UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Autoreferát disertační práce

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

PharmDr. Dalibor Černý

Praha, 2012

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: **Farmakologie a toxikologie**

Předseda oborové rady: **Prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc.**

Školicí pracoviště: **Farmakologický ústav 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze**
Albertov 4
128 00 Praha 2

Školitel: **Prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc.**

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Oponenti:

1. **Prof. MUDr. Miloslav Kršiak, DrSc.**

   Ústav farmakologie 3. LF UK v Praze

2. **Prof. MUDr. Libor Vítek, Ph.D., MBA**

   Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Obsah autoreferátu

Seznam použitých zkratek 2
Souhrn 3
Summary 4
1. Úvod 5
2. Hypotézy a cíle práce 7
3. Materiál a metodika 7
4. Použité látky a experimentální modely 11
5. Výsledky 13
6. Diskuze 25
7. Závěry 26
8. Použitá literatura 27
9. Seznam publikací doktoranda 31
Poděkování 32

Seznam použitých zkratek

ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
CAT	kataláza
CD	konjugované dieny
D-GalN	D-galaktosamin
GC-UV	plynová chromatografie s detekcí v oblasti UV
GSH	redukovaný glutathion
α-GST	alfa glutathion-S-transferáza
HO-1	inducibilní forma hemoxygenázy
KUR	kurkumin
LPS	směs lipopolysacharidů získaných z *E.coli*
MDA	malonyldialdehyd
NOS-2	inducibilní forma syntázy oxidu dusnatého
PBS	fosfátový pufr
RES	resveratrol
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SIRT-1	Silent Information Regulator Two – 1. podtyp (histon deacetyláza)
SM	silymarin
tBH	*tert*-butylhydroperoxid
TBARS	látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou – hl. látkou je MDA

Souhrn

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 plynných 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, αGST) 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 hodnocená 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 cvtoprotektivní 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 předléčení (*in vitro a in vivo*) a naopak zvýšení aktivity při kurkuminovém předléčení (*in vivo*). Předléčení kurkuminem a resveratrolem 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 hepatotoxicitních modelech.

Summary

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, αGST 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 imunohistochemically 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 inductors 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.

1. Úvod

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 NO_2. 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.

Endogenní nitrobuněčná produkce těchto molekul a jejich zapojení do transmiterových 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]. Jsou to malé plynné molekuly.

1) 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.
2) Jsou endogenně a enzymaticky tvořeny a jejich tvorba je regulována.
3) Mají dobře definované specifické funkce při fyziologických koncentracích, ale jakékoliv změny v těchto koncentracích vyvolají i změny fyziologie.
4) Jejich endogenní funkce mohou být zamaskovány jiným exogenním působením.
5) Jejich působení v buňce může, ale také nemusí být zprostředkována jinými posly, ale musí mít v buňce vždy specifické molekulárně-biologické cíle.

A. Oxid uhelnatý (CO)

Hlavní intracelulární biosyntetický zdroj oxidu uhelnatého (CO) jsou tři isoformy 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, difenylhydantoin [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 králičích [7] a myších hepatocytárních mikrosomů [8].
Dosud jsou známy tři základní isoformy 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 (Fe^{2+}), biliverdinu a CO.

Indukce hemoxygenázy, hlavní biosyntetické cesty vzniku CO, ať už nějakou endogenní látkou nebo xenobiotikem, je většinou chápána jako příznivý proces pro cytoprotektivní účinek [9]. Existují však také publikace, které tuto skutečnost zpochybňují [10]. 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 down-regulován, nebo naopak jeho hyper-up-regulace 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 defenzivity hepatocytů [11].

B. Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý (NO• 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. Izoformy 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 [12].

Velké množství NO vyvolává cytotoxické účinky (buď přímo nebo cestou peroxynitritových aniontů). Za určitých podmínek je ale paradoxně NO cytoprotektivní látkou [13]. Nízké koncentrace NO totiž mají příznivý efekt na hepatocyty, snižuje se například množství kaspáz [14]. 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 [15]. Shrnuto: NO může mít tedy jak proapoptotický tak antiapoptotický účinek, který závisí na množství jeho produkce, typu buňky a interakcích s ostatními intracelulárními složkami, jako je železo, thioly, proteiny a reaktivní kyslíkové radikály (ROS) [16].

2. Hypotézy a cíle práce

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 plynných 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 [17, 18, 19]. 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 [20], ale i inhibuje [21] např. potlačováním exprese NOS [22]. Z opačného hlediska také NO potencuje aktivitu HO/CO systému [23], ale také inhibuje [24].

3. Materiál a metodika

A. Materiál 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 αGST 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 firny Biocon Diagnostik, Vöhl-Marienhagen Německo.

B. Měření genové exprese HO-1 a NOS-2 pomocí real time PCR

Po odebrání stanoveného množství živých buněk či tkáně a izolování celkové RNA byl realizován přepis celkové RNA do cDNA. Na to byl použit univerzální kit GeneAmp® RNA PCR používající reverzní transkriptázu MuLv (murine leukemia virus), což je RNA-dependentní DNA polymeráza.

Vlastní exprese genů pro HO-1 a NOS-2 byla vyhodnocena z výsledků polymerázové řetězcové reakce s cDNA prováděné v reálném čase (RT-PCR) systémem ABI PRISM 7900. 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 genové expresi [25, 26].

C. Měření biochemických parametrů týkajících se NOS/NO systému

Přímé měření extracelulárního NO_2

Množství iontů NO_2^- – hlavního stabilního produktu po oxidaci NO – v mediu tkáňových kultur nebo bioreaktoru byla po převedení na barevnou diazoniovou sůl měřena spektrofotometricky při 540nm na mikrodestičce. Ionty NO_3^-, které také mohly v průběhu pokusu z NO vznikat, byly před vlastním stanovením převedeny nitrátreduktázou na NO_2^-. K diazotační reakci bylo použito Griessovo činidlo. Hodnoty absorbancí byly porovnávány se standardní kalibrační křivkou $NaNO_2$.

