buněk studeným PBS a stabilizaci v 4% paraformaldehydu byly hepatocyty pozorovány z morfologického hlediska a pro studium apoptózy imunohistochemicky barveny použitím Annexin-V/propidium jodidu. K detekci byl použit fluorescenční mikroskop. Použitím této metody bylo možné hodnotit poměr apoptotické popř. nekrotické buněčné populace po 24 hodinové a 48 hodinové kultivaci. Apoptotické

hepatocyty vykazovaly zelenou fluorescenci díky vazbě Annexinu V na fosfatidylserinové zbytky na povrchu buněčné membrány. Propidium jodid, který poskytoval červenou fluorescenci, se vázal na DNA všech fixovaných buněk. Pro lepší rozlišení a jeho kontrolu byla část fixovaných hepatocytů označena toluidinovou modří.

4.7 Metody měření parametrů antioxidační kapacity

Přímé měření je obtížné vzhledem ke krátkému poločasu volných radikálů. Stanovují se látky vzniklé jejich působením [49]. Používali jsme vybraných několik metod, které jsou popsány detailněji v této kapitole.

4.7.1 Přímá měření

4.7.1.1 Stanovení radikálů dusíku a jeho aduktů

Je možno přímo stanovit oxid dusnatý, například plynovou chromatografií, ale toto stanovení je velmi obtížné provést, neboť je tento plyn velmi nestabilní a podléhá velmi rychle spontánní oxidaci na dusitany (nitrity) a dusičnany (nitráty). Proto jsme využívali metody nepřímé, kdy se stanovovaly nitrity, nitráty nebo látky modifikované nitrací – nitrosohemoglobin - viz předchozí kapitolu 4.3.

4.7.2 Nepřímá měření

Nejčastěji se měří produkty lipoperoxidace nebo stanovení stupně antioxidační ochrany organismu.

4.7.2.1 Měření lipoperoxidace

4.7.2.1.1 Stanovení malonyldialdehydu (resp. TBARS)

Malonyldialdehyd reaguje s deoxyadenosinem a deoxyguanosinem v DNA a tvoří s nimi DNA adukty. Stanovení malonyldialdehydu (MDA) lze uskutečnit spektrofotometricky, neboť po reakci s thiobarbiturátem se tvoří barevný komplex [50]. Stanovení má svá omezení, neboť reakce není zcela specifická, reagují též jiné látky např. bilirubin nebo volná DNA.

Pufr (0,2 M TRIS-HCl pH 7.4 + 0,002 M EDTA- Na_2 + 0,025 M sacharóza) s cca 10% obsahem jaterní tkáně byl homogenizován rotační rychlořeznou míchačkou s následným stočením v centrifuze při 4000 otáčkách/min. U plazmatických měření se stáčela heparinizovaná krev. 0,3 ml supernatantu (z plazmy nebo homogenátu) se smíchalo s 0,5ml 1M HCl a 1 ml 0,67% vodného roztoku kyseliny thiobarbiturové (TBA). Vzorky byly inkubovány při 95°C po dobu 20 minut. Po zchlazení byly vzorky deproteinovány 10% vodným roztokem kyseliny trichloroctové (TCA) v poměru 1:1. Vzniklá sraženina byla odstraněna centrifugací při 805g po dobu 10 minut. Spektrofotometricky byla měřena absorbance supernatantu při vlnové délce 532nm. Malonyldialdehydový standard byl připraven *ex tempore* ze standardu tetraetoxipropanu (10 μM). Výsledky byly vyjádřeny v jednotkách nmol/ml pro plazmatické vzorky a nmol/mg celkové bílkoviny u homogenátových vzorků.

4.7.2.1.2 Stanovení konjugovaných dienu (CD)

Metodika stanovování konjugovaných dienu byla převzata z již dříve publikovaného článku [51]. Princip stanovení spočívá v tom, že konjugované dieny, izolované z jaterního homogenátu nebo plazmy byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce 233nm. Jako slepý vzorek byl použit heptan (99 %). Pro stabilizaci vzorku a na zábranu další lipoperoxidace byl při izolaci použit heptan, isopropanol, 0,01M HCl a u plazmatických vzorků navíc 0,2M EDTA. Výsledky byly vyjádřeny v nmol/ml (plazmatické vzorky) a nmol/mg celkové bílkoviny.

4.7.2.2 Antioxidační ochrana organismu

4.7.2.2.1 Stanovení antioxidačního enzymu – katalázy (CAT)

Stanovení katalázy bylo realizováno pomocí spektrofotometrické analýzy. Metoda je založena na měření poklesu absorbance při štěpení peroxidu vodíku katalázou, přičemž peroxid vodíku následně reaguje s molybdenanem amonným v kyselém prostředí za vzniku barevného komplexu [52]. Po stanovení se smíchaly 2 ml 0,03% peroxidu vodíku a 50 μl vzorku plazmy nebo jaterního homogenátu. Po inkubaci 5 minut při 20°C byl přidán 1 ml molybdenanu amonného a 1 ml 0,25 M H_2SO_4 a vzorky byly následně centrifugovány 10 minut při 805g. Absorbance byla měřena při vlnové délce 410 nm. Množství katalázy bylo vyjádřeno v $\mu\text{molech/ml}$ u plazmatických vzorků a $\mu\text{mol/mg}$ celkové bílkoviny.

4.7.2.2 Stanovení antioxidačního substrátu – hepatocytárního redukovaného glutathionu (GSH)

Metodika stanovení spočívá ve spektrofotometricky stanovitelné reakci mezi volnými SH skupinami a kyselinou 5,5'-dithio-2-nitrobenzoovou (DTNB) [53]. Stanovení GSH má svá omezení (vysoká vaznost na albumin a dlouhý poločas).

Kousky jaterní tkáně byly homogenizovány v pufru (0,2 M TRIS-HCl + 0,002 M EDTA-Na₂ + 0,025 M sacharóza – pH 7,4). 0,5 ml homogenátu bylo smícháno s 0,5 ml 10% vodného roztoku kyseliny trichloroctové (TCA) a centrifugováno po dobu 15 minut při 805g. K 0,1 ml supernatantu bylo přidáno dalších 1,4 ml TRIS-HCl pufru o koncentraci 0,2 M a pH 8.5 obsahující 0,02 M EDTANa₂ a dále 0,05 ml 3 mM DTNB. Směs byla inkubována po dobu 10 minut při 20°C a poté byla změřena absorbance při vlnové délce 412 nm. Jako standard pro kalibrační křivku byl použit 48 mM roztok redukovaného glutathionu v 10% TCA. Výsledky byly vyjádřeny v μ molech/mg TP.

4.8 Stanovení celkového proteinu (TP)

Spolu s některými výše uvedenými stanoveními bylo nezbytné měření celkové bílkoviny (TP), aby bylo možné vztáhnout hodnoty k reálnému buněčnému obsahu. K tomuto stanovení se využila biuretová reakce se spektrofotometrickým vyhodnocením při vlnové délce 595nm. Jako standard pro kalibrační křivku byl použit hovězí sérový albumin (BSA).

4.9 Statistické zpracování výsledků

Všechny experimenty byly prováděny skupinově. Pět výsledků v jednom souboru byl minimální počet zvířat nebo *in vitro* modelů. Pokaždé bylo učiněno jedno nezávislé měření pro každý parametr pro každé zvíře nebo model. Předpokládalo se normální rozdělení všech měřených náhodných veličin.

Všechny výsledky byly hodnoceny porovnáváním s negativní kontrolou (placebo skupina) nebo pozitivní kontrolou (lěčená/inkubovaná skupina). K tomuto hodnocení byla používána analýza rozptylu (ANOVA) s jednoduchým tříděním (one-way analysis of

variance) s následným mnohonásobným porovnáváním pomocí Bonferroniho nebo Tukey-Kramerova testu.

Výsledky se standardně vyjadřovaly ve formátu **výběrový průměr + SD** (výběrová směrodatná odchylka) **nebo SEM** (standardní odchylka od průměru). Výsledky s p-hodnotou menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné. Značky pro označování jednotlivých hodnot hladin statistické významnosti jsou uvedeny v tabulce 2:

	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,001$
porovnání vůči negativní kontrole	*	**	***
porovnání vůči pozitivní kontrole	#	##	###

Tabulka 2: Značky pro označování jednotlivých p-hodnot

K vyhodnocení statistických výsledků byl používán licenční fakultní software Statistica případně volně šiřitelný program GraphPad in Stat verze 3.06.

5 POUŽITÉ LÁTKY A EXPERIMENTÁLNÍ MODELY

5.1 Zvířata, tkáňové kultury a bioreaktor

Zvířata

Pro všechny izolace buněk či pokusy *in vivo* byli používáni farmakologicky neovlivňovaní outbrední potkani (Wistar) ve věku 1–1,5 měsíce vážící průměrně od 200 do 300 gramů (Velaz, Lysolaje). Potkani byli krmeni standardní granulovanou laboratorní dietou *ad libitum* a napájeni vodou z vodovodního řádu. Po celou dobu pobytu ve viváriu měla zvířata standardní světelný režim 12 hodin světlo 12 hodin tma. Teplota v místnosti byla udržována v rozmezí $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ při relativní vlhkosti $50\pm 10\%$.

Veškerá péče o zvířata probíhala dle příslušných standardních postupů stejných pro celou 1. lékařskou fakultu Univerzity Karlovy v Praze, schválených Fakultní etickou komisí, a to vždy náležitě kvalifikovaným personálem. O všech pracovních postupech včetně usmrcování zvířat byly vedeny protokoly, které byly v souladu se všemi pokyny.

Izolace potkaních hepatocytů

Před vyjmutím jater z těla potkana byla provedena heparinizace krve ve *vena cava*, následně byla játra perfundována specifickým pufrem několik minut. Poté byly hepatocyty izolovány za použití standardní dvoufázové kolagenázové perfuzní metody, při které došlo k rozvolnění mezibuněčných spojů v jaterní tkáni. Po několikanásobném opatrném přečištění pomocí centrifugy byla získána suspenze hepatocytů, ve které bylo teprve možno stanovit pomocí Bürkerovy komůrky celkový počet buněk v 1 ml homogenní suspenze. Dále byla po expozici malého vzorku buněk roztoku trypanové modři spočítána celková životnost buněk v suspenzi vyjádřená v procentech. Počítal se poměr obarvených (resp. mrtvých) buněk k celkovému počtu všech [54].

Pro následný pokus byla použita vždy jen ta suspenze, jejíž buňky dosahovaly životnosti nad 85 %.

Tkáňové kultury hepatocytů

Kultivační misky byly nejprve pokryty tenkou vrstvou roztoku kolagenu v ředěné kyselině octové. Po tomto nakolagenování jsme provedli proplach čistým

Williamsovým médiem E a teprve potom byly misky (Nunclon™ Multidishes z tvrzeného polystyrenu o 6 nebo 24 jamkách) připraveny k nasazení suspenze hepatocytů. Hustota osídlení misky byla 104 000 živých buněk/cm², což bylo samozřejmě zohledněno při výpočtu množství pipetované hepatocytární suspenze.

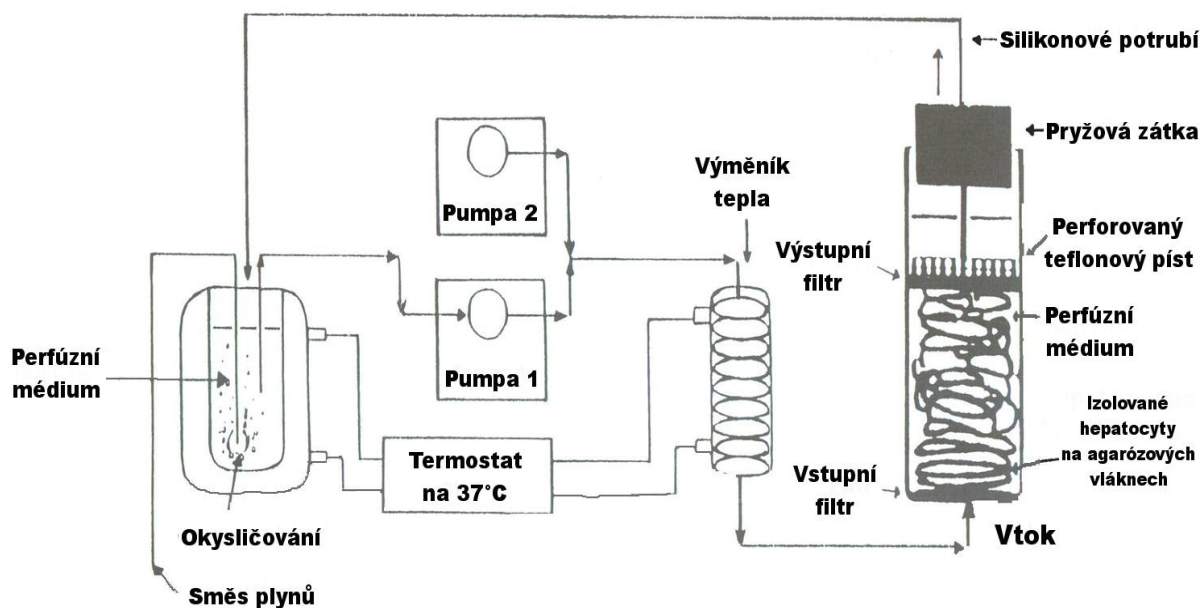
Inkubace probíhala v kompletním médiu složeného z Williamsova media E, antibiotické přísady Penicilin/Streptomycin (1 %), glutaminu (1 %), insulinu (0,06 %) a fetálního bovinního séra 5 %. Prvních 24 hodin buňky zůstaly v samotném kompletním médiu a dalších 24 hodin podléhaly účinkům směsi kompletního média s danou zkoumanou látkou či kombinací zkoumaných látek. Byla-li použita kombinace hepatoprotektivní látky a hepatotoxické, pak se ta hepatoprotektivní nasazovala na kulturu jako premedikace a to přesně 30 minut před nasazením látky hepatotoxické.

Všechny kultury byly po celou dobu experimentu udržovány v prostředí s vysokou relativní vlhkostí (± 90 %) v atmosféře s přidavkem 5 % CO₂ a při teplotě 37°C

Bioreaktor

Model hepatocytárního bioreaktoru používaný na našem pracovišti je schematicky znázorněn na obrázku 6 a byl podrobně popsán v samostatné publikaci [55].

Základ bioreaktoru tvoří 1,8%ní roztok agarózy, která je schopná gelace při nízké teplotě cca 35 – 39°C. Tato agaróza byla rozpuštěna v 70°C horkém Krebs-Hensleitově pufru (KHB) a poté zchlazena na 37°C. Tato směs byla spolu s hepatocyty v poměru 1:1 vytlačena skrz chlazenou trubičku ze speciálního plastu Chemfluor TFE přímo do čistého média bioreaktoru. Systém takovýchto agarózových „nudliček“ s navázanými imobilizovanými hepatocyty byl poté uzavřen tak, že byla umožněna perfuze médiem. Z tohoto perfuzního média je možno kdykoliv během pokusu odebírat vzorky k měření ALT, močoviny, NO₂⁻ a z „bioptického“ vzorku je pak možno provádět imunohistochemické hodnocení apoptoticko/nekrotických markerů, stanovovat expresi vybraných genů a měřit další cytologické parametry.

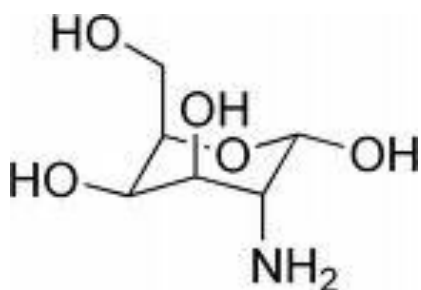


Obrázek 6: Schéma bioreaktoru

5.2 Vybrané hepatotoxické modely

Z velkého množství používaných hepatotoxických látek, které jsou využívány k modelování některých patofyziologických či toxikologických stavů, jsem vybral pouze tři, které jsme používali ve své výzkumné práci. Jsou to D-galaktosamin, *tert*-butylhydroperoxid a lipopolysacharid, případně jejich kombinace.

5.2.1 D-galaktosaminová toxicita jako model fulminantní hepatitidy *in vivo* i *in vitro*



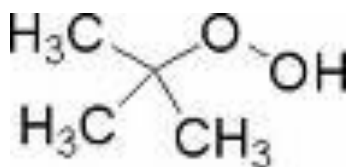
D-galaktosamin 2-Amino-2-deoxy-D-galaktopyranóza

D-galaktosamin (D-GalN), 2-Amino-2-deoxy-D-galaktopyranóza, nejčastěji používaný ve formě hydrochloridu, je velmi silný jaterní toxin a jeho aplikaci lze získat velmi

dobré modely pro studium hepatotoxicity. Apoptotické signály produkované těmito modely byly hodně studovány *in vitro* i *in vivo*. Vzhledem k hepatotoxicitě byly publikovány u hlodavčích modelů příspěvky takových signálů, jako je TNF α , Fas ligandů nebo NO zvláště v Kupfferových buňkách nebo jiných infiltrovaných buněk retikuloendoteliárního systému do jater [56, 57]. Naproti tomu *in vitro* byl negativní vliv D-galaktosaminu studován na kólturách primárních hepatocytů s Kupfferovými buňkami [58, 59], ale i na samotných potkaních primárních hepatocytech [60, 61]. D-GalN působí také jako depletor uridinových nukleotidů, čímž blokuje syntézu RNA a tím i některých nezbytných proteinů [62]. Tady je pak možno vidět souvislost působení D-GalN se sníženou produkcí NO kvůli potlačení jeho syntézy *de novo* NOS-2 enzymem. To je v souladu se zjištěními v některých dalších studiích [63], kdy to byl mimo jiné uridin a ne arginin (hlavní substrát pro NOS), který zvedl produkci NO v kultuře hepatocytů. To také kromě jiného vysvětluje negativní vliv D-GalN na LPS indukovanou expresi NOS-2 [64]. Jinak je také už dlouho známo, že D-GalN nesnižuje produkci ATP, nezbytné např. pro tvorbu urey a jeho velký obrat je v časných stádiích apoptózy a naopak malý v terminálních stádiích [62].

Z uvedených zjištění sice částečně vyplývá analogická podobnost působení D-galaktosaminu s fulminantní hepatitidou, nicméně přesný molekulární mechanismus zodpovědný za apoptoticko/nekrotické změny dosud plně objasněn není. Používá se nejčastěji v dávkách 100–1000 mg/kg *in vivo i. p.* nebo koncentracích 1 – 10 mM *in vitro*.

5.2.2 *In vitro* toxicita vyvolaná *tert*-butylhydroperoxidem jako model radikálového poškození



***Tert*-butylhydroperoxid** 1,1-dimethylethylhydroperoxid, 2-hydroperoxy-2-methylpropan

U této látky, vzhledem k její struktuře a fyzikálně-chemickým vlastnostem, již na první pohled nelze pochybovat o jejím cytotoxickém efektu. *Tert*-butylhydroperoxid (tBH) je tedy představován jako látka, která je schopna zastavit buněčný růst a indukovat apoptózu u mnoha typů buněk, např. *in vivo* v mozku, *in vitro* v hepatocytech [65, 66]. Expozice buněk tBH způsobuje na dávce závislé zvýšení množství reaktivních kyslíkových radikálů (oxidační stres), vstup Ca²⁺ do buněk a tvorbu annexinu V. Lipoperoxidací (díky volným kyslíkovým

radikálům) vzniklé peroxidy mastných kyselin mají prokazatelně škodlivý vliv na stabilitu buněčných membrán, mitochondriální funkce atd. *Tert*-butylhydroperoxid je krátkořetězcová modifikace těchto látek mající velmi podobné vlastnosti. Peroxyradikály mohou vznikat z tBH v cytosolu interakcí s železnatými ionty podobně jako je tomu ve Fentonově reakci [67]. Také bylo zjištěno, že expozice tBH vede k buněčné smrti přímo ovlivněním permeability membrán mitochondrií doprovázené depolarizací [68, 69]. Používá se nejčastěji v koncentracích 0,1 – 10 mM *in vitro*.

5.2.3 Imunomodulace lipopolysacharidy vedoucí k akutní toxicitě *in vivo*

Jako další model studia hepatotoxicity je možno použít standardizovanou směs bakteriálních lipopolysacharidů získaných z *Escherichia coli*, dále jen lipopolysacharid (LPS). Samotný LPS významně zvyšuje produkci NO. Navíc LPS interferuje s mitochondriální membránou, což vede k její destabilizaci, poklesu aktivity mitochondriálních dehydrogenáz, uvolnění cytochromu C navíc spolu se zvýšením aktivity kaspázy-3 v cytosolu u primárních hepatocytů. Tato biochemická zjištění byla potvrzena imunohistochemicky, kdy expozice LPS vyvolala větší odezvu apoptotickou než nekrotickou [70]. U monoblastických U937 buněk je LPS velký vliv na mitochondrie zvláště v časných stádiích apoptózy [71]. Důležitý je také indukční vliv LPS na Kupfferovy buňky, TNF- α či TNFR1 ještě před nastoupením apoptózy, což bylo pozorováno jak *in vivo*, tak *in vitro* v kokulturách hepatocytů a Kupfferových buněk, ale nikoli u hepatocytů v monokultuře [72]. V další studii bylo prokázáno, že LPS sám přímo indukuje membránový Fas ligand (mFasL), což bylo hodnoceno metodou TUNEL (the terminal transferase uridyl nick end labelling) v kulturách primárních hepatocytů po 24–48 hodinách [73]. Jak vyplývá z několika dalších studií, LPS zvyšuje množství reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), aktivuje jaderný faktor kappa B (NF κ B), čímž se na straně jedné automaticky aktivuje i většina prozánětlivých markerů včetně NOS-2 (iNOS), ale na straně druhé se tím aktivují i některé proteiny anti-apoptotické [74–79]. Používá se nejčastěji v dávkách 0,5 – 50 μ g/ kg *in vivo i.p.*

5.2.4 Kombinace LPS/D-GalN

Mnoho různých kombinací LPS a D-GalN bylo zkoušeno v literatuře [80–85] ve snaze vyprodukovat u laboratorního zvířete cílené subletální reverzibilní jaterní poškození, které by simulovalo různé klinické stavy u člověka jako např. virová hepatitida, polékové či alkoholové poškození, cholestatické poškození, autoimunní poškození či ischemicko-reperfuční poškození.

Ve všech našich pokusech byly pro toxický inzult použity kombinace lipopolysacharidu a D-galaktosaminu pro jejich synergismus na navození akutního hepatocelulárního poškození, které je analogické např. fulminantní virové hepatitidě či některým polékovým poškozením. Vyzkoušeli jsme celkem šest různých kombinací, z nichž se jako ideální pro naše experimenty hodily tyto tři:

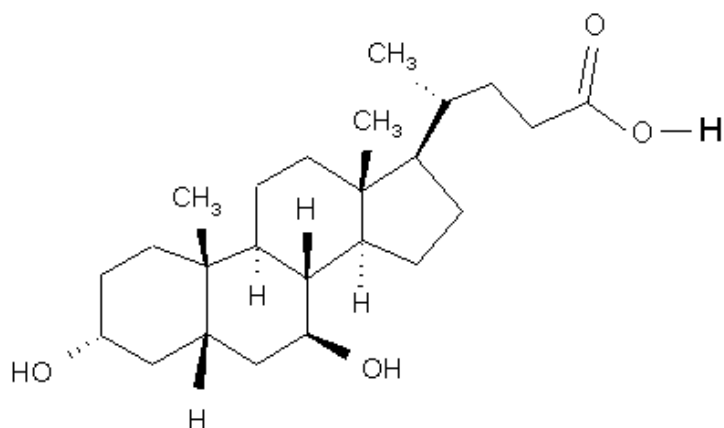
LPS + D-GalN – 0,5 µg/kg + 800mg/kg *i.p.*

LPS + D-GalN - 10 µg/kg + 400mg/kg *i.p.*

LPS + D-GalN - 50 µg/kg + 400mg/kg *i.p.*

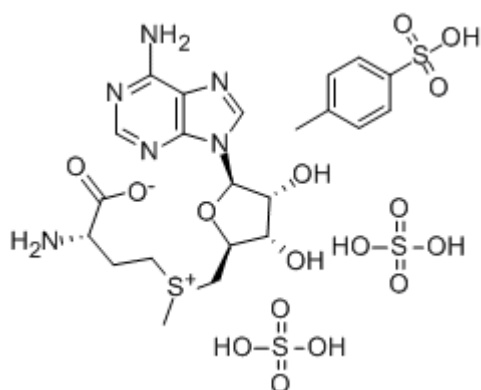
5.3 Vybrané látky s protektivními účinky na hepatocyty

Pojmem hepatoprotektiva označujeme látky, které mohou mít příznivý vliv na regeneraci jaterních buněk či na zpomalení některých patologických procesů při akutních i chronických jaterních chorobách. Existuje mnoho látek, u kterých byly takové účinky prokázány v experimentu, praktické využití je omezeno na několik látek. Mezi základní klinicky používané látky z této skupiny patří **silymarin** (viz dále) a **kyselina ursodeoxycholová**, což je hydrofilní látka, která ochraňuje buněčné membrány před detergentním účinkem toxických, hydrofobních žlučových kyselin. Ursodeoxycholová kyselina zlepšuje klinické projevy, laboratorní parametry a histologické změny u pacientů s primární biliární cirhózou. Dále se používá u mnoha cholestatických jaterních chorob, jako jsou poléková poškození, primární sklerotizující cholangitida či alkoholické nebo virové onemocnění s cholestatickým průběhem a cholestáza v těhotenství.



Kyselina ursodeoxycholová kyselina 3a,7b-dihydroxy-5b-cholan-24-ová

Kromě silymarinu a kyseliny ursodeoxycholové se klinicky ještě používají tzv. **donátory methylových skupin**, které prostřednictvím transmetylace a transsulfurace podporují syntézu látek obsahujících síru (cystein, taurin, glutathion, koenzym A aj.), jež se pak účastní detoxikačních procesů. Mezi tyto látky řadíme **N-acetylcystein** (přímý prekurzor cysteinu), **aspartát ornithinu** (dipeptid ovlivňující močovinový cyklus a cyklus dikarboxylových kyselin a zasahující do syntézy glutaminu a dalších aminokyselin, který má imunomodulační vlastnosti, působící antikatabolicky, snižuje plazmatickou hladinu amoniaku a aromatických aminokyselin), **kombinace betainu** (usnadňuje přeměnu homocysteinu na methionin), a **argininu**, (důležitá komponenta močovinového cyklu a cyklu trikarboxylových kyselin). Avšak klinicky nepoužívanější látkou z této skupiny je jednoznačně **ademethionin (S-adenosyl-L-methionin)**.



Ademethionin S-adenosyl-L-methionin

Tato molekula je fyziologicky přítomná téměř ve všech tělesných tkáních a tekutinách, to je i v hepatocytech. Při jaterní cirhóze se zjistilo, že k největšímu poklesu syntézy ademethioninu

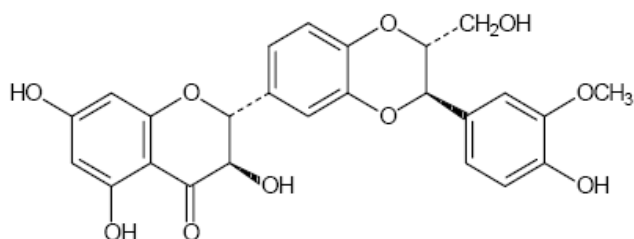
dochází v důsledku dramatického poklesu (o 50 %) aktivity ademethionin-syntetázy, enzymu účastnícího se přeměny methioninu (esenciální aminokyseliny obsahující síru) na ademethionin. Tato metabolická blokáda vyvolává pokles přeměny methioninu na ademethionin, tím se vyřazují fyziologické procesy prevence cholestázy. V důsledku toho dochází u nemocných s cirhózou jater k poklesu plazmatické clearance methioninu z potravy, jakož i ke snížení dostupnosti jeho fyziologických metabolitů, zejména cysteinu, glutathionu a taurinu. Dále vyvolává tento metabolický blok hypermethioninemii spojenou s rizikem encefalopatie. Bylo prokázáno, že hromadění methioninu v organismu vyvolává zvýšení plazmatických hladin jeho metabolitů (merkaptanu a metathiolu), které hrají značnou roli v patogenezi jaterní encefalopatie. Substituce ademethioninu z externích zdrojů zvyšuje syntézu thiolových sloučenin, aniž by docházelo ke zvýšení hladiny cirkulujícího methioninu. U nemocných trpících jaterní cirhózou, omezující biologickou dostupnost ademethioninu, obnovuje doplnění této esenciální sloučeniny její hladinu a spolu s tím i základní biologické mechanismy bránící cholestáze, k čemuž by bez substituce docházelo jen velmi zřídka. U intrahepatální cholestázy dojde podáním ademethioninu k překonání metabolické blokády způsobené snížením aktivity syntetázy ademethioninu a tím k obnovení fyziologických mechanismů bránících cholestáze [86].

