

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2006

Iva Zavřelová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
*KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD*

**SPEKTROFLUORIMETRICKÉ STANOVENÍ  
DIHYDROORACINU V BIOLOGICKÉM  
MATERIÁLU**

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové, 2006

Iva Zavřelová

Děkuji členům kateder biochemických věd a fyzikální chemie za ochotu, podnětné názory, poskytnutí materiálů a přístrojů pro tuto práci. Děkuji RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a pomoc při řešení problémů.

# 1. ÚVOD

Cílem biotransformace xenobiotik u živočichů je převedení cizorodé látky na její hydrofilnější derivát, který je poté snadněji eliminován ven z těla. Tento krok však může být při podání terapeutik do jisté míry nežádoucí a proto je metabolismus každého nového léčiva intenzivně studován. Součástí těchto studií je stanovení aktivit biotransformačních enzymů a testování vlivu potenciálního léčiva na tyto aktivity.

Nové potenciální cytostatikum oracin, které se v současné době nachází ve druhé fázi klinických studií vykazuje velmi příznivé terapeutické vlastnosti. Hlavní biotransformační cestou oracinu je u savců redukce karbonylové skupiny, při které vzniká 11-dihydrooracin. Tvorbu tohoto metabolitu katalyzuje mnoho různých enzymů a jeho množství po inkubaci biologického materiálu s oracinem odráží aktivitu širokého spektra enzymů, které jsou schopny redukovat karbonylovou skupinu xenobiotik. Redukce oracinu by se tedy mohla využít pro stanovení celkové aktivity těchto enzymů a pro sledování modulace této aktivity vlivem různých faktorů. Pro sledování redukční přeměny oracinu byla dosud využívána pouze HPLC analýza, která je však poměrně náročná na provedení. Jako další použitelný způsob stanovení množství dihydrooracinu v biologickém materiálu se jeví spektrofotometrie, která by využila skutečnosti, že dihydrooracin fluoreskuje, zatímco samotný oracin fluorescenci nevykazuje.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. SPEKTROFLUORIMETRIE

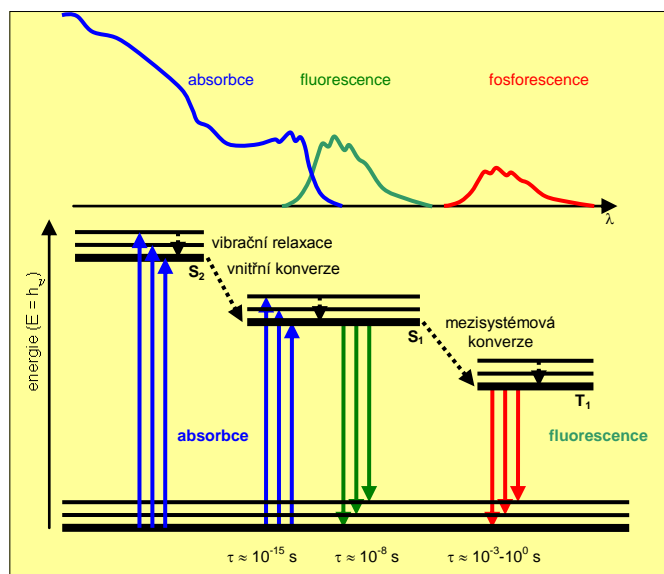
#### 2.1.1. Princip

Fluorimetrie je vysoce selektivní a citlivá metoda, která se využívá pro důkaz a stanovení některých látek schopných za určitých podmínek emitovat luminiscenční záření. V případě fluorimetrie jde o fluorescenci, při které absorpce ultrafialového záření vede k excitaci molekuly z vibračního stavu na základní elektronové hladině na jednu z mnoha vibračních hladin v elektronovém excitovaném stavu. Jde obvykle o první excitovaný singletový stav. Molekula na vysoké vibrační hladině ztrácí při kolizích s okolními molekulami rychle energii a přechází na nejnižší vibrační hladinu. Tento jev se nazývá vibrační relaxace molekuly. Nastane-li přechod na základní elektronovou hladinu ze singletového excitovaného stavu vyzářením nadbytečné energie emisí fotonu, hovoříme o zářivém přechodu na základní hladinu. Látka tedy nejdříve absorbuje primární záření, molekuly se dostávají do excitovaného stavu, při přechodu do stabilnějšího stavu o nižší energii pak uvolňuje přebytečnou energii ve formě sekundárního záření. Porovnáme-li energii absorbovaného záření a záření vyslaného fotoluminiscencí, má fluorescenční záření nižší energii a tedy větší vlnovou délku. Na rozdíl od fosforescence, při fluorescenci látka emituje sekundární záření pouze po dobu působení primárního záření. (Klouda 2003)

Fotoluminiscence jsou schopny zejména velké a pevné rovinné molekuly s konjugovanými dvojnými vazbami. Proces fluorescence je cyklický. Pokud není fluorofor nevratně zničen v excitovaném stavu, potom může být opakovaně excitován a emitovat fluorescenční záření, což je základem vysoké citlivosti fluorescenčních technik. (Fišar 2004)

#### 2.1.2. Fluorescenční spektra

Fluorescenci charakterizují dvě spektra: emisní a excitační. Excitační spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce primárního záření s konstantní intenzitou. Emisní spektrum udává závislost intenzity fluorescence na vlnové délce sekundárního záření při konstantních podmínkách primárního záření.



Obr. 1. Schéma zářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy.

### 2.1.3. Vliv prostředí na absorpční a emisní spektra

V roztocích dochází vlivem elektrostatických interakcí mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla k solvataci fluoreskujících molekul a tím ke změnám v optických spektrech. Doba potřebná pro molekulární relaxaci je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu, ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu. K emisi proto dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace. Protože část absorbované energie se spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem molekuly fluoroforu v excitovaném i základním stavu, je energie emitovaného fluorescenčního záření menší, než by odpovídalo čistě elektronovému přechodu. (Fišar 2004)

### 2.1.4. Charakteristiky fluorescence

Fluorescenci charakterizují následující veličiny:

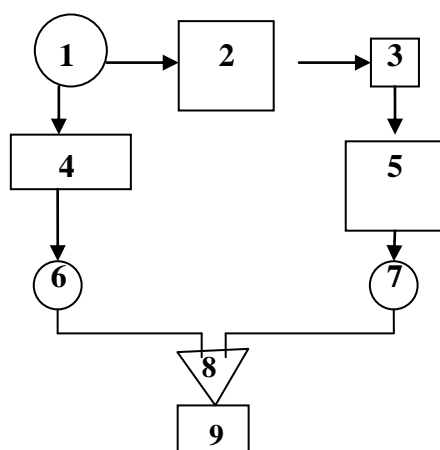
- Intenzita = počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času.
- Spektrální složení = spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí.
- Polarizace = směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny.
- Doba dohasínání = vnitřní doba života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi; úzce souvisí s pochody vedoucími k nezářivé deaktivaci tohoto stavu.

- Koherenční vlastnosti = vztahy mezi fázemi světelných vln.(Fišar 2004)

### 2.1.5. Instrumentace

K měření fluorescence se používají nejčastěji dvoupaprskové spektrofotometry, jejichž schéma je znázorněno na obr.2. Zdroj musí poskytovat dostatečně intenzivní záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti. Nejčastěji jako zdroj primárního záření slouží vysokotlaká xenonová oblouková lampa, nebo laser. Paprsek ze zdroje je rozdělen rotujícími zrcadlovými segmenty na dva. Z jednoho paprsku je vhodná vlnová délka vymezena prvním (excitačním) monochromátorem nebo filtrem. Tento excitační paprsek pak vstupuje do kyvety se vzorkem, kde vyvolává fluorescenční emisi. Ta je sledována v pravém úhlu ke zdrojovému paprsku. Emitované záření prochází emisním monochromátorem nebo filtrem, jímž se izoluje vlnová délka pro měření. Jako srovnávací paprsek slouží druhý paprsek ze zdroje, který je před měřením zeslaben. Oba paprsky se měří ve fotonásobičích, jejichž signál je srovnáván a vyhodnocován. (Klouda 2003)

Při měření emisních spekter fluorescence je excitační monochromátor nastaven na pevnou vlnovou délku budícího záření. Při měření excitačních spekter je pevně nastavena vlnová délka na emisním monochromátoru. Kromě vlnových délek excitace a emise se běžně nastavují ještě šířky štěrbin obou monochromátorů, které ovlivňují citlivost a spektrální rozlišení daného měření.(Fišar 2004)



**Obr. 2.** Schéma spektrofluorimetru (1- zdroj, 2- excitační monochromátor, 3- kyveta se vzorkem, 4- zeslabovač paprsku, 5- emisní monochromátor, 6, 7- fotonásobiče, 8- zesilovač, 9- vyhodnocovací zařízení).

## 2.2. ORACIN

### 2.2.1. Vlastnosti a chemická struktura

Oracin, 6-(2-(2-hydroxyethyl)-aminoethyl)-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11*H*-indeno(1,2-*c*)isochinolin, je nové potenciální cytostatikum, které se v současné době nachází ve II. fázi klinických testů. Z jeho chemické struktury vyplývá, že hlavní způsob účinku spočívá v interkalaci s molekulou nukleové kyseliny, podobně jako u protinádorových antibiotik ze skupiny anthracyklinů. Nicméně široké spektrum nádorů (např. sarkom S37, pevná forma Ehrlichova sarkomu atd.), které jsou na oracin citlivé není výsledkem pouze tohoto jediného mechanismu účinku, který se projevuje inhibicí syntézy DNA a RNA, následovanou snížením obsahu proteinů v nádorových buňkách (Mělka 1993). Byly prokázány také jiné mechanismy, omezující růst nádorových buněk. Týkají se inhibice topoisomerasy II, která byla izolována z jader buněk Ehrlichova karcinomu (Miko et al. 2002), stimulace aerobní spotřeby glukosy a, v menším rozsahu, tvorby laktátu, který indukuje apoptózu nádorových buněk (Mělka 1993). Hlavními výhodami tohoto nového chemoterapeutika je možnost perorální administrace, různé mechanismy účinku, absence kardiotoxicity, negativní výsledky v Amesově testu mutagenicity, velmi nízká hepatotoxicita a příznivé farmakokinetické vlastnosti (Wsol et al. 2005).