Dle našich zkušeností množství NO_2^- iontů, které vznikly redukcí z NO_3^- nepřesahovalo zpravidla více než 5 %.

D. Měření biochemických parametrů týkajících se HO/CO systému

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.

Aktivita HO byla vyjádřená 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 [27].

Měření bilirubinu/biliverdinu jako vedlejšího produktu 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 [28].

E. Měření biochemických parametrů viability/poškození hepatocytů

Měření ALT

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

Princip metody využívá přirozené vlastnosti tohoto enzymu. Nechá se proběhnout reakce:

$$\text{2-oxoglutarát + L-alanin} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{L-glutamát + pyruvát}$$

Na ní navazuje standardizovaná reakce katalyzovaná laktátdehydrogenázou:

$$\text{pyruvát + NADH + H}^+ \xrightarrow{\text{LD}} \text{L-laktát + NAD}^+$$

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

Měření močoviny

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:

$$\text{urea + } H_2O + 2\ H^+ \xrightarrow{\text{ureáza}} 2\ NH_4^+ + CO_2$$

Na ní navazuje standardizovaná reakce katalyzovaná glutamátdehydrogenázou:

$$2\ NH_4^+ + \text{2 NADH + 2-oxoglutarát} \xrightarrow{\text{GLDH}} H_2O + 2\ NAD^+ + \text{glutamát}$$

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

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.

F. Hodnocení buněčné morfologie hepatocytů

Po promytí buněk studeným PBS a stabilizaci ve 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.

G. Metody měření parametrů lipoperoxidace a antioxidační kapacity

Přímé měření je obtížné vzhledem ke krátkému poločasu volných radikálů. Stanovují se látky vzniklé jejich působením [29]. Používali jsme vybraných několik metod, které jsou popsány detailněji v této kapitole.

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 [30]. Stanovení má svá omezení, neboť reakce není zcela specifická, reagují též jiné látky např. bilirubin nebo volná DNA. Výsledky byly vyjádřeny v jednotkách nmol/ml pro plazmatické vzorky a nmol/mg celkové bílkoviny u homogenátových vzorků.

Stanovení konjugovaných dienů (CD)

Metodika stanovování konjugovaných dienů byla převzata z již dříve publikovaného článku [31]. Princip stanovení spočívá v tom, že konjugované dieny, izolované z jaterního homogenátu nebo plazmy byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce 233nm. Výsledky byly vyjádřeny v nmol/ml (plazmatické vzorky) a nmol/mg celkové bílkoviny.

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 [32]. Množství katalázy bylo vyjádřeno v µmol/ml u plazmatických vzorků a µmol/mg celkové bílkoviny.

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) [33]. Stanovení GSH má svá omezení (vysoká vaznost na albumin a dlouhý poločas). Výsledky byly vyjádřeny v µmol/mg celkové bílkoviny.

H. 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 (léčená/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 1:

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

Tabulka 1: 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.

4. Použité látky a experimentální modely

A. 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±2°C při relativní vlhkosti 50±10 %.

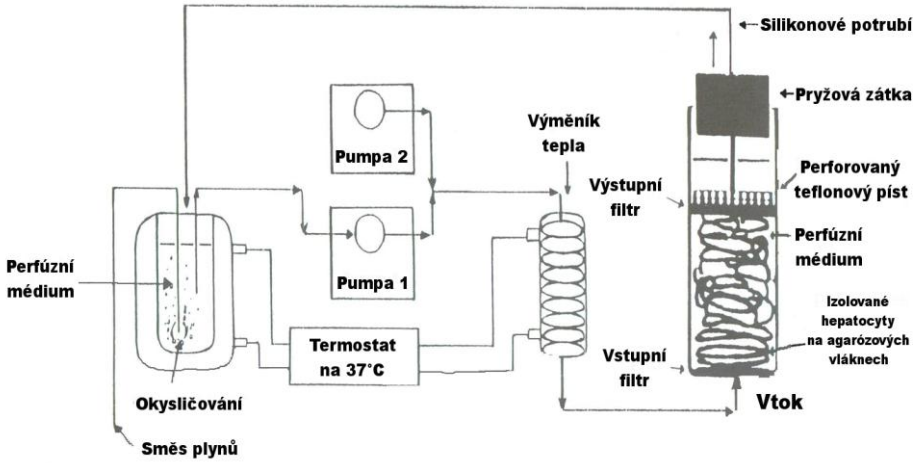
Veškerá péče o zvířata probíhala dle příslušných standardních postupů stejných pro celou 1. lékařskou fakultu Univerzity Karlovy v Praze, schválených Fakultní etickou komisí, a to vždy náležitě kvalifikovaným personálem. O všech pracovních postupech včetně usmrcování zvířat byly vedeny protokoly, které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

B. *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 [34]. Pro následný pokus byla použita vždy jen ta suspenze, jejíž buňky dosahovaly životnosti nad 85 %.

C. *Bioreaktor*

Model hepatocytárního bioreaktoru používaný na našem pracovišti je schematicky znázorněn na obrázku 1 a byl podrobně popsán v samostatné publikaci [35]. Základ bioreaktoru tvoří 1,8%ní roztok agarózy, která je schopná gelace při nízké teplotě cca 35– 39°C a tvoří vlákna, vhodná pro usazení izolovaných hepatocytů.



Obrázek 1: Schéma bioreaktoru

D. *Vybrané hepatotoxicitní 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.

Pro *in vitro* studii na bioreaktoru byl vybrán *tert*-butylhydroperoxid v koncentraci 1 mM v perfuzátu jako model poškození peroxidovými radikály. Ve všech našich pokusech *in vivo* 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. Pro *in vivo* studii s resveratrolem byla vybrána *i.p.* fixní kombinace LPS/D-GalN v poměru 0,5 μg/kg LPS a 800 mg/kg D-GalN a pro *in vivo* studii s kurkuminem byla vybrána fixní kombinace LPS/D-GalN v poměru 10 μg/kg a 400 mg/kg D-GalN.