Poslední skupinou hepatoprotektiv jsou **esenciální fosfolipidy**, které obsahují nenasycené mastné kyseliny (kyselinu linolovou, linolenovou), jsou nezbytné pro funkci buněčných membrán a membrán buněčných organel; mají význam k udržení funkce a zajištění regenerace buněčných struktur všech buněk, především však jaterních. Působí protektivně proti vzniku jaterní nekrózy a steatózy.

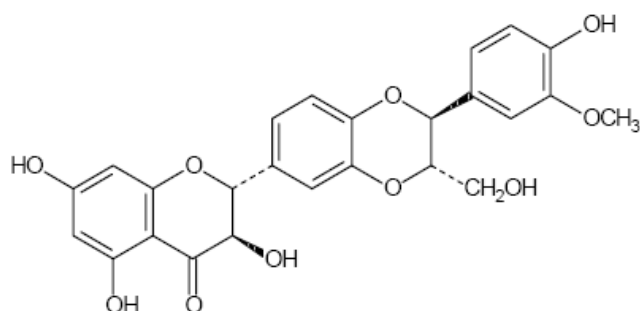
Za hepatoprotektiva se považuje i spousta dalších látek, nicméně prokazatelnost jejich účinku je zvláště v klinických studiích někdy velmi těžká a mnohdy i pochybná. Proto je nejdříve potřeba zhodnotit tyto látky na vybraných modelech *in vitro* a *in vivo* a nikoli je hodnotit pouze z empirického hlediska. V našem případě jsme hodnotili na preklinické úrovni celkem dvě látky s hepatoprotektivním potenciálem – resveratrol a kurkumin, přičemž hepatoprotektivní silymarin byl použit jako komparátor a zároveň byl i u něho detailněji zkoumán vliv na funkci hepatocytů.

5.3.1 Silymarin

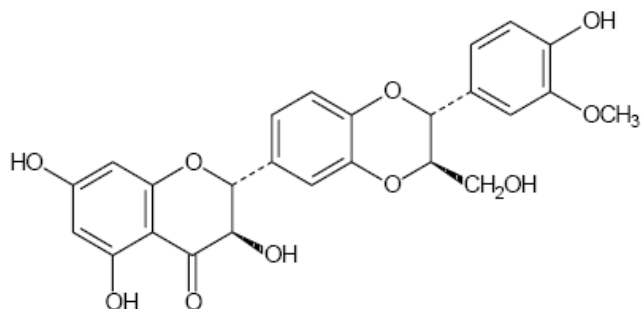
Jako silymarin (SM) je označována směs látek flavolignanového typu získaná extrakcí plodu ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Hlavní podíl obsahových látek tvoří silybinin A, silybinin B (dohromady tvoří více než 80 % silymarinu), isosilybinin A, isosilybinin B, silydianin, silychristin, taxifolin.



Silybinin A. (2*R*,3*R*)-3,5,7-trihydroxy-2-[(2*R*,3*R*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxan-6-yl]chroman-4-on,



Isosilybinin B. (2*R*,3*R*)-3,5,7-trihydroxy-2-[(2*S*,3*S*)-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-3-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxan-6-yl]chroman-4-on,



Isosilybinin A. (2*R*,3*R*)-3,5,7-trihydroxy-2-[(2*R*,3*R*)-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-3-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxan-6-yl]chroman-4-on,

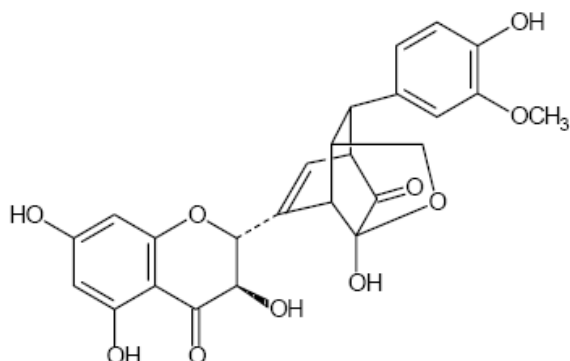
Silymarin je velmi dobře známé a v klinické medicíně – typicky v Evropě –používané hepatoprotektivum. Své účinky prokazuje v jak *in vitro* nebo *in vivo* preklinických studiích [87], tak ve studiích klinických, například v randomizované studii II. fáze kombinující antivirotickou a antioxidační terapii [88, 89]. Mechanismy jeho účinku nejsou zcela objasněny, ale předpokládá se určitý komplexní účinek zahrnující ovlivnění transportních peptidů, které mají stabilizační efekt na membránu hepatocytů, dále ovlivnění antioxidačních systémů, inhibice lipooxygenázy, NOS-2 a jaderného faktoru kappa B a redukce syntézy kolagenu. Terapeutická účinnost silymarinu je založena na několika mechanismech: silymarin má jednak antiperoxidativní aktivitu, vychytává volné radikály a tím narušuje patofyziologický proces peroxidace lipidů, který je odpovědný za rozpad buněčných membrán. Navíc silymarin stimuluje v poškozených jaterních buňkách proteosyntézu a normalizuje metabolismus fosfolipidů. Společným efektem je stabilizace buněčné membrány, která zabraňuje úniku uvolněných buněčných součástí (např. transamináz) z jaterních buněk. Silymarin brání intracelulárnímu vstupu a působí antagonisticky vůči mnohým modelům jaterního poškození: toxinům houby *Amanita phalloides* (muchomůrky zelené), faloidinu a alfa-amanitinu, lamhanidinu, tetrachloridu uhličitému, D-galaktosaminu, thioacetamidu a hepatotoxickému viru FV3 studenokrevných zvířat.

Nejúčinnější složkou je silybin. Hepatoprotektivní účinek se projevuje normalizací hodnot jaterních enzymů, sérových lipidů, restitucí histologického nálezu apod. Zvýšení proteosyntézy po silymarinu je podmíněno stimulací aktivity jaderné RNA-polymerázy, čímž následně dochází ke zvýšené tvorbě ribozomální RNA. Důsledkem je zvýšená syntéza strukturálních a funkčních bílkovin (enzymů). Celkově se tak zvyšuje reparační kapacita a regenerační schopnost jater.

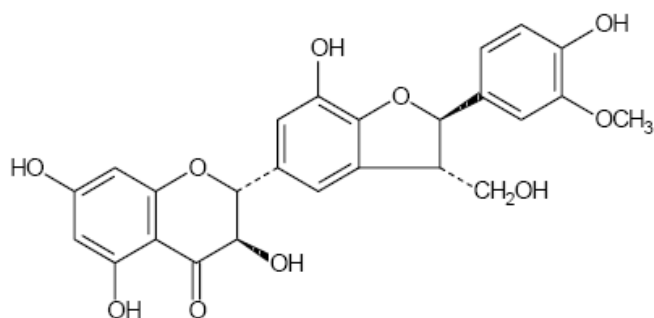
Kontrolované studie prokázaly zkrácení doby onemocnění u akutní hepatitidy. Silymarin působí příznivě na chronická zánětlivá onemocnění jater a na jaterní cirhózu. Stejně pozitivní účinek má na alkoholickou steatózu jater a na jaterní poruchy, které byly vyvolány některými léčivými.

Co se akutní toxicity týče, v pokusech na potkanech a myších bylo prokázáno, že silymarin je po jednorázové perorální aplikaci prakticky netoxický – hodnota LD₅₀ byla vyšší než 2000 mg/kg. V dlouhodobém pokusu na zjištění chronické toxicity bylo po dobu maximálně 12 měsíců podáváno potkanům a psům perorálně max. 2500, popř. 1200 mg silymarinu/kg. Laboratorní údaje ani patologickoanatomické nálezy neprokázaly toxické účinky. Studie ovlivnění fertility a prenatalní, perinatální a postnatální toxicity, provedené na potkanech a králících, nezjistily žádné nepříznivé účinky na různá stadia reprodukce

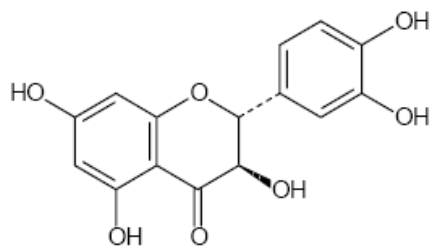
(maximální zkoušená dávka 2500 mg/kg). Nebyl zjištěn žádný teratogenní potenciál silymarinu. Studie mutagenity provedené *in vitro* a *in vivo* byly negativní [90].



Silydianin. (2*R*,3*R*)-3,5,7-trihydroxy-2-[3-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-8-oxo-1,3,3a,6,7,7a-hexahydro-3,6-methano-2-benzofuran-4-yl]chroman-4-on,

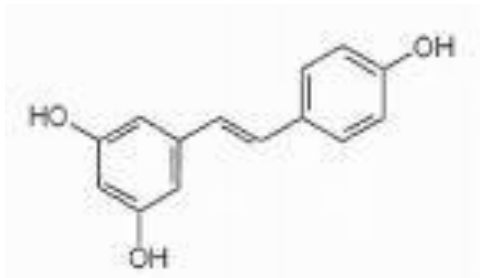


Silychristin. (2*R*,3*R*)-3,5,7-trihydroxy-2-[(2*R*,3*S*)-7-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-3-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl]chroman-4-on,



Taxifolin. (2*R*,3*S*)-3,5,7-trihydroxy-2-(3,4-dihydroxyfenyl)chroman-4-on.

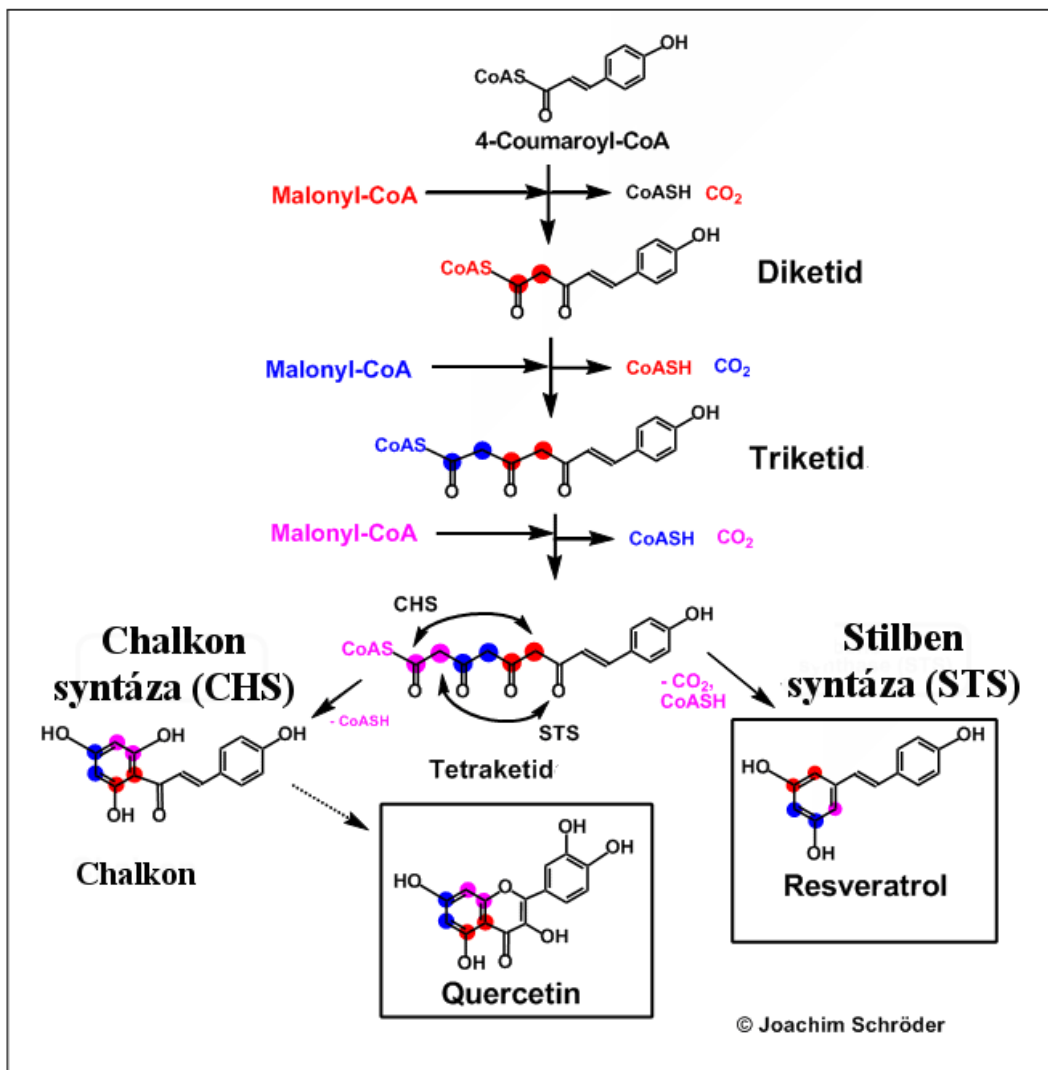
5.3.2 Resveratrol



Resveratrol trans-3,4',5-trihydroxystilben

Resveratrol je rovněž látka přírodního původu s hepatoprotektivním potenciálem. Je to látka bisfenolická, ale ne-flavonoidního původu. Z farmakologického hlediska je to aktivátor cílových proteinů SIRT-1 a AMPK. Resveratrol se nachází v některých stromech např. kořenu některých druhů rdesna (*Polygonum cuspidatum*), listu japonského zázvoru (*Alpinia speciosa*), v podzemnici olejné (*Arachis hypogea*) a také v plodech vinné révy (*Vitis vinifera*). Hlavním zdrojem pro člověka je tedy víno, hroznové víno a burské ořechy. Syntéza resveratrolu v rostlinách je naznačena na obrázku 7.

Tato látka je v současné době a v posledních několika letech intenzivně studována a vykazuje nejrůznější biologické účinky. Z těch zaznamenaných je to její antitrombotický efekt, protizánětlivý efekt, kardioprotektivní a neuroprotektivní efekt, určitý antikancerogenní potenciál v podobě spouštění signalizační kaskády u programované buněčné smrti [91, 92, 93] atd. Protizánětlivé účinky resveratrolu se mimo jiné vysvětlují inhibicí inducibilní NOS-2 spojenou s agonizací AMPK receptoru [94]. Potenciální hepatoprotektivní efekt nebyl dosud pořádně studován ve srovnání s jeho dalšími biologickými účinky. Dosud byla prezentována protektivní role resveratrolu u cholestatických jaterních poškození, ale ne u primárních hepatocytů. Dále bylo v některých publikacích zjištěno, že při intraperitoneální aplikaci



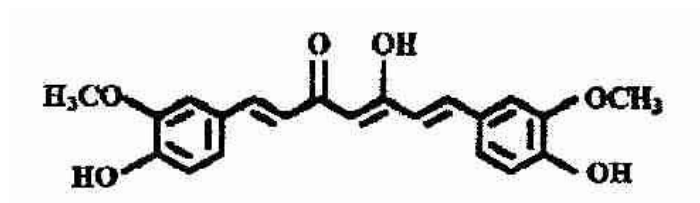
Obrázek 7: Biosyntetická dráha resveratrolu v rostlinách – naznačena strukturní příbuznost s chalkonem i quercetinem, které mají podobné biologické vlastnosti

(Upraveno dle internetového zdroje:

http://www.biologie.unifreiburg.de/data/bio2/schroeder/Sirtuin_Activators.html)

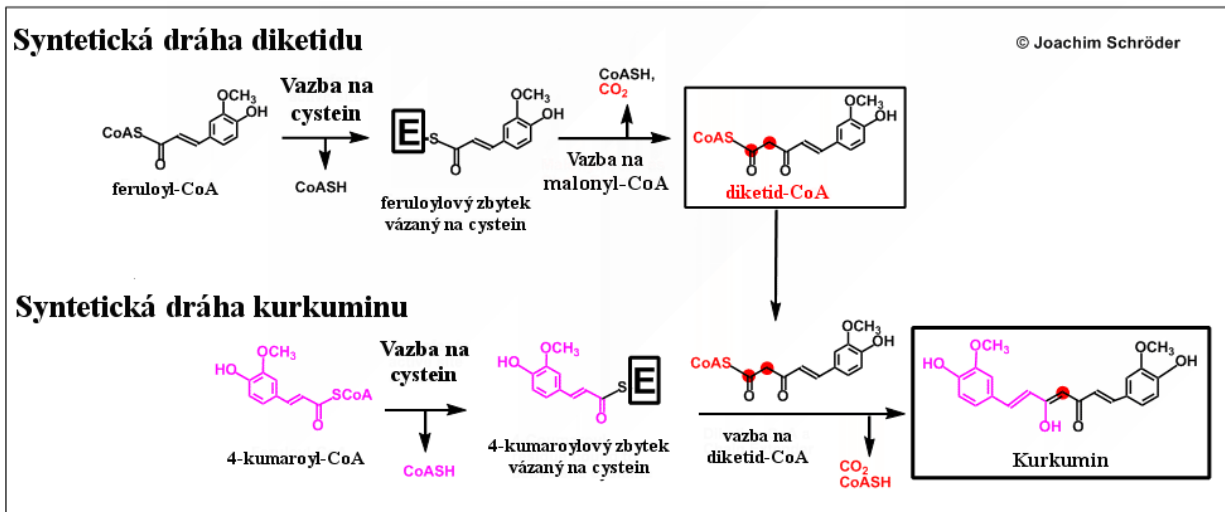
resveratrolu u potkanů s ligací *ductus bilifer*, došlo ke zmírnění oxidativního poškození hepatocytů [95, 96]. Používá se *in vitro* v koncentracích 10-200 $\mu\text{mol/l}$ a *in vivo* v dávkách 1-18 mg/kg.

5.3.3 Kurkumin



Kurkumin (1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion

Kurkumin je látka, která pochází z oddenků rostliny *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*). Jeho zdroj pro člověka je tzv. curry koření, jehož typicky žlutá barva je často využívána v potravinářství jako barvivo. Tento nízkomolekulární polyfenol je v oddenku této rostliny obsažen cca pouze v 2 – 8 % [97]. Je to látka, o níž bylo publikováno, že vykazuje inhibiční efekt na expresi genů pro COX-2 [98, 99], a zároveň je to opět silný antioxidant, scavenger peroxynitritových volných radikálů [100]. Dále kurkumin inhibuje uvolňování TNF-alfa a transkripci prozánětlivého a antiapoptotického NF-κB [101]. Některé studie hovoří o antionkogenním a cytoprotektivním potenciálu této látky [102–109]. Díky jeho antioxidantním a antifibrotickým vlastnostem je o kurkuminu uvažováno také jako o potenciální hepatoprotektivní látce pro ischemicko-reperfuzní jaterní poškození i fibrotizaci podložené jaterní poškození [110, 111, 112]. Z dalších farmakologických účinků potenciálně využitelných v klinické medicíně se pak projevuje efektem v krvi antiagregačním [113], spekuluje se jeho využití u idiopatických střevních zánětů [114] a Alzheimerovy choroby, protože blokuje agregaci amyloidu-beta [115] a představuje tak určitou slibnou perspektivu i u neurodegenerativních onemocnění [116]. Další zajímavý mechanismus kurkumin vykazuje na indukci hemoxygenázy [117, 118]. Používá se *in vivo* v dávkách 25-200mg/kg a *in vitro* v koncentracích 1-100 µg/ml.



Obrázek 8: Biosyntetická dráha kurkuminu v rostlinách – naznačena strukturní příbuznost s diketidem, který je mimo jiné prekurzorem resveratrolu

(Upraveno dle internetového zdroje:

http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schroeder/Curcumin_Biosynthesis.html)

6 VÝSLEDKY

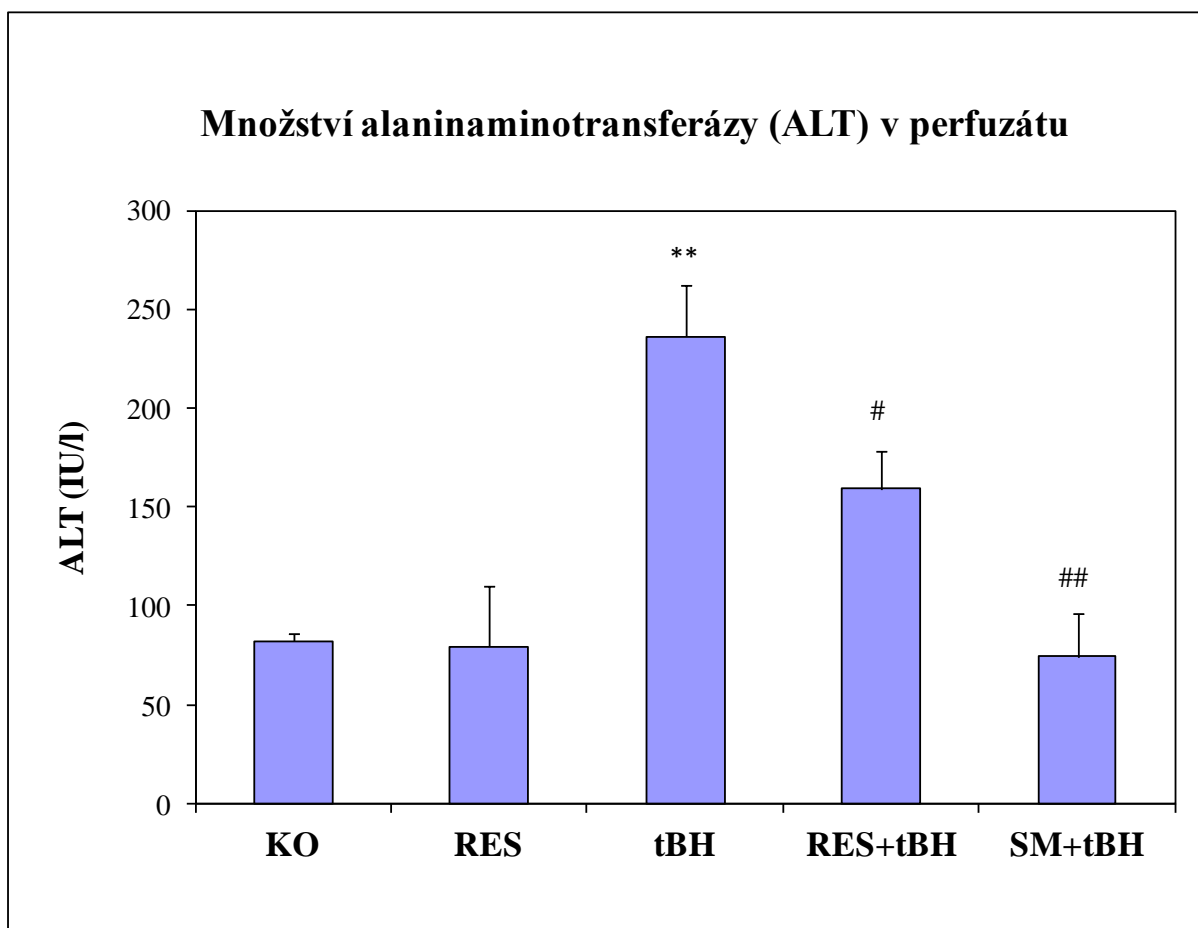
6.1 Preinkubace resveratrolem a silymarinem na modelu poškození kyslíkovými radikály: bioreaktor s izolovanými primárními hepatocyty

V pilotních experimentech byly inkubovány hepatocyty spolu s použitými látkami na tkáňových kulturách. Všechny látky byly standardně nasazovány 24 hodin po nasazení čerstvě izolovaných primárních hepatocytů v nosném médiu. Byla vytitrována koncentrace *tert*-butylhydroperoxidu 1 mM jako ideální koncentrace pro dostatečné toxické poškození oxidativním stresem, což však zároveň nezpůsobilo nekrózu většiny buněk na misce, kvůli které by se nedaly hodnotit důležité biochemické a ostatní parametry. Resveratrol byl postupně zkoušen samostatně v koncentracích 1, 5, 10, 15 a 20 μ M. U silymarinu se zkoušely koncentrace 50, 100, 250, 500 a 1000 μ M. Bylo zjištěno, že při koncentracích 10 μ M u resveratrolu a 500 μ M u silymarinu vykazovaly hepatocyty nejvyšší stabilitu pokud jde o přežívání, funkceschopnost a imunohistochemické hodnocení apoptotické aktivity. Proto byly tyto koncentrace použity pro testování cytoprotektivního účinku do bioreaktoru, kdy byly resveratrol se silymarinem přidán do perfuzního média vždy 30 minut před toxickým inzultem *tert*-butylhydroperoxidu (čas 0), přičemž celý experiment s perfuzí bioreaktoru trval celkem 5 hodin.

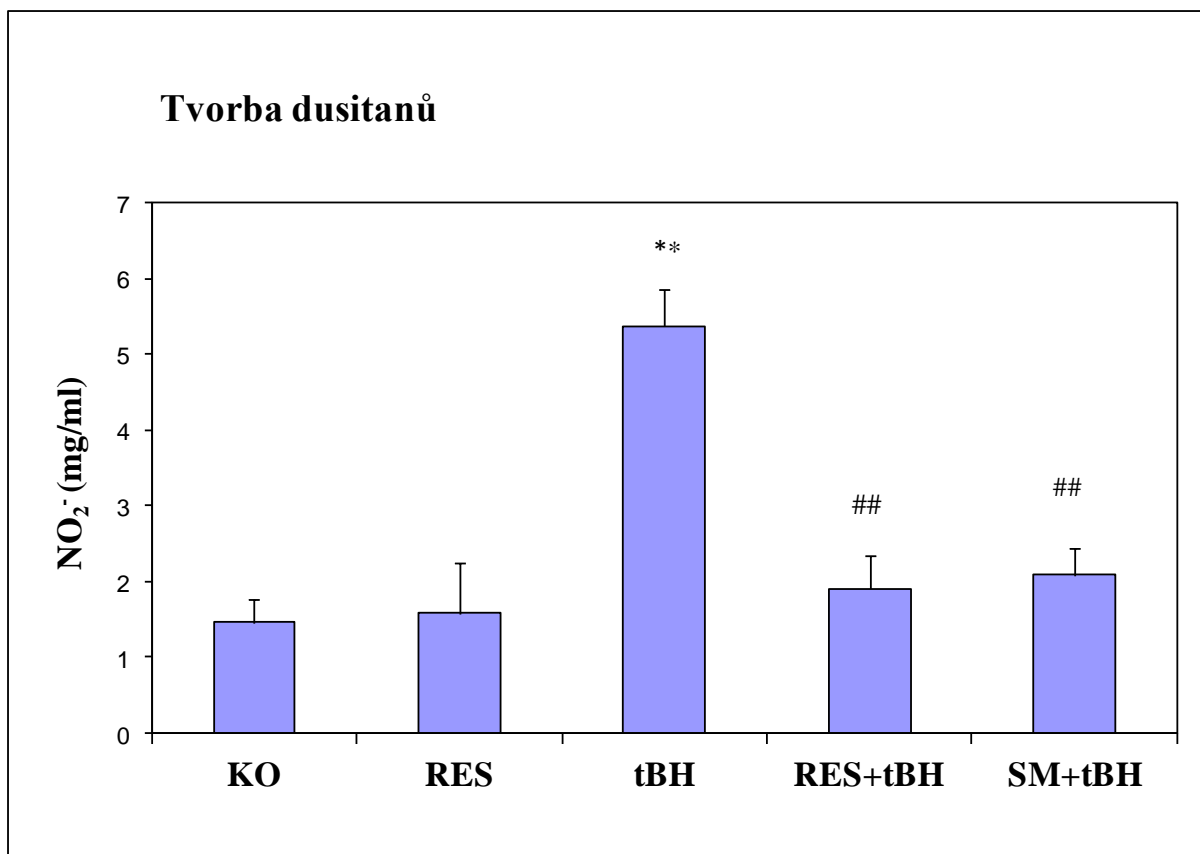
6.1.1 Biochemické výsledky

Po inkubaci primárních hepatocytů s *tert*-butylhydroperoxidem se zvýšilo množství uvolněného ALT na trojnásobek, jak znázorňuje obrázek 9. Samotné předlčení resveratrolem nijak produkci ALT neovlivnilo, ale třicetiminutová inkubace primárních hepatocytů s resveratrolem i se silymarinem, která předcházela toxickému šoku, statisticky významně snížila uvolňování ALT z buněk do perfuzátu. Obrázek 10 naznačuje velmi podobnou situaci týkající se tvorby NO, kterou odráží tvorba dusitanů. Jak resveratrolová tak i silymarinová preinkubace snížily *tert*-butylhydroperoxidem indukovanou tvorbu NO ($P \leq 0.01$). Poněkud opačná situace byla pozorována u měření močoviny v perfuzátu, která charakterizovala buněčnou funkceschopnost. Zde předlčení resveratrolem samotné i před toxickým šokem

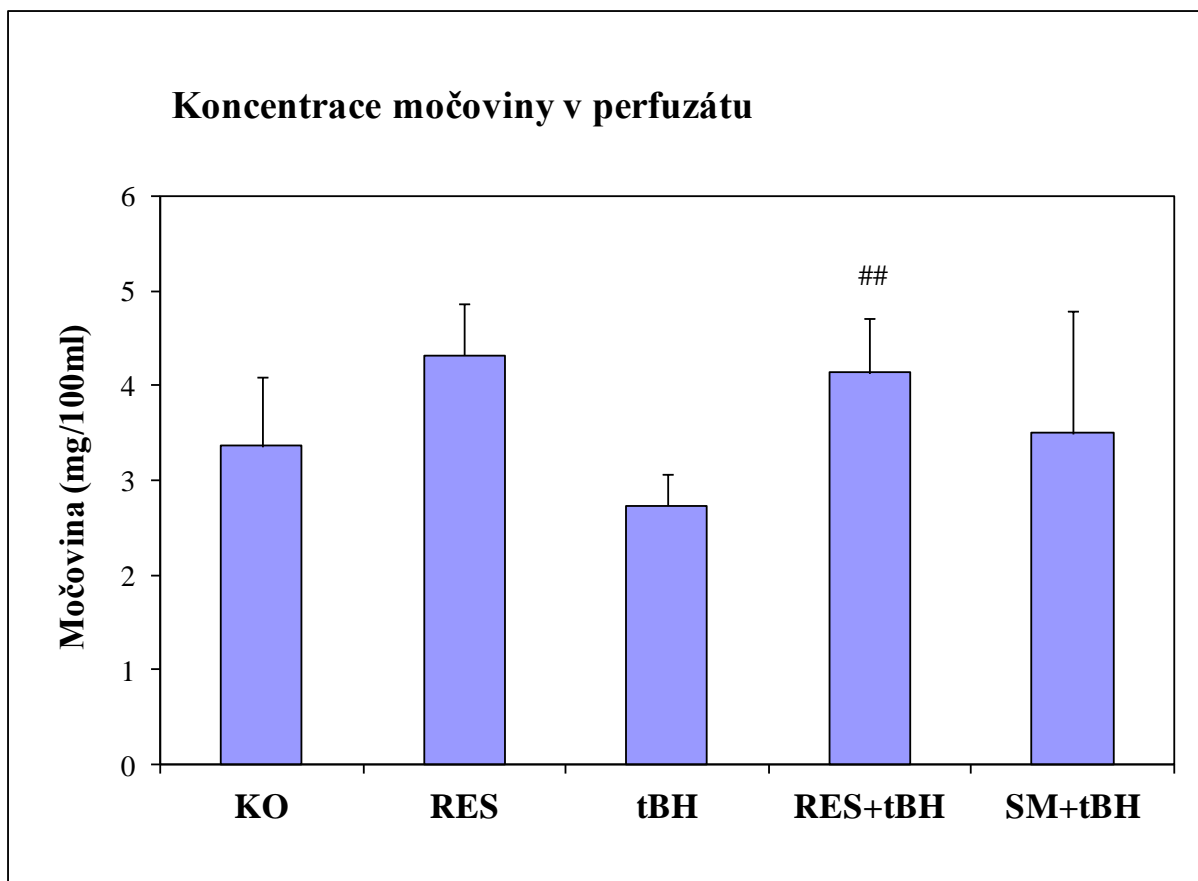
dominovalo nad ostatními. U modelů, které byly exponovány tBH byl naznačen pokles v tvorbě močoviny (obrázek 11), avšak tento nebyl statisticky významný. U modelů s resveratrolovou premedikací bylo pozorováno statisticky významné snížení tohoto ukazatele ($P \leq 0.05$). Výsledky u silymarinové předinkubace byly velmi rozkolísané a rovněž statisticky nevýznamné.