Díky důležité biologické aktivitě a pozitivním vlastnostem, byla biotransformace oracinu intenzivně studována. Tyto studie odhalily karbonylovou redukci oracinu na dihydrooracin (DHO), jako hlavní cestu metabolismu jak u běžných laboratorních zvířat, tak u člověka (Wsol et al. 1996; Szotakova et al. 1996; Wsol et al. 2000). Vzhledem k tomu, že DHO vykazuje fluorescenční vlastnosti, mohl by být vhodným substrátem pro spektrofluorimetrické stanovení aktivity redukčních enzymů.

### 2.2.2. Redukce oracinu v mikrosomálních a cytosolických frakcích potkaních jater

Redukce oracinu byla nejprve studována z hlediska příspěvku NADPH dependentního cytochromu P450, který hraje důležitou roli v redukci některých xenobiotik nesoucích karbonylovou skupinu. Jedním z nejběžnějších prostředků ke zjištění role P450 v biotransformačním procesu je využití inhibitorů a induktorů.

Kyslík je důležitým inhibitorem reduktasové aktivity cytochromu P450, proto bylo při studiích pozorováno značné zvýšení produkce DHO v anaerobních podmínkách. Pro vyhodnocení vlivu cytochromu P450 na redukci oracinu byl použit oxid uhelnatý, jehož



vazba na cytochrom P450 překvapivě zvyšuje výnos DHO. Toto pozorované zvýšení tvorby DHO může být vysvětleno inhibicí reoxidace DHO na oracin, která je pravděpodobně katalyzována cytochromem P450. Z různých induktorů potkaního cytochromu P450, pouze 3-methylcholantren způsobuje značnou stimulaci produkce DHO a inhibitor cytochromu P4501A,  $\alpha$ -naftoflavon, významně snižuje jeho redukční aktivitu. Z těchto poznatků je zřejmé, že účast cytochromu P450 v redukci oracinu je důležitá pouze po indukci P4501A.

11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenasa je další NADPH dependentní enzym, který se účastní této redukce v mikrosomálních frakcích. Jako inhibitor HSD byla použita kyselina 18 $\beta$ -glycyrrhetinová. Inkubací s touto látkou se snížila produkce DHO ve srovnání s neinhibovanou reakcí. Použitím metyraponu, substrátu 11 $\beta$ -HSD bylo prokázáno, že hlavním mikrosomálním enzymem, který katalyzuje mikrosomální karbonylovou redukci oracinu je pravděpodobně 11 $\beta$ -HSD.

Cytosol také hraje roli v redukci oracinu, přičemž je stejně jako u mikrosomů preferován koenzym NADPH a anaerobní podmínky. Na první pohled se zdá, že je cytosolická redukce nižší než u mikrosomů (množství DHO je vztaženo na mg proteinů), ale přepočítáme-li produkci DHO na mg jaterní tkáně, je redukce v cytosolických frakcích až 7x vyšší. Podle prokázané citlivosti na quercitrin se zdá, že enzymem zodpovědným za tvorbu DHO v jaterním cytosolu je karbonyl reduktasa (Szotáková et al. 2000).

### **2.2.3. Stereospecifická redukce oracinu v potkaních extrahepatálních tkáních**

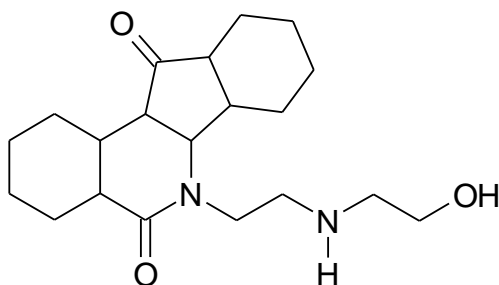
Játra jsou hlavním místem metabolismu xenobiotik v těle, nicméně většina léčiv podstupuje také metabolismus v extrahepatálních tkáních. Rozsah a stereospecifita redukce oracinu na DHO byly testovány v mikrosomálních a cytosolických frakcích jater, ledvin, srdce, plic, stěny tenkého a tlustého střeva a caeca. Stejně tak byla sledována bakteriální redukce ve střevech. Množství DHO enantiomerů bylo měřeno pomocí HPLC s použitím chirální kolony. Reduktivní biotransformace oracinu byla většinou stereospecifická pro (+)-DHO, ale procenta enantiomerů se mezi jednotlivými tkáněmi a subcelulárními frakcemi významně lišila (od 56% (+)-DHO v srdečních mikrosomech do 92% (+)-DHO v jaterním cytosolu. Stereospecifita pro (-)-DHO byla pozorována u bakteriální redukce v lumen tenkého střeva, caeca a tlustého střeva. Posun poměru (+)-DHO/(-)-DHO z 90:10 (v jaterních subcelulárních frakcích) na 60:40 (in-

vivo) potvrzuje důležitost příspěvku extrahepatického metabolismu na celkovou biotransformaci oracinu na DHO (Szotáková et al. 2003).

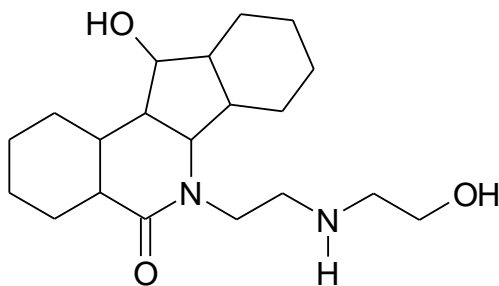
#### 2.2.4. Příspěvek aldo/ketoreduktas na metabolismus oracinu u člověka

Stejně jako u potkana i u člověka je hlavním enzymem zodpovědným za karbonylovou redukci oracinu v mikrosomech 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenasa typu 1. Na karbonylové redukci oracinu v jaterním cytosolu se dále podílí tři enzymy z nadrodiny aldo/ketoreduktas. O AKR1C je známo, že hrají důležitou roli v metabolismu eobiotik, jejich schopnost metabolizovat xenobiotika byla prokázána pouze v několika málo případech. V případě konverze oracinu na dihydrooracin se jedná o AKR1C1, AKR1C2 a AKR1C4, přičemž AKR1C1 je zodpovědná za tvorbu obou DHO enantiomerů (+)-DHO i (-)-DHO v procentuálním poměru 97:3 a má vyšší aktivitu ve srovnání s AKR1C2 a 1C4, které jsou výhradně stereospecifické pro (+)-DHO.

Fakt, že produkce (-)-DHO je pouze 3%, přestože bylo prokázáno, že se v cytosolu vytvoří více než 10% tohoto enantiomeru poukazuje na příspěvek jiných, dosud neznámých enzymů s vyšší aktivitou pro produkci (-)-DHO (Wsol et al.2005)



**Obr. 3.** Oracin



**Obr. 4.** Dihydrooracin

## 2.3. ENZYMY REDUJÍCÍ KARBONYLOVOU SKUPINU

Vědecké výzkumy ukazují, že většina xenobiotických aldehydů a ketonů je u savců enzymaticky metabolizována redukčními cestami (Felsted, Bachur 1980). Redukce karbonylové skupiny je významným krokem v 1. fázi biotransformace mnoha různých aromatických, alicyklických a alifatických xenobiotik obsahujících karbonylové skupiny včetně farmakologicky účinných látek. Z farmakologického hlediska je redukce karbonylové skupiny významná v mnoha inaktivačních procesech u léčiv obsahujících karbonylovou skupinu, dále mohou být látky redukcí karbonylové skupiny aktivovány či toxifikovány (Maser 1995).

Redukce mění fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly, což má za následek vliv na rozdělovací koeficient. Tím se mění intracelulární distribuce, tkáňová distribuce, permeabilita membrán, vaznost proteinů a farmakologická distribuce. Tato metabolická změna může vést ke změně farmakologického a toxikologického účinku daného agens (Felsted, Bachur 1980).

Redukce karbonylové skupiny xenobiotik je převážně katalyzována cytosolickými a mikrosomálními NAD(P)H dependentními enzymy patřícími do tří proteinových nadrodin:

1. dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)
2. dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)
3. aldo/ketoreduktasy (AKR)

Nejdůležitějšími enzymy jsou aldehydreduktasa (E.C.1.1.1.2), aldoreduktasa (E.C.1.1.1.21) a karbonylreduktasa (E.C.1.1.1.184) společně s hydroxysteroiddehydrogenasami (HSD) 3 $\alpha$ -HSD (E.C.1.1.1.50), 3 $\beta$ -HSD (E.C.1.1.1.51), 17 $\beta$ -HSD (E.C.1.1.1.62), 3 $\alpha$ /20 $\beta$ -HSD (E.C.1.1.1.53), 20 $\alpha$ -HSD (E.C.1.1.1.149) a 11 $\beta$ -HSD (E.C.1.1.1.146) (Maser 1995).

### 2.3.1. Aldo/ketoreduktasy

Aldo/ketoreduktasy (AKR) reprezentují širokou rodinu oxidoreduktas. Nacházejí se u obratlovců, bezobratlých, rostlin, protozoí, hub, eubakterií a archebakterií, což dokazuje, že se jedná o prastarou nadrodinu enzymů. Členové nadrodiny AKR jsou monomerní proteiny v délce přibližně 320 aminokyselin, které váží NAD(P)H. AKR se účastní metabolismu širokého spektra substrátů (Jez, Penning 2001). Zahrnují aldehydreduktasy, aldoreduktasy, dihydrodioldehydrogenasy a hydroxysteroiddehydrogenasy.

Enzymy náležící do nadrodiny AKR mají často několik názvů v závislosti na substrátové specifitě. Např. lidská AKR1C4 neboli lidská 3 $\alpha$ -hydroxysteroiddehydrogenasa typ I je také známa jako dihydrodioldehydrogenasa 4 a chlordeconreduktasa, díky své enzymatické aktivitě vůči insekticidu chlordeconu (Breyer-Pfaff, Nill 2000).

Díky této mnohočetnosti názvů pro jednotlivé členy AKR, navrhli Jez a Penning (2001) rozšiřovatelný nomenklaturní systém, který je založen na identitě sekvence aminokyselin. Na hladině 40% aminokyselinové identity byla nadrodina AKR rozčleněna do jednotlivých rodin, značených arabskými číslicemi (AKR1 apod.). Na hladině 60% identity aminokyselinové sekvence se rozlišují podrodiny značené velkými písmeny.