E. Vybrané látky s protektivními účinky na hepatocyty

V našich studiích jsme používali celkem tři látky – resveratrol, kurkumin a silymarin. Resveratrol *in vitro* v bioreaktoru byl postupně zkoušen v koncentracích 1, 5, 10, 15 a 20 μM. U silymarinu se tamtéž zkoušely koncentrace 50, 100, 250, 500 a 1000 μM. Resveratrol byl podáván *i.p.* v dávce 2,3 mg/kg v *in vivo* studii na potkaním toxicitním modelu LPS/D-GalN v poměru 0,5 μg/kg LPS a 800 mg/kg D-GalN. Kurkumin byl podáván *i.p.* v dávce 100 mg/kg v *in vivo* studii na potkaním toxicitním modelu LPS/D-GalN v poměru 10 μg/kg LPS a 400 mg/kg D-GalN.

5. Výsledky

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

Biochemické výsledky

Po inkubaci primárních hepatocytů s *tert*-butylhydroperoxidem se zvýšilo množství uvolněného ALT na trojnásobek, jak znázorňuje obrázek 2. Samotné předléčení 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 3 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 předléčení resveratrolem samotné i před toxickým šokem dominovalo nad ostatními. U modelů, které byly exponovány tBH byl naznačen pokles v tvorbě močoviny, 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.

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 4 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 nález koreluje i s biochemickým nálezem

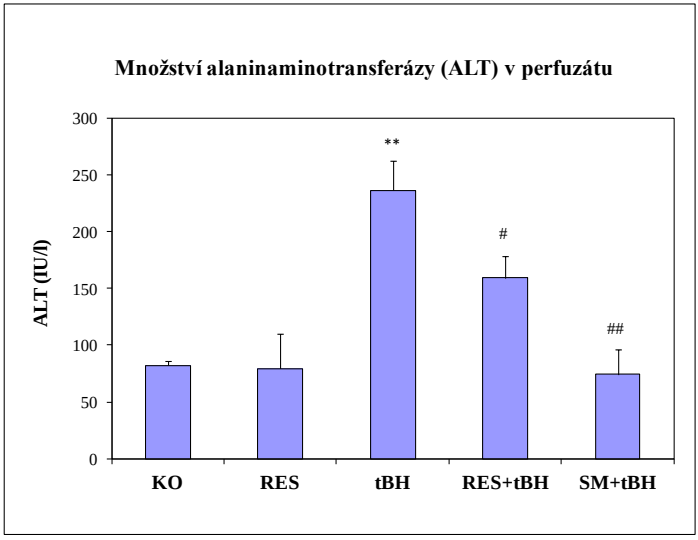
(viz obr. 3). Preinkubace s resveratrolem i silymarinem měla statisticky velmi významný vliv na snížení tBH indukované exprese. Vliv tBH s resveratrolovou a silymarinovou preinkubací na expresi mRNA pro HO-1 je znázorněn na obrázku 6. Samotný tBH zvýšil expresi mRNA tohoto genu zhruba třikrát, zatímco 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.

Histologické nálezy

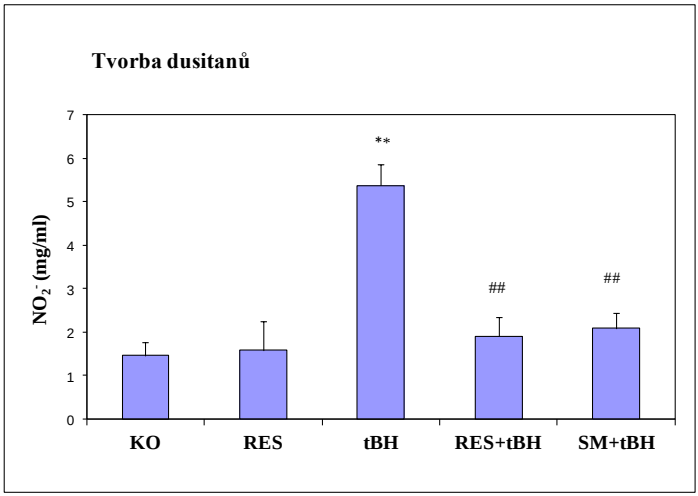
Primární hepatocyty neovlivněné žádnou látkou (obr. 5A), kultivované v bioreaktoru na agarózových vláknech, vykazovaly typické strukturální znaky jako hepatocyty v přirozené struktuře jater. Hepatocyty vystavené resveratrolové inkubaci (obr. 5B) vypadaly velmi podobně jako kontrolní hepatocyty, jejich cytologická struktura vypadala více zachovalá, tudíž byla pod mikroskopem patrnější a výraznější.

Inkubace hepatocytů v prostředí tBH byla spojena se zásadní změnou vnitřní buněčné stavby (obr. 5C). 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.