Obrázek 9: Vliv premedikace resveratrole a silymarinem na uvolnění ALT do perfuzátu
 KO čisté médium – negativní kontrola, RES resveratrol 10 μ M, tBH tert-butylhydroperoxid 1 mM – pozitivní kontrola, SM silymarin 500 μ M, ** statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,01$), ##,### statisticky významné vůči tBH ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$); Průměr \pm SEM, $n = 9-18$.



Obrázek 10: Vliv premedikace resveratrolem a silymarinem na tvorbu NO resp. dusitanů
 KO čisté médium – negativní kontrola, RES resveratrol 10 μ M, tBH tert-butylhydroperoxid 1 mM – pozitivní kontrola, SM silymarin 500 μ M, ** statisticky významné vůči kontrole, ## statisticky významné vůči tBH; Průměr \pm SEM, n = 9-18, p \leq 0,01.



Obrázek 11: Vliv premedikace resveratrolem a silymarinem na tvorbu močoviny

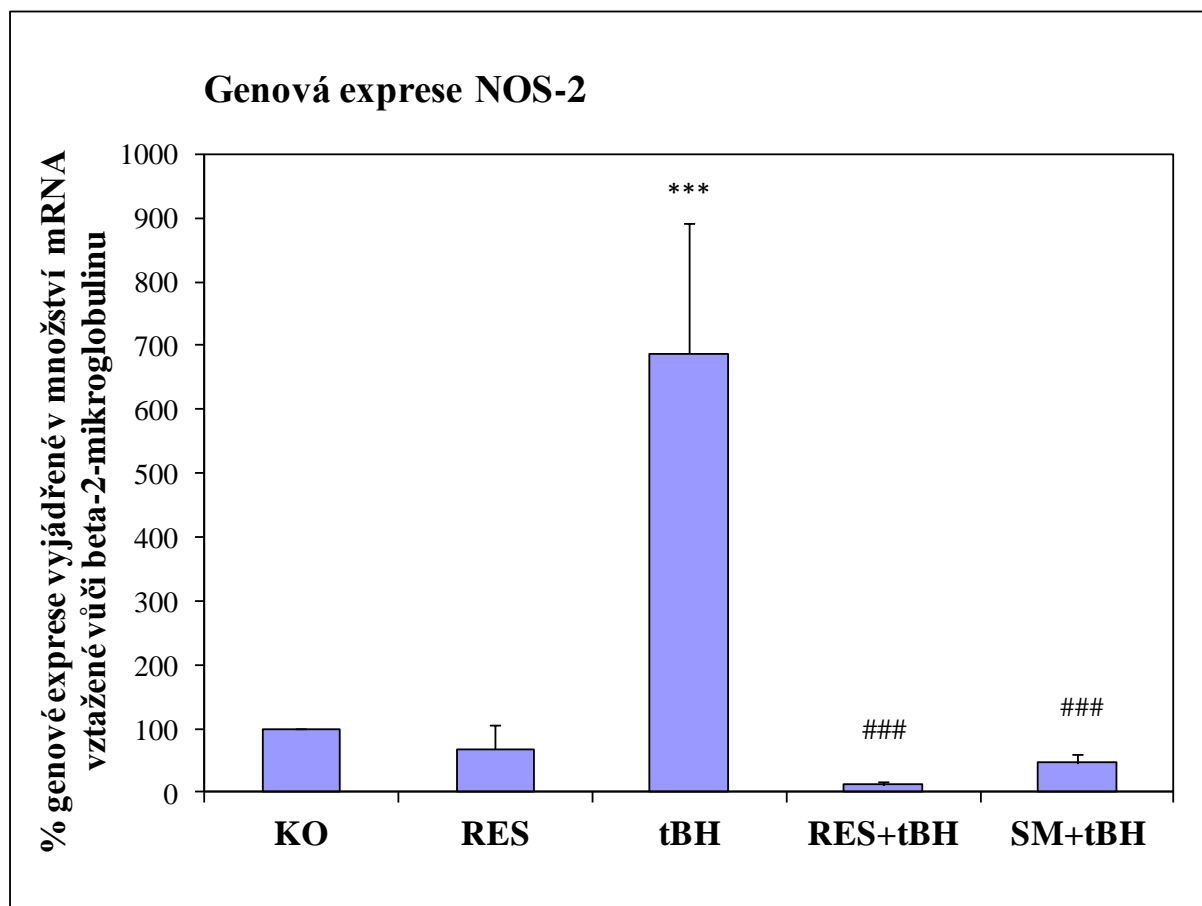
KO čisté médium – negativní kontrola, RES resveratrol 10 μ M, tBH tert-butylhydroperoxid 1 mM, SM silymarin 500 μ M, ^{##} statisticky významné vůči tBH; Průměr \pm SEM, n = 9-18, p \leq 0,01.

6.1.2 Výsledky real time-PCR

U všech RT-PCR měření byl jako vnitřní kontrolní gen použit beta-2-mikroglobulin, někdy též zkracován jako beta-globin.

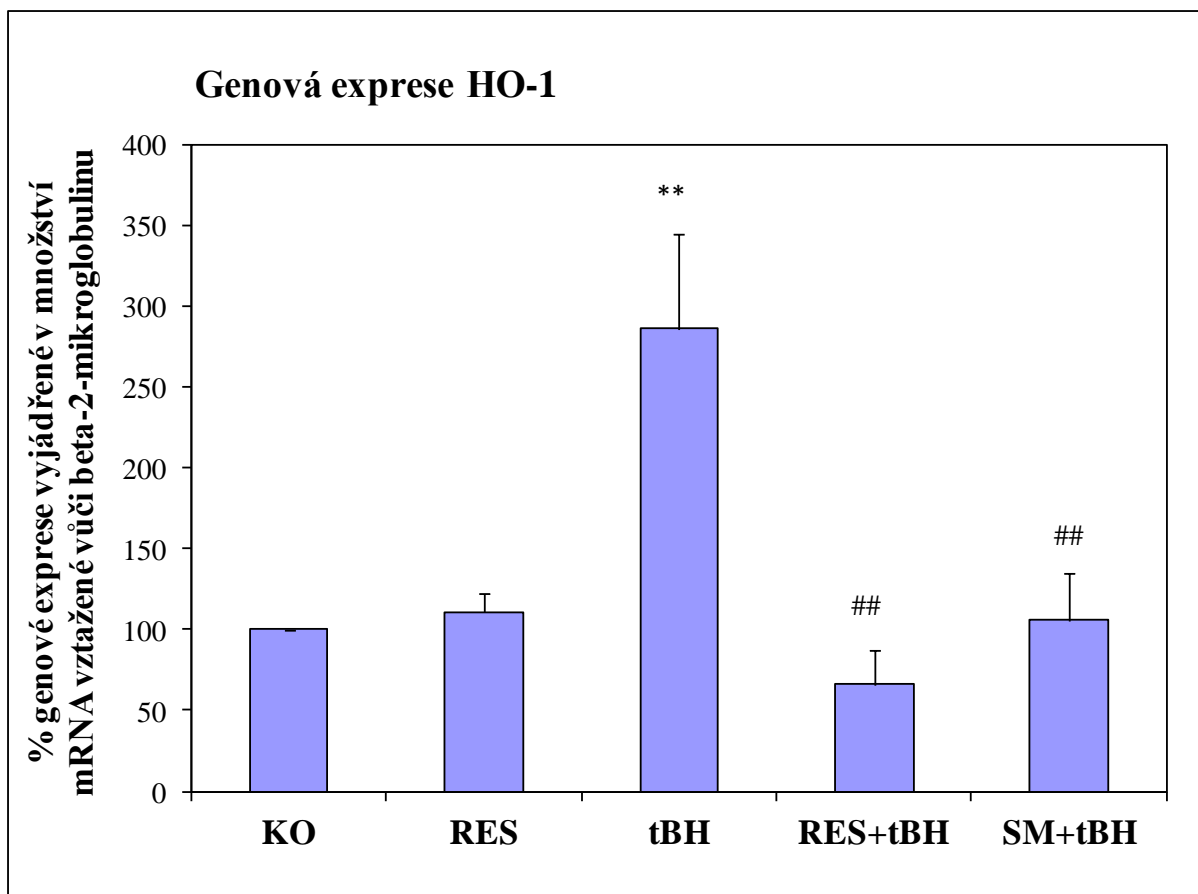
Z obrázku 12 je zřejmé, jak velký vliv měl oxidační stres vyvolaný tBH na indukci tvorby NOS-2 na úrovni genové exprese, která byla cca sedminásobná v porovnání s kontrolními hepatocyty. Tento nálezný koreluje i s biochemickým nálezem (viz obr. 8). Preinkubace s resveratrolem i silymarinem měla statisticky velmi významný vliv na snížení tBH indukované exprese. Vliv tBH s resveratrolovou a silymarinovou preinkubací na expresi mRNA pro HO-1 je znázorněn na obrázku 13. Samotný tBH zvýšil expresi mRNA tohoto genu zhruba třikrát, zatímco preinkubace resveratrolem i silymarinem dokázala tuto

indukovanou expresi velmi potlačit až na úroveň kontrolní skupiny. Samotná inkubace hepatocytů s resveratrolem expresi HO-1 ani NOS-2 statisticky významně neovlivnila.



Obrázek 12: Vliv premedikace resveratrolem a silymarinem na expresi genu pro NOS-2

KO čisté médium – negativní kontrola, RES resveratrol 10 μ M, tBH tert-butylhydroperoxid 1 mM – pozitivní kontrola, SM silymarin 500 μ M, ***statisticky významné vůči kontrole, ### statisticky významné vůči tBH; Průměr \pm SEM, $n = 4-5$, $p \leq 0,001$.



Obrázek 13: Vliv premedikace resveratrolem a silymarinem na expresi genu pro HO-1

KO čisté médium – negativní kontrola, RES resveratrol 10 μ M, tBH tert-butylhydroperoxid 1 mM – pozitivní kontrola, SM silymarin 500 μ M, ** statisticky významné vůči kontrole, ## statisticky významné vůči tBH; Průměr \pm SEM, $n = 4-5$, $p \leq 0,01$.

6.1.3 Histologické nálezy

Primární hepatocyty neovlivněné žádnou látkou (obr. 14A), kultivované v bioreaktoru na agarózových vláknech, vykazovaly typické strukturální znaky jako hepatocyty v přirozené struktuře jater. Kvůli předchozí desintegraci kolagenázou netvořily tyto hepatocyty typické trabekulární uspořádání a chyběla mezi nimi těsná spojení. Zhruba 15 % hepatocytů bylo dvoujaderných. Po pětihodinovém omývání perfuzním médiem byl přirozený úbytek hepatocytů 15 – 20%. Zatímco apoptotické procesy byly započaty v prvních stádiích imobilizace hepatocytů, což bylo potvrzeno přítomností apoptotických markerů na přeživších buňkách, hepatocyty poškozené izolací zahynuly nekrotickými nebo aponekrotickými mechanismy. K nejtypičtějším znakům těchto hepatocytů patřil mírně světlý houbovitý vzhled

cytoplasmy a patrné degenerativní změny na buněčném jádře, místy již s projevy karyolýzy. Naopak živé hepatocyty vykazovaly metabolickou aktivitu, jejich jádra obsahovala jemně granulovanou strukturu heterochromatinu, šlo rozpoznat jádérka a v mírně basofilní cytoplasmě se nacházela spousta mitochondrií, které se však nápadně soustřeďovaly uprostřed buněk, čímž se tvořil prázdný lem v blízkosti cytoplazmatické membrány.

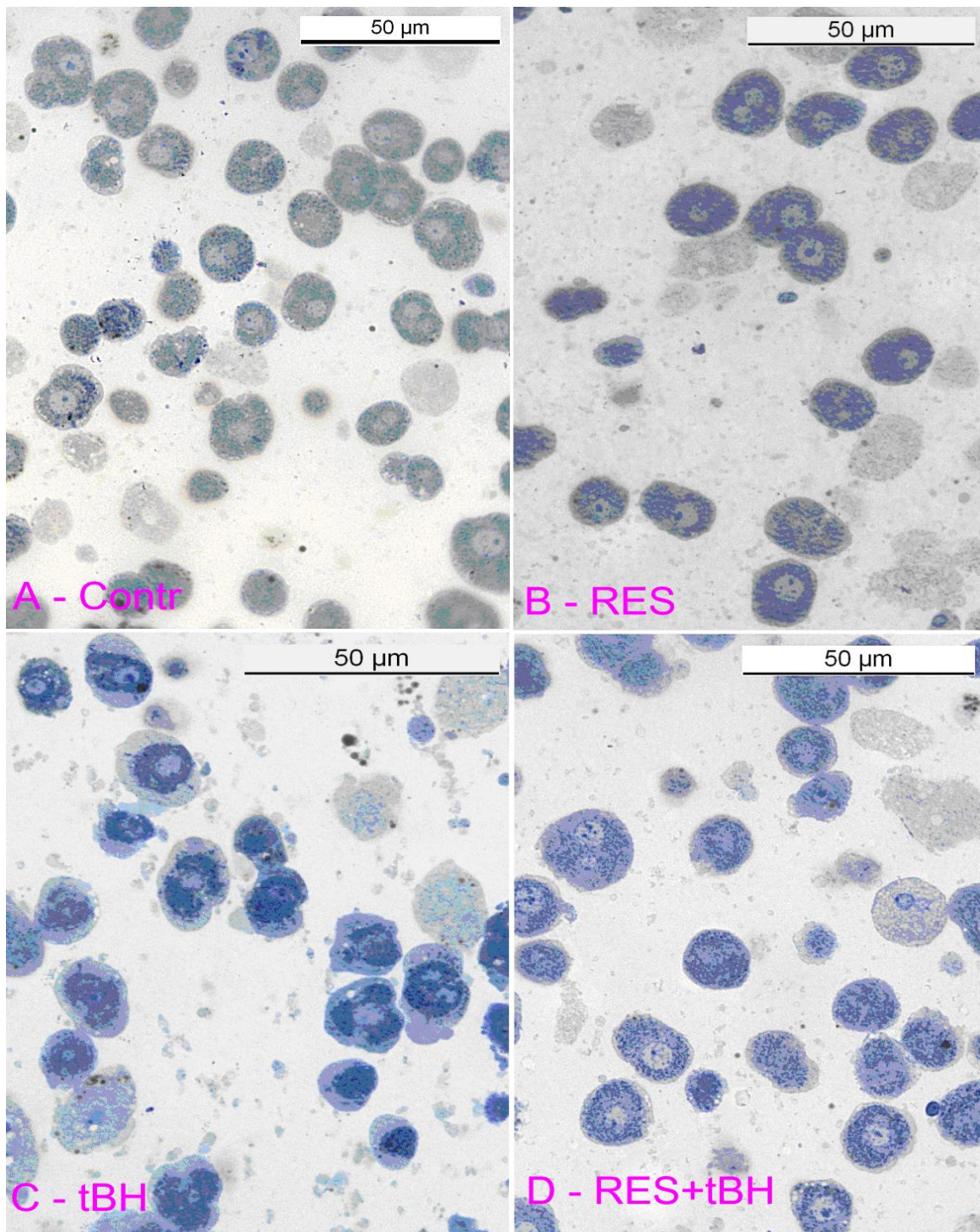
Hepatocyty vystavené resveratrolové inkubaci (obr. 14B) vypadaly velmi podobně jako kontrolní hepatocyty, jejich cytologická struktura vypadala více zachovalá, tudíž byla pod mikroskopem patrnější a výraznější. Jediným rozdílem byl nález drobných osmiofilních tukových kapének, které byly častěji u těchto hepatocytů patrnější než u kontrolních.

Inkubace hepatocytů v prostředí tBH byla spojena se zásadní změnou vnitřní buněčné stavby (obr. 14C). Hlavním znakem bylo nahromadění organel velmi blízko sebe doprostřed buněk za současného vytvoření cytoplazmového lemu na okrajích, což je pravděpodobně důsledek kolapsu cytoskeletu, který se stal cílem působení tBH. Ve srovnání s kontrolními hepatocyty byl zde daleko větší nález buněk v apoptotickém či nekrotickém stádiu buněčné smrti (cca 25–30 %). U těchto buněk byl také typický nález prázdných vakuol jako reziduí po bývalých zásobních vakuolách.

Preinkubace hepatocytů exponovaných vůči tBH resveratrolem (RES) byla charakterizovaná histologicky detekovaným cytoprotektivním účinkem (obr. 14D). U cca 60 % přeživších buněk byly nalezeny identické znaky jako ty, které byly popsány u kontrolních hepatocytů. Všechny pozorované buňky vykazovaly oproti pozitivní kontrole výrazně lépe zachovalou strukturu cytoskeletu.

Průměrná velikost buněk byla srovnatelná u skupin tBH a RES+tBH a byla u těchto skupin celkově menší než u skupiny kontrolní a čistě resveratrolové.

Protože silymarin byl pouze komparativní látkou pro biochemické nálezy, nebyly vzorky obsahující SM nebo SM+tBH histologicky hodnoceny.



Obrázek 14: Účinek pětihodinové inkubace imobilizovaných izolovaných primárních potkaních hepatocytů s různými látkami:

A/ Kontrolní hepatocyty (negativní kontrola, bez přítomnosti látek, pouze perfuzní médium)

B/ Hepatocyty vystavené inkubaci s resveratrolem (10 μM)

C/ Hepatocyty vystavené inkubaci s tert-butylhydroperoxidem (1 mM)

D/ Hepatocyty vystavené inkubaci s resveratrolem 30 minut přes toxickým insultem tert-butylhydroperoxidu a během něj

6.2 Premedikace resveratrolem na modelu fulminantní hepatitidy navozené kombinací lipopolysacharidu a D-galaktosaminu: in vivo studie na potkaním modelu

6.2.1 Biochemické výsledky

Intraperitoneální injekce kombinace lipopolysacharidu a D-galaktosaminu navodila pro jaterní tkáň situaci analogickou fulminantní hepatitidě, což se oproti kontrolní skupině projevilo signifikantním vzestupem všech tří měřených transferáz (ALT, AST a α -GST), jejichž množství v plasmě bylo měřeno 24 hodin po podání toxické kombinace.

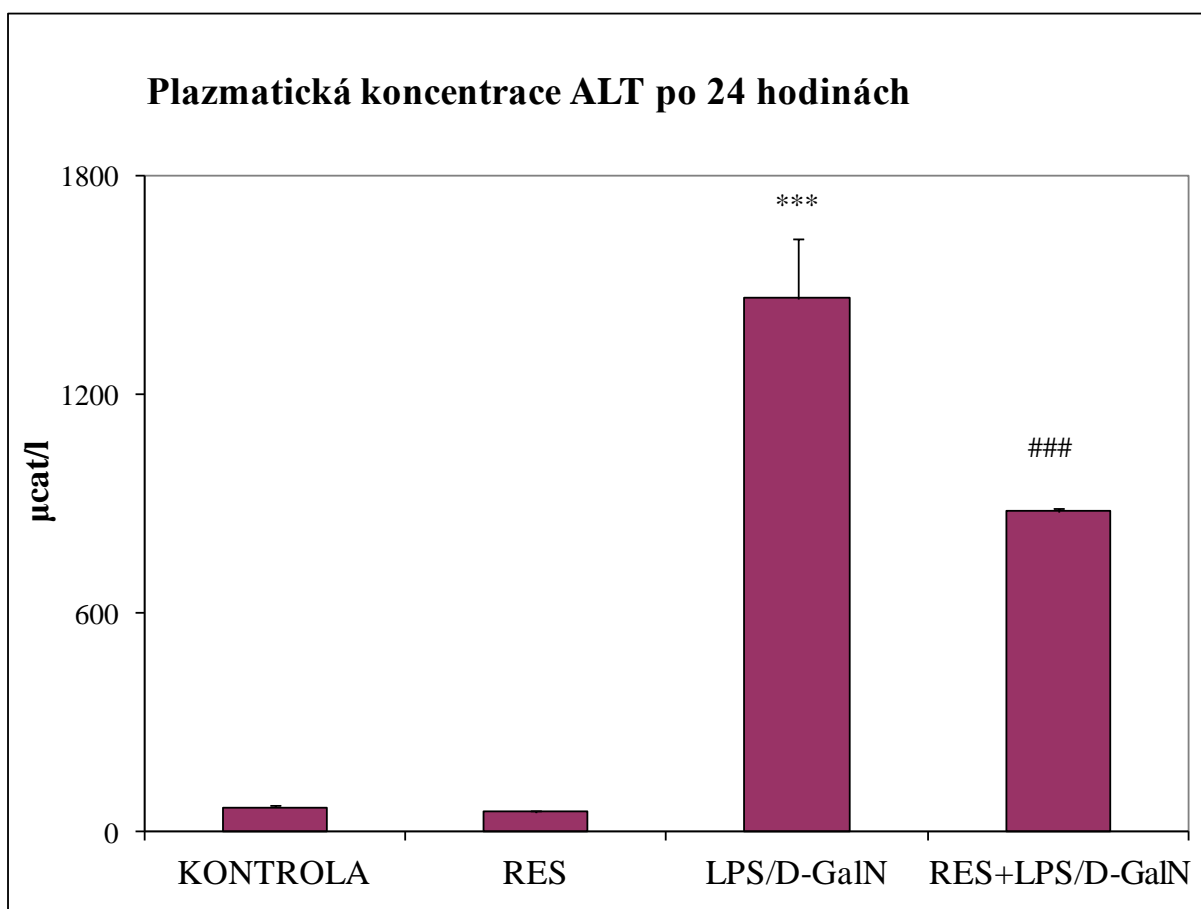
Předlčení intraperitoneálně podaným resveratrolem 2,3 mg/kg před toxickým nárazem statisticky významně snížilo plazmatickou koncentraci ALT, AST i α -GST oproti pozitivní kontrole (samotný LPS+D-GalN) – obrázky 15, 16 a 17. Podobná situace byla pozorována i u snížení plazmatické hladiny bilirubinu oproti pozitivní kontrole, u které bylo zaznamenáno cca dvojnásobné zvýšení. I přesto, že zde byl rozdíl statisticky významný, nebyl tak markantní jako u transferáz (obrázek 18). Působení samotného RES nezpůsobilo prakticky žádné významné změny vůči negativní kontrole.

Obrázek 19 znázorňuje dvojnásobné, statisticky významné zvýšení produkce nitrátů v plasmě 24 hodin po aplikaci LPS/D-GalN. Toto však nebylo pozorováno po předlčení resveratrolem, kdy koncentrace nitrátů byla srovnatelná s kontrolní skupinou nebo s resveratrolovou skupinou.

Vyšetření parametrů antioxidační kapacity bylo realizováno nepřímo pomocí měření lipoperoxidace – stanovení TBARS a konjugovaných dienu (CD) v plasmě a jaterním homogenátu a antioxidační stav byly hodnoceny pomocí plazmatické katalázy (CAT) a redukovaného glutathionu (GSH) měřeného v jaterním homogenátu (Tabulka 3).

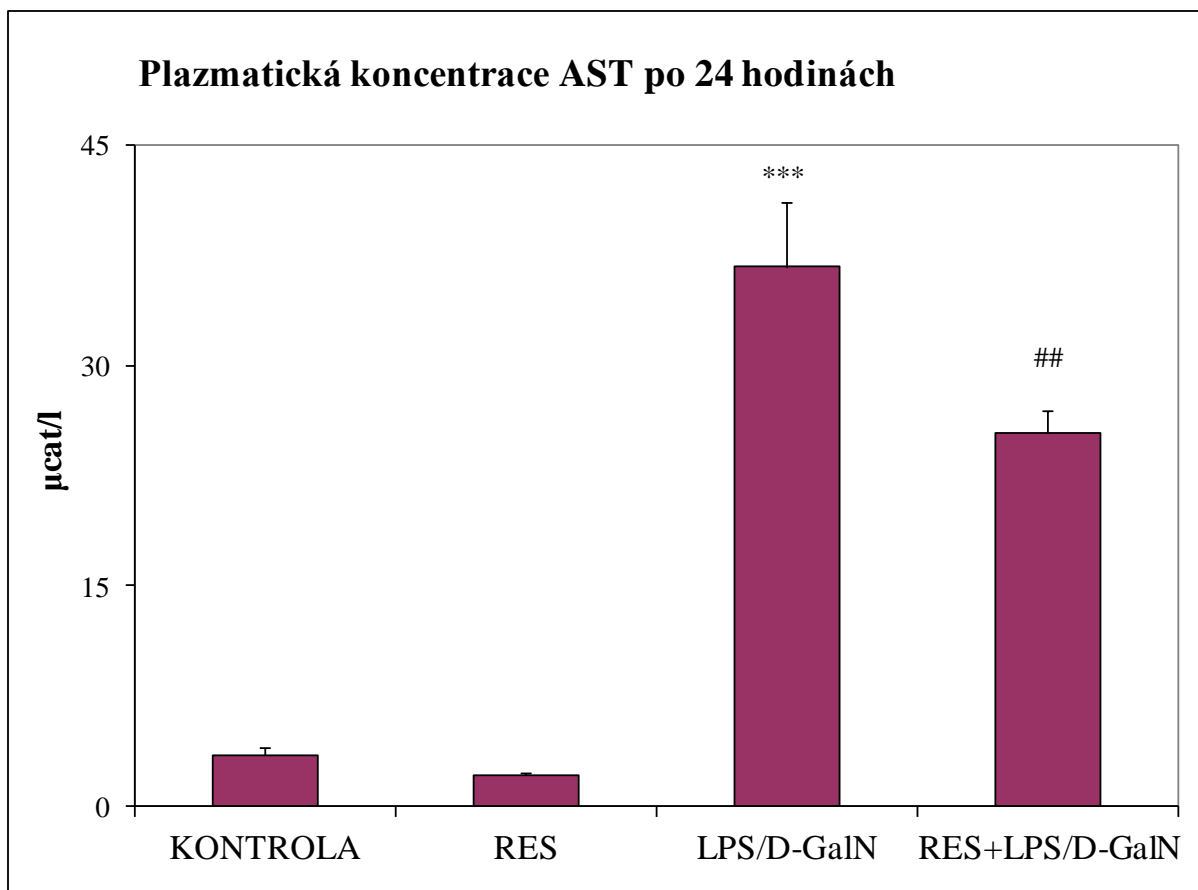
Kombinace LPS/D-GalN způsobila zvýšení lipoperoxidace, u TBARS došlo ke zvýšení jak u plazmatických tak (se statistickou významností) i u homogenátových vzorků ($p < 0,05$). Při měření konjugovaných dienu byl také zaznamenán zvyšující se trend. Rovněž plazmatická hladina katalázy byla zvýšena. Velmi zajímavý účinek na lipoperoxidaci vykázal RES podaný jako samotný; 24 hodin po jeho podání došlo ke statisticky významnému snížení plazmatických TBARS i konjugovaných dienu. Zároveň však došlo i ke snížení množství plazmatické katalázy. Předlčení resveratrolem vedlo k signifikantnímu nárůstu plazmatické

katalázy a poklesu TBARS a CD ($p < 0,05$). Laboratorní vyšetření redukováného glutathionu neukázalo žádné signifikantní nálezy.