AKR se podle Jeze a Penninga (2001) člení do dvanácti rodin AKR1-12. Rodina AKR1 zahrnuje pět podrodin, označených velkými písmeny:

1. savčí aldehydreduktasy (AKR1A)
2. aldoreduktasy (AKR1B)
3. hydroxysteroiddehydrogenasy (AKR1C)
4.  $\Delta^4$ -3-ketosteroid-5 $\beta$ -reduktasy (AKR1D)
5. rostlinné aldehydreduktasy (AKR1E) (Jez et al. 1997a).

#### 2.3.1.1. HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASY

Hydroxysteroiddehydrogenasy jsou NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktasy, které zprostředkovávají přeměnu sekundárních alkoholů na ketony na steroidním jádře a postranním řetězci. Podstatnou rolí těchto enzymů je ochrana organismů před poškozením akumulací toxických karbonylových sloučenin (Maser, Oppermann 1997). Nacházejí se jak v mikrosomech, tak v cytosolu.

### 2.3.1.2. ALDEHYDREDUKTASY

Subcelulární lokalizace aldehydreduktas je primárně cytosolická a v některých případech také mitochondriální. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje mezi 29 000 až 44 000 v nativní i denaturované formě, což ukazuje na monomerní strukturu enzymů. Ketoreduktasy jsou v distribuci a oblasti molekulových hmotností srovnatelné s aldehydreduktasami (Testa 1995).

Aldehydreduktasy katalyzují NADP(H)-dependentní redukce širokého spektra aldehydů na příslušné alkoholy. K jejich fyziologickým funkcím patří metabolismus aldehydických neurotransmiterů produkovaných monoaminoxidasou, detoxikace reaktivních aldehydických intermediátů a osmoregulace (Allan, Lohnes 2000).

Aldehydreduktasa byla poprvé získána z jater potkana a charakterizována Mannem v roce 1961. První enzym z lidské tkáně byl získán z jater a charakterizován Wermuthem v roce 1977. Aldehydreduktasa je rozšířena mezi všemi druhy savců a ptáků, byla také detekována u plazů, obojživelníků, ryb, hmyzu, kvetoucích rostlin a hub. Nejvyšší hodnoty aldehydreduktas byly u savců zjištěny v kůře ledvin a játrech. Určité hodnoty aktivity jsou však naměřitelné ve všech tkáních (Barski et al. 1996b).

### 2.3.1.3. ALDOSOREDUKTASY

Aldosoreduktasy byly zjištěny v mnoha živočišných tkáních a jsou zapojeny v konverzi glukózy na sorbitol (kofaktorem je NADPH), který je dále přeměňován na fruktózu sorbitoldehydrogenasou s  $\text{NAD}^+$  jako kofaktorem. Tato metabolická cesta je nazývána polyolovou a je alternativní cestou glukózového metabolismu (Seo et al. 2000). Aldosoreduktasa vykazuje vysokou aktivitu pro glyceraldehyd s nižší aktivitou pro pentosy a hexosy a je též klíčovým enzymem v oxidativní deaminaci sympatoneurálního neurotransmiteru norepinefrinu. Aldehydreduktasa zde může aldosoreduktasu nahradit, ale její redukční aktivita je mnohem nižší (Kawamura et al. 1999).

### 2.3.1.4. KETOREDUKTASY

Další skupinou karbonylreduktas jsou ketoreduktasy. Ketoreduktasy jsou často zmiňovány, ale zřídka dobře charakterizovány. Zahrnují  $\alpha$ - a  $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy, různé prostaglandinreduktasy a mnoho dalších (Testa 1995).

Tyto enzymy jsou primárně lokalizovány v cytosolu, nejvíce aktivní jsou v játrech a ledvinách (Felsted, Bachur 1980). V oblasti molekulových hmotností jsou srovnatelné s aldehydreduktasami. Aromatické ketony jsou těmito reduktasami redukovány mnohem více než alifatické ketony. Aldehydy jsou také vhodnými substráty pro ketoreduktasy a proto jsou nazývány karbonylreduktasami (Testa 1995).

### **2.3.2. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)**

Cytosolická karbonyl reductasa a mikrosomální 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa-1 jsou dva nejstudovanější enzymy redukující karbonylovou skupinu xenobiotik z rodiny SDR, která je jednou z největších proteinových podrodin současnosti. Většina známých struktur spadajících do skupiny SDR jsou rozpustné proteiny s délkou monomeru okolo 270 aminokyselinových zbytků a jsou popisovány jak mono-, tak oligomerní formy. Aktivní místo zahrnuje katalytickou triádu s vysoce, ale ne striktně zachovanými zbytky Ser-Tyr-Lys. (Oppermann, Maser 2000)

### **2.3.3. Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)**

Hlavní funkcí enzymů náležících do nadrodiny MDR je oxidace alkoholů, redukce chinonů a dehydrogenace/redukce endogenních sloučenin. Jako koenzym slouží především NAD(H). Struktura zahrnuje nejčastěji okolo 370 aminokyselinových zbytků a aktivní místo je tvořeno Zn<sup>2+</sup>, His a Ser. V současnosti je identifikováno více než 500 různých struktur – členů MDR, mezi něž patří i většina alkoholdehydrogenas. (Oppermann, Maser 2000)

### 3. CÍLE PRÁCE

Cílem předložené bakalářské práce bylo:

- 1) Proměřit absorpční spektra vodných roztoků dihydrooracinu a oracinu pomocí spektrofotometru.
- 2) Proměřit fluorescenční emisní a excitační spektra dihydrooracinu a oracinu a vybrat nejvhodnější excitační a emisní vlnové délky pro měření závislosti intenzity fluorescence na koncentraci sledované látky.
- 3) Změřit závislost intenzity fluorescence na koncentraci dihydrooracinu ve vodném roztoku v rozmezí 0,5 – 50  $\mu\text{M}$ .
- 4) Zjistit vliv oracinu na intenzitu fluorescence dihydrooracinu .
- 5) Zjistit vliv biologického materiálu (cytosolu a mikrosomů) na intenzitu fluorescence dihydrooracinu.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POMŮCKY

#### **Chemikálie :**

- Dihydrooracin
- Oracin
- Redestilovaná voda
- Cytosol
- Mikrosomy

#### **Přístroje:**

- Spektrofotometr Helios  $\beta$
- Spektrofluorimetr Perkin Elmer
- Spektrofluorimetr AMINCO – Bowman serie 2
- Analytické váhy
- Ultrazvuková lázeň Bandelin - sonorex

#### **Pomůcky:**

- Skleněné lahvičky
- Automatické pipety
- Buničina
- Křemenné kyvety
- Lžičky
- Alobal
- parafilm



## 4.2. PŘÍPRAVA VODNÝCH ROZTOKŮ ORACINU A DHO

Zásobní roztoky oracinu a dihydrooracinu o koncentraci 500  $\mu\text{M}$  byly připraveny rozpuštěním vypočtené navážky těchto látek v 10 ml redestilované vody s použitím ultrazvukové lázně. Skleněné lahvičky s jednotlivými roztoky byly obaleny alobalem, aby se zabránilo fotolýze vzorku.

**Výpočet navážky oracinu:**  $V = 10 \text{ ml} = 0,01 \text{ l}$

$$M_r = 370,85 \text{ g/mol}$$

$$c = 500 \mu\text{M}$$

$$n = c \cdot V = 500 \cdot 10^{-6} \cdot 0,01 = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

$$m = n \cdot M = 5 \cdot 10^{-6} \cdot 370,85 = 1,854 \cdot 10^{-4} \text{ g} = 1,85 \text{ mg}$$

**Výpočet navážky DHO:**  $V = 0,01 \text{ l}$

$$M_r = 372,85 \text{ g/mol}$$

$$c = 500 \mu\text{M}$$

$$n = c \cdot V = 500 \cdot 10^{-6} \cdot 0,01 = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

$$m = n \cdot M = 5 \cdot 10^{-6} \cdot 372,85 = 1864,25 \cdot 10^{-6} \text{ g} = 1,86 \text{ mg}$$

( $V$  – celkový objem roztoku,  $M_r$  – molekulová hmotnost,  $c$  – výsledná koncentrace roztoku,  $n$  – látkové množství,  $m$  – hmotnost).

## 4.3. MĚŘENÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER ORACINU A DHO

Absorpční spektra (závislost absorbance na vlnové délce záření) byla měřena u připravených 500  $\mu\text{M}$  zásobních roztoků oracinu a dihydrooracinu pomocí spektrofotometru HELIOSb. Měření probíhalo za laboratorní teploty a na přístroji byly nastaveny tyto parametry:

Počáteční vlnová délka: 200.0 nm

Koncová vlnová délka: 800.0 nm pro oracin, 500.0 nm pro dihydrooracin

Šířka pásma: 2.0 nm

Interval dat: 1.0 nm

#### 4.4. MĚŘENÍ FLUORESCENČNÍCH EMISNÍCH A EXCITAČNÍCH SPEKTER

Fluorescenční spektra byla měřena u 2,5  $\mu\text{M}$  roztoku dihydrooracinu, který byl připraven z 0,05 ml zásobního roztoku a 9,95 ml redestilované vody.

Parametry přístroje: Zdroj primárního záření: 150 W xenonová lampa

Šířka štěrbin monochromátorů: 4,0 nm

Rozsah vlnových délek pro měření emis. spektra: 350 – 800 nm

Rozsah vlnových délek pro měření ex. spektra: 280 – 370 nm

Emisní spektrum DHO bylo nejprve měřeno při konstantní excitační vlnové délce 340 nm a podruhé při konstantní excitační vlnové délce 359 nm.

Excitační spektrum DHO bylo měřeno při konstantních hodnotách emisního záření a to nejdříve při 385 nm a poté při 408 nm.

#### 4.5. MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY

Roztoky pro měření kalibrační křivky byly připraveny ředěním 500  $\mu\text{M}$  zásobního roztoku dihydrooracinu podle následující tabulky:

**Tab. 1.** Objemy zásobního roztoku DHO a redestilované vody pro přípravu kalibračních roztoků.

koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	zásobní roztoku DHO (ml)	redestilovaná voda (ml)
0,5	0,01	9,99
1,0	0,02	9,98
2,0	0,04	9,96
2,5	0,05	9,95
5,0	0,10	9,90
10,0	0,20	9,80
25,0	0,50	9,50
50,0	1,00	9,00

U každého z těchto roztoků byla na spektrofluorimetru změřena intenzita fluorescence při excitační vlnové délce rovné 359 nm a vlnové délce emisního záření 408 nm a znovu při excitační vlnové délce 341 nm a emisní vlnové délce 385 nm . Ze závislosti intenzity fluorescence na koncentraci roztoku DHO byly sestrojeny grafy pro jednotlivé kombinace vlnových délek excitace a emise a vybrány hodnoty těchto veličin, při kterých byla intenzita fluorescence vyšší. Tyto parametry poté byly použity pro další měření.