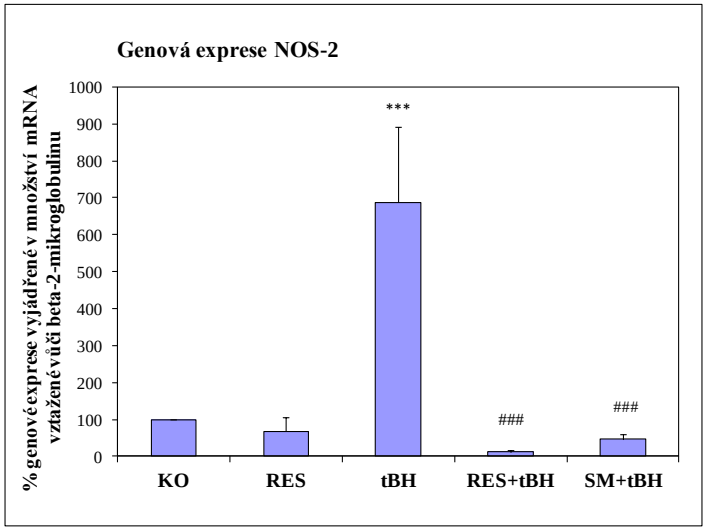
Preinkubace hepatocytů exponovaných vůči tBH resveratrolem (RES) byla charakterizovaná histologicky detekovaným cytoprotektivními účinkem (obr. 5D). U cca 60 % přeživších buněk byly nalezeny identické znaky jako ty, které byly popsány u kontrolních hepatocytů. Všechny pozorované buňky vykazovaly oproti pozitivní kontrole výrazně lépe zachovalou strukturu cytoskeletu.



Obrázek 2: Vliv premedikace resveratrolem a silymarinem na uvolnění ALT do perfuzátu

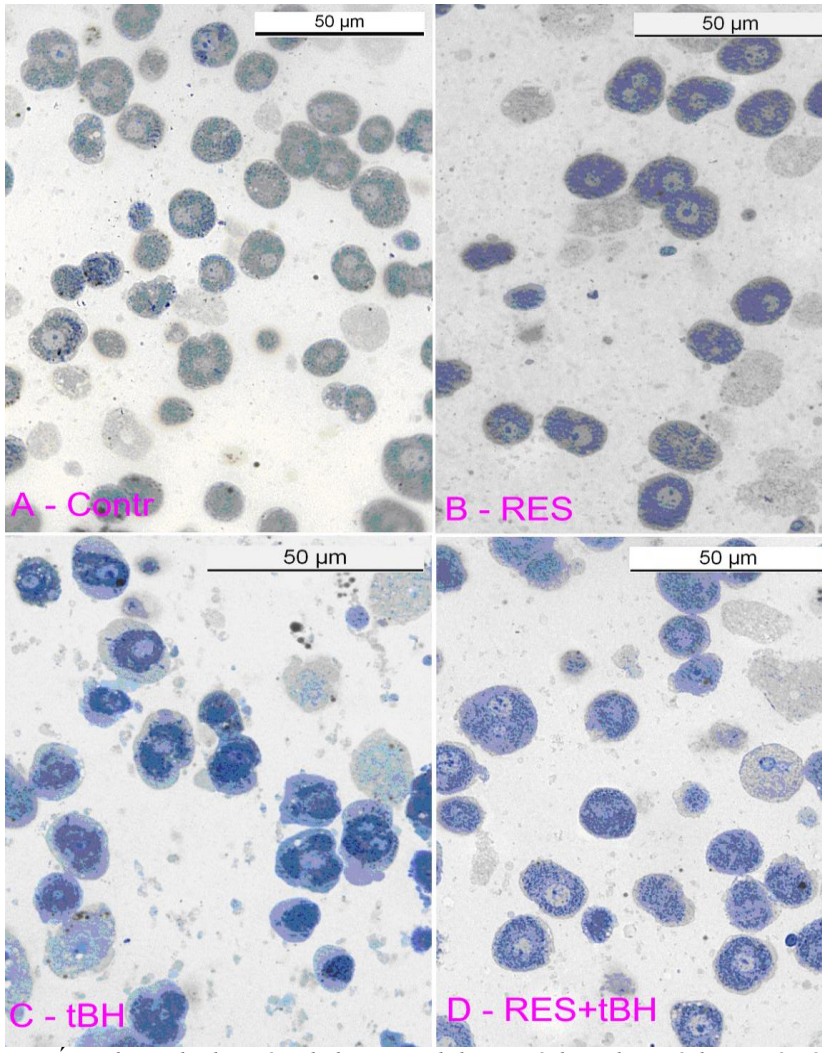


Obrázek 3: Vliv premedikace resveratrolem a silymarinem na tvorbu NO resp. dusitanů

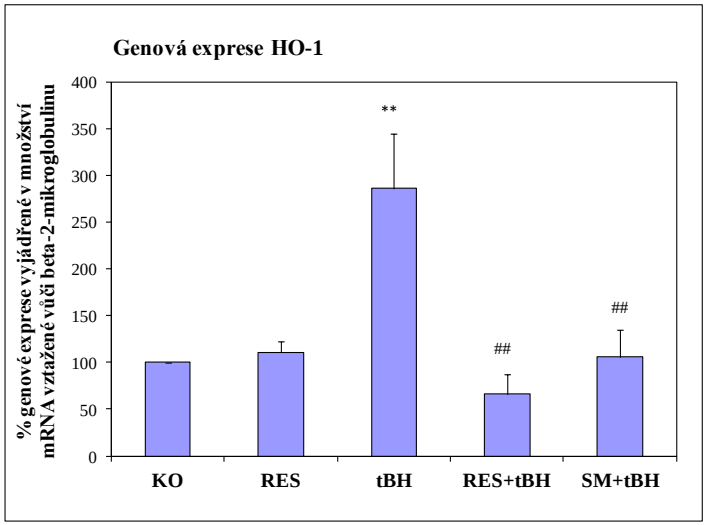


Obrázek 4: Vliv premedikace resveratrolem a silymarinem na expresi genu pro NOS-2

Legenda k obrázkům 2,3,4 a 6 (grafům):
*KO čisté médium – negativní kontrola, RES resveratrol 10 µM, tBH tert-butylhydroperoxid 1 mM – pozitivní kontrola, SM silymarin 500 µM, **,*** statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$), $^{\#,\#\#,\#\#\#}$ statisticky významné vůči tBH ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$); Průměr ± SEM, n = 9-18.*



Obrázek 5: 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 inzultem tert-butylhydroperoxidu a během něj