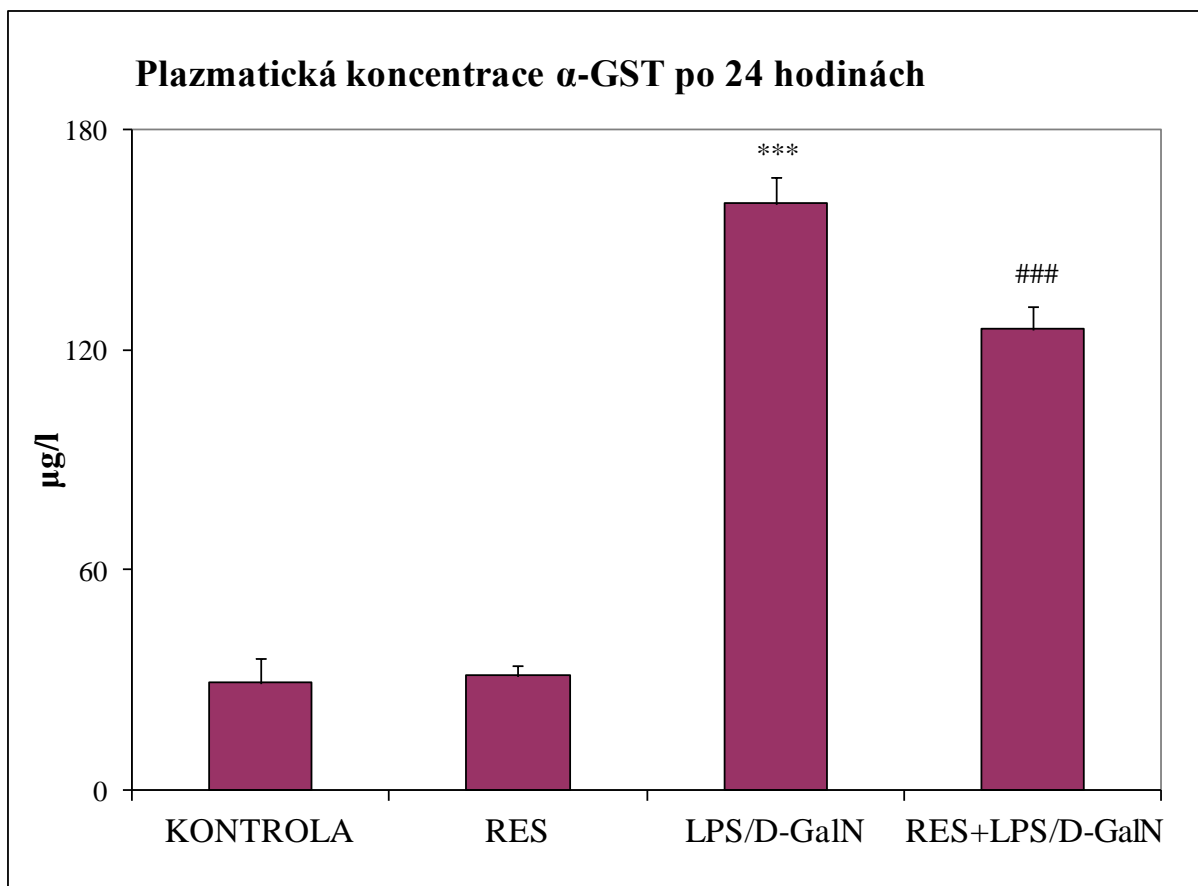
Obrázek 15: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na plazmatické koncentrace ALT

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9% NaCl, RES – skupina vystavená i.p. injekci resveratrolu v dávce 2,3 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 µg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg, RES + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole, ### statisticky významné vůči LPS/D-GalN; Průměr ± SEM, $n = 8-16$, $p \leq 0,001$.



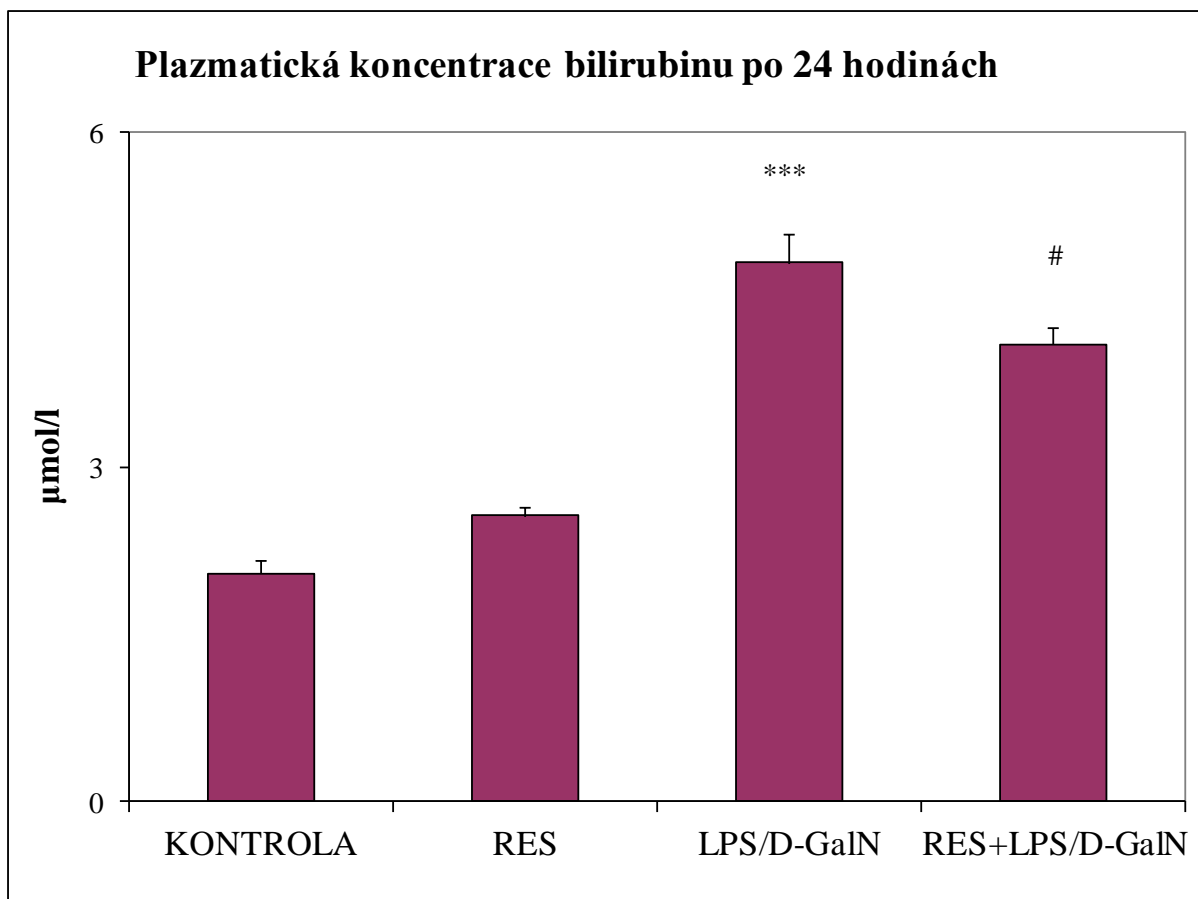
Obrázek 16: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na plazmatické koncentrace AST

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, *RES* – skupina vystavená i.p. injekci resveratrolu v dávce 2,3 mg/kg, *LPS/D-GalN* skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 µg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg, *RES + LPS/D-GalN* skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$), ## statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,01$); Průměr ± SEM, n = 8-16.



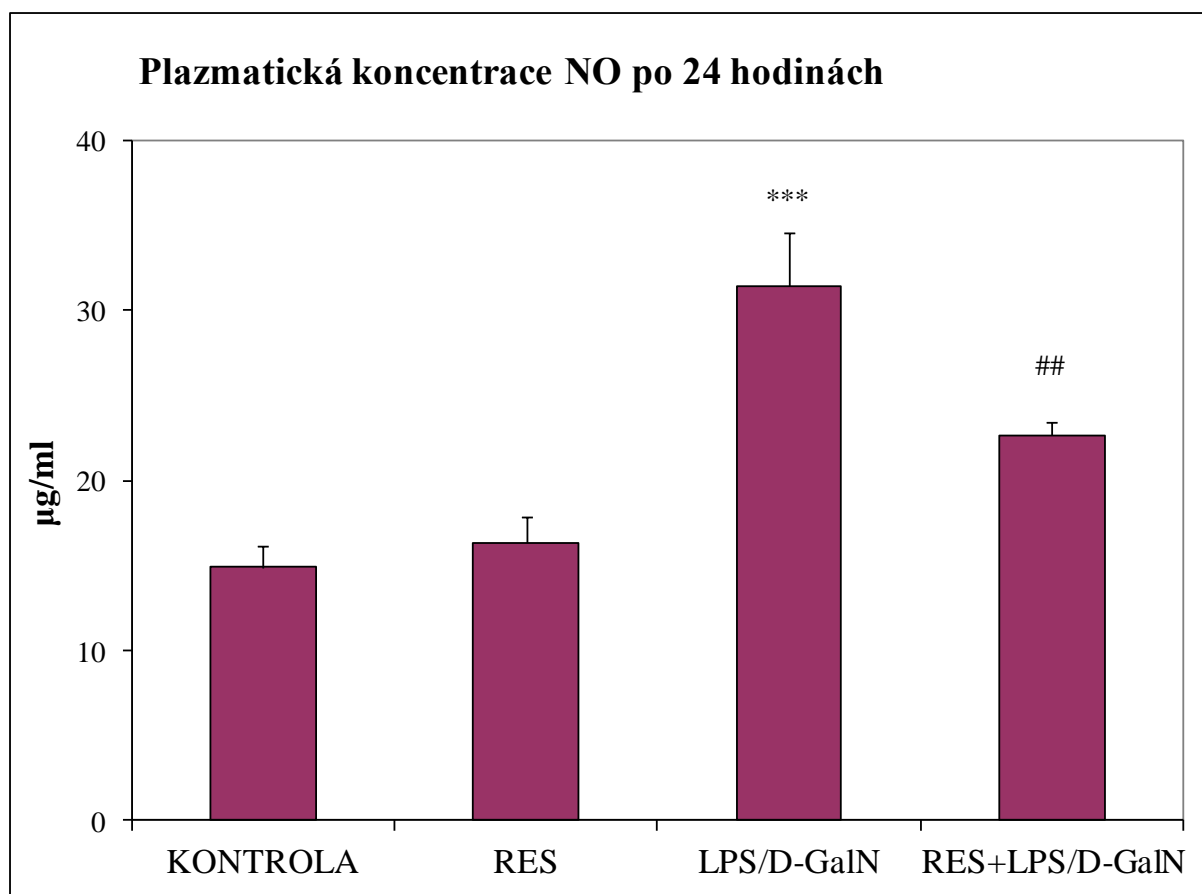
Obrázek 17: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na plazmatické koncentrace α -GST

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, RES – skupina vystavená i.p. injekci resveratrolu v dávce 2,3 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 $\mu\text{g/kg}$ s D-Galaktosaminem 800 mg/kg, RES + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole, ### statisticky významné vůči LPS/D-GalN; Průměr \pm SEM, $n = 8-16$, $p \leq 0,001$.



Obrázek 18: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na plazmatické koncentrace celkového bilirubinu

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, *RES* – skupina vystavená i.p. injekci resveratrolu v dávce 2,3 mg/kg, *LPS/D-GalN* skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 µg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg, *RES + LPS/D-GalN* skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$), # statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,05$); Průměr \pm SEM, $n = 8-16$.



Obrázek 19: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na plazmatické koncentrace NO_2^-

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, *RES* – skupina vystavená i.p. injekci resveratrolu v dávce 2,3 mg/kg, *LPS/D-GalN* skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 µg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg, *RES + LPS/D-GalN* skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$), ## statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,01$); Průměr \pm SEM, $n = 8-16$.

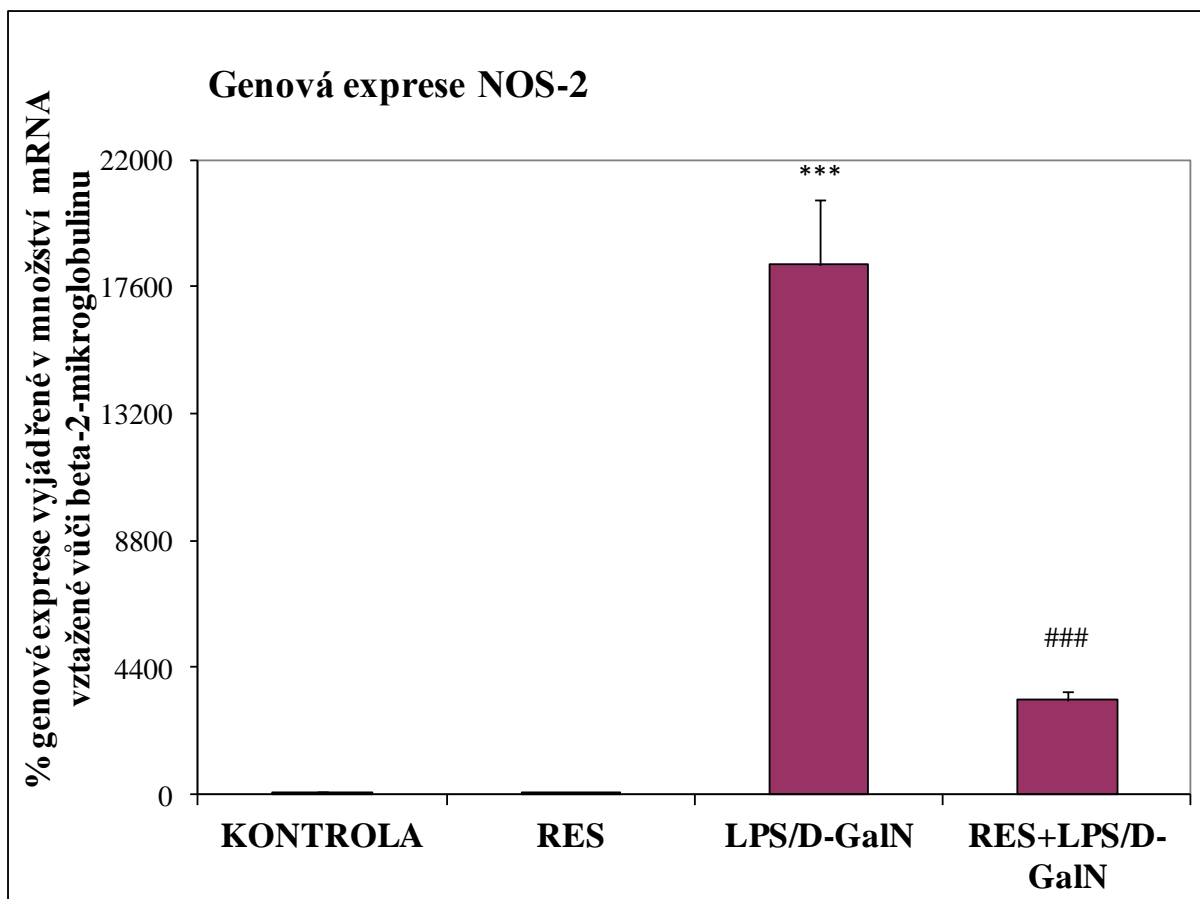
MĚŘENÝ MARKER		TBARS	CD	CAT	GSH
jednotky	plazma	nmol/ml	nmol/ml	μmol/ml	-
	homogenát	nmol/mg prot.	nmol/mg prot.	μmol/mg prot.	μmol/mg prot.
KONTROLA					
- plazma		1575±33	323±40	77±2	-
- homogenát		298±2,6	11±2,3	-	438±100
RES					
- plazma		1286±33***	50±2,7***	54±1,3***	-
- homogenát		297±8,3	20±3,3**	-	484±47
LPS/D-GalN					
- plazma		1720±73	360±50	137±3***	-
- homogenát		338±4***	30±5**	-	361±60
RES+LPS/D-GalN					
- plazma		1237±34####	160±26,7####	155±0,3####	-
- homogenát		328±4	39±5	-	300±45

Tabulka 3: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na koncentrace TBARS (reaktivní substance kyseliny thiobarbiturové), CD (konjugovaných dienů), CAT (katalázy) a GSH (redukováného glutathionu) v plazmě nebo jaterním homogenátu; KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, RES – skupina vystavená i.p. injekci resveratrolu v dávce 2,3 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 μg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg, RES + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$), **statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,01$), #### statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,001$); Průměr ± SEM, n = 8-16.

6.2.2 Výsledky real time PCR

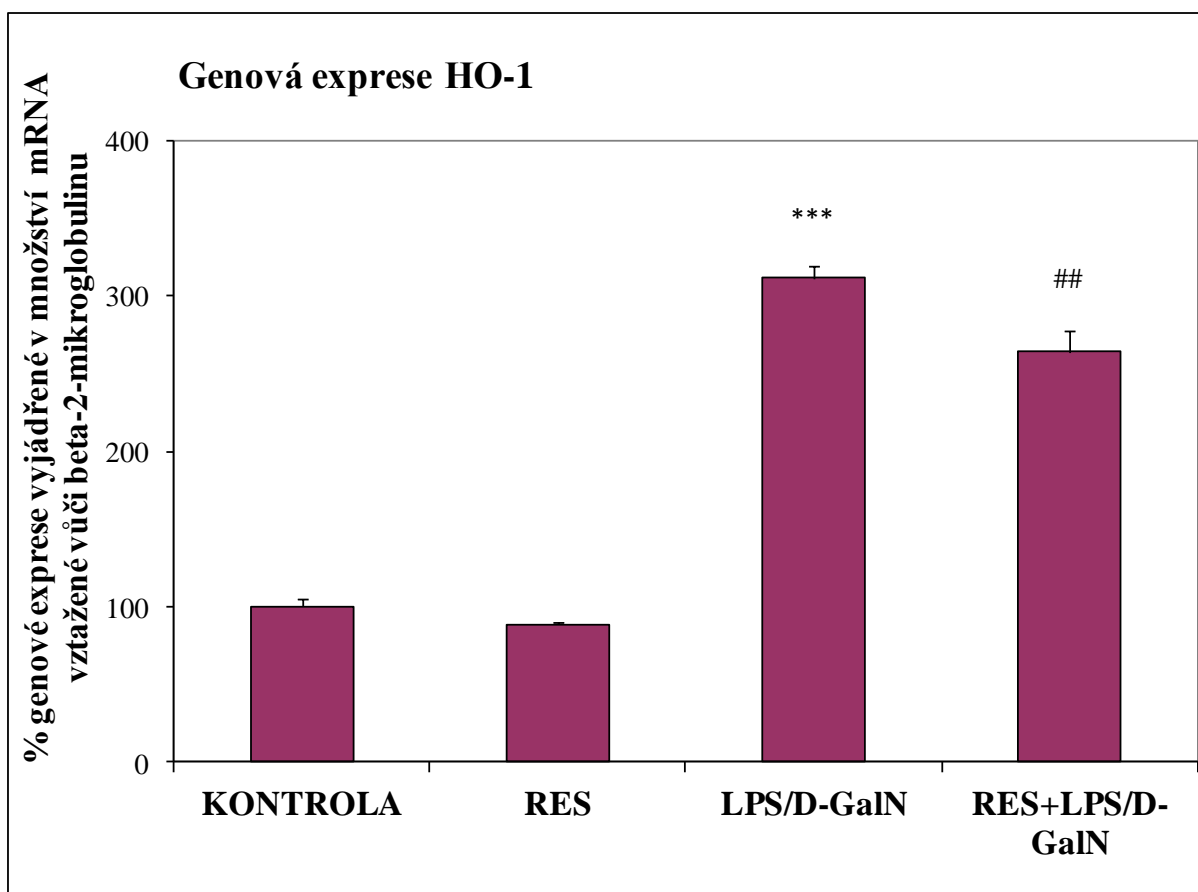
Účinek resveratrolového předléčení na genovou expresi mRNA pro geny indukibilních enzymů NOS-2 a HO-1 je znázorněn na obrázcích 20 a 21. Jako vnitřní endokontrola (housekeepingový gen) byl pro oba geny použit beta-2-mikroglobulin. Ten byl při všech pokusech vyhodnocen jako nejstabilnější (stejně jako ještě beta-aktin), a proto byly genové exprese obou výše uvedených genů k němu vztahovány.

Podání kombinace LPS/D-GalN způsobilo více než stosedmdesátinásobné zvýšení exprese NOS-2 oproti negativní kontrole. Resveratrolové předléčení dokázalo tento indukční efekt výrazně snížit cca o čtyři pětiny. Co se týče exprese HO-1, expozice kombinaci LPS/D-GalN vyvolala trojnásobné zvýšení, zatímco expozice kombinaci RES+LPS/D-GalN způsobila 2,5násobné zvýšení oproti kontrolní skupině. Přesto tento rozdíl byl statisticky významný ($p \leq 0,01$).



Obrázek 20: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na genovou expresi NOS-2

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, RES – skupina vystavená i.p. injekci resveratrolu v dávce 2,3 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 µg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg, RES + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole, ### statisticky významné vůči LPS/D-GalN; Průměr ± SEM, n = 9, p ≤ 0,001.



Obrázek 21.: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na genovou expresi HO-1

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, RES – skupina vystavená i.p. injekci resveratrolu v dávce 2,3 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 µg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg, RES + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$), ## statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,01$); Průměr \pm SEM, $n = 9$.

6.2.3 Histologické nálezy

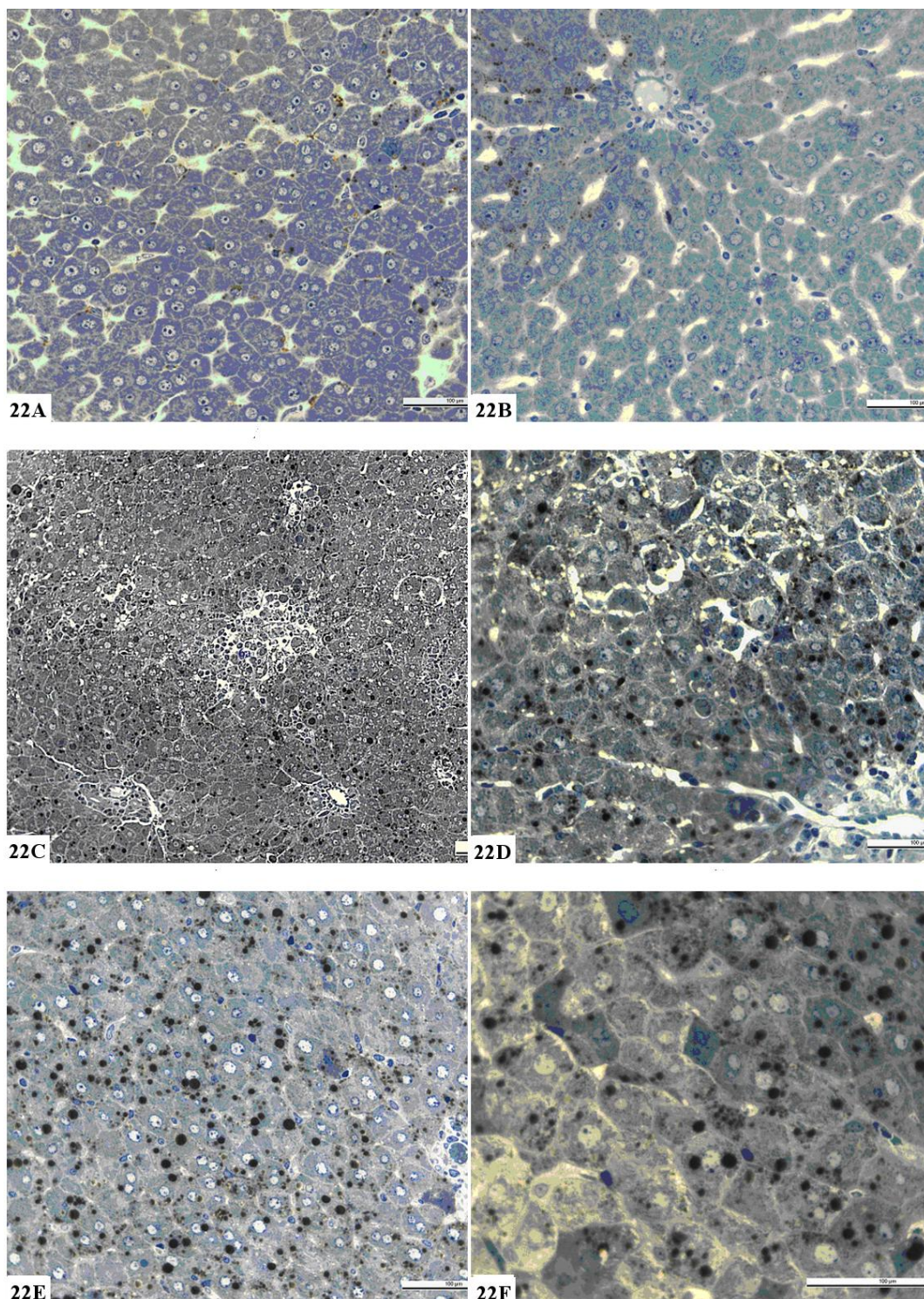
U kontrolních jaterních vzorků byla patrná zcela jasná neporušená trabekulární struktura. Všechny hepatocyty vykazovaly navzájem si podobné znaky. Lipidové inkluze byly nalézány pouze ojediněle. Z morfometrického hlediska byla průměrná velikost hepatocytů $25,5 \pm 3,95$ µm; příliš se nelišila u hepatocytů lokalizovaných periferně, intermediárně a ve středním regionu centrální žíly (obrázek 22A).

Aplikace samotného resveratrolu se na změnách mikroskopickém obrazu jaterních lalůček výrazněji neprojevila. Teprve podrobnější analýza hepatocytů naznačila, že podání RES může způsobit poněkud vyšší zastoupení drobných lipidových inkluzí typu neutrálních tuků, a to zvláště v intermediární a centrální zóně lalůček. Naproti tomu rozměrnější jednotlivé tukové kapénky nebyly pozorovány. Zajímavým nálezem, který korespondoval s morfologií hepatocytů z tkáňové kultury, bylo periferní projasnění cytoplazmy, jež byla nápadně chudá na organely (obrázek 22B).

Podání D-galaktosaminu v kombinaci s LPS vyvolalo nápadné změny v morfologii jaterních lalůček, charakterizované dvěma typickými projevy. Jako první lze uvést, že se v oblasti vaziva portobiliárních prostorů objevila mononukleární infiltrace, na níž se kromě převažujících lymfocytů podílely i plně diferencované plazmatické buňky. Druhým predilekčním místem infiltrace mononukleárními buňkami bylo okolí centrální vény jaterních lalůček, kde se v rozvolněných trámčích hepatocytů rovněž ve větším počtu objevovaly početnější bloudivé buňky. Druhý komplex změn se týkal samotných hepatocytů. V porovnání s kontrolními zvířaty se v intermediární a centrální zóně lalůček centrální vény výrazně množily lipidové inkluze v hepatocytech. I když tukové kapénky patří k běžnému obrazu cytoplazmy hepatocytu, v tomto případě bylo možno konstatovat, že vykazovaly výraznou pleomorfii, a to jak co do velikosti, tak do složení. Tedy prosté zmnožení drobných tukových inkluzí mělo většinou morfologické vlastnosti, které odpovídaly neutrálním tukům, a bylo spíše patrné na periférii zóny pozměněných hepatocytů, kdežto vlastní ložiska pozměněných hepatocytů byla typická často značně rozměrnými (15 – 24 μm) jednotlivými, případně jen několika, inkluzemi. Zvýšená osmiofilie těchto kapének nasvědčovala, kromě vyššího zastoupení nenasyceným mastných kyselin i vyššímu podílu fosfolipidů. V radiálně uspořádaných trámčích hepatocytů se obvykle blíže k centrální véně vyskytovaly obrazy korespondující (podle typického jaderného chromatinu) s nastartovaným procesem apoptózy. Druhým znakem, známým v plném rozvoji z tkáňových kultur hepatocytů, byl obraz cytoplazmy, kde se objevovaly různě rozsáhlé oblasti prakticky bez buněčných organel, tedy především jinak bohatě zastoupených mitochondrií (obrázky 22cC, D a 23A).