#### 4.6. STUDIUM VLIVU ORACINU

Zásobní roztok oracinu o koncentraci 0,1 mol/l byl připraven rozpuštěním vypočtené navážky ve 2ml redestilované vody. Tento roztok byl přidáván do jednotlivých kalibračních vzorků (koncentrace od 0,5 do 50  $\mu$ M) podle tabulky a poté byly změřeny tři závislosti intenzity fluorescence na koncentraci DHO v roztoku (pro jednotlivé koncentrace přidaného oracinu).

**Výpočet navážky oracinu:**  $V = 2 \text{ ml} = 0,002 \text{ l}$

$$M_r = 370,85 \text{ g/mol}$$

$$c = 0,1 \text{ mol/l}$$

$$n = c \cdot V = 0,1 \cdot 0,002 = 0,0002$$

$$m = n \cdot M_r = 0,0002 \cdot 370,85 = 0,0742 \text{ g}$$

**Tab. 2.** Hodnoty přidaného oracinu a jeho výsledná koncentrace v roztoku.

Přidaný objem zásobního roztoku oracinu ( $\mu$ l)	Výsledný objem zásobního roztoku oracinu ( $\mu$ l)	Výsledná koncentrace oracinu v roztoku ( $\mu$ M)
2,5	2,5	100
1,5	4,0	160
1,5	5,5	220

#### 4.7. STUDIUM VLIVU CYTOSOLU A MIKROSOMŮ

K jednotlivým kalibračním roztokům o objemu 2,5 ml a koncentracích 0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10; 25 a 50  $\mu\text{M}$  bylo přidáváno rostoucí množství cytosolu (mikrosomů). Následně byla změřena závislost intenzity fluorescence na koncentraci roztoků.

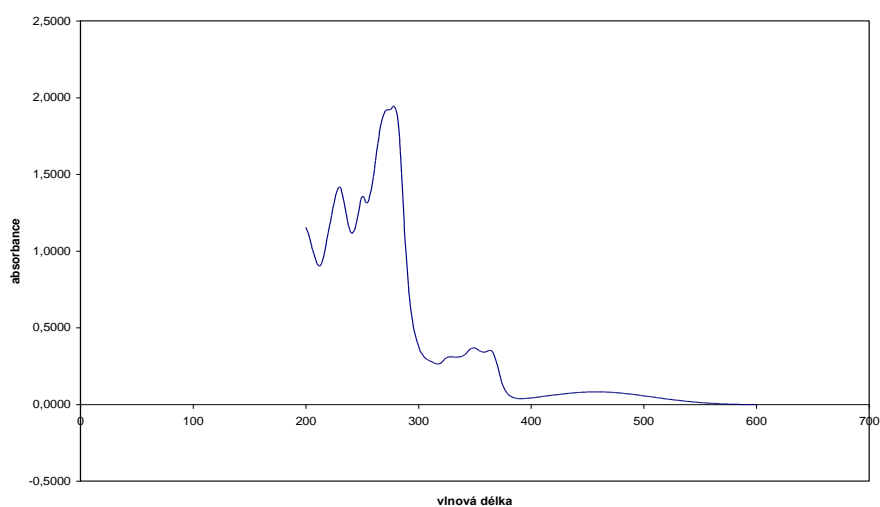
**Tab. 3.** Přidaný a výsledný objem cytosolu (mikrosomů) v roztoku.

Objem přidaného cytosolu (mikrosomů) ( $\mu\text{l}$ )	Výsledný objem cytosolu (mikrosomů) v roztoku ( $\mu\text{l}$ )
1	1
1	2
3	5
5	10
10	20
10	30
10	40
10	50

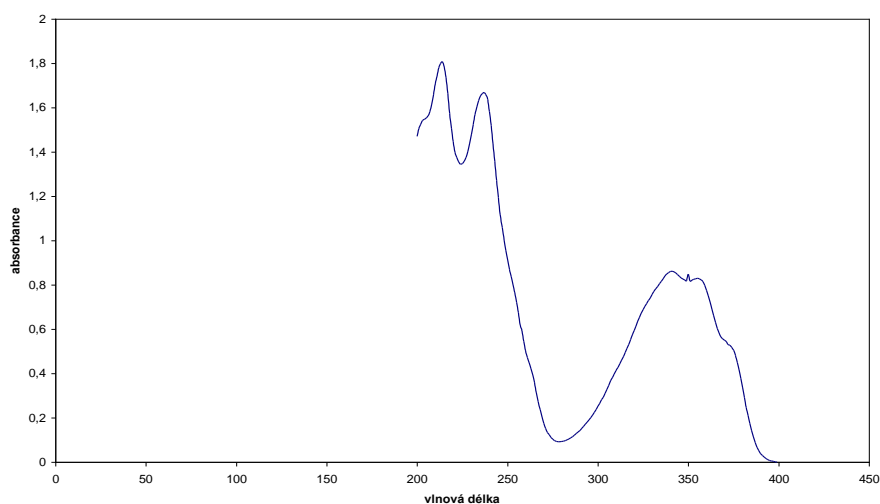
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. ABSORPČNÍ SPEKTRA

U jednotlivých vodných roztoků dihydrooracinu a oracinu o koncentraci 500  $\mu\text{M}$  byla změřena absorpční spektra, která jsou uvedena na obrázku 5 a 6.



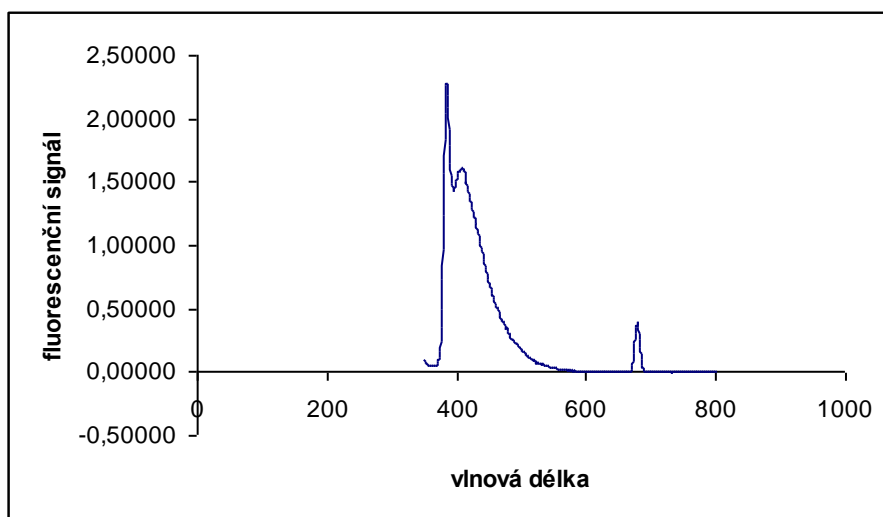
**Obr. 5.** Absorpční spektrum vodného roztoku oracinu s maximy absorbance při vlnových délkách: 230 nm, 280 nm a 350 nm.



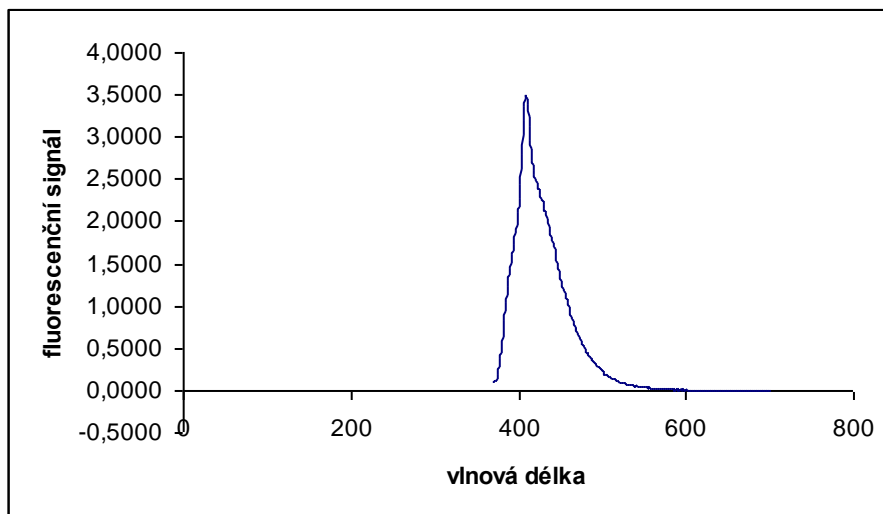
**Obr. 6.** Absorpční spektrum vodného roztoku dihydrooracinu s maximy absorbance při vlnových délkách: 214 nm, 238 nm, 343 nm.

## 5.2. EXCITAČNÍ A EMISNÍ SPEKTRA

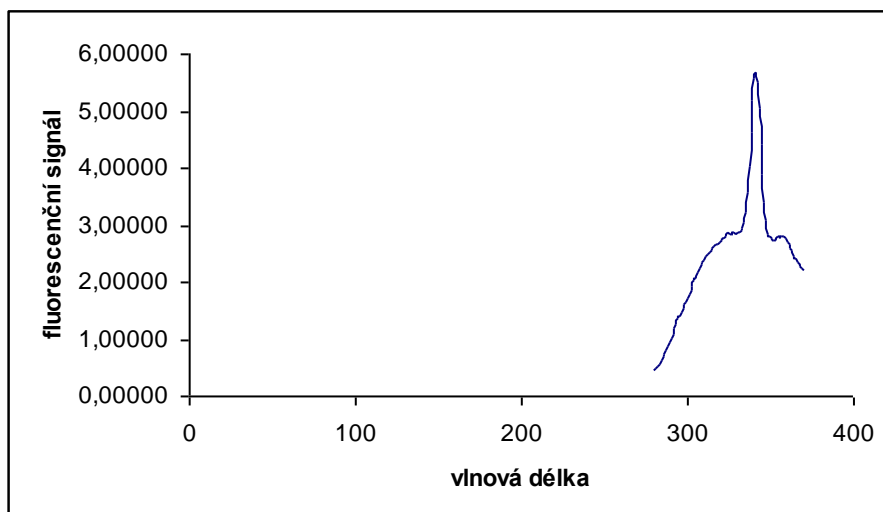
Excitační a emisní spektra byla měřena u 2,5  $\mu\text{M}$  roztoku dihydrooracinu pomocí spektrofluorimetru. Výsledky měření při různé vlnové délce excitace resp. emise demonstrují obrázky 7 – 10.



