

SOUHRN

Glutathion je velmi hojný intracelulární nebílkovinný thiol. Tento tripeptid, jenž se vyskytuje v redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formě, je jedním z nejvýznamnějších antioxidantů. Cílem naší práce bylo zavést stanovení glutathionu, které by oproti běžně užívaným HPLC metodám vynikalo nízkými náklady a menší časovou náročností. Jako vhodnou jsme zvolili spektrofotometrickou metodu založenou na detekci produktu reakce GSH a o-ftaldialdehydu. Optimalizací postupu jsme dosáhli těchto analytických parametrů: GSH (kalibrace: $R^2=1$, 0-500 $\mu\text{mol/l}$; intra-assay: CV% \ll 5%), GSSG (kalibrace: $R^2=0,99$, 0-200 $\mu\text{mol/l}$; intra-assay: CV% $<$ 5%). Dále byla porovnáním naměřených koncentrací s referenční HPLC/FL metodou vypočtena velmi silná korelace, $r=0,99$, mezi oběma stanoveními. Z udávaných hodnot vyplývá, že byla zavedena specifická, citlivá a přesná metoda srovnatelná s HPLC stanovením.

Druhým cílem této práce byla charakterizace toxického vlivu acetaminofenu (AAP) na potkaní hepatocyty *in vitro*. Příčinou AAP toxicity je jeho přeměna na NAPQI (N-acetyl-p-benzochinonimin), který reaguje s GSH za vzniku AAP-GSH, což způsobuje depleci GSH. Po předávkování AAP následuje nekróza buněk, jež může vyústit až v jaterní selhání. I když je AAP toxicita velmi intenzivně studována, mechanismus poškození není ještě zcela známý.

Hepatocyty byly inkubovány s AAP (1-20 mmol/l) v časových intervalech 1-24 hod. Pomocí WST-1 testu bylo zjištěno, že viabilita hepatocytů klesá u všech koncentrací AAP v závislosti na čase, což bylo u nejvyšších koncentrací potvrzeno únikem LDH do média. Kromě jiných markerů jsme také v buňkách stanovovali aktivitu glutathionreduktasy (GR). Překvapivě jsme u všech koncentrací AAP již po 3 hodinách inkubace zjistili na dávce závislý pokles aktivity tohoto enzymu. Dalším studiem mechanismu této inhibice jsme objevili, že glutathionreduktasa je inhibována metabolitem acetaminofenu, který byl až dosud obecně považován za zcela neškodný. Syntézou a následným testováním tohoto metabolitu byla prokázána velmi silná inhibice hepatocytární GR, a to o 97% oproti kontrolám. Tento nález vnáší naprosto nové poznatky do studia AAP toxicity a řadu jich zcela mění.