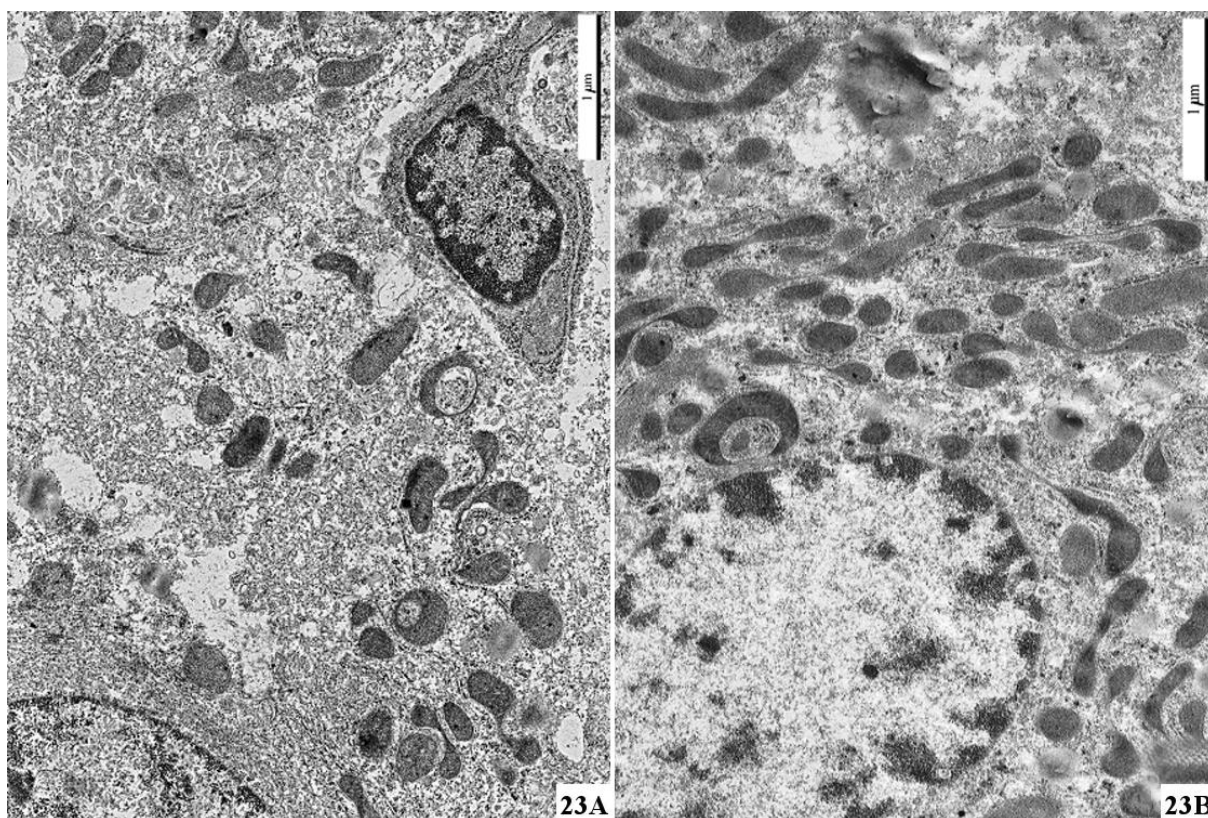
Podání resveratrolu v kombinaci s oběma předchozími látkami bylo prováděno především nápadným snížením infiltrace portobiliárních prostorů i ložisek kolem centrálních vén jaterních lalůček mononukleárními buňkami. Pokud šlo o zvýšené stádací procesy, tedy hlavně o výskyt tukových kapének, byly i v tomto případě korespondující s výše uvedenými nálezy s tím, že rozsah postižených partií lalůček byl menší. Současně bylo konstatováno, že velikost jednotlivých denzních kapének dosahovala jen kolem 10 – 12 μm a spíše se

v cytoplasmě hepatocytu vyskytovaly jen drobné lipidové inkluze (obrázky 22E,F, a 23B). Menší osmiofilie těchto kapének nasvědčovala menšímu zastoupení nenasycených mastných kyselin než u LPS/D-GalN skupiny.



Obrázek 22: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na jaterní tkáň – histologie s použitím světelného mikroskopu

A - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, B – skupina vystavená i.p. injekci resveratrolu v dávce 2,3 mg/kg, C- skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 µg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg – zvětšení 40x, D - skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 µg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg – zvětšení 80x, E - skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN – zvětšení 40x, F - skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN – zvětšení 80x



Obrázek 23: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na jaterní tkáň – histologie s použitím elektronového mikroskopu

A- skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 µg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg, B - skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN

6.3 Premedikace kurkuminem na modelu fulminantní hepatitidy navozené kombinací lipopolysacharidu a D-galaktosaminu: in vivo studie na potkaním modelu

6.3.1 Účinek na jaterní funkce

Jaterní funkce byly monitorovány podle plazmatické koncentrace bilirubinu a dvou základních jaterních enzymů – transamináz ALT a AST (Tabulka 4). Statisticky významné zvýšení jaterních transamináz, odrážející těžší hepatocelulární poškození, bylo pozorováno u pozitivní kontroly LPS/D-GalN. Podání samotného kurkuminu (KUR) prakticky nijak neovlivnilo žádný z parametrů. Předléčení kurkuminem však vedlo ve srovnání s pozitivní kontrolou k významnému poklesu koncentrací obou transamináz, zatímco koncentrace bilirubinu u této skupiny ještě více stoupla.

MĚŘENÝ MARKER	ALT	AST	BILIRUBIN
<i>jednotky</i>	<i>μcat/l</i>	<i>μcat/l</i>	<i>μmol/l</i>
KONTROLA			
- plazma	27,77±3,02	56,80±4,48	3,68±1,78
LPS/D-GalN			
- plazma	247,31±54,79***	127,87±10,63***	19,38±3,48***
KUR			
- plazma	35,89±4,79	57,90±9,79	4,88±0,82
KUR+LPS/D-GalN			
- plazma	113,05±31,92[#]	63,70±9,39^{###}	36,89±2,97^{###}

Tabulka 4: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na koncentrace ALT, AST a bilirubinu v plazmě

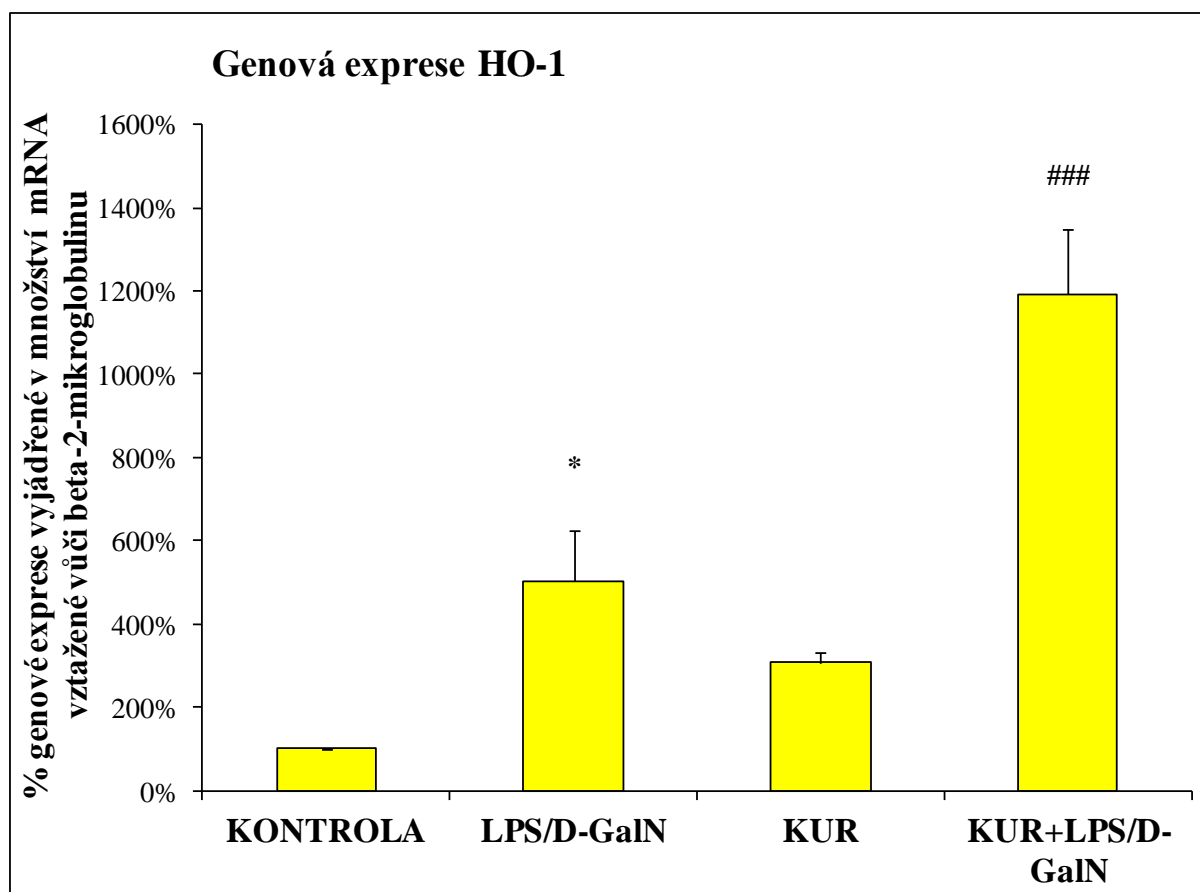
KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, KUR – skupina vystavená i.p. injekci kurkuminu v dávce 100 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 10 μg/kg s D-Galaktosaminem 400 mg/kg, KUR + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí kurkuminu 100 mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$), ### statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,001$), [#] statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,05$); Průměr ± SEM, n = 7.

6.3.2 Účinek na aktivitu HO, expresi HO-1 a celkové tkáňové množství CO

Paradoxní vztah mezi klesajícími plazmatickými koncentracemi transamináz a vzrůstající hladinou celkového bilirubinu nás vedl k zacílení se na jaterní systém HO-1/CO. Byla měřena genová exprese jaterní HO-1, verifikována měřením její reálné aktivity a stanovením celkového množství tkáňového CO. Všechna tři měření potvrdila, že vysoká koncentrace plazmatického bilirubinu není náhodná a že souvisí se zvýšenou aktivitou inducibilní jaterní hemoxygenázy HO-1.

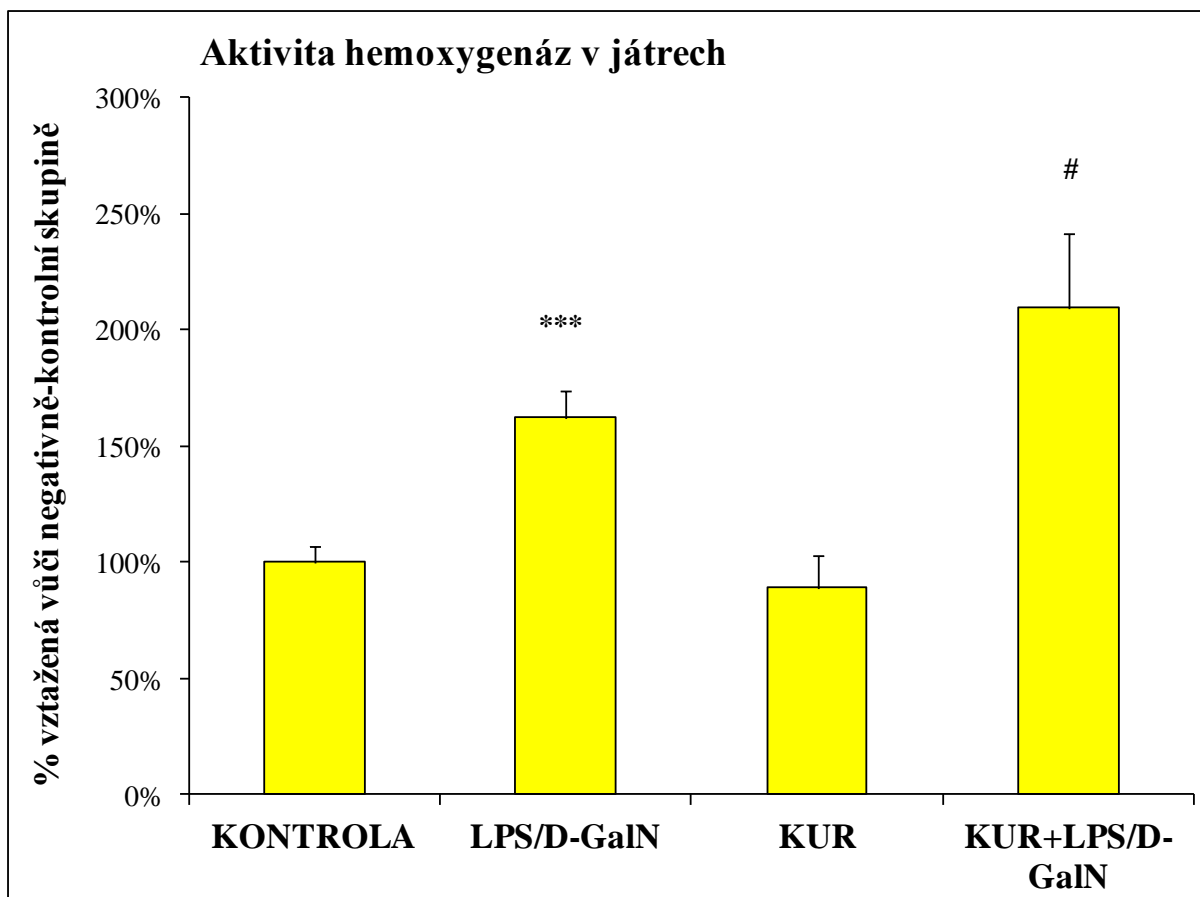
Ve skupině pozitivně-kontrolní (LPS/D-GalN) došlo ke statisticky významnému pětinásobnému zvýšení (Obr. 24) genové exprese HO-1 ($p \leq 0,05$). Ovšem ve skupině s toxickým insultem předléčené kurkuminem došlo dokonce ke 12ti násobnému zvýšení genové exprese HO-1 oproti negativní kontrole ($p < 0.001$, Obr. 24).

Velmi podobný trend, avšak ne tak výrazný, byl pozorován při měření aktivity hemoxygenázy (Obr. 25) v hepatocytech. Tento nálezkoreloval nejen s genovou expresí, ale i s biochemickým nálezem bilirubinu. Překvapivě, tkáňový oxid uhelnatý, další produkt hemoxygenázy, byl statisticky významně 2,5násobně zvýšený u pozitivní kontroly ($p < 0.01$; Obr. 26), ale ne u skupiny předléčené kurkuminem (KUR+LPS/D-GalN). Dalším zajímavým nálezem bylo to, že samotný kurkumin neměl žádný indukční efekt ani na genovou expresi HO-1, ani na tkáňovou aktivitu hemoxygenáz, ani na množství tkáňového CO a ani na koncentraci celkového plazmatického bilirubinu. (Obr. 24–26, Tabulka 4).



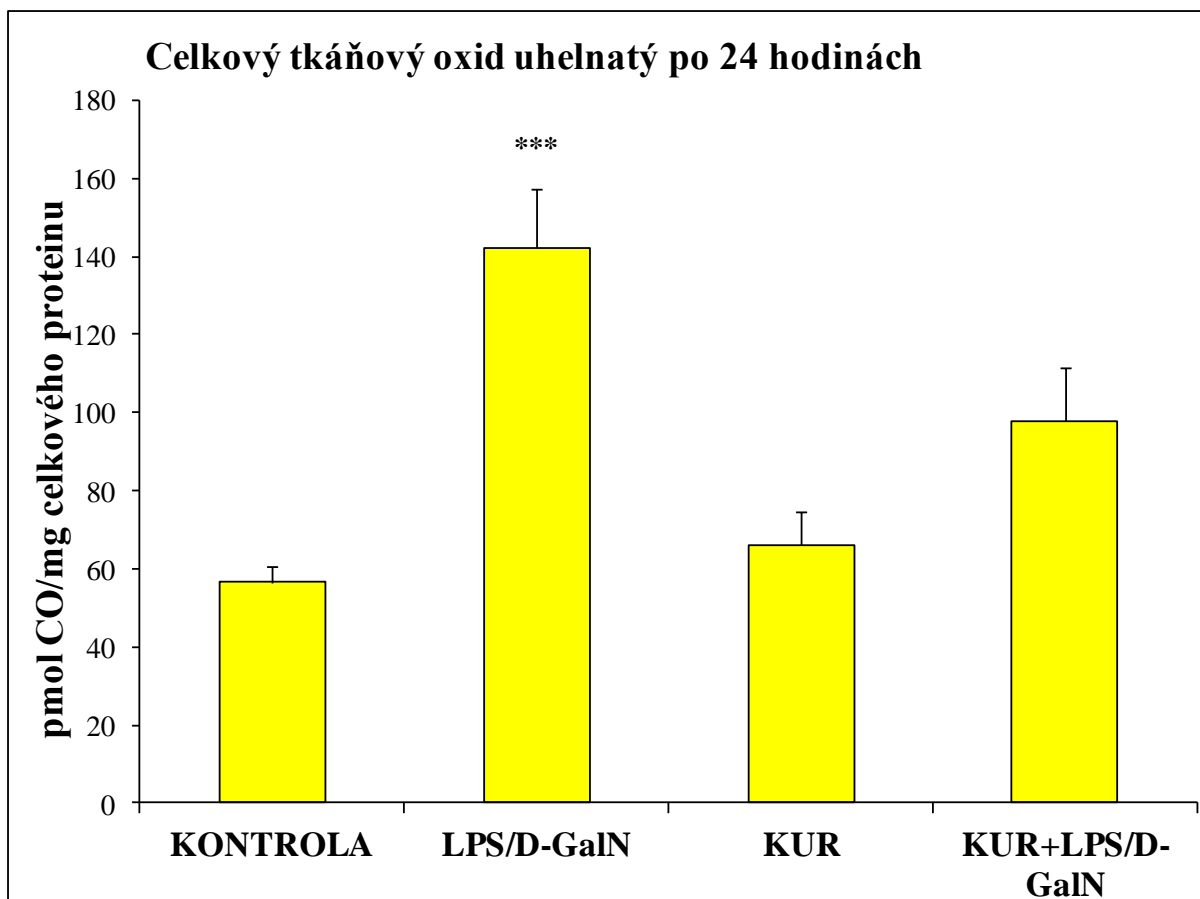
Obrázek 24: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na genovou expresi HO-1

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, KUR – skupina vystavená i.p. injekci kurkuminu v dávce 100 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 10 µg/kg s D-Galaktosaminem 400 mg/kg, KUR + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí kurkuminu 100 mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; *statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,05$), ### statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,001$); Průměr \pm SEM, $n = 7$.



Obrázek 25: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na aktivitu jaterních hemoxygenáz (měřeny aktivity všech hemoxygenáz nespecificky, ale byl předpoklad, že z většiny se jednalo o aktivitu HO-1)

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, KUR – skupina vystavená i.p. injekci kurkuminu v dávce 100 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 10 µg/kg s D-Galaktosaminem 400 mg/kg, KUR + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí kurkuminu 100 mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$), # statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,05$); Průměr \pm SEM, $n = 7$.



Obrázek 26: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na tvorbu oxidu uhelnatého v jaterní tkáni

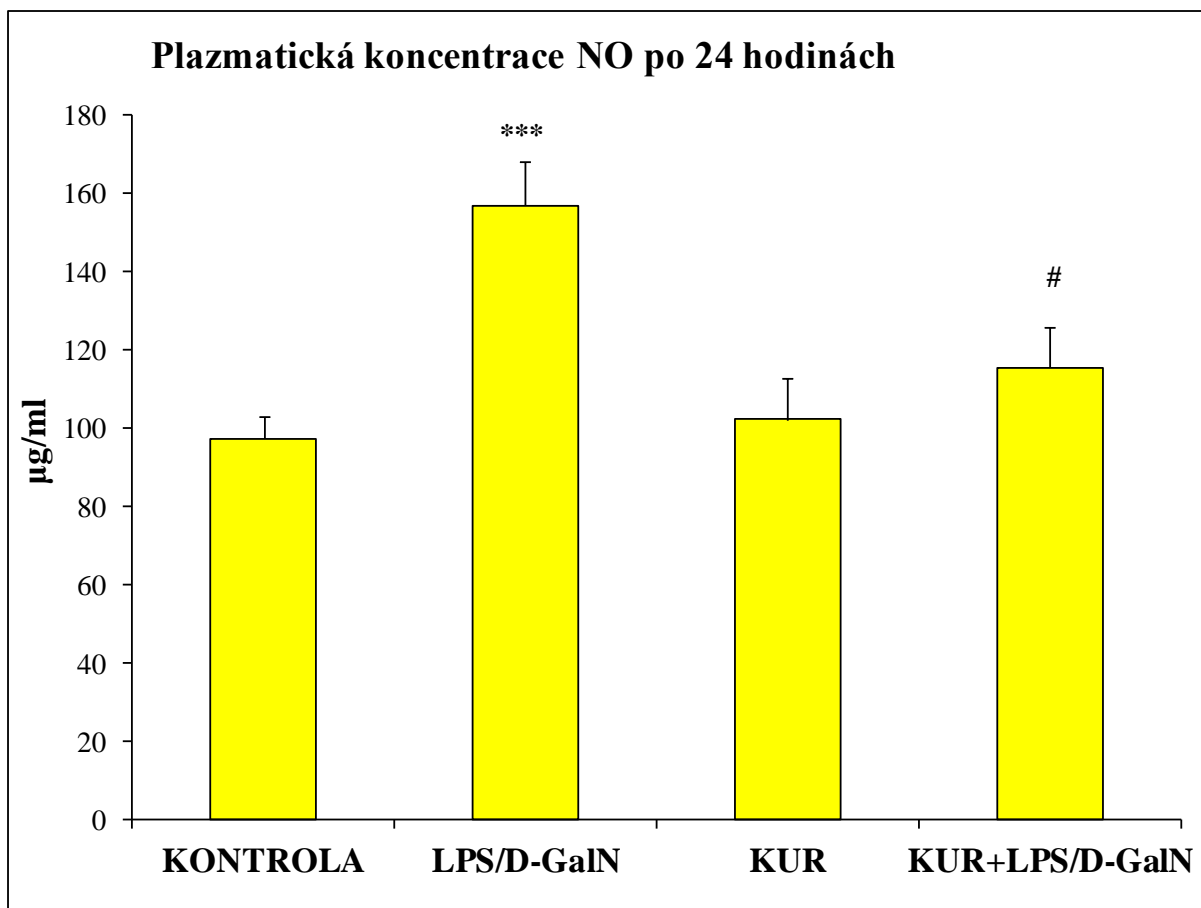
KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, *KUR* – skupina vystavená i.p. injekci kurkuminu v dávce 100 mg/kg, *LPS/D-GalN* skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 10 µg/kg s D-Galaktosaminem 400 mg/kg, *KUR + LPS/D-GalN* skupina předléčená injekcí kurkuminu 100 mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$); Průměr ± SEM, $n = 7$.

Protože oxid uhelnatý (CO) není jenom produktem katabolické dráhy hemu, ale také produktem lipoperoxidace, měřili jsme dále markery lipoperoxidace a oxidativního stresu spolu se systémem NOS-2/NO.

6.3.3 Účinek na lipoperoxidaci, aktivitu enzymů oxidativního stresu a aktivaci NOS-2/NO systému

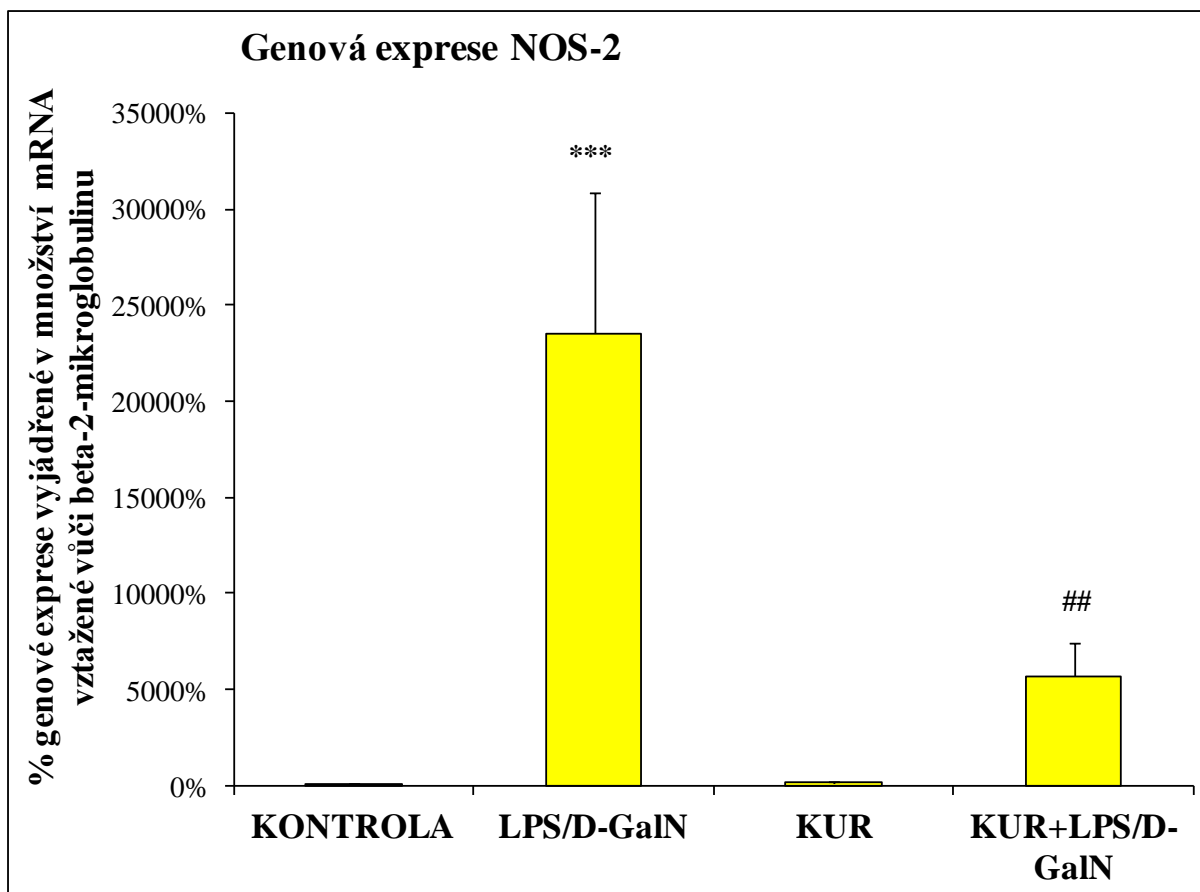
Vzestup lipoperoxidace, na který poukazuje 3,5násobné zvýšení koncentrace konjugovaných dienu oproti negativní kontrole, byl se statistickou významností prokázán u skupiny s kombinací LPS/D-GalN ($p < 0.001$; Tabulka 5). Kurkumin v premedikaci tento vzestup statisticky významně snížil na úroveň 1,6násobku negativní kontroly. Zajímavé bylo, že koncentrace katalázy, hlavního ukazatele oxidačního stavu celého organismu, byla statisticky významně zvýšená (2,4násobek, $p \leq 0,001$) u pozitivní kontroly (LPS/D-GalN) a u skupiny navíc předléčené kurkuminem (3násobek, $p \leq 0,05$) tento trend ještě vzrostl, což bylo podobné situaci u celkového bilirubinu.

Navíc při měření NO (Obr. 27) bylo zjištěno, že ve skupině LPS/D-GalN byla nejvyšší produkce NO ve srovnání s kontrolou. Kurkumin v premedikaci před LPS/D-GalN dokázal tento indukovaný vzestup statisticky významně snížit ($p \leq 0,05$), avšak podán samostatně nijak tvorbu NO neovlivnil. V souladu s těmito výsledky byl i nález genové exprese inducibilní NOS-2 (Obr. 28). U skupiny LPS/D-GalN došlo k 240násobnému zvýšení ($p \leq 0,001$), zatímco podání kurkuminu vedlo k téměř 5násobné redukci exprese ($p \leq 0,01$).



Obrázek 27: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na plazmatické koncentrace NO_2^-

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, KUR – skupina vystavená i.p. injekci kurkuminu v dávce 100 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 10 µg/kg s D-Galaktosaminem 400 mg/kg, KUR + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí kurkuminu 100 mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$), # statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,05$); Průměr \pm SEM, $n = 7$.