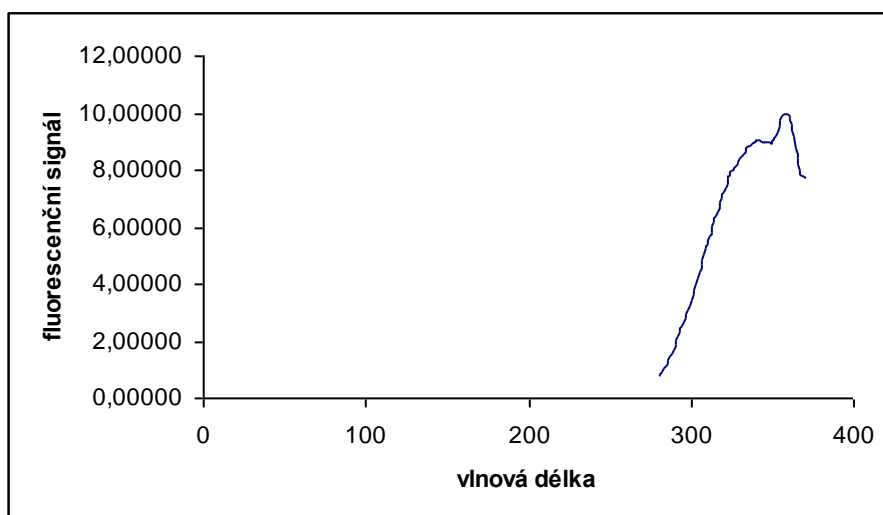
**Obr. 7.** Emisní spektrum dihydrooracinu při excitaci 340 nm. Maxima odpovídají vlnovým délkám: 385 nm, 408 nm a 680 nm.



**Obr. 8.** Emisní spektrum dihydrooracinu při excitaci 359 nm. Maximum odpovídá hodnotě 408 nm.



**Obr. 9.** Excitační spektrum dihydrooracinu při emisi 385 nm. Maximum odpovídá vlnové délce 340 nm.



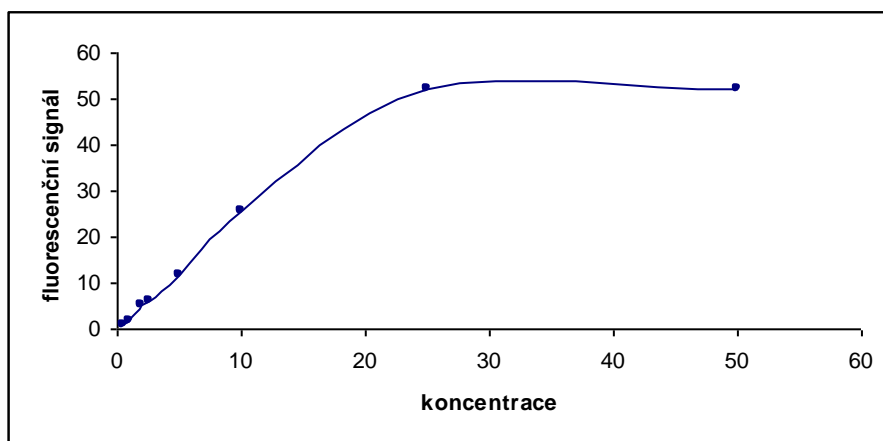
**Obr. 10.** Excitační spektrum dihydrooracinu při emisi 408 nm. Vlnová délka maxima odpovídá hodnotě 359 nm.

### 5.3. ZÁVISLOST INTENZITY FLUORESCENCE NA KONCENTRACI DIHYDROORACINU

Závislost intenzity fluorescence na koncentraci dihydrooracinu v roztoku byla měřena na spektrofluorimetru při hodnotách excitace 340 nm a 359 nm a emise 385 nm a 408 nm a výsledky jsou uvedeny v tabulce 4 a 5 a na obrázku 11, 12 a 13.

**Tab. 4.** Fluorescenční signál pro jednotlivé kalibrační roztoky při vlnové délce excitace 359 nm a vlnové délce emise 408 nm.

<b>c (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
<b>signál</b>	1,006	1,718	5,223	6,22	11,78	25,66	52,32	52,24

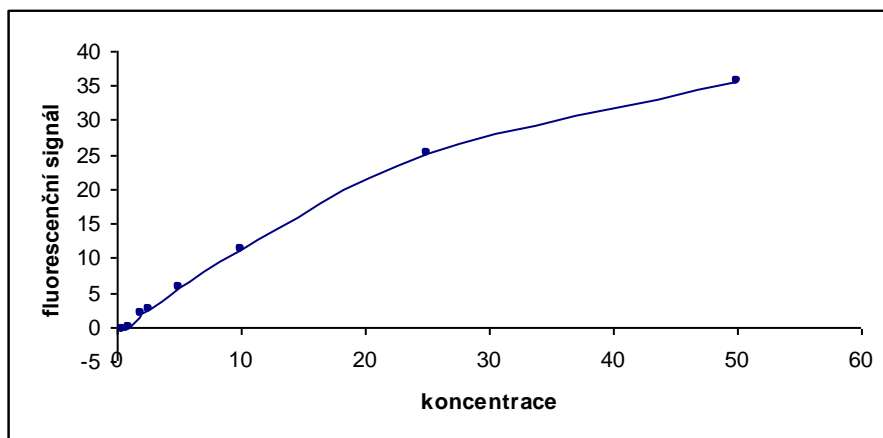


**Obr. 11.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci dihydrooracinu při excitaci 359 nm a emisi 408 nm.

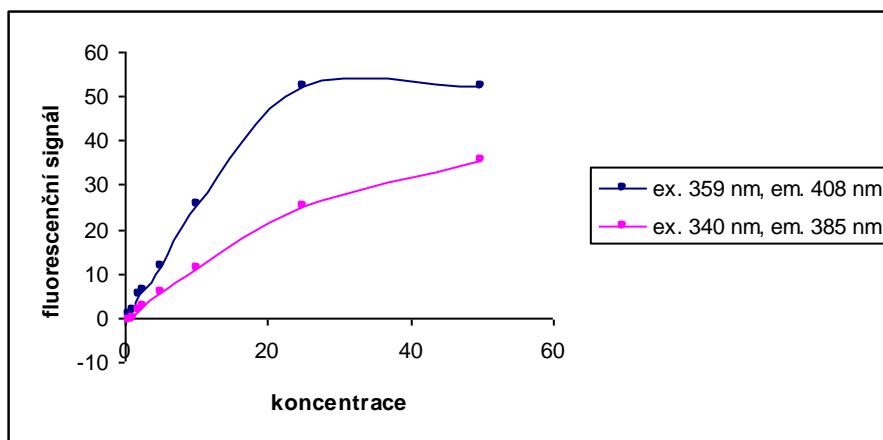


**Tab. 5.** Fluorescenční signál pro jednotlivé koncentrace dihydrooracinu při vlnové délce excitace 340 nm a emise 385 nm.

c (μM)	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	-0,474	-1,105	1,846	2,658	5,831	11,280	25,100	35,510



**Obr. 12.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci dihydrooracinu při excitaci 340 nm a emisi 385 nm.



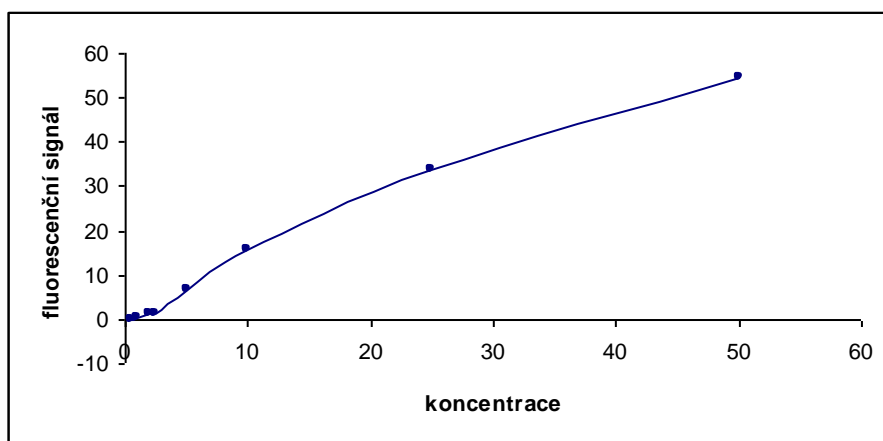
**Obr. 13.** Porovnání závislosti intenzity fluorescence na koncentraci DHO.

#### 5.4. VLIV ORACINU NA INTENZITU FLUORESCENCE DHO

Po přidání určitého množství zásobního roztoku oracinu o koncentraci 0,1 mol/l (viz tab. 2.) byla pomocí spektrofluorimetru změřena závislost intenzity fluorescence na koncentraci dihydrooracinu a bylo sledováno snížení fluorescenčního signálu pro různé koncentrace přidaného oracinu. Výsledky shrnují tabulky 6 - 8 a obrázky 14 - 17.