Obrázek 6: Vliv premedikace resveratrolem a silymarinem na expresi genu pro HO-1

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

Biochemické výsledky

Předléčení intraperitoneálně podaným resveratrolem 2,3 mg/kg před toxickým nárazem statisticky významně snížilo plazmatickou koncentraci ALT (obr.7), AST i α-GST oproti pozitivní kontrole (samotný LPS+D-GalN). 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 (obr. 8). Obrázek 9 znázorňuje dvojnásobné, statisticky významné zvýšení produkce nitrátů v plazmě 24 hodin po aplikaci LPS/D-GalN. Kombinace LPS/D-GalN způsobila zvýšení lipoperoxidace (Tabulka 2), u TBARS došlo ke zvýšení jak u plazmatických tak (se statistickou významností) i u homogenátových vzorků ($p < 0,05$). Při měření konjugovaných dienů byl také zaznamenán zvyšující se trend. Rovněž plasmatická 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 dienů. Zároveň však došlo i ke snížení množství plazmatické katalázy. Předléčení resveratrolem vedlo k signifikantnímu nárůstu plazmatické katalázy a poklesu TBARS a CD ($p<0,05$). Laboratorní vyšetření redukovaného glutathionu neukázalo žádné signifikantní nálezy.

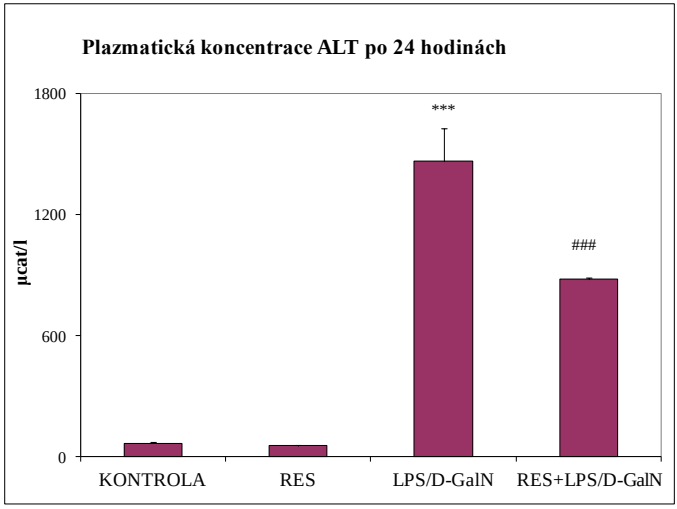
Výsledky real time PCR

Účinek resveratrolového předléčení na genovou expresi mRNA pro geny inducibilních enzymů NOS-2 a HO-1 je znázorněn na obrázkách 10 a 11. Podání

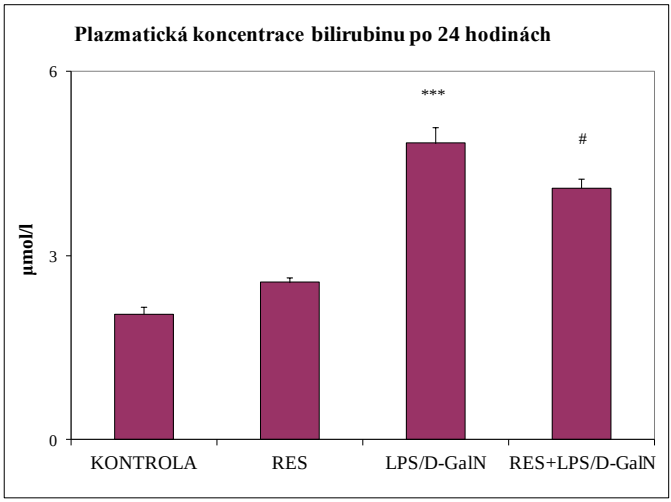
kombinace LPS/D-GalN způsobilo více než stosedmdesátinásobné zvýšení exprese NOS-2 oproti negativní kontrole. Resveratrolové předléčení dokázalo tento indukční efekt výrazně snížit cca o čtyři pětiny. Co se týče exprese HO-1, expozice kombinaci LPS/D-GalN vyvolala trojnásobné zvýšení, zatímco expozice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

Histologické nálezy

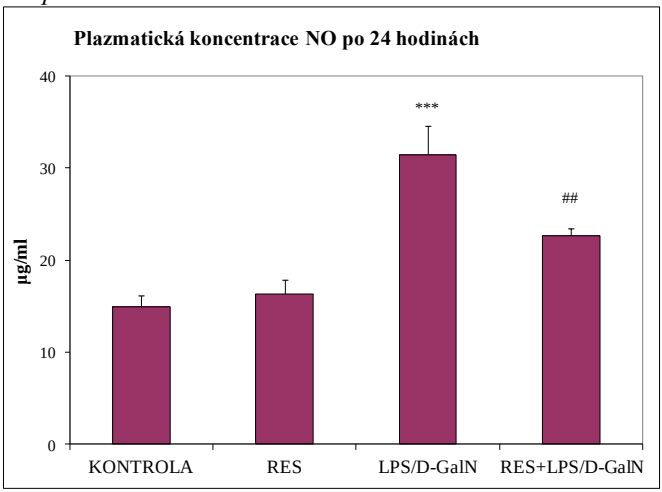
Imunohistochemická analýza (obrázek zobrazen pouze v dizertační práci), prováděná u všech skupin, prokázala cytoprotektivní efekt RES hepatocytů z čerstvých biopsií, které byly odebrány po 24hodinovém experimentu z potkanů skupiny RES+LPS/D-GalN. Zatímco aplikace samotného resveratrolu se na změnách mikroskopického obrazu jaterních lalůčků výrazněji neprojevila, tak resveratrol podán 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 nalezli dle osmiofility 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).