Obrázek 28: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na genovou expresi NOS-2

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, KUR – skupina vystavená i.p. injekci kurkuminu v dávce 100 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 10 µg/kg s D-Galaktosaminem 400 mg/kg, KUR + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí kurkuminu 100 mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$), ## statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,01$); Průměr \pm SEM, $n = 7$.

MĚŘENÝ MARKER		CAT	CD
jednotky	plazma	$\mu\text{mol/ml}$	-
	homogenát	-	nmol/mg prot.
KONTROLA			
- plazma		$55,43 \pm 6,45$	-
- homogenát		-	$2,19 \pm 0,37$
LPS/D-GalN			
- plazma		$132,93 \pm 10,20^{***}$	-
- homogenát		-	$7,76 \pm 1,49^{***}$
KUR			
- plazma		$41,22 \pm 3,23$	-
- homogenát		-	$1,77 \pm 0,42$
KUR+LPS/D-GalN			
- plazma		$164,35 \pm 9,11^{\#}$	-
- homogenát		-	$3,43 \pm 0,60^{\#\#}$

Tabulka 5: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na koncentrace katalázy (CAT) v plazmě a konjugovaných dienu (CD) v jaterním homogenátu

KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, KUR – skupina vystavená i.p. injekci kurkuminu v dávce 100 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 10 $\mu\text{g/kg}$ s D-Galaktosaminem 400 mg/kg, KUR + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí kurkuminu 100 mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; ***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,001$), $\#\#$ statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,01$), $\#$ statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,05$); Průměr \pm SEM, $n = 7$.

7 DISKUZE

Léčba akutního fulminantního jaterního poškození vzniklého následkem různých vlivů (ischemicko-reperfuzní příčina, toxická příčina, infekční příčina, cholestatická příčina apod.) zůstává dosud velkým klinickým otazníkem. V současné době nemáme k dispozici klinicky ověřené, farmakologicky účinné a dostatečně univerzální látky v oblasti léčby akutního jaterního poškození různé etiologie. Proto je nezbytné rozvíjet výzkum nových potenciálních látek v této farmakoterapeutické skupině. Výzkum látek vhodných pro léčbu chronických jaterních chorob směřuje celosvětově většinou ke zpomalení či zastavení fibrotizace. V oblasti léčby akutních jaterních poškození se zatím experimentálně zkoušelo ovlivnění několika mechanismů, avšak jednoznačný směr, kterým by se hlavní výzkum ubíral, není.

Existuje řada látek přírodního původu, u kterých se popisují různé biologické či farmakologické vlastnosti. Mechanismus účinku mnoha látek však zůstává velmi často neobjasněn, a pokud jsou tyto látky používané v humánní medicíně, pak často pouze na základě literárních dat a klinické zkušenosti. Epidemiologické studie poukazují i na řadu těchto látek, které běžně užíváme např. v potravě.

V naší výzkumné práci jsme potvrdili na experimentech *in vitro* a *in vivo* cytoprotektivní účinek tří látek přírodního původu – resveratrolu, silymarinu, kurkuminu a zároveň se snažili objasnit jejich mechanismus. Potenciální hepatoprotektivní účinek resveratrolu byl hodnocen ve dvou studiích – *in vitro* a *in vivo*. Ve studii *in vitro* byl navíc tento efekt srovnáván s komparátorem – silymarinem, což je látka standardně používaná v klinické praxi. Dále byl ještě *in vivo* hodnocen potenciální hepatoprotektivní účinek kurkuminu. Výše uvedené výsledky jsou diskutovány v následující stati.

Prvním cílem mé práce bylo experimentálně sledovat vzájemný vztah systémů HO/CO a NOS/NO v prostředí hepatotoxických látek *in vitro* v izolovaných primárních potkaních hepatocytech a *in vivo* na potkaním modelu. Jak již bylo popsáno v kapitole 6.2, u všech tří námi používaných toxicitních modelů jsme našli paralelní statisticky významný indukční efekt na oba námi studované systémy – NOS-2/NO i HO-1/CO.

Pro *in vitro* experimenty jsme vybrali *tert*-butylhydroperoxid (tBH) pro jeho schopnost tvořit stabilní prostředí oxidativního stresu, čímž je možno uměle navodit apoptoticko-nekrotické změny u mnoha typů buněk [119, 120], v našem případě hepatocytů. Výsledkem expozice tBH byl časově závislý vzestup volných peroxyradikálů a buňky

vykazovaly apoptotické změny dokazatelné barvením Annexinem V. V případě tohoto typu poškození šlo o kombinaci volných kyslíkových radikálů i volných nitrosylových radikálů vznikajících z NO, tvořeného *in situ* převážně prozánětlivou inducibilní NOS-2. Zatímco nízké koncentrace oxidu dusnatého, ať už fyziologicky tvořeného či uměle dodaného, mohou být v časných fázích toxického šoku adaptivní odpovědí a vykazovat protektivní vlastnosti [37, 38, 39, 121, 122], při nadprodukcí se NO a od něho derivované radikály stávají mediátory zánětu, spouštěči proapoptotických kaspáz a spouštěči poškození buněčných organel a membrán. Takže NO může mít anti-apoptotické i pro-apoptotické vlastnosti v závislosti na míře své vlastní produkce, typu buňky a typu interakce s buněčnou strukturou [123, 30]. Oxid uhelnatý je, jak již bylo uvedeno výše, velmi významná signální molekula buněčné adaptivní odpovědi. V hepatocytech vzniká převážně katabolismem hemu za vzniku biliverdinu a volného železnatého kationtu. Biliverdin je následně redukován na bilirubin, přičemž oba jsou považovány za jedny z nejvíce antioxidačně působících látek v organismu [124, 125]. V jaterních buňkách je hemoxygenáza ve své konstitutivní podobě nejhojněji zastoupena v Kupfferových buňkách, ale v inducibilní podobě je zastoupena v parenchymatických i neparenchymatických jaterních buňkách. Indukce genové exprese jaterní HO-1 byla popsána *in vitro* a *in vivo* u řady endogenních ale i exogenních látek [15, 18, 19, 20, 126] a její up-regulace je téměř vždy spojena s cytoprotektivními vlastnostmi v buňce, ať už u modelů toxického poškození [127, 128] nebo ischemicko-reperfučního poškození hepatocytů [21]. U myších modelů s knock-outovaným genem pro HO-1 docházelo během života k splenomegáliím, hepatomegáliím, lymfadenopatiím a leukocytóze. U těchto jedinců docházelo k masivní kumulaci železa v játrech a ledvinách, což vedlo ke zvýšenému oxidačnímu stresu v těchto klíčových orgánech, a tito jedinci vykazovali v důsledku jejich následného selhávání vysokou mortalitu v mladém věku [129].

Pro *in vivo* experimenty jsme používali kombinaci LPS s D-GalN v různých poměrech. Tato kombinace vykazovala dostatečně silné, reverzibilní, subletální jaterní poškození, které představovalo podmínky navozené hepatitidou různé etiologie, jak se popisuje v následujících pracích [81, 83, 84, 130, 131]. Hlavní mechanismus toxického účinku u D-GalN je schopnost tvořit vazbu UDP-D-GalN a tím *in vitro* i *in vivo* způsobovat depleci uridindifosfátových nukleotidů, čímž se blokuje syntéza RNA a tím i syntéza většiny klíčových celulárních proteinů [58, 62]. Dalším významným toxickým mechanismem *in vivo* je ovlivnění retikuloendoteliálního systému, v játrech se to týká především Kupfferových buněk. Stimulací Kupfferových buněk pomocí D-GalN dochází k vyšší tvorbě nitrosylových, kyslíkových radikálů a prozánětlivých cytokinů, které následně vyvolávají zánětlivou reakci a

poškozují okolní hepatocyty [59]. Toxický účinek LPS na jaterní tkáň je potom závislý převážně na aktivaci Kupfferových buněk [132]. Ke stimulaci prozánětlivých cytokinů (zejména TNF- α) dochází už v časných fázích po podání, tj. ještě před nastoupením apoptózy, což bylo pozorováno jak *in vivo*, tak *in vitro* v ko-kulturách hepatocytů a Kupfferových buněk, ale ne u hepatocytů pěstovaných v monokultuře [72].

Po podání tBH nebo kterékoliv z námi používaných kombinací LPS/D-GalN došlo v porovnání s genovou expresí u negativní kontrolní skupiny k signifikantní up-regulaci obou studovaných genů – HO-1 a NOS-2, přičemž genová exprese NOS-2 v procentuálním srovnání dominovala nad genovou expresí HO-1. Tento nálezn také velmi úzce koreloval i s nálezy biochemickými: úroveň genové exprese HO-1 odpovídala celkovému bilirubinu, úroveň genové exprese NOS-2 odpovídala koncentraci dusitanů v plazmě. Minoritní příspěvek k celkové měřené koncentraci NO v plazmě mohla mít sice aktivace konstitutivní izoformy NOS-3 v sinusoidálních endoteliálních buňkách [133]. Nicméně, na úrovni měření genové exprese tím, že jsme měřili specificky genovou expresi NOS-2, jsme tuto skutečnost mohli zanedbat. *In vivo* došlo současně ke zvýšení lipoperoxidace v podobě zvýšených koncentrací TBARS a konjugovaných dienu v jaterním homogenátu. A dále byla zaznamenána zvýšená koncentrace antioxidantní plasmatické katalázy. *In vitro* tyto parametry nebyly měřeny.

Různorodý vztah mezi systémy CO/HO-1 a NO/NOS-2 je popisován v několika předchozích pracích [15, 40–44, 134]. Když se však zaměříme na námi nalezenou paralelní aktivaci systémů HO-1/CO a NO/NOS-2, pak lze naše výsledky konfrontovat pouze s několika pracemi [135, 136]. Hyperaktivace NOS-2/NO systému je považována spíše za proapoptotickou a buňky poškozující (spolu s dalšími mediátory zánětu). Naopak aktivace systému HO-1/CO při toxickém šoku má určitý defenzivní účel. Někdy je dokonce vzájemná hyperaktivace nutná pro udržení homeostázy tkáně nebo orgánu [137]. V případě našich experimentů jsme tedy došli k závěru, že aktivace HO-1/CO systému je jednou z defenzivních složek buňky při obraně před toxickým šokem LPS/D-GalN, jehož mechanismus působení je závislý mimo jiné i na hyperaktivaci NOS-2/NO systému. Příkladným vysvětlením toho, že může být jeden systém závislý na druhém, je tvorba nitrosylovaného cyklického nukleotidu 8-nitroguanosin 3',5'-cyklického monofosfátu (8-nitro-cGMP), který je významným induktorem systému HO-1/CO [138]. Navíc, pokud předpokládáme, že se mRNA kódující tyto dva enzymy v průběhu našeho pětihodinového experimentu kumulovala v buňkách se stejnou intenzitou, pak lze usuzovat, že systém NO/NOS-2 byl aktivován časněji. Z toho lze dále předpokládat, že časná hyperaktivace systému NO/NOS-2 mohla být, tak jak se běžně

popisuje v literatuře [42, 43, 132, 139], jedním ze spouštěčů a aktivátorů systému CO/HO-1, který měl při tomto typu toxického poškození defenzivní úlohu.

Druhým cílem mé práce bylo hodnotit cytoprotektivní účinek vybraných látek na poškozené potkaní hepatocyty a zkoumat závislost tohoto efektu na změnách v parametrech cytotoxicity/cytoprotektivity, antioxidantních parametrech, genové expresi mRNA u vybraných genů a na změnách v histologického stavu buněk/tkání/orgánů. V prvních dvou mých publikacích byl hodnocen cytoprotektivní účinek resveratrolu *in vitro* a *in vivo* a v další publikaci pak efekt kurkuminu *in vivo* na výše zmiňovaných toxicitních modelech.

Ve studii *in vitro* byl zkoumán cytoprotektivní účinek resveratrolu na modelu poškození peroxidovými radikály a byl porovnáván s účinkem klinicky používaného silymarinu na témže modelu. V pěti hodinových experimentech na perfuzním bioreaktoru s imobilizovanými primárními hepatocyty byl jednoznačně prokázán signifikantní hepatocytově protektivní vliv resveratrolu v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ stejně jako jeho komparátoru silymarinu v koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$. Toto bylo v souladu i s nálezy, které jsme učinili již dříve v experimentech na jednovrstevných tkáňových kulturách primárních hepatocytů inkubovaných s resveratrolem po dobu 48 hodin. Imunohistochemická analýza, prováděná pouze u resveratrolu, prokázala cytoprotektivní efekt této látky u imobilizovaných hepatocytů navázaných na agarózový gel, které byly v pěti hodinovém experimentu omývány nosným médiem s tBH. Samotný resveratrol vykazoval určitý stabilizační efekt na hepatocyty, jak je detailněji popsáno v kapitole 6.1.3. Nález drobných osmiofilních tukových kapének, které byly častější u těchto hepatocytů patrnější než u kontrolních, mohl souviset s použitým rozpouštědlem (DMSO), ve kterém byl resveratrol rozpuštěn. Resveratrol podaný v preinkubaci snížil počet buněk s apoptoticko-nekrotickými znaky a významně snížil počet poškozených buněk. Co byl ale nejmarkantnější rozdíl, byla architektura cytoskeletu napříč experimentálními skupinami. U tBH skupiny byl cytoskelet zkolabovaný a jeho zbytky lokalizované na kraji cytoplasmy, zatímco u preinkubované skupiny vykazoval cytoskelet srovnatelnou architekturu, jako u negativně-kontrolních buněk nebo buněk inkubovaných se samotným resveratrolem. Lze tedy uzavřít, že resveratrol zabránil destrukci cytoskeletu a působil antiapoptoticky. Antiapoptotické vlastnosti této látky byly již pozorovány i v jiných publikovaných pracích [140, 91]. Stejně jako u resveratrolu, tak i u silymarinu bylo hledáno v literatuře vysvětlení pro jeho cytoprotektivní efekt. Podrobněji o antioxidantních, protizánětlivých a antifibrotických vlastnostech silymarinu píše následující práce [141, 142].

Na základě předchozích výsledků jsme se rozhodli udělat další studii s resveratrolem, tentokrát na *in vivo* potkaním toxicitním modelu. Tento model byl však použit již v řadě dalších experimentálních prací. Bylo vyzkoušeno mnoho různých poměrů mezi D-GalN a LPS. Hlavním cílem bylo navodit hepatocelulární poškození, které by simulovalo různé klinické situace – např. virová hepatitida, poléková hepatocelulární poškození, alkoholické poškození jater, imunologické poškození jater nebo ischemicko-reperfuzní poškození jater [80, 81, 82, 83, 84, 130, 130]. V experimentální studii s resveratrolem jsme se rozhodli používat fixní kombinaci 800mg/kg D-GalN a 0,5 µg/kg LPS. Tato kombinace, popsána též v jiné studii [143], způsobila reverzibilní subletální fulminantní hepatocelulární poškození a jediná i.p. injekce resveratrolu vedla k signifikantnímu zmírnění negativních dopadů této toxické kombinace – hodnoceno na základě koncentrace transamináz, úrovně lipoperoxidace a histologického obrazu. Podrobnější imunohistochemická analýza, prováděná u všech skupin, prokázala cytoprotektivní efekt RES hepatocytů izolovaných z čerstvých biopsií, které byly odebrány po 24hodinovém experimentu z potkanů skupiny RES+LPS/D-GalN. Zatímco aplikace samotného resveratrolu se na změnách mikroskopického obrazu jaterních lalůček výrazněji neprojevila, tak resveratrol podaný v premedikaci k LPS/D-GalN snížil počet buněk s apoptoticko-nekrotickými znaky a snížil i počet poškozených buněk. Velmi zajímavým nálezem byl charakter lipidových inkluzí. Zatímco u skupiny LPS/D-GalN jsme našli dle osmiofilie v lipidových inkluzích vyšší podíl nenasycených MK, tak u skupiny předléčené resveratrolem tento jev popsán nebyl. Byl popsán pouze nález drobných inkluzí a lipidových kapének. Celková velikost inkluzí byla u resveratrolem premedikované skupiny v průměru 1,5násobně menší oproti pozitivní kontrole (LPS/D-GalN). Tento efekt mohl souviset s aktivačním efektem resveratrolu na metabolismus lipidů a aktivitu mitochondrií [144]. V této studii *in vivo* jsme dále našli, že resveratrol v premedikaci statisticky významně snížil úroveň buněčné lipoperoxidace (prokázáno snížením koncentrace TBARS, konjugovaných dienu a nárůstem aktivity plazmatické katalázy).

Velmi zajímavý byl paralelně inhibiční vliv resveratrolu na systémy NOS-2/NO a HO-1/CO, a to jak na úrovni genové exprese, tak na úrovni enzymatické. V obou našich studiích bylo nalezeno statisticky významné snížení aktivity systému NO/NOS-2, což bylo prokázáno jednak snížením produkce NO a dále snížením genové exprese klíčového indukibilního enzymu NOS-2, který se většinou podílí na tvorbě NO v situacích stresové buněčné odpovědi. Jeden z mechanismů hepatoprotektivního účinku resveratrolu je inhibice prozánětlivé indukibilní NOS-2. Toto tvrzení bylo podpořeno staršími i velmi recentními nálezy z literatury [94, 145, 146, 147]. Paradoxně byla tedy také snížena aktivita systému HO-

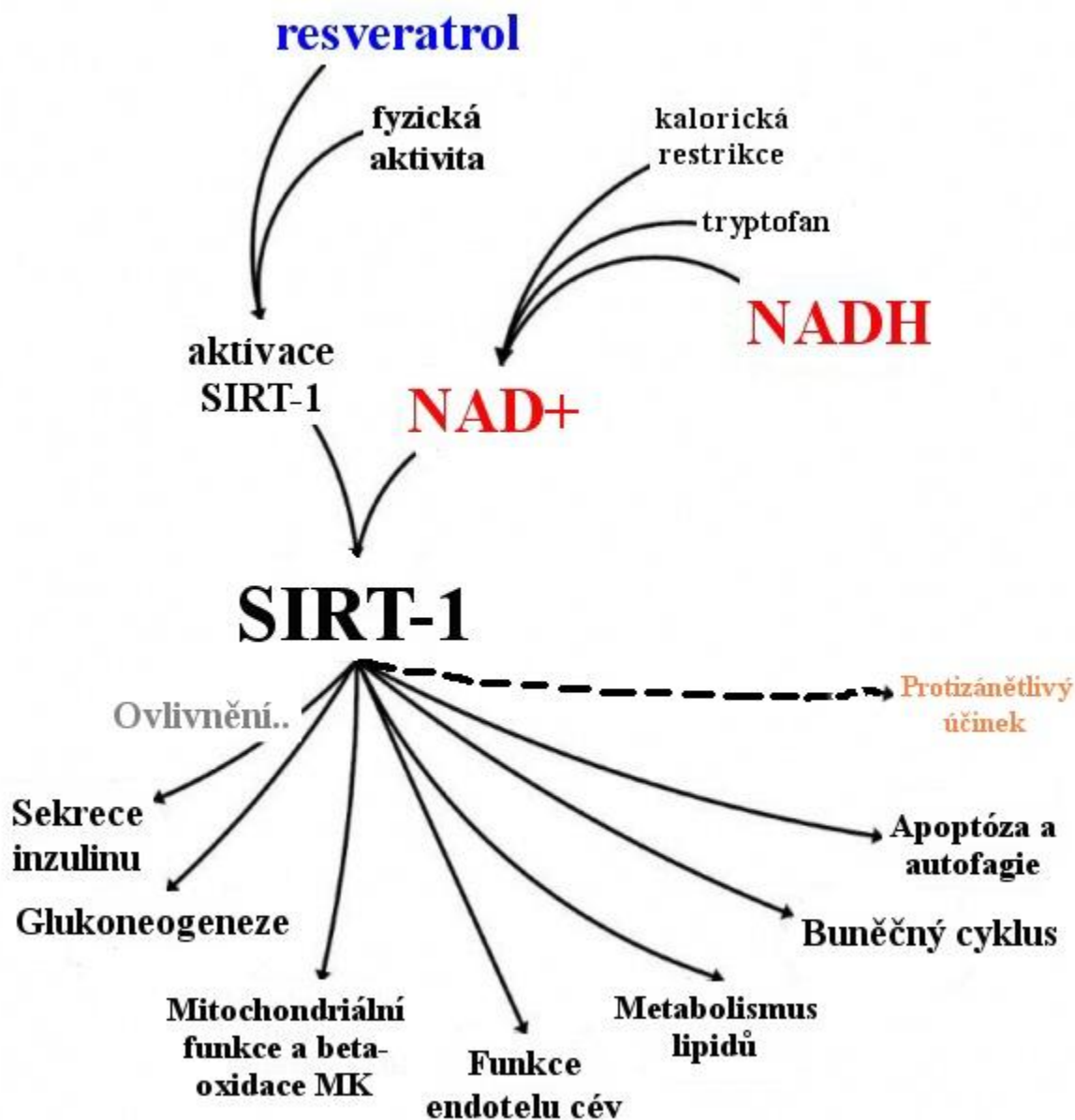
1/CO, což bylo prokázáno down-regulací genové exprese HO-1 a sníženou produkcí CO a/nebo bilirubinu. Důležitým faktem, který je však nezbytné zmínit, je to, že resveratrol vykázal sice signifikantní redukci obou systémů, avšak systém NOS-2/NO byl redukován cca na jednu šedesátinu oproti pozitivní kontrole, zatímco systém HO-1/CO byl redukován na jednu třetinu (*in vitro*) oproti nálezu u příslušné pozitivní kontroly, tj. v mnohonásobně menším měřítku. *In vivo* byla tato disproporce ještě markantnější.

Snažili jsme se vysvětlit tento paradoxní účinek resveratrolu na inhibici HO-1/CO systém srovnáním s daty v literatuře. Jedna práce hovoří o cílené inhibici HO-1 zink-protoporfyrinem, kdy tato inhibice vedla k protektivě při inkubaci s tetrachlormetanem kvůli interferenci s metabolismem tetrachlormetanu přes CYP 450 [148]. Dalším příkladem negativního důsledku hyperaktivace HO-1 je ochrana nádorových buněk u karcinomu žaludku (MKN-45 buněčná linie), kdy vysoká HO-1 chránila tyto buňky před chemoterapií cisplatinou [149]. Nicméně v případě našich experimentů, kdy naměřené nízké hodnoty genové exprese hemoxygenázy-1 byly spojeny s hepatoprotektivními účinky popsány histologicky a biochemicky, nebyl předpoklad ani pro jeden z výše uvedených mechanismů. Jedním z vysvětlujících argumentů mohl být fakt, že resveratrol, podobně jako se vysvětluje mechanismus účinku silymarinu, dokázal stabilizovat hepatocytární membránu pomocí své vazby na thiolické struktury a tím aktivně bránil vstupu toxických látek do cytosolu buněk. Tím celkově zmírnil nutnost aktivace všech defenzivních buněčných mechanismů (např. antioxidačních systémů - redukováného glutathionu či katalázy či superoxiddismutázy), HO-1 nevyjímaje, a zároveň nevyvolal tak masivní prozánětlivou odpověď (viz snížení NOS-2). Tento fakt potvrzuje velmi recentní experimentální práce, která se věnovala interakci resveratrolu s membránovými proteiny [111]. Dalším vysvětlením může být přímo časná podpora resveratrolu výše uvedených defenzivních systémů. Třetím uvažovaným mechanismem může být ovlivnění procesů na plazmatické membráně, např. iontových kanálů, jako tomu např. v případě kardioprotektivního účinku resveratrolu ovlivněním Na⁺/H⁺ iontového kanálu [150]. Existuje řada dalších navrhovaných mechanismů, jakými resveratrol může přispět ke svému cytoprotektivnímu efektu, a které nejsou spojeny s CO/HO-1 a NO/NOS-2 systémy [140, 151–156]. Jeden z dalších z argumentů podporujících fakt, že resveratrol působí jinými mechanismy, vychází z dat publikovaných již dříve naší výzkumnou skupinou. Zjistili jsme a publikovali, že resveratrol a silymarin vykazovaly cytoprotektivní efekt již v pokusech *in vitro* na jednovrstevných tkáňových kulturách, kde jako hepatotoxická látka byl použit D-Galaktosamin. Přitom u D-Galaktosaminové toxicity bylo nalezeno, že NO není rozhodujícím faktorem [157].

Na základě našich výsledků jsme došli k závěru, že cytoprotektivní, antiapoptotické a antinekrotické účinky resveratrolu jsou spojeny se statisticky významným poklesem aktivace enzymů HO-1 a NOS-2, což bylo prokázáno na úrovni genové exprese a částečně i biochemicky. Nicméně tento pokles nelze dát do přímé souvislosti s mechanismem CO/HO-1 a NO/NOS-2, ale souvisí pravděpodobně s aktivací jiných defenzivních mechanismů v hepatocytech. Resveratrolová preinkubace u toxicitního tBH *in vitro* i LPS/D-GalN *in vivo* modelu podpořila natolik defenzivní procesy v hepatocyty, že se musel méně aktivovat prozánětlivý a proapoptotický systém NO/NOS-2, a tudíž zároveň buňky nevykázaly tak silnou defenzivní odpověď v podobě aktivace CO/HO-1 systému. Podobné výsledky přinesla později i další práce, která hodnotila hlavně přežívání myších modelů po aplikaci LPS ve srovnání s těmi, které byly předlčeny resveratrolem [158].

Existuje totiž celá řada mechanismů, kterými resveratrol působí v buňce protektivně, že navenek při toxickém insultu nevykazují tak silnou protizánětlivou a antiapoptotickou odpověď. Tyto mechanismy potom mohou objasňovat skutečnost, proč resveratrolová premedikace má redukční vliv nejen na genovou expresi genů pro HO-1 a NOS-2, ale i na příslušné signální systémy NO a CO. Jedním z primárních cílů resveratrolového působení je právě systém NOS-2/NO, jehož inhibice s sebou přináší řadu pozitivních konsekvencí, které ve výsledku vedou k cytoprotektivě. Protizánětlivé účinky resveratrolu se mimo jiné vysvětlují právě inhibicí indukibilní NOS-2 spojenou s agonizací AMPK receptoru [94]. Díky této inhibici byla i snížena potřeba aktivovat defenzivní systém HO-1/CO.

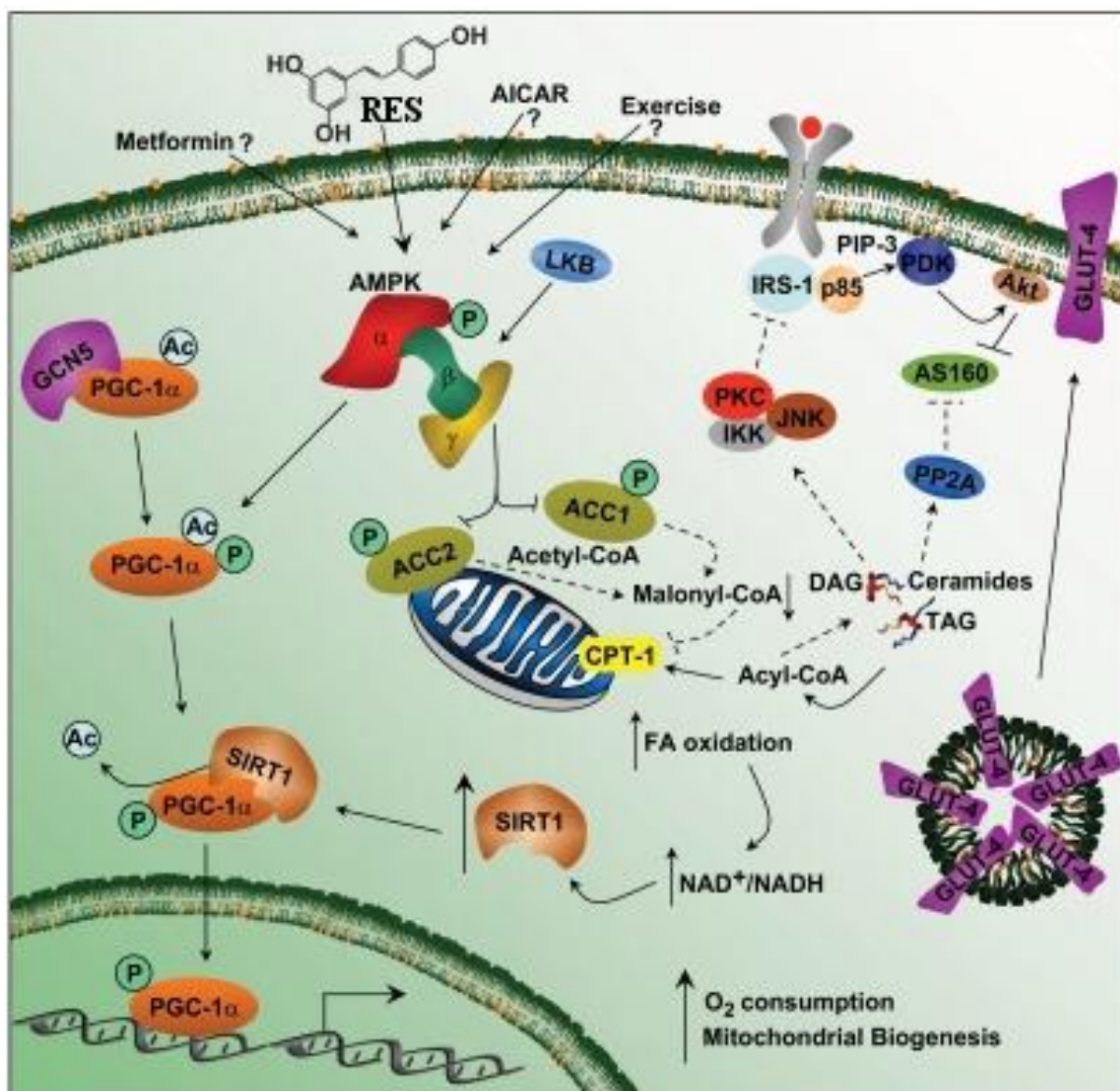
Prvním z nejvýznamnějších mechanismů resveratrolu, který se v současnosti popisuje, je aktivace tzv. sirtuinů, např. sirtuinu 1 (SIRT-1). Sirtuiny (zkratka pochází z anglického Silent Information Regulator Two, podtyp 1) jsou NADH-dependentní enzymy, které působí epigeneticky deacetylací histonů na lyzinových zbytcích v rámci posttranslačních modifikací. Dnes se považují za látky umožňující delší přežívání, které mimo jiné napodobují efekt kalorické restrikce. Resveratrol je proto dnes hodně zkoumán v oblasti léčby metabolického syndromu a jeho komplikací [159, 160]. Schematicky znázorňuje význam sirtuinové aktivace obrázek 29. Není dosud zcela vyjasněno, zda nitrobuněčná aktivace SIRT-1 resveratrolem je zprostředkována přímo nebo přes AMPK (systém AMP-aktivované proteinkinázy), nicméně v hepatocytech oba tyto systémy přispívají mj. k biogenezi nových mitochondrií, ke zlepšení stability mitochondriálních membrán a k zábraně uvolňování proapoptotických signálních molekul z mitochondrií (Bax, Bcl-2) [161]. Schematicky je aktivace SIRT-1 resveratrolem znázorněna na obrázku 30, který však předpokládá aktivaci SIRT-1 pouze přes AMPK [144].