**Tab. 6.** Hodnoty fluorescence pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 100  $\mu\text{M}$  oracinu.

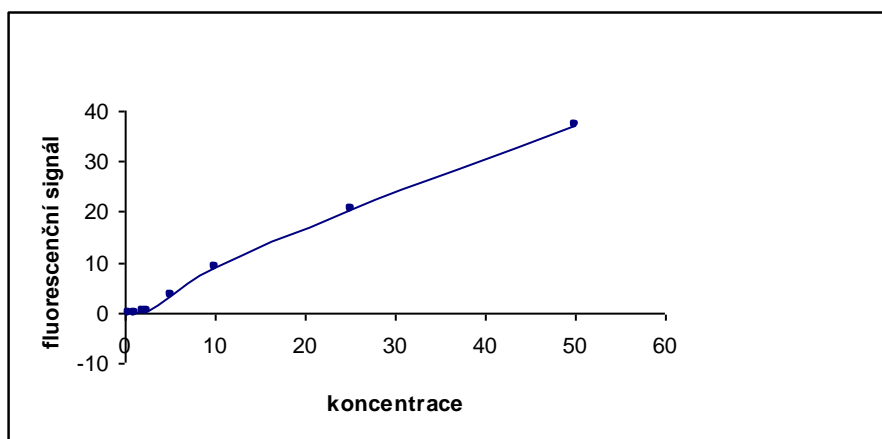
c ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	-0,255	0,364	1,299	1,331	6,591	15,700	33,790	54,750



**Obr. 14.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO s přidavkem 100  $\mu\text{M}$  oracinu.

**Tab. 7.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé koncentrace DHO po přidání roztoku oracinu o koncentraci 160  $\mu\text{M}$ .

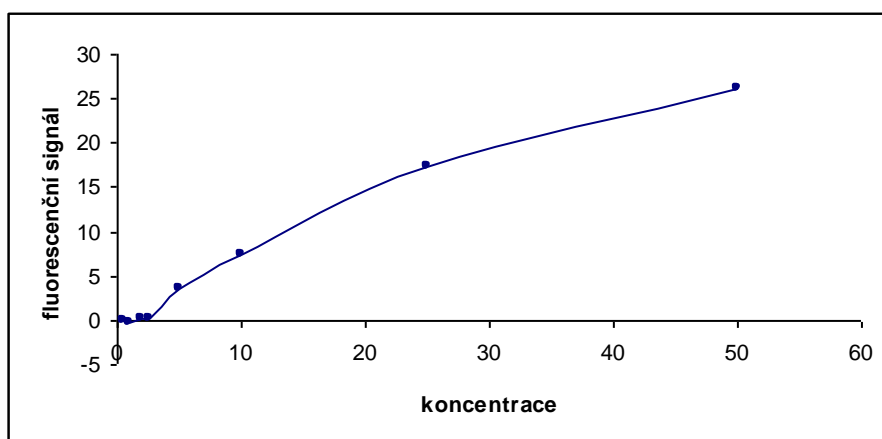
<b>c (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
<b>signál</b>	-0,196	-0,115	0,394	0,497	3,668	9,147	20,750	37,070



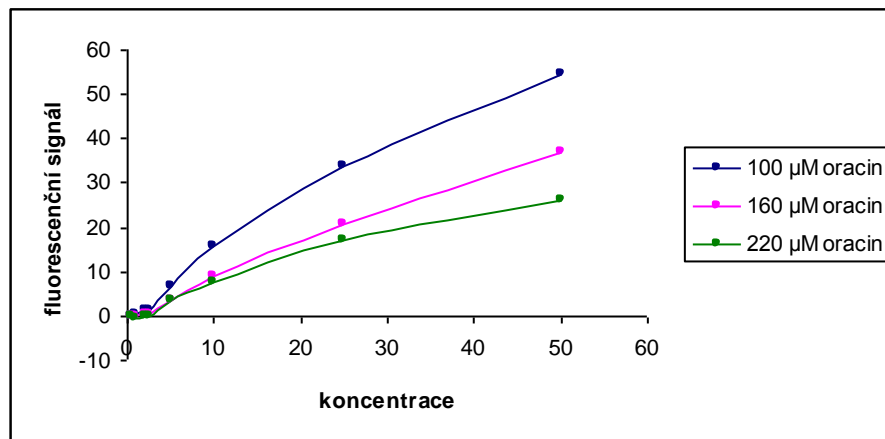
**Obr. 15.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO pro přidání 160  $\mu\text{M}$  roztoku oracinu.

**Tab. 8.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé koncentrace DHO po přidání 220  $\mu\text{M}$  roztoku oracinu.

<b>c (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
<b>signál</b>	-0,051	-0,366	0,128	0,159	3,496	7,410	17,270	26,130



**Obr. 16.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání oracinu o koncentraci 220  $\mu\text{M}$ .



**Obr. 17.** Porovnání vlivu různé koncentrace přidaného oracinu na intenzitu fluorescence DHO.

## 5.5. VLIV BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU NA INTENZITU FLUORESCENCE DIHYDROORACINU

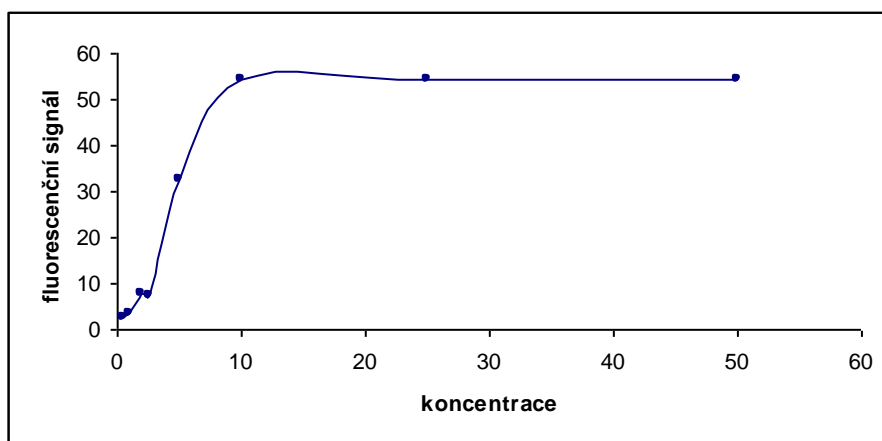
K jednotlivým kalibračním roztokům dihydrooracinu bylo postupně přidáváno určité množství biologického materiálu (cytosolu, mikrosomů) (viz. tab. 3.) a pomocí spektrofluorimetru byla měřena závislost intenzity fluorescence na koncentraci dihydrooracinu. Vliv biologického materiálu byl posuzován podle změn ve fluorescenčních signálech.

### 5.5.1. Vliv cytosolu

Výsledky testování vlivu cytosolické suspenze na intenzitu fluorescence dihydroracinu jsou uvedeny v tabulkách 9-16 a na obrázcích 18 -25.

**Tab. 9.** Hodnoty fluorescence pro jednotlivé roztoky DHO obsahující 1 $\mu$ l cytosolu

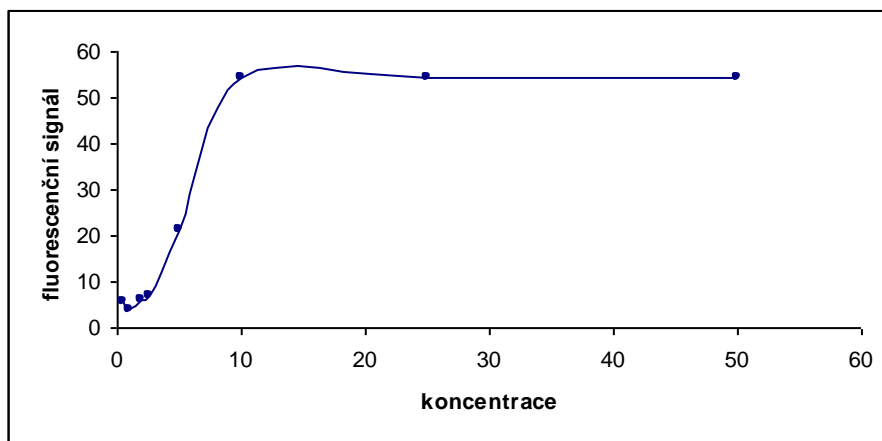
c ( $\mu$ M)	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	2,619	3,275	7,839	7,582	32,550	54,430	54,440	54,430



**Obr. 18.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 1 $\mu$ l cytosolu.

**Tab. 10.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé koncentrace DHO s 2  $\mu$ l cytosolu.

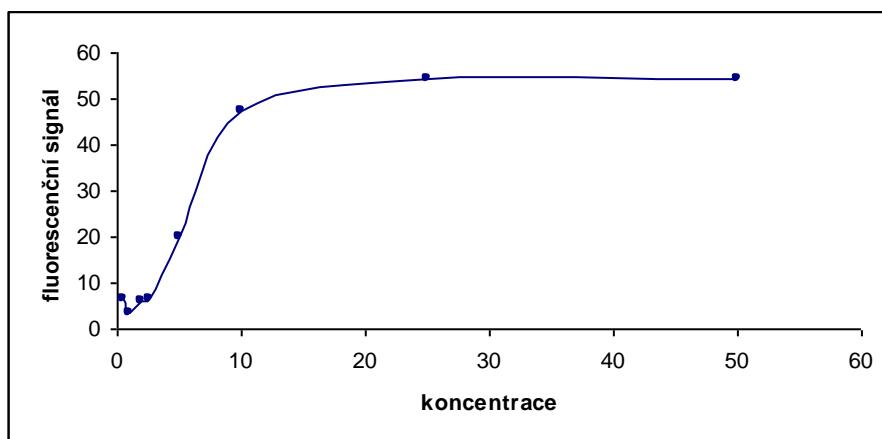
c ( $\mu$ M)	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	5,529	3,932	6,077	7,134	21,310	54,370	54,210	54,400



**Obr. 19.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 2  $\mu$ l cytosolu.

**Tab. 11.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 5  $\mu$ l cytosolu.

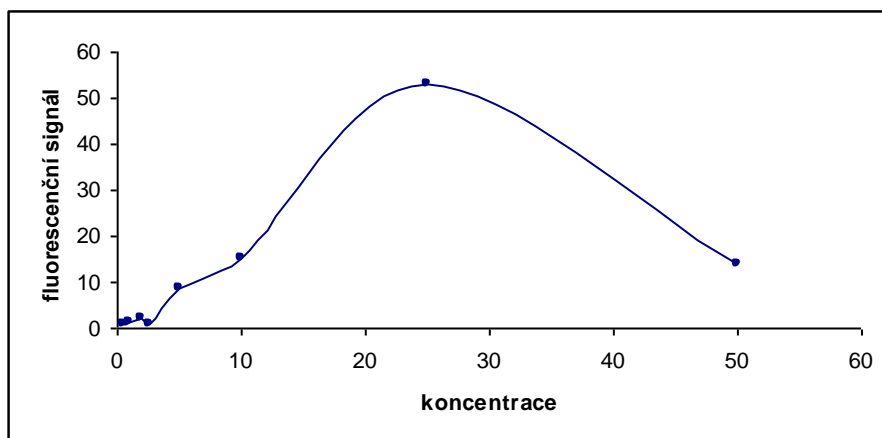
c ( $\mu$ M)	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	6,564	3,689	6,175	6,643	19,910	47,360	54,430	54,270