Obrázek 7: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na plazmatické koncentrace ALT



Obrázek 8: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na plazmatické koncentrace celkového bilirubinu



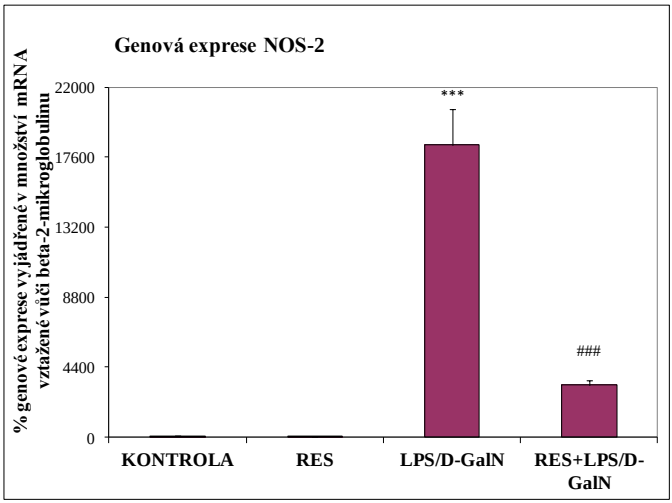
Obrázek 9: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na plazmatické koncentrace NO_2^-

Legenda k obrázkům 7-11 a tabulce 2:

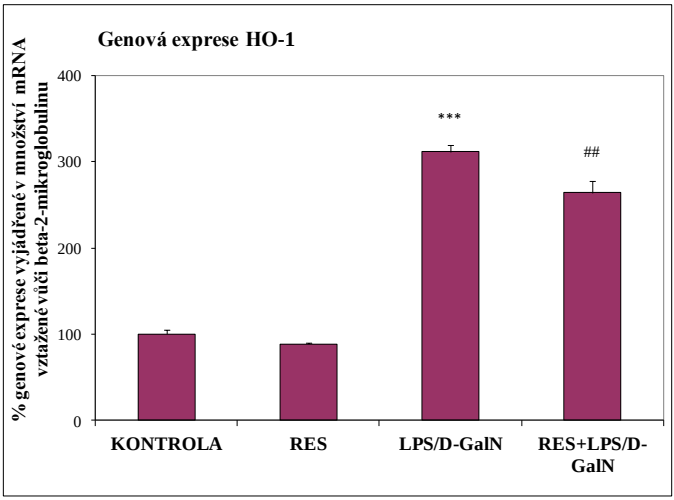
*(KONTROLA - negativní kontrolní skupina léčená fyziologickým roztokem 0,9%NaCl, RES – skupina vystavená i.p. injekci resveratrolu v dávce 2,3 mg/kg, LPS/D-GalN skupina vystavená i.p. injekci lipopolysacharidu 0,5 µg/kg s D-Galaktosaminem 800 mg/kg, RES + LPS/D-GalN skupina předléčená injekcí resveratrolu 2,3mg/kg a následně vystavená i.p. injekci kombinace LPS s D-GalN; *,**,***statisticky významné vůči kontrole ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ a $p \leq 0,001$), $^{\#}$, $^{\#\#}$, $^{\#\#\#}$statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ a $p \leq 0,001$); Průměr ± 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 2: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na koncentrace TBARS (reaktivní substance kyseliny thiobarbiturové), CD (konjugovaných dienů), CAT (katalázy) a GSH (redukovaného glutathionu) v plazmě nebo jaterním homogenátu;



Obrázek 10: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na genovou expresi NOS-2



Obrázek 11.: Vliv resveratrolové premedikace u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na genovou expresi HO-1

C. *Premedikace kurkuminem na modelu fulminantní hepatitidy navozené kombinací lipopolysacharidu a d-galaktosaminu: in vivo studie na potkaním modelu*

Vliv na jaterní funkce

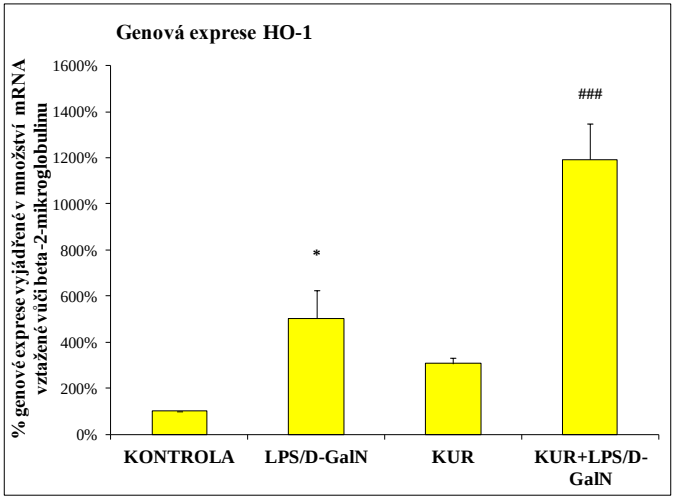
Jaterní funkce byly monitorovány podle plazmatické koncentrace bilirubinu a dvou základních jaterních enzymů – transamináz ALT a AST (Tabulka 3). Statisticky významné zvýšení jaterních transamináz, odrážející těžší hepatocelulární poškození, bylo pozorováno u pozitivní kontroly LPS/D-GalN. Předléčení 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**
jednotky	*µcat/l*	*µcat/l*	*µmol/l*
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 3: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na koncentrace ALT, AST a bilirubinu v plazmě

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

Paradoxní vztah mezi klesajícími plazmatickými koncentracemi transamináz a vzrůstající hladinou celkového bilirubinu (tabulka 3) 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 genové exprese HO-1 ($p \leq 0,05$). Ovšem ve skupině s toxickým inzultem předléčené kurkuminem došlo dokonce ke 12ti násobnému zvýšení genové exprese HO-1 oproti negativní kontrole ($p<0.001$, Obr. 12). Velmi podobný trend, avšak ne tak výrazný, byl pozorován při měření aktivity hemoxygenázy (Obr. 13) v hepatocytech. Tento nález koreloval 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 ($p<0.01$), ale ne u skupiny předléčené kurkuminem (KUR+LPS/D-GalN).

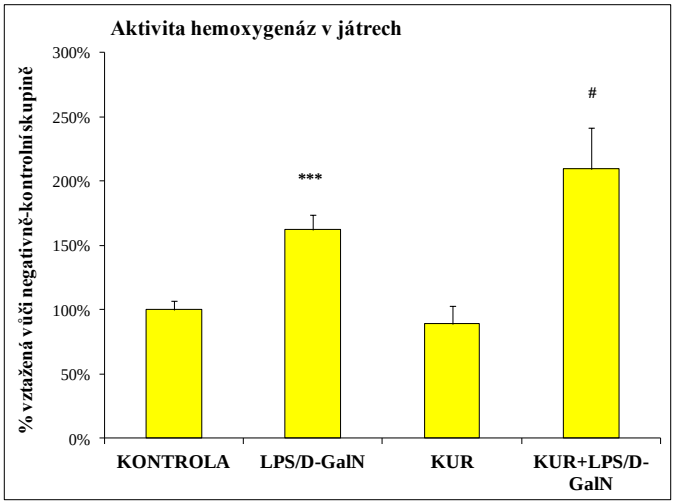


Obrázek 12: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na genovou expresi HO-1

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.

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

Vzestup lipoperoxidace, na který poukazuje 3,5násobné zvýšení koncentrace konjugovaných dienů oproti negativní kontrole, byl se statistickou významností

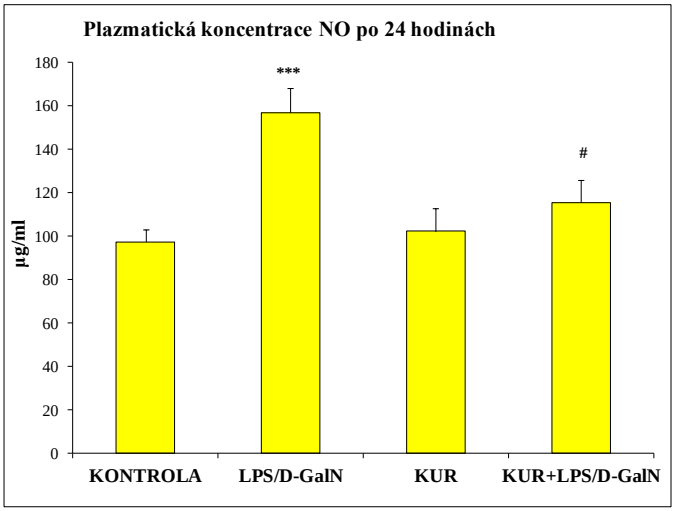


Obrázek 13: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na aktivitu jaterních hemoxygenáz (měřeny aktivity všech hemoxygenáz nespecificky, ale byl předpoklad, že z většiny se jednalo o aktivitu HO-1)

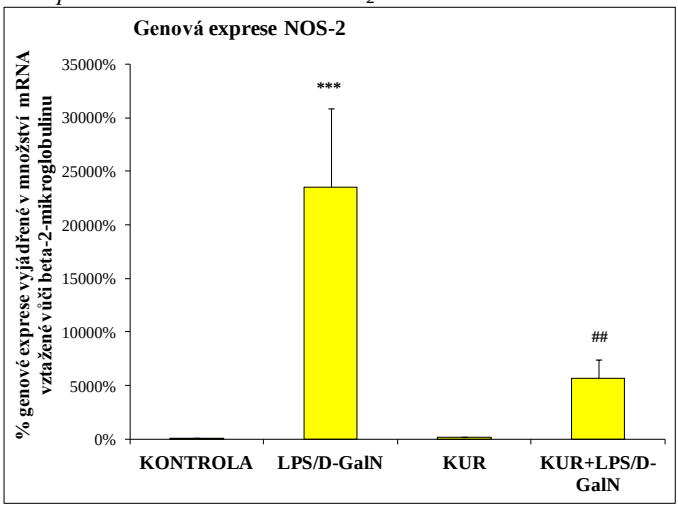
prokázán u skupiny s kombinací LPS/D-GalN ($p<0.001$; Tabulka 4). Kurkumin v premedikaci tento vzestup statisticky významně snížil na úroveň 1,6násobku negativní kontroly. Zajímavé bylo, že koncentrace katalázy, hlavního ukazatele oxidačního stavu celého organismu, byla statisticky významně zvýšená (2,4násobek, $p\leq0,001$) u pozitivní kontroly (LPS/D-GalN) a u skupiny navíc předléčené kurkuminem (3násobek, $p\leq0,05$) tento trend ještě vzrostl, což bylo podobné situaci u celkového bilirubinu.

Navíc při měření NO (Obr. 14) 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. 15). U skupiny LPS/D-GalN došlo ke 240násobnému zvýšení ($p\leq0,001$), zatímco podání kurkuminu vedlo k téměř 5násobné redukci exprese ($p \leq 0,01$).

Legenda k obrázkům 12 – 15 a tabulce 3:
*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 ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ a $p \leq 0,001$); $^{\#}$, $^{\#\#}$, $^{\#\#\#}$ statisticky významné vůči LPS/D-GalN ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ a $p \leq 0,001$); Průměr ± SEM, n = 7.*



Obrázek 14: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na plazmatické koncentrace NO_2^-



Obrázek 15: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na genovou expresi NOS-2

MĚŘENÝ MARKER		**CAT**	**CD**
jednotky	*plazma*	*µmol/ml*	-
	homogenát	-	*nmol/mg prot.*
KONTROLA			
- plazma		55,43±6,45	-
- homogenát		-	2,19±0,37

LPS/D-GalN		
- plazma	**132,93±10,20*** **	-
- homogenát	-	**7,76±1,49*** **
KUR		
- plazma	41,22±3,23	-
- homogenát	-	1,77±0,42
KUR+LPS/D-GalN		
- plazma	**164,35±9,11**$^{\#}$	-
- homogenát	-	**3,43±0,60**$^{\#\#}$

Tabulka 4: Vliv premedikace kurkuminem u hepatotoxického poškození kombinací LPS/D-GalN na koncentrace katalázy (CAT) v plazmě a konjugovaných dienů (CD) v jaterním homogenátu

6. Diskuze

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.

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 „5. Výsledky“, u všech tří námi používaných toxicitních modelů jsme nalezli paralelní statisticky významný indukční efekt na oba námi studované systémy – NOS-2/NO i HO-1/CO.

Různorodý vztah mezi systémy CO/HO-1 a NO/NOS-2 je popisován v několika předchozích pracích [9, 20–24, 36]. 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 [37, 38]. 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 [39]. 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 [40]. 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 [41, 42], 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, antioxidačních 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.

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 prokázaný 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 (viz celá řada mechanismů uvedená v dizertační práci), zda tento systém byl inhibován ve spojení se systémem NOS-2/NO [43 - 46]. 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.

7. 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 pětihodinových experimentech na perfuzním bioreaktoru s imobilizovanými primárními hepatocyty byl jednoznačně prokázán signifikantní cytoprotektivní vliv resveratrolu v koncentraci 10 μmol/l, stejně jako jeho komparátoru silymarinu v koncentraci 500 μmol/l.

Jako nový a v literatuře dosud nepopsaný byl nález 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 μg/kg LPS), která způsobila reverzibilní subletální fulminantní hepatocelulární poškození prokázané biochemicky i imunohistochemicky. V krátkodobých 24hodinových 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 lipoidních 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 inhibicí 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 24hodinových 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.

8. Použitá literatura

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 systém, Can J Physiol Pharmacol 76: 1057–1065, 1998.
5. Coburn RF; Enhancement by phenobarbitol 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. 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
10. 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.
11. Ollinger R, Wang H, Yamashita K, et al.; Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation, Antioxidants & Redox Signaling 12: 2175–2185, 2007.
12. Lincová D, Farghali H. et al., Základní a aplikovaná farmakologie, Galén-Karolinum 2006, p.333-337
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Kim PKM, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR; The regulatory role of nitric oxide in apoptosis, Int Immunopharmacol, 1: 1421–1441, 2001.
18. Kishikawa H, Sakamoto A, Ogawa R; Nitric oxide suppresses hepatocyte apoptosis induced by free radicals, Biomed Res 22: 83–89, 2001.

19. 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.
20. 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.
21. Johnson FK, Durante W, Peyton KJ, Johnson RA; Heme oxygenase inhibitor restores arteriolar nitric oxide function in Dahl rats, Hypertension 41: 149–155, 2003.
22. Ding Y, McCoubrey WK, Maines MD; Interaction of heme oxgenase-2 with nitric oxide donors. Is the oxygenase an intracelluar 'sink' for NO?, Eur J Biochem 264: 854–861, 1999.
23. Alcaraz MJ, Habib A, Creminon C, Vicente AM, Lebret 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.
24. 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 Investig 107: 1163–1171, 2001.
25. 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.
26. Bustin SA; Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences, Expert Rev Molec Diagnostics, 5: 493–498, 2005.
27. 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
28. Vítek L; Bilirubin a interní choroby, význam pro kliniku a praxi, Grada Publishing, Praha 2009, ISBN: 978-80-247-2351-8.
29. Schneiderka P, et al.; Kapitoly z klinické biochemie, 2. vydání, Praha, Karolinum 2004, ISBN 80-246-0678-X.
30. 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.
31. Ward PJ, Pill GO, Hatherill JR; Systemic complement activation, lung injury and products of lipid peroxidation, J Clin Invest 76: 517–527, 1985.
32. Aebi H; Catalase *in vitro*, Methods Enzymol 105: 121–126, 1984.
33. 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.
34. Farghali H, Kamenikova L, Martinek J, Lincova D, Hynie S; Preparation of functionally active immobilized and perifused mammalian cells - an example of hepatocyte bioreactor, Physiol Res 43: 121–125, 1994.

35. Farghali H, Berry MN, Edwards AM; Perifused immobilized hepatocytes for metabolic studies, Hepatocyte Review, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2000.
36. 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.
37. Grion N, Repetto EM, Pomeraniec 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Fullerton MD , Steinberg GR; SIRT1 takes a backseat to AMPK in the regulation of insulin sensitivity by resveratrol, Diabetes 59: 551–53, 2010.
44. Muriel P; NF-kappa B in liver diseases: a target for drug therapy, J ApplToxicol 29: 91–100, 2009.
45. 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.
46. 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.

9. Seznam publikací doktoranda

A. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace (v chronologickém pořadí s uvedením impakt faktoru):

I. 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 perifused hepatocytes: Involvement of inducible nitric oxide synthase and hemoxygenase-1, Nitric Oxide Biology and Chemistry 20 (1), 1-8, 2009 **(IF: 3,5)**

II. 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 **(IF: 3,5)**

III. 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 **(IF: 1,6)**

IV. 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 **(IF: 1,9)**

B. Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace (bez impakt faktoru):

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

II. 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

C. Konferenční abstrakta týkající se přímo dizertační práce publikovaná v mezinárodních časopisech (v chronologickém pořadí s vyznačením impakt faktoru):

I. 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 **(IF:0,3)**

II. 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 **(IF:6,6)**

III. 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 **(IF:6,3)**

IV. 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 **(IF:3,2)**

Poděkování

Rád bych tímto vyjádřil hluboce své poděkování následujícím lidem a sice:

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. Nikolině 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 a podporu 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.

Identifikační záznam disertační práce

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

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

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