Obrázek 29: Význam vlivu SIRT-1 receptorové aktivace na jednotlivé funkce buňky
 NAD⁺ nikotinadenin dinukleotid-oxidovaná forma, NADH nikotinadenin dinukleotid redukovaná forma

(Převzato a upraveno podle internetového zdroje:

<http://www.lmreview.com/articles/view/resveratrol-niacin-nicotinamide-riboside-key-players-in-activating-sirtuins-to-mimic-calorie-restriction-extend-lifespan-part-ii/>)



Obrázek. 30: Význam aktivace AMPK resveratrolem na aktivaci SIRT-1 a zlepšování inzulinové rezistence. Resveratrol (RES) může působit zvýšení mitochondriální β -oxidace MK, která ve výsledku zvýší přeměnu NAD^+ na $NADH$, což aktivuje SIRT-1 a následně deacetylaci proteinu $PGC-1\alpha$, což má za následek podporu mitochondriální biogeneze (Převzato a upraveno podle [144].)

Vysvětlivky: Ac, acetylace; ACC, acetyl-CA karboxyláza; Akt, protein kináza B; CPT-1, karnitin palmitoyl transferáza; IKK, inhibitor κ kinázy; FA, mastné kyseliny; IRS-1, substrát receptoru pro insulin-1; JNK, Jun NH₂-terminální kináza; GCN5, histon acetyltransferáza GCN5; P, fosfát; PP2A, protein fosfatáza 2A; PDK, 3-fosfoinositid-dependentní kináza; $PGC-1\alpha$ - peroxisomální proliferátorem-aktivovaný receptor- α , PKC, protein kináza C; TAG, triacylglycerol.

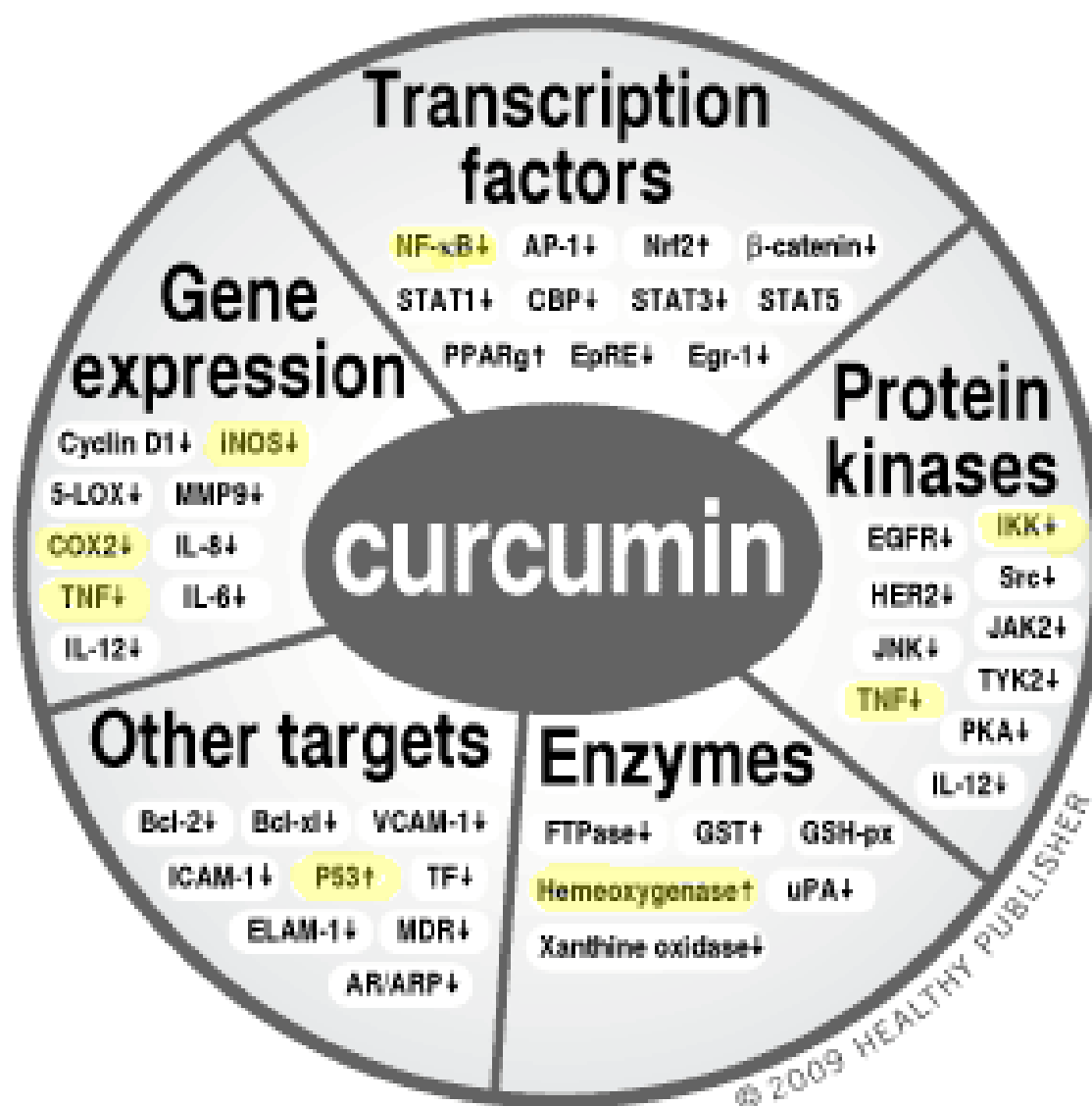
Některé další práce hovoří o velmi těsném vztahu mezi jadernými faktory a syntézou autakoidů. Dalším významným mechanismem resveratrolu, který se pravděpodobně uplatnil i

při našem experimentu, je totiž inhibiční efekt resveratrolu na vybrané dráhy systému jaderného faktoru kappa B (NFκB), které jsou esenciálními prostředníky v prozánětlivé buněčné odpovědi. Tento efekt byl popsán například u buněčných linií C6 mikroglií [162], což může mít potenciální význam při léčbě Alzheimerovy choroby [163]. Jako další příklad lze uvést studii, ve které byl resveratrol v prostředí homocysteinu popsán jako inhibitor těch drah systému NFκB, které jsou v konečném důsledku zodpovědné za expresi bioadhezivních molekul na endotelu, jmenovitě molekuly VCAM-1 [164]. Ovlivnění systémových drah jaderného faktoru kappa B je tedy velmi komplexní a v současné době je aktuálním tématem řady studií ve vztahu právě k hepatoprotektivě [165]. Některé velmi recentní práce hovoří o protizánětlivém efektu resveratrolu závislém, ale i nezávislém na aktivaci SIRT-1, který inhibuje klíčové dráhy systému NFκB, což ve výsledku vede k protizánětlivému účinku [166, 167]. Další velmi recentní práce hovoří o resveratrolu jako velmi silném inhibitoru buněčného proteazómu, což je systém umožňující (buď s pomocí ubiquitinu nebo bez něj) měnit koncentraci jednotlivých enzymů, regulovat průběh buněčného cyklu, regulovat transkripci jednotlivých genů, angažovat se v opravě DNA či v přestavbě chromatinu [168].

Další látkou, jejíž cytoprotektivní vlastnosti jsem v rámci svého studia zkoumal, byl kurkumin. Práce, jejíž výsledky jsou prezentovány v kapitole 6.3, naznačuje mechanismy modulace systémů HO-1/CO a NOS-2/NO, kterými kurkumin působí *in vivo* na potkaním toxicitním modelu jako hepatoprotektivní látka.

Jak již bylo uvedeno výše v kapitole 5.3.3, kurkumin vykazuje na různých *in vitro* a *in vivo* modelech zejména cytoprotektivní, protizánětlivé, antioxidační a antionkogenní vlastnosti, které se zakládají na ovlivnění několika buněčných cílů – viz obrázek 31.

Většina publikovaných prací o kurkuminu se však týká inhibičního ovlivnění prozánětlivých kaskád, zejména ovlivnění inducibilní cyklooxygenázy-2 (COX-2), 5-lipooxygenázy (5-LOX), inducibilní syntázy oxidu dusnatého (iNOS=NOS-2), jaderného faktoru kappa B (NfκB), TNF-α a dalších [169]. Další významnou skupinou buněčných struktur, kterou může kurkumin ovlivňovat jsou proteiny teplotního šoku (Hsp). Bylo publikováno, že aktivace Hsp 70 je spojena s cytoprotektivním efektem [170], inhibice Hsp 90 vede potom k rozvoji antiproliferativních a proapoptotických buněčných procesů [171] a indukce Hsp 32 (=HO-1) je spojena s ochranou buňky před oxidačním stresem [172].



Obrázek 31: Vybrané cíle působení kurkuminu – barevně jsou vyznačeny ty, které byly uvažovány při diskutování výsledků naší práce (Upraveno dle [173].)

Na toxicitním modelu LPS/D-GalN jsme v rámci naší studie prokázali hepatoprotektivní efekt kurkuminu, jenž byl prokázán biochemicky signifikantním poklesem jaterních transamináz (ALT, AST) oproti pozitivně-kontrolní skupině (LPS/D-GalN). Avšak zajímavý byl nález progresu ve zvyšování koncentrace celkového plazmatického bilirubinu ve skupině CUR+LPS/D-GalN oproti LPS/D-GalN. Paradoxní vztah mezi klesajícími plazmatickými koncentracemi transamináz a vzrůstající hladinou celkového bilirubinu nás vedl k zacílení se na jaterní systém HO-1/CO a prokázali jsme, že tento efekt není spojený se závažností jaterního poškození, ale se zvýšenou aktivací systému HO-1/CO. Byla totiž nalezena zvýšená genová exprese jaterní HO-1, verifikována měřením její reálné aktivity a

stanovením celkového množství tkáňového CO. Všechna tři měření potvrdila, že vysoká koncentrace plazmatického bilirubinu není náhodná a že souvisí se zvýšenou aktivitou inducibilní jaterní hemoxygenázy HO-1 v enzymatické podobě v jaterním homogenátu. Na základě literárních dat usuzujeme, že tento jev souvisí s přirozenými vlastnostmi produktů hemoxygenáz – biliverdinu a bilirubinu, které jako silné antioxidanty chrání buňku před poškozením následky oxidativního stresu [125, 174]. Samotný bilirubin bývá v řadě prací dáván do souvislosti s ochranou buněk před lipoperoxidací a to jak v nekonjugované (hydrofobní) podobě v konjugované (hydrofilní) podobě i vázaný na albumin [175]. Tento efekt byl prokázán *in vitro* [176] i *in vivo* [177].

Jak již bylo řečeno v této práci několikrát, oxid uhelnatý (CO) není pouze produkt katabolické dráhy hemu, ale také produkt lipoperoxidace [4, 177]. Měřili jsme proto dále markery lipoperoxidace a oxidativního stresu spolu se systémem NOS-2/NO. Z těchto měření vyplynulo, že podání toxické kombinace LPS/D-GalN vedlo ke statisticky významnému zvýšení lipoperoxidace (demonstrováno vzestupem konjugovaných dienů) a aktivace systému NOS-2/NO nejen na úrovni genové exprese mRNA pro NOS-2, ale i v podobě dusitanů měřených v plazmě i jaterním homogenátu experimentálních zvířat. Premedikace kurkuminem způsobila statisticky významný pokles těchto ukazatelů a navíc byla nalezena zvýšená aktivita plazmatické katalázy odrážející zvýšený antioxidační status experimentálních zvířat. Naše výsledky jsou i v souladu s výsledky několika dalších prací prokazujících protizánětlivé a antioxidační vlastnosti kurkuminu na různých modelech tkáňového a orgánového poškození [178–180]. Náš nálezní antiparalelního vztahu aktivace HO-1/CO a NOS-2/NO systémů *in vivo* koreloval i s nálezem jiné práce, která *in vitro* na makrofágových buněčných liniích vysvětlovala inhibiční efekt kurkuminu na systém NOS-2/NO up-regulací HO-1/CO systém, a která inhibovala klíčové dráhy systému NFκB [181].

Překvapivě, tkáňový oxid uhelnatý, další produkt hemoxygenázy, byl statisticky významně 2,5násobně zvýšený u pozitivní kontroly (LPS/D-GalN), ale ne u skupiny předléčené kurkuminem (KUR+LPS/D-GalN). Tento zajímavý efekt může pomoci vysvětlit právě pokles lipoperoxidace, který byl nalezený u této skupiny navzdory zvýšené aktivitě hemoxygenáz. Jak již bylo řečeno výše, oxid uhelnatý (CO) není jenom produkt katabolické dráhy hemu, ale také produkt lipoperoxidace. Na základě této skutečnosti tedy mohla být výsledná naměřená koncentrace tkáňového CO signifikantně ovlivněna.

Dalším zajímavým nálezem bylo to, že samotný kurkumin, v prostředí bez indukce oxidativního stresu a prozánětlivého jaterního poškození, neměl žádný indukční efekt ani na genovou expresi HO-1, ani na tkáňovou aktivitu hemoxygenáz, ani na množství tkáňového

CO a ani na koncentraci celkového plazmatického bilirubinu. Pro tento náález jsme neměli v naší práci jasnějšího vysvětlení a stejně jako autoři ostatních prací se domníváme, že různé regulační mechanismy kurkuminu mohou být aktivovány v odlišných fyziologických nebo patofyziologických situacích [117, 118].

Lze tedy uzavřít, že hepatoprotektivní účinek kurkuminu na *in vivo* potkaním hepatotoxicitním modelu LPS/D-GalN (poměr 400mg/kg a 10 µg/kg i.p.), je spojený s další up-regulací a indukcí antioxidantního systému HO-1/CO a jeho dalšího produktu bilirubinu. Tento účinek je následován down-regulací a inhibicí systému NOS-2/NO a inhibicí lipoperoxidačních procesů, které vedou ke snížené akumulaci produktů lipoperoxidace v játrech a/nebo plazmě experimentálních zvířat.

Na úplný závěr této diskuze bych chtěl shrnout, že stejně jako ve studii *in vitro*, tak i *in vivo* vykázaly látky resveratrol, silymarin a kurkumin silný hepatoprotektivní efekt při použití proti tBH a LPS/D-GalN stimulované jaterní toxicitě. Tento účinek byl prokázán imunohistochemicky a/nebo biochemicky, byl spojený s inhibičním účinkem na systém NOS-2/NO, který na základě literárních dat můžeme velmi dobře vysvětlit. Nicméně jednotný vliv na systém HO-1/CO z našich experimentů jednoznačně neplyne. Nelze tudíž ani s jistotou prokázat, že hepatoprotektivní účinek resveratrolu je přímo závislý na inhibici/indukci HO-1/CO systému. Můžeme prozatím pouze diskutovat, zda tento systém byl inhibován ve spojení se systémem NOS-2/NO. Budou nutné další studie s použitím inhibitorů a induktorů HO-1 a NOS-2, aby mohly být učiněny jasnější závěry. A je potřeba dalších studií především proto, aby byl dobře prozkoumán hlavní farmakodynamický účinek resveratrolu i kurkuminu v organismu, protože tyto polyfenolické látky skýtají slibný potenciál pro klinické využití. Výzkum těchto látek má smysl i proto, že jsou ve velkém měřítku spotřebovávány lidskou populací v běžných potravinách i potravinových doplňcích.

8 SHRnutí A Závěry

Na preklinické úrovni byl prokázán na základě biochemických, molekulárně-biologických a imunohistochemických metod protektivní vliv resveratrolu, kurkuminu i silymarinu na jaterní funkce.

1) V sérii experimentů na *in vitro* modelu perfuzního bioreaktoru byl studován účinek resveratrolu i silymarinu na systémy NOS-2/NO a HO-1/CO, k čemuž byly současně hodnoceny biochemické parametry a histologie hepatocytů (publikace I.). V této studii byl hepatoprotektivní účinek resveratrolu zkoumán na modelu poškození peroxidovými radikály (*tert*-butylhydroperoxid 1 mmol/l = tBH) a byl porovnáván s účinkem klinicky používaného silymarinu na témže modelu. V pěti hodinových experimentech na perfuzním bioreaktoru s imobilizovanými primárními hepatocyty byl jednoznačně prokázán signifikantní cytoprotektivní vliv resveratrolu v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$, stejně jako jeho komparátoru silymarinu v koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$.

Jako nový a v literatuře dosud nepopsaný byl nálezná paralelní indukce genové exprese pro geny HO-1 a NOS-2 po inkubaci s tBH, přičemž genová exprese NOS-2 v procentuálním srovnání dominovala nad genovou expresí HO-1. Po preinkubaci s cytoprotektivními látkami následoval naopak paralelní pokles aktivity obou těchto enzymů. Z histologického pohledu bylo možno uzavřít, že resveratrol zabránil destrukci cytoskeletu a působil antiapoptoticky.

2) Na základě předchozích výsledků experimentální studie *in vitro*, byl hodnocen účinek resveratrolu (*in vivo* na toxicitním potkaním modelu) na systémy NOS-2/NO a HO-1/CO, přičemž byly současně hodnoceny biochemické parametry, parametry lipoperoxidace, parametry antioxidační kapacity a histologie hepatocytů (publikace II.). V tomto modelu byla použita fixní kombinace dvou látek (800 mg/kg D-GalN a 0,5 $\mu\text{g/kg}$ LPS), která způsobila reverzibilní subletální fulminantní hepatocelulární poškození, prokázané biochemicky i imunohistochemicky. V krátkodobých 24-hodinových experimentech byl prokázán po premedikaci s resveratrolem 2,3 mg/kg signifikantní hepatoprotektivní efekt hodnocený biochemicky i histologicky, přičemž byla pozorována i nižší úroveň lipoperoxidace.

Podobně jako v *in vitro* studii byl popsán paralelní indukční vliv této toxické kombinace na enzymy NOS-2 a HO-1, přičemž genová exprese NOS-2 v procentuálním srovnání dominovala nad genovou expresí HO-1. Po preinkubaci s resveratrolem následoval

paralelní pokles aktivity obou těchto enzymů a z histologického pohledu bylo možno uzavřít, že resveratrol působil antiaponekroticky a bránil akumulaci lipidních inkluzí intracelulárně. Na základě literárních dat můžeme velmi dobře vysvětlit inhibiční efekt této látky na systém NOS-2/NO. Nicméně z našich *in vivo* experimentů nelze jednoznačně prokázat, zda hepatoprotektivní účinek resveratrolu je závislý na inhibici HO-1/CO systému a zda tento systém byl inhibován ve spojení se systémem NOS-2/NO.

3) Další látkou, jejíž cytoprotektivní vlastnosti jsem v rámci svého studia zkoumal, byl kurkumin. V experimentální studii *in vivo*, byl hodnocen účinek kurkuminu 100 mg/kg na toxicitním potkaním modelu na systémy NOS-2/NO a HO-1/CO, přičemž byly současně hodnoceny biochemické parametry, parametry lipoperoxidace, parametry antioxidační kapacity a histologie hepatocytů (publikace III.). V tomto modelu byla použita fixní kombinace dvou látek (400 mg/kg D-GalN a 10 µg/kg LPS), která způsobila reverzibilní subletální fulminantní hepatocelulární poškození, prokázané biochemicky. V krátkodobých 24-hodinových experimentech byl prokázán po premedikaci s kurkuminem signifikantní hepatoprotektivní efekt hodnocený biochemicky, přičemž byla pozorována i nižší úroveň lipoperoxidace.

Inovativním zjištěním bylo, že hepatoprotektivní účinek byl spojený s další up-regulací a indukcí antioxidačního systému HO-1/CO a jeho dalšího produktu bilirubinu. Tento účinek je následován down-regulací a inhibicí systému NOS-2/NO a inhibicí lipoperoxidačních procesů, které vedou ke snížené akumulaci produktů lipoperoxidace v játrech a/nebo plazmě experimentálních zvířat. Mezi systémy NOS-2/NO a HO-1/CO byl tedy po premedikaci kurkuminem pozorován antiparalelní vztah.

9 SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ

1. Wang R; Signal transduction and the gasotransmitters, Humana Press, Totowa 2004, 13.
2. Rodgers PA, Vreman HJ, Dennery PA, Stevenson DK; Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies, *Semin Perinatol* 18: 2–10, 1994.
3. Nishibayashi H, Tomura T, Soto R, Estabrook RW; Structure and Function of Cytochromes, p 658, University Park Press, Baltimore 1968, MD, USA.
4. Vreman HJ, Wong RJ, Sanesi C, Dennery PA, Stephenson DK; Simultaneous production of carbon monoxide and thiobarbituric acid reactive substances in rat tissue preparations by an iron ascorbate system, *Can J Physiol Pharmacol* 76: 1057–1065, 1998.
5. Coburn RF; Enhancement by phenobarbital and diphenylhydantoin of carbon monoxide production in normal man. *N Engl J Med* 283: 512–515, 1997a.
6. Delivoria-Papadopoulos M, Coburn RF, Forster FE; Cyclic variation of rate of carbon monoxide production in normal women, *J Appl Physiol* 36: 49–51, 1974.
7. Archakov AI, Karuzina II, Petushkova NA, Lisitsa AV, Zgoda VG; Production of carbon monoxide by cytochrome P450 during iron-dependent lipid peroxidation. *Toxicol In Vitro* 16: 1–10, 2002.
8. Usami N, Tateoka Y, Watanabe K, Yamamoto I, Yoshimura H; Formation of carbon monoxide during mouse hepatic microsomal oxidative metabolism of cannabidiol; identification and determinativ, *Biol Pharm Bull* 18: 529–535, 1995.
9. Abraham NG, Lin JH, Schwartzman ML, Levere RD, Shibahara S; The physiological significance of heme oxygenase, *Int J Biochem* 20: 543–558, 1988.
10. Tzagoloff A, Wharton DC; Studies on the electron transfer system: LXII. The reaction of cytochrome oxidase with carbon monoxide, *J Biol Chem* 240: 2628, 1965.
11. Coburn RF, Forman HJ; Carbon monoxide toxicity, *Handbook Physiol* 4: 439–456, 1987.
12. Coburn RF; The carbon monoxide body stores, *Ann NY Acad Sci* 174: 11–22, 1970b.
13. Luomanmaki K, Coburn RF; Effects of metabolism and distribution of carbon monoxide on blood and body stores, *Am J Physiol* 217: 354–363, 1969.
14. Ragsdale SW; Life with carbon monoxide, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39: 165– 195, 2004.

15. Zuckerbraun BS, Billiar TR, Otterbein SL, Kim PKM, Liu F, Choi AMK, Bach FH, Otterbein LE; Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1, *J Exp Med* 198: 1707–1716, 2003
16. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G; Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme, *Blood* 100: 879–887, 2002.
17. Ollinger R, Wang H, Yamashita K, et al.; Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation, *Antioxidants & Redox Signaling* 12: 2175–2185, 2007.
18. Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, Goda N, Shinoda Y, Ishimura Y; CO as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion, *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1333–1337, 1994.
19. Bauer M, Bauer I; Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress, *Antioxid Redox Signal* 4: 749–758, 2002.
20. Bakken AF, Thaler MM, Schmid R; Metabolic regulation of heme catabolism and bilirubin production. Hormonal control of hepatic heme oxygenase activity, *J Clin Invest* 51: 530–536, 1972.
21. Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, et al.; Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury, *J Clin Invest* 104: 1631–1639, 1999.
22. Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M; Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation, *J Clin Invest* 101: 604–612, 1998.
23. Shinoda Y, Suematsu M, Wakabayashi Y, Suzuki T, Goda N, Saito S, Yamaguchi T, Ishimura Y; Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes, *Hepatology* 28: 286–295, 1998.
24. Norimizu S, Kudo A, Kajimura M, Ishikawa K, Tanihara H, Yamaguchi T, Fujii K, Arii S, Nimura Y, Suematsu M; Carbon monoxide stimulates mrp2- dependent excretion of bilirubin-IXa into bile in the perfused rat liver, *Antioxid Redox Signal* 5: 449–456, 2003.
25. Lincová D, Farghali H. et al., *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén-Karolinum 2006, p.333-337
26. Beckman JS; The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In Lancaster, T. Jr. (Ed.), *Nitric oxide, principals and actions*. San Diego Academic Press 1996, p. 1–82.
27. Al-Sa'doni H, Ferro A; S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs, *Clinical Science London*, 98(5): 507–20, 2000.

28. Alberts B, et al.; *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York 2002, p. 258–279.
29. Raman CS, Martásek P, Masters BSS; Structural themes determining function in nitric oxide synthases. In KADISH KM, SMITH KM, GUILARD R, (Eds), *Porphyrin handbook*, London Academic Press 2000, p. 293–339.
30. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM; Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun* 282(5): 1075–79, 2001.
31. Ilan E, Tirosh O, Madar Z; Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes, *J Nutr* 135(9): 2090–95, 2005.
32. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA; Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620–1624, 1990.
33. Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, Authier S; Nitric oxide, cell signaling and cell death, *Toxicology* 208: 177–192, 2006.
34. Lygidakis NJ, Pearl A; Metastatic liver disease - A review, *Hep-Gastroent* 44: 1484–1487, 1997.
35. Kalimi M; Glucocorticoid receptors - From Development To Aging - A Review, *Mechanisms of Ageing and Development* 24 : 129–138, 1984.
36. Gaskill CL, Miller LM, Mattoon JS, et al.; Liver histopathology and liver and serum alanine aminotransferase and alkaline phosphatase activities in epileptic dogs receiving phenobarbital, *Veterinary Pathology* 42: 147–160, 2005.
37. Kim PKM, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR; The regulatory role of nitric oxide in apoptosis, *Int Immunopharmacol*, 1: 1421–1441, 2001.
38. Kishikawa H, Sakamoto A, Ogawa R; Nitric oxide suppresses hepatocyte apoptosis induced by free radicals, *Biomed Res* 22: 83–89, 2001.
39. Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK; Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: 1996–2003, 2002.
40. Cao L, Blute TA, Eldred WD; Localization of heme oxygenase-2 and modulation of cGMP levels by carbon monoxide and/or nitric oxide in the retina, *Vis Neurosci* 17: 319–329, 2000.
41. Johnson FK, Durante W, Peyton KJ, Johnson RA; Heme oxygenase inhibitor restores arteriolar nitric oxide function in Dahl rats, *Hypertension* 41: 149–155, 2003.

42. Ding Y, McCoubrey WK, Maines MD; Interaction of heme oxygenase-2 with nitric oxide donors. Is the oxygenase an intracellular 'sink' for NO?, *Eur J Biochem* 264: 854–861, 1999.
43. Alcaraz MJ, Habib A, Creminon C, Vicente AM, Leuret M, Levy-Toledano S, Maclouf J; Heme oxygenase-1 induction by nitric oxide in RAW 264. macrophages is upregulated by a cyclo-oxygenase-2 inhibitor, *Biochim Biophys Acta* 1526: 13–16, 2001.
44. Kaide JI, Zhang F, Wei Y, Jiang H, Yu C, Wang WH, Balazy M, Abraham NG, Nasjletti A; Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors, *J Clin Invest* 107: 1163–1171, 2001.
45. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A; Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR, *Biotechniques* 37: 112–14, 116, 118–19, 2004.
46. Bustin SA; Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences, *Expert Rev Molec Diagnostics*, 5: 493–498, 2005.
47. Vreman HJ, Stevenson DK; Detection of heme oxygenase activity by measurement of CO, *Current Protocols in Toxicology*, New York 1999, pp. 9.2.1–9.2.10
48. Vitek L; Bilirubin a interní choroby, význam pro kliniku a praxi, Grada Publishing, Praha 2009, ISBN: 978-80-247-2351-8.
49. Schneiderka P, et al.; Kapitoly z klinické biochemie, 2. vydání, Praha, Karolinum 2004, ISBN 80-246-0678-X.
50. Yokode M, Kita T, Kikawa Y; Stimulated arachidonate metabolism during foam cell transformation of mouse peritoneal macrophages with oxidized low density lipoprotein, *J Clin Invest* 81: 720–729, 1988.
51. Ward PJ, Pill GO, Hatherill JR; Systemic complement activation, lung injury and products of lipid peroxidation, *J Clin Invest* 76: 517–527, 1985.
52. Aebi H; Catalase *in vitro*, *Methods Enzymol* 105: 121–126, 1984.
53. Sedlak J, Lindsay RH; Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Analyt Biochem* 25: 192–205, 1968.
54. Farghali H, Kamenikova L, Martinek J, Lincova D, Hynie S; Preparation of functionally active immobilized and perfused mammalian cells - an example of hepatocyte bioreactor, *Physiol Res* 43: 121–125, 1994.
55. Farghali H, Berry MN, Edwards AM; Perfused immobilized hepatocytes for metabolic studies, *Hepatocyte Review*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2000.

56. Freudenberg MA, Galanos C; Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine-treated mice, *Infect Immun* 59(6): 2110–15, 1991.
57. Gujral JS, Farhood A, Jaeschke H; Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats, *Toxicol Appl Pharmacol* 190(1): 37–46, 2003.
58. Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B, Bradham CA, Rusyn I, Germolec D, Thurman RG; Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells., *Hepatology* 29(3): 737–45, 1999.
59. Abou-Elella AM, Siendones E, Padillo J, Montero JL, De la Mata M, Muntane Relat J; Tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide mediate apoptosis by D-galactosamine in a primary culture of rat hepatocytes: exacerbation of cell death by cocultured Kupffer cells, *Can J Gastroenterol* 16(11): 791–99, 2002.
60. Siendones E, Jimenez-Gomez Y, Montero JL, Gomez-Diaz C, Villalba JM, Muntane J; PGE1 abolishes the mitochondrial-independent cell death pathway induced by D-galactosamine in primary culture of rat hepatocytes, *J Gastroenterol Hepatol* 20(1): 108–16, 2005.
61. Rodriguez-Ariza A, Lopez-Sanchez LM, Gonzalez R, Corrales FJ, Lopez P, Bernardos A, Muntane J; Altered protein expression and protein nitration pattern during D-galactosamine- induced cell death in human hepatocytes: a proteomic analysis, *Liver Int* 25(6): 1259–69, 2005.
62. Keppler DO, Pausch J, Decker K; Selective uridine triphosphate deficiency induced by D-galactosamine in liver and reversed by pyrimidine nucleotide precursors. Effect on ribonucleic acid synthesis, *J Biol Chem* 249(1): 211–16, 1974.
63. McMillan JM; Galactosamine decreases nitric oxide formation in cultured rat hepatocytes: lack of involvement in cytotoxicity, *J Biochem Mol Toxicol* 13(3–4): 135–42, 1999a.
64. Meier P, Finch A, Evan G; Apoptosis in development; *Nature* 2000; 407: 796–801, 1999a.
65. Mc Carthy NJ, Smith CA, Williams GT; Apoptosis in the development of the immune system: growth factors clonal selection and Bcl-2, *Cancer Metastasis Rev* 11: 157–78, 1992.
66. Sanchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I; Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates, *J Biol Chem* 271: 7416–22, 1996.

67. Kim CH, Yasumoto K, Suzuki T, Yoshida M; *Tert*-butyl hydroperoxide- induced hemolysis of alpha-tocopherol-decreased erythrocytes from selenium-deficient and selenium-adequate rats, *J Nutr Sci Vitaminol* 34: 481–90, 1988.
68. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ; Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to *t*-butylhydroperoxide, *Biochem J* 307: 99–106, 1995.
69. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ; Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by *t*-BuOOH:NAD(P)H and reactive oxygen species, *Am J Physiol* 272: C1286–94, 1997.
70. Farghali H, Canova NK, Martinek J, et al.; The effect of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha on D-galactosamine-induced apoptosis in rat hepatocyte culture, *ACTA PHARMACOLOGICA SINICA* 27: 356–356, 2006.
71. Kuwabara T, Imajoh-Ohmi S; LPS-induced apoptosis is dependent upon mitochondrial dysfunction, *Apoptosis* 9(4): 467–74, 2004.
72. Hamada E, Nishida T, Uchiyama Y, Nakamura J, Isahara K, Kazuo H, Huang TP, Momoi T, Ito T, Matsuda H; Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin, *J Hepatol* 30(5): 807–18, 1999.
73. Yao Y, Zhang D, Luo Y, Zhang D, Huang A, Zhou W, Ren H; Fas ligand expression and apoptosis in primary rat hepatocytes induced by lipopolysaccharide, *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 8(5): 285–87, 2000.
74. Taylor BS, Liu S, Villavicencio RT, Ganster RW, Geller DA; The role of protein phosphatases in the expression of inducible nitric oxide synthase in the rat hepatocyte, *Hepatology* 29(4): 1199–207, 1999.
75. Heyninck K, Wullaert A, Beyaert R; Nuclear factor-kappa B plays a central role in tumour necrosis factor-mediated liver damage, *Biochem Pharmacol* 66(8): 1409–15, 2003.
76. Schoemaker MH, Gommans WM, Conde de la Rosa L, Homan M, Klok P, Trautwein C, van Goor H, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL, Moshage H; Resistance of rat hepatocytes against bile acid-induced apoptosis in cholestatic liver injury is due to nuclear factor-kappa B activation, *J Hepatol* 39(2): 153–61, 2003.
77. Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Gutierrez B, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J; Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes, *Biochem Pharmacol* 66(3): 439–45, 2003.

78. Kumar A, Takada Y, Boriak AM, Aggarwal BB; Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease, *J Mol Med* 82(7): 434–48, 2004.
79. Liao CH, Sang S, Liang YC, Ho CT, Lin JK; Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in downregulating nuclear factor-kappa B pathway by Garcinol, *Mol Carcinog* 41(3): 140–49, 2004.
80. Liu LM, Zhang JX, Luo J, Guo HX, Deng H, Chen JY, Sun SL; A role of cell apoptosis in lipopolysaccharide (LPS)-induced nonlethal liver injury in D-Galactosamine (D-GalN)-sensitized rats, *Digest Dis Sci* 53: 1316–1324, 2008.
81. Morikawa A, Kato Y, Sugiyama T, Koide N, Chakravorty D, Yoshida T, Yokochi T; Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced hepatic injury in D-Galactosamine-sensitized mice as an experimental endotoxic shock model, *Infect Immun* 67: 1018–1024, 1999.
82. Van Dien M, Takahashi K, Mu MM, Koide N, Sugiyama T, Mori I, Yoshida T, Yokochi T; Protective effect of Wogonin on endotoxin-induced lethal shock in D-Galactosamine-sensitized mice, *Microbiol Immunol* 45: 751–756, 2001.
83. Xiong QB, Hase K, Tezuka Y, Namba T, Kadota S; Acteoside inhibits apoptosis in D-Galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury, *Life Sciences* 65: 421–430, 1999.
84. Freudenberg MA, Keppler D, Galanos C; Requirement For Lipopolysaccharide-Responsive Macrophages in Galactosamine-Induced Sensitization to Endotoxin, *Infection and Immunity* 51: 891–895, 1986.
85. Farghali H, Cerny D, Kamenikova L, Martinek J, Horinek A, Kmonickova E, Zidek Z; Resveratrol attenuates lipopolysaccharide-induced hepatitis in D-galactosamine sensitized rats: Role of nitric oxide synthase 2 and heme oxygenase-1, *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 21: 216–225, 2009.
86. Brůha R, Hepatoprotektiva, *Klin Farmakol Farm* 20: 154–157, 2006.
87. Muriel P, Rivera-Espinoza Y; Beneficial drugs for liver diseases - review, *Journal of Applied Toxicology* 28: 93–103, 2008.
88. Chandrashekar KS, Prasanna KS, Joshi AB; Hepatoprotective activity of the *Leucas lavandulaefolia* on D(+)-galactosamine-induced hepatic injury in rats, *Fitoterapia* 78: 440–442, 2007.
89. Gabbay E, Zigmond E, Pappo O, Hemed N, Rowe M, Zabrecky G, Cohen R, Ilan Y; Antioxidant therapy for chronic hepatitis C after failure of interferon: Results of phase II

- randomized, double-blind placebo controlled clinical trial, *W J Gastroent* 13: 5317–5323, 2007.
90. Saller R, Brignoli RM, Melzer J, et al.; An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin, *Forschende Komplementarmedizin* 15: 9–20, 2008.
 91. Holme AL, Pervaiz S; Resveratrol in cell fate decisions, *J Bioenerg Biomembr* 39: 59–63, 2007.
 92. Hebbar V, Shen GX, Hu R, Kim BR, Chen C, Korytko PJ, Crowell JA, Levine BS, Kong ANT, Toxicogenomics of resveratrol in rat liver, *Life Sciences* 76: 2299–2314, 2005.
 93. Ara C, Kirimlioglu H, Karabulut AB, Coban S, Ay S, Harputluoglu M, Kirimlioglu V, Yilmaz S; Protective effect of resveratrol against oxidative stress in cholestasis, *J Surgical Res* 127: 112–117, 2005.
 94. Centeno-Baez C, Dallaire P, Marette A; Resveratrol inhibition of inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle involves AMPK but not SIRT1, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: 922–30, 2011.
 95. Yang H, Lee MK, Kim YC; Protective activities of stilbene glycosides from Acer mono leaves against H₂O₂-induced oxidative damage in primary cultured rat hepatocytes, *J Agr Food Chem* 53: 4182–4186, 2005.
 96. Wu SL, Pan CE, Yu L, Meng KW; Immunosuppression by combined use of cyclosporine and resveratrol in a rat liver transplantation model, *Transplant Proceed* 37: 2354–2359, 2005.
 97. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP; Curcumin: the story so far, *Eur J Cancer* 41: 1955–68, 2005.
 98. Rao CV; Regulation of COX and LOX by curcumin, *Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease* 595: 213–226, 2007.
 99. Mukhopadhyay A, Basu N, Ghatak N, Gujral PK; Antiinflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats, *Agents Actions* 12: 508–15, 1982.
 100. Reddy AC, Lokesh BR; Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron induced lipid peroxidation in the rat liver, *Food Chem Toxicol* 32: 279–83, 1994.
 101. Marin YE, Wall BA, Wang S, et al.; Curcumin downregulates the constitutive activity of NF- κ B and induces apoptosis in novel mouse melanoma cells, *Melanoma Research* 17: 274–283, 2007.
 102. Wongcharoen W, Phrommintikul A; The protective role of curcumin in cardiovascular diseases, *Int J Cardiol* 133: 145–51, 2009.

103. Swamy MV, Citineni B, Patlolla JMR, Mohammed A, Zhang YT, Rao CV; Prevention and treatment of pancreatic cancer by curcumin in combination with omega-3 fatty acids. Symposium on Bioactive Food Components, Alternative Medicine and Cancer Chemoprevention, Crete, Greece 2007, p. 81–89.
104. Mishra VK, Kumar A; Curcumin induced cell death and inhibition of telomerase activity in mouse lymphoma P388D1 cells, *Excli J* 8: 20–29, 2009.
105. Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A; Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways, *Hum Reprod* 24: 1717–25, 2009.
106. Hanai H, Sugimoto K; Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease, *Curr Pharm Des* 15: 2087–94, 2009.
107. Bas M, Tugcu V, Kemahli E, Ozbek E, Uhri M, Altug T, et al.; Curcumin prevents shock-wave lithotripsy-induced renal injury through inhibition of nuclear factor kappa-B and inducible nitric oxide synthase activity in rats, *Urol Res* 37: 159–64, 2009.
108. Rajakrishnan V, Vishwanathan P, Rajasekharan KN, Gunashekar G, Menon VP; Role of curcumin in alcoholic hepatotoxicity., *MedSci Res* 26: 715–19, 1998.
109. Kalpana C, Menon VP; Protective effect of curcumin on circulatory lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity, *Toxicol Mech Methods* 14: 339–43, 2004.
110. Akila G, Rajakrishnan V, Viswanathan P, Rajashekar G, Menon VP; Effects of curcumin on lipid profile and lipid peroxidation status in experimental hepatic fibrosis, *Hepatol Res* 11: 147–57, 1998.
111. Nagase H, Woessner Jr F; Matrix metallo proteinases, *J Biol Chem* 274: 491–94, 1999.
112. Lin CM, Lee JF, Chiang LL, Chen CF, Wang D, Su CL; The protective effect of curcumin on ischemia-reperfusion-induced liver injury, *Transplant Proc* 44(4): 974–77, 2012.
113. Mayanglambam A, Dangelmaier CA, Thomas D, Damodar Reddy C, Daniel JL, Kunapuli SP; Curcumin inhibits GPVI-mediated platelet activation by interfering with the kinase activity of Syk and the subsequent activation of PLCgamma2, *Platelets* 21(3): 211–20, 2010.
114. Holt PR, Katz S, Kirshoff R; Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study, *Dig Dis Sci* 50(11): 2191–93, 2005.

115. Huang HC, Chang P, Dai XL, Jiang ZF; Protective Effects of Curcumin on Amyloid- β -Induced Neuronal Oxidative Damage, *Neurochem Res* 37(7): 1584–97, 2012.
116. Darvesh AS, Carroll RT, Bishayee A, Novotny NA, Geldenhuys WJ, Van der Schyf CJ; Curcumin and neurodegenerative diseases: a perspective, *Expert Opin Investig Drugs*, publikováno online doi:10.1517/13543784.2012.693479, Jun 6: 1–18, 2012.
117. Farombi, EO; Shrotriya, S; Na, HK, et al.; Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1, *Food and Chemical Toxicology* 46: 1279–1287, 2008.
118. McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Garden OJ, Wigmore SJ; Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition, *Int J Mol Med* 19: 165–72, 2007.
119. Cervinkova Z, Lotkova H, Krivakova P, Rousar T, Kucera O, Tichy L, Cervinka M, Drahotka Z; Evaluation of mitochondrial function in isolated rat hepatocytes and mitochondria during oxidative stress, *ALTA* 35: 353–361, 2007.
120. Prasad KD, Ram MS, Sawhney RC, Havazhagan G, Banerjee PK; Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ROS, *Toxicol In Vitro* 21: 846–854, 2007.
121. Liu J, Li CX, Waalkes MP; The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice, *Hepatology* 37: 324–333, 2003.
122. Liu J, Waalkes MP; Nitric oxide and chemically induced hepatotoxicity beneficial effects of the liver selective nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, *Toxicology* 208: 289–297, 2005.
123. Li J, Billiar TR; Nitric Oxide IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver, *Am J Physiol* 276: G1069– 1073, 1999.
124. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH; Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant, *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16093–16098, 2002.
125. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN; Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science* 235: 1043– 1046, 1987.
126. Immenschuh S, Kietzmann T, Hinke V, Wiederhold M, Katz N, Muller-Eberhard U; The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures, *Mol Pharmacol* 53: 483–491, 1998.
127. Kawakami T, Takahashi T, Shimizu H, Nakahira K, Takeuchi M, Katayama H, Yokoyama M, Morita K, Akagi R, Sassa S; Highly liver-specific heme oxygenase-1

- induction by interleukin-11 prevents carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, *Int J Mol Med* 18: 537–46, 2006.
128. Qi H, Chen B, Le XC, Rong J; Concomitant induction of heme oxygenase-1 attenuates the cytotoxicity of arsenic species from lumbricus extract in human liver HepG2 cells, *Chem Biodivers* 9: 739–54, 2012.
129. Duvigneau JC, Piskernik C, Haindl S, Kloesch B, Hartl RT, Huttemann M, Lee I, Ebel T, Moldzio R, Gemeiner M, Redl H, Kozlov AV; A novel endotoxin-induced pathway: upregulation of heme oxygenase 1, accumulation of free iron, and free iron-mediated mitochondrial dysfunction, *Lab Invest* 88: 70–77, 2008.
130. Thorlacius K, Slotta JE, Laschke MW, Wang YS, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H; Protective effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on chemokine expression, leukocyte recruitment, and hepatocellular apoptosis in septic liver injury, *J Leukoc Biol* 79: 923–931, 2006
131. Motobu M, Amer S, Koyama H, Kurosaka YK, Sameshima T, Yamada M, Nakamura K, Koge K, Kang CB, Hayasidani H, Hirota Y; Protective effects of sugar cane extract on endotoxic shock in mice, *Phytother Res* 20: 359–363, 2006
132. Neihorster M, Inoue M, Wendel A; A link between extracellular reactive oxygen and endotoxin-induced release of tumor-necrosis-factor-alpha *in vivo*, *Biochem Pharmacol* 43: 1151–1154, 1992.
133. Gardner CR, Laskin DL; Hepatotoxicity, in: Saura C. Sahu (Ed.), *From Genomics to In Vitro and In Vivo Models*, John Wiley & Sons, Chichester, England 2007, pp. 341–370.
134. Chae HJ, Chin HY, Lee GY, Park HR, Yang SK, Chung HT; Carbon monoxide and nitric oxide protect against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: HO-1 is necessary to mediate the protection, *Clin Chim Acta* 365: 270–278, 2006.
135. Grion N, Repetto EM, Pomeranec Y, Calejman CM, Astort F, Sanchez R, Pignataro OP, Arias P, Cymeryng CB; Induction of nitric oxide synthase and heme oxygenase activities by endotoxin in the rat adrenal cortex: involvement of both signaling systems in the modulation of ACTH-dependent steroid production, *J Endocrinol* 194: 11–20, 2007.
136. Ejima K, Perrella MA; Alteration in heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase-2 gene expression during endotoxemia in cyclooxygenase-2-deficient mice, *Antioxid Redox Signal* 6: 850–57, 2004.

137. Schuett H, Eipel C, Maletzki C, Menger MD, Vollmar B; NO counterbalances HO-1 overexpression-induced acceleration of hepatocyte proliferation in mice, *Lab Invest* 87: 602–612, 2007.
138. Zaki MH, Fujii S, Okamoto T, Islam S, Khan S, Ahmed KA, Sawa T, Akaike T; Cytoprotective function of heme oxygenase 1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis, *J Immunol* 182: 3746–3756, 2009.
139. Hoetzel A, Welle A, Schmidt R, Loop T, Humar M, Ryter SW, Geiger KK, Choi AMK, Pannen BHJ; Nitric oxide-deficiency regulates hepatic heme oxygenase, *Nitric Oxide* 18: 61–69, 2008.
140. Shakibaei M, John T, Seifarth C, Mobasher A; Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes *in vitro*, *Signal Transduct Pathways* 1095: 554–563, 2007.
141. Comelli MC, Mengs U, Schneider C, Prosdocimi M; Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy, *Integr Cancer Ther* 6: 120–129, 2007.
142. Loguercio C, Festi D; Silybin and the liver: from basic research to clinical practice, *World J Gastroenterol* 18: 2288–301, 2011.
143. Aniya Y, Koyama T, Miyagi C, Miyahira M, Inomata C, Kinoshita S, Ichiba T; Free radical scavenging and hepatoprotective actions of the medicinal herb, *Crassocephalum crepidioides* from the Okinawa Islands, *Bio Pharm Bull* 28: 19–23, 2005.
144. Fullerton MD, Steinberg GR; SIRT1 takes a backseat to AMPK in the regulation of insulin sensitivity by resveratrol, *Diabetes* 59: 551–53, 2010.
145. Leiro J, Alvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E, Orallo F; Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes, *Journal of Leukocyte Biology* 75: 1156–1165, 2004.
146. Oktem G, Uysal A, Oral O, Sezer ED, Olukman M, Erol A, Akgur SA, Bilir A; Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cellular damage by modulating nitric oxide and apoptosis, *Exp Toxicol Pathol* 64: 471–79, 2012.
147. Wang SJ, Qian YM, Gong DD, Zhang YY, Fan Y; Resveratrol attenuates acute hypoxic injury in cardiomyocytes: Correlation with inhibition of iNOS-NO signaling pathway, *Eur J Pharm Sci* 44: 416–21, 2011.
148. Eipel C, Eisold M, Schuett H, Vollmar B; Inhibition of heme oxygenase-1 protects against tissue injury in carbon tetrachloride exposed livers, *J Surg Res* 139: 113–20, 2007.

149. Yin Y, Liu Q, Wang B, Chen G, Xu L, Zhou H; Expression and function of heme oxygenase-1 in human gastric cancer, *Exp Biol Med (Maywood)*. 237(4): 362–71, 2012. Použita původní publikace online doi:10.1258/ebm.2011.011193, Apr 4, 2012.
150. Neves AR, Lucio M, Lima JL, Reis S; Resveratrol in medicinal chemistry: a critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions, *Curr Med Chem* 19: 1663–81, 2012.
151. Thuc LC, Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Fukui A, Kume O, Saito S, Nakagawa M, Saikawa T; Inhibition of Na(+) -H(+) exchange as a mechanism of rapid cardioprotection by resveratrol, *Br J Pharmacol* 166: 1745–1755, 2012. Použita původní publikace online doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01877.x, June 27, 2012.
152. Aribal-Kocaturk P, Kavas GO, Buyukkagnici DI; Pretreatment effect of resveratrol on streptozotocin-induced diabetes in rats, *Biol Trace Elem Res* 118: 244–249, 2007.
153. Tsai SK, Hung LM, Fu YT, Cheng H, Nien MW, Liu HY, Zhang FBY, Huang SS; Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats, *J Vasc Surg* 46: 346–353, 2007.
154. Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Otani H, Bagchi D, Das DK, Maulik N; Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase, *Free Radic Biol Med* 43: 720–729, 2007.
155. Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK; Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide and TNF-alpha, *Phytother Res* 21: 278–283, 2007.
156. Shankar S, Siddiqui I, Srivastava RK; Molecular mechanisms of resveratrol (3,4,5-trihydroxy-trans-stilbene) and its interaction with TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in androgen-insensitive prostate cancer cells, *Mol Cell Biochem* 304: 273–285, 2007.
157. Canova NK, Martinek J, Kmonickova E; Modulation of spontaneous and lipopolysaccharide-induced nitric oxide production and apoptosis by Dgalactosamine in rat hepatocyte culture: the significance of combinations of different methods, *Toxicol Mech Methods* 18: 63–74, 2008.
158. Sebai H, Sani M, Ghanem-Boughanmi N, Aouani E; Prevention of lipopolysaccharide-induced mouse lethality by resveratrol, *Food Chem Toxicol* 48: 1543–49, 2010.

159. Suchankova G, Nelson LE, Gerhart-Hines Z, Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ido Y, Puigserver P, Ruderman NB; Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun* 378: 836–841, 2009.
160. Wong YT, Gruber J, Jenner AM, Ng MPE, Ruan R, Tay FEH; Elevation of oxidative-damage biomarkers during aging in F2 hybrid mice: protection by chronic oral intake of resveratrol, *Free Radic Biol Med* 46: 799–809, 2009.
161. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J; Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha, *Cell* 127: 1109–22, 2006.
162. Kim YA, Kim GY, Park KY, Choi YH; Resveratrol inhibits nitric oxide and prostaglandin E-2 production by lipopolysaccharide-activated C6 microglia, *J Med Food* 10: 218–224, 2007.
163. Gan L, Therapeutic Potential of Sirtuin-Activating Compounds in Alzheimer's Disease, *Drug News Perspect* 20: 233, 2007.
164. Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distante A, Storelli C, De Caterina R; Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappa B and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H2344–H2354, 2007.
165. Muriel P; NF-kappa B in liver diseases: a target for drug therapy, *J Appl Toxicol* 29: 91–100, 2009.
166. Lee SI, Min KS, Bae WJ, Y.M. Lee YM, Lee SY, Lee ES, Kim EC; Role of SIRT1 in heat stress- and lipopolysaccharide-induced immune and defense gene expression in human dental pulp cells, *J Endod* 37: 1525–30, 2011.
167. Annabi B, Lord-Dufour S, Vézina A, Béliveau R; Resveratrol Targeting of Carcinogen-Induced Brain Endothelial Cell Inflammation Biomarkers MMP-9 and COX-2 is Sirt1-Independent, *Drug Target Insights* 6: 1–11, 2012.
168. Qureshi AA, Guan XQ, Reis JC, Papasian CJ, Jabre S, Morrison DC, Qureshi N; Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent proteasome inhibitor, *Lipids Health Dis* 11: 76, 2012.
169. Menon VP, Sudheer AR; Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin, *Molecular Targets Therapeutic Uses Curcumin Health Disease* 595: 105–25, 2007.

170. Dunsmore KE, Chen PG, Wong HR; Curcumin, a medicinal herbal compound capable of inducing the heat shock response, *Crit Care Med* 29: 2199–204, 2001.
171. Giommarelli C, Zuco V, Favini E, Pisano C, Dal Piaz F, De Tommasi N, et al.; The enhancement of antiproliferative and proapoptotic activity of HDAC inhibitors by curcumin is mediated by Hsp90 inhibition, *Cell Mol Life Sci* 67: 995–1004, 2010.
172. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ; Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 28: 1303–12, 2000.
173. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M; Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin, *Cancer Lett* 223: 181–90, 2005.
174. Granato A, Gores G, Vilei MT, Tolando R, Ferrareso C, Muraca M; Bilirubin inhibits bile acid induced apoptosis in rat hepatocytes, *Gut* 52: 1774–78, 2003.
175. Stocker R, Glazer AN, Ames BN; Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin, *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5918–22, 1987.
176. Stocker R, Ames BN; Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile, *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8130–34, 1987.
177. Muchova L, Vanova K, Zelenka J, Lenicek M, Petr T, Vejrazka M, et al.; Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress, *J Cell Mol Med*. 15: 1156-65, 2011.
178. Ciftci O, Ozdemir I, Tanyildizi S, Yildiz S, Oguzturk H; Antioxidative effects of curcumin, {beta}-myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver, *Toxicol Ind Health* 27(5): 447–53, 2011.
179. Ali EH, Arafa NM; Comparative protective action of curcumin, memantine and diclofenac against scopolamine-induced memory dysfunction, *Fitoterapia* 82: 601–608, 2011.
180. Yousef MI, Omar SA, El-Guendi MI, Abdelmegid LA; Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat, *Food Chem Toxicol* 48: 3246–61, 2010.
181. Kim KM, Pae HO, Zhung M, Ha HY, Ha YA, Chai KY, et al.; Involvement of anti-inflammatory heme oxygenase-1 in the inhibitory effect of curcumin on the expression of pro-inflammatory inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages, *Biomed Pharmacother* 62: 630–36, 2008.

10 PŘÍLOHA-PUBLIKACE I.-IV.

PUBLIKACE I.

Černý D, Canová N, Martínek J, Hořínek A, Kmoníčková E, Zídek Z, Farghali H

Effects of resveratrol pretreatment on *tert*-butylhydroperoxide induced hepatocyte toxicity in immobilized perfused hepatocytes: Involvement of inducible nitric oxide synthase and hemoxygenase-1

Nitric Oxide Biology and Chemistry 20 (1), 1-8, 2009

PUBLIKACE II.

Farghali H, Černý D, Kameníková L, Martínek J, Hořínek A, Kmoníčková E, Zídek Z

Resveratrol attenuates lipopolysaccharide-induced hepatitis in D-Galactosamine sensitized rats: role of nitric oxide synthase 2 and heme oxygenase-1

Nitric Oxide Biology and Chemistry 21 (3-4), 216-225, 2009

PUBLIKACE III.

Černý D, Lekić N, Váňová K, Muchová L, Hořínek A, Kmoníčková E, Zidek Z, Kameníková L, Farghali H.

Hepatoprotective effect of curcumin in lipopolysaccharide/D-galactosamine model of liver injury in rats: relationship to HO-1/CO antioxidant system

Fitoterapia, 82 (5), 786-791, 2011

PUBLIKACE IV.

Lekić N, Černý D, Hořínek A, Provazník Z, Martínek J, Farghali H.

Differential oxidative stress responses to D-galactosamine-lipopolysaccharide hepatotoxicity based on real time PCR analysis of selected oxidant/antioxidant and apoptotic gene expressions in rat

Physiological Research 60 (3), 549-558, 2011