**Obr. 20.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 5  $\mu$ l cytosolu.

**Tab. 12.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 10  $\mu\text{l}$  cytosolu.

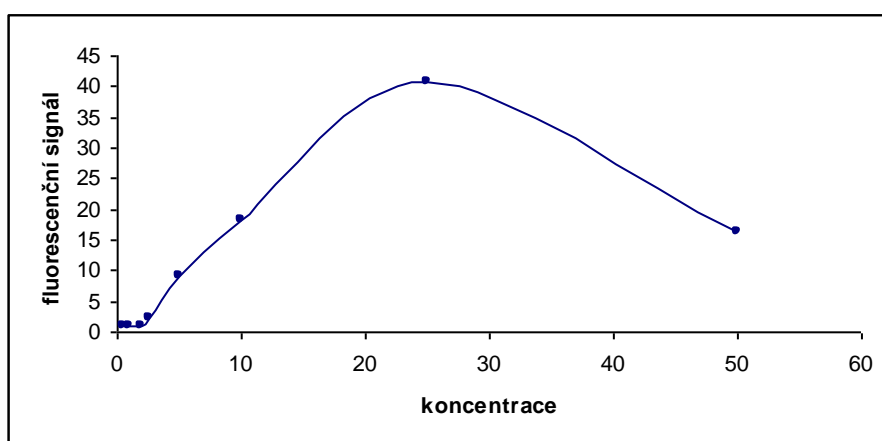
c ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	0,694	1,492	2,276	0,865	8,569	15,080	52,870	13,760



**Obr. 21.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 10  $\mu\text{l}$  cytosolu.

**Tab. 13.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 20  $\mu\text{l}$  cytosolu.

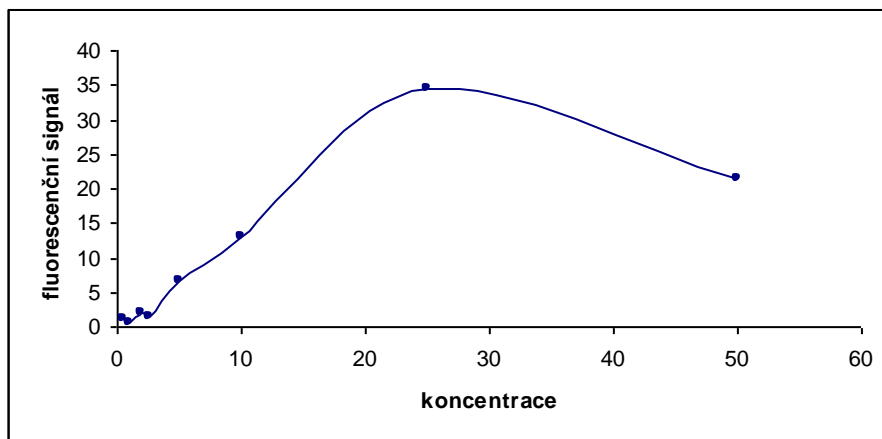
c ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	0,850	1,092	1,116	2,419	9,262	18,160	40,630	16,180



**Obr. 22.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO pro přidání 20  $\mu\text{l}$  cytosolu.

**Tab. 14.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 30  $\mu\text{l}$  cytosolu.

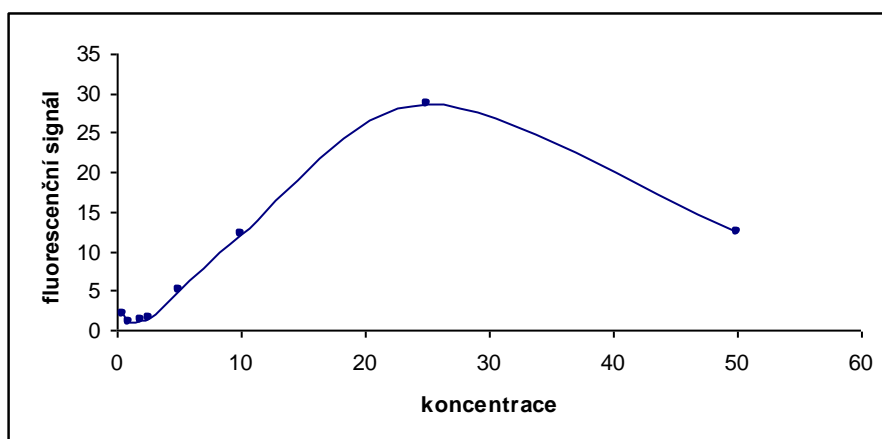
c ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	1,053	0,671	2,025	1,497	6,672	13,170	34,600	21,440



**Obr. 23.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 30  $\mu\text{l}$  cytosolu.

**Tab.15.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 40  $\mu\text{l}$  cytosolu.

c ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	2,116	1,140	1,369	1,545	4,978	12,130	28,710	12,380

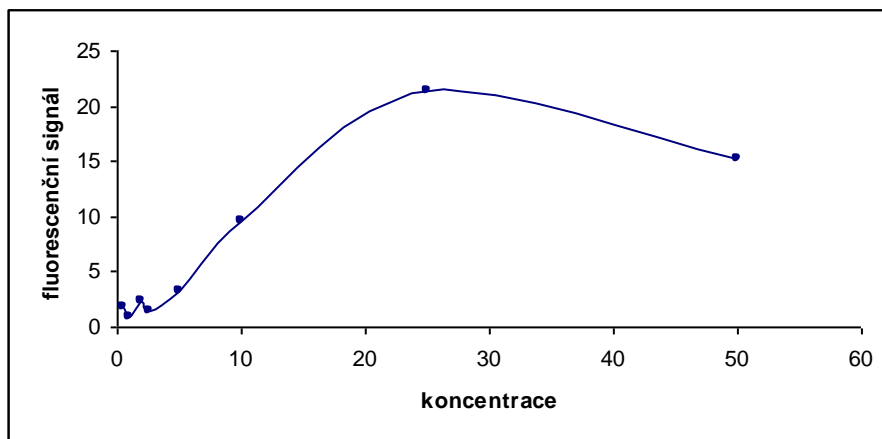


**Obr. 24.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 40  $\mu\text{l}$  cytosolu.



**Tab. 16.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 50  $\mu$ l cytosolu.

<b>c (<math>\mu</math>M)</b>	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
<b>signál</b>	1,796	0,840	2,334	1,393	3,178	9,668	21,450	15,280



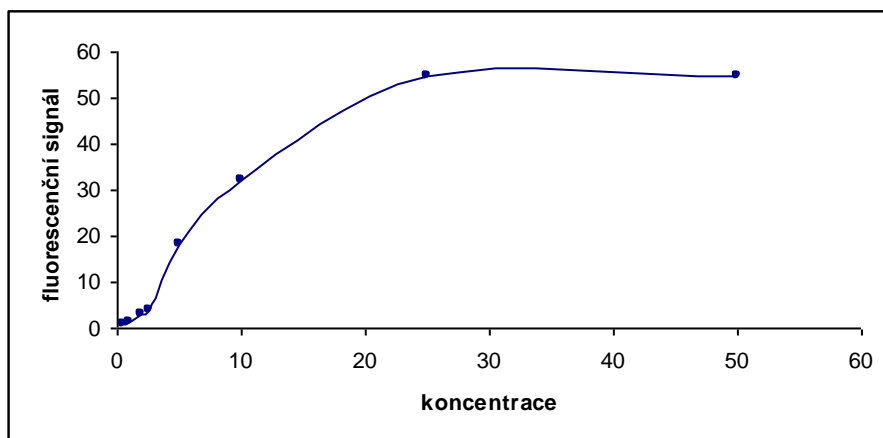
**Obr. 25.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 50  $\mu$ l cytosolu.

### 5.5.2. Vliv mikrosomů

Výsledky testování vlivu mikrosomální suspenze na intenzitu fluorescence dihydroracinu jsou uvedeny v tabulkách 17 – 24 a na obrázcích 26 - 33.

**Tab. 17.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 1  $\mu$ l mikrosomů.

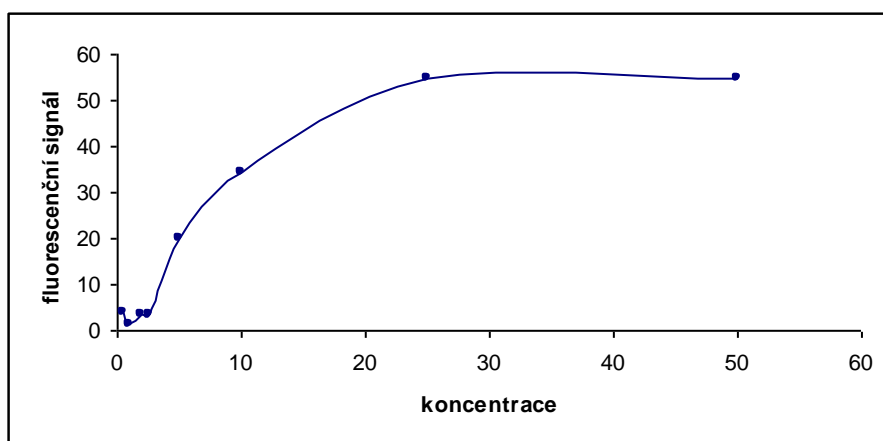
<b>c (<math>\mu</math>M)</b>	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
<b>signál</b>	0,925	1,356	2,922	4,027	18,390	32,350	54,940	54,900



**Obr. 26.** Závislost int. fluorescence na koncentraci DHO pro přidání 1 µl mikrosomů.

**Tab. 18.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 2 µl mikrosomů.

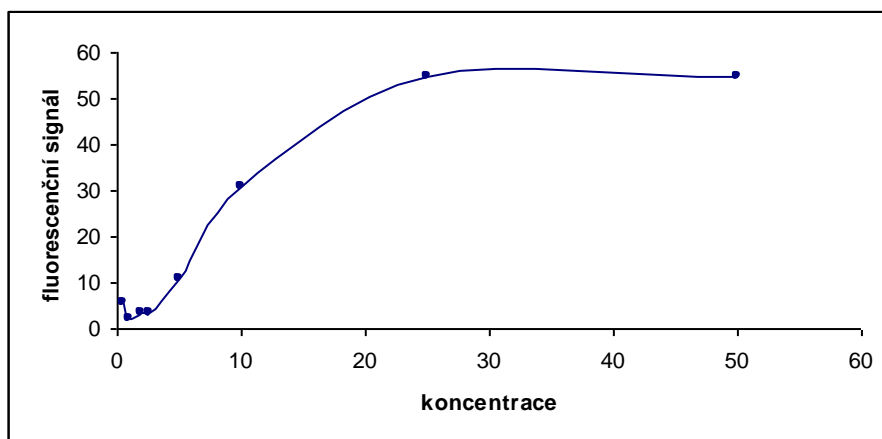
c (µM)	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	4,022	1,420	3,297	3,420	20,190	34,230	54,930	54,930



**Obr. 27.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 2 µl mikrosomů.

**Tab. 19.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 5  $\mu\text{l}$  mikrosomů.

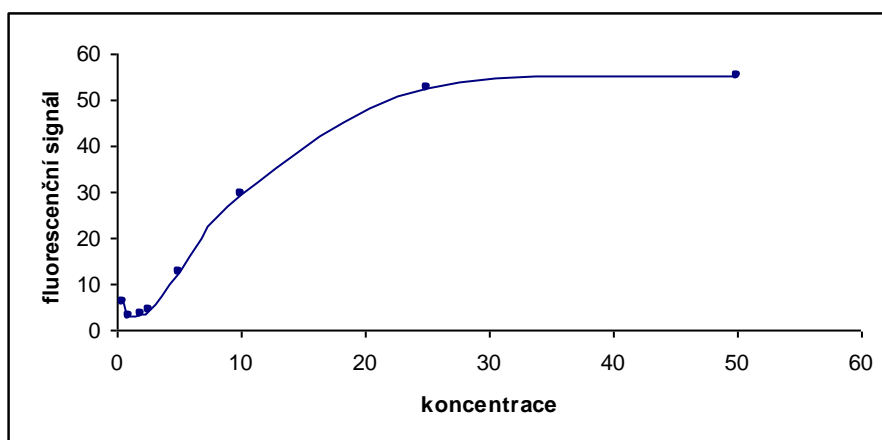
c ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	5,800	2,306	3,615	3,691	10,850	30,700	54,930	54,830



**Obr. 28.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 5  $\mu\text{l}$  mikrosomů.

**Tab. 20.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 10  $\mu\text{l}$  mikrosomů.

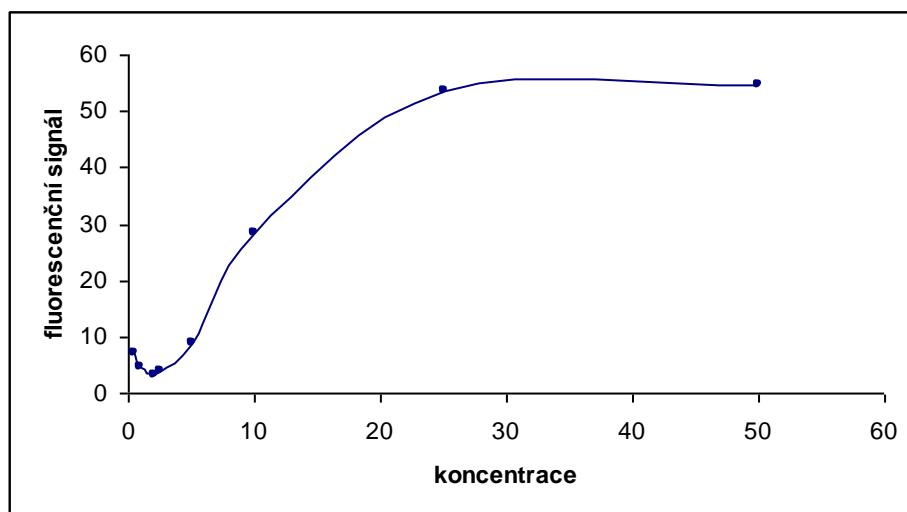
c ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	5,945	3,246	3,352	4,290	12,640	29,730	52,76	55,13



**Obr. 29.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 10  $\mu\text{l}$  mikrosomů.

**Tab. 21.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro roztoky DHO po přidání 20  $\mu\text{l}$  mikrosomů.

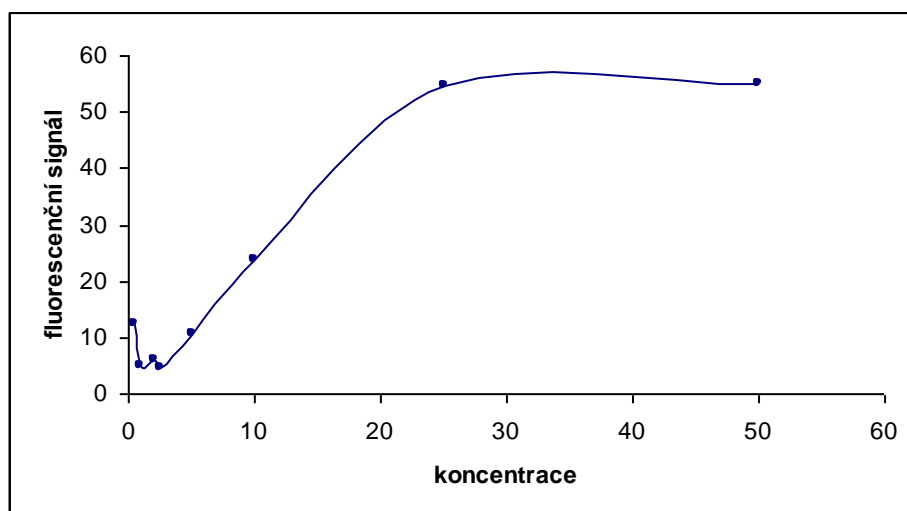
c ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	7,149	4,441	3,110	3,754	9,015	28,570	53,660	54,730



**Obr. 30.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 20  $\mu\text{l}$  mikrosomů.

**Tab. 22.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 30  $\mu\text{l}$  mikrosomů.

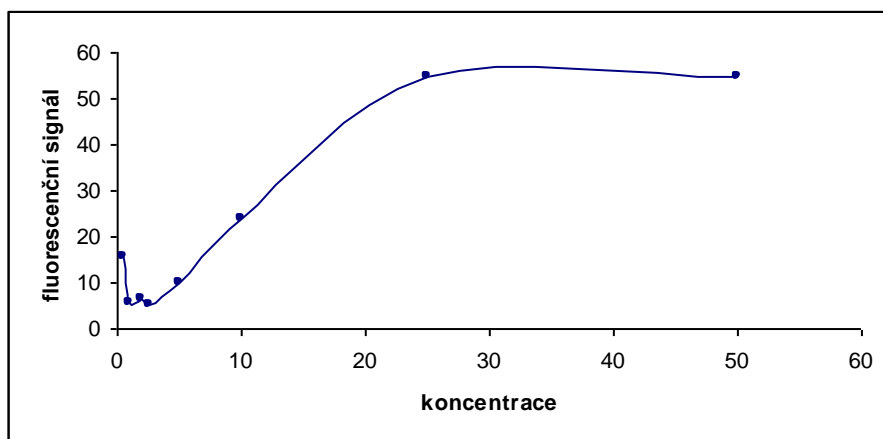
c ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	12,580	4,915	6,174	4,540	10,560	23,830	54,730	54,950



**Obr. 31.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 30  $\mu\text{l}$  mikrosomů.

**Tab. 23.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 40  $\mu$ l mikrosomů.

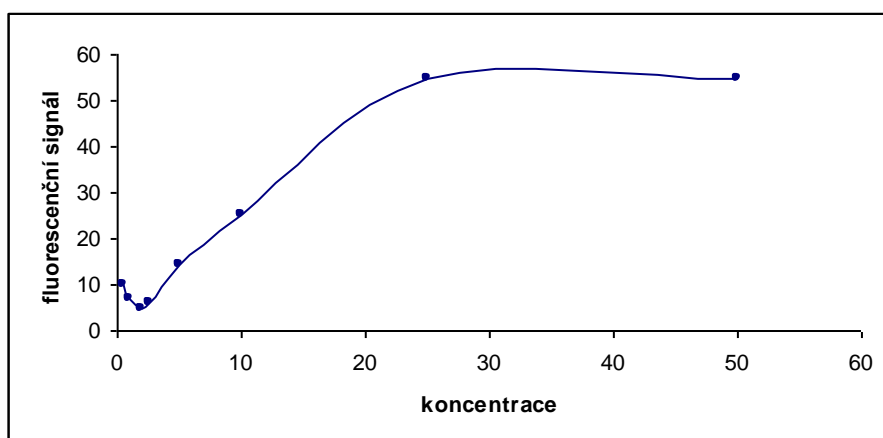
c ( $\mu$ M)	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	15,570	5,823	6,310	5,123	9,960	23,750	54,950	54,790



**Obr. 32.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 40  $\mu$ l mikrosomů.

**Tab. 24.** Hodnoty fluorescenčního signálu pro jednotlivé roztoky DHO po přidání 50  $\mu$ l mikrosomů.

c ( $\mu$ M)	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
signál	9,862	6,762	4,769	5,895	14,550	25,240	54,860	54,980



**Obr. 33.** Závislost intenzity fluorescence na koncentraci DHO po přidání 50  $\mu$ l mikrosomů.

## 6. DISKUSE

Cílem této práce bylo zjistit, zda je spektrofotometrie použitelná pro stanovení aktivity některých enzymů redukujících karbonylovou skupinu. Aktivita v tomto případě odpovídá intenzitě fluorescence produktu vznikajícího při redukci. Pro tuto studii byl vybrán dihydrooracin, metabolit vznikající enzymatickou redukcí karbonylové skupiny nového potenciálního cytostatika oracinu. Hlavním důvodem jsou jeho výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti: dobrá rozpustnost ve vodě a hlavně schopnost fluorescence.

V první fázi byla proměřena absorpční spektra zásobních roztoků dihydrooracinu a oracinu. Obě tato spektra vykazovala tři významnější maxima v přibližně podobných oblastech vlnových délek, přičemž maxima vodného roztoku dihydrooracinu odpovídala nižším hodnotám vlnových délek než absorpční maxima roztoku oracinu.

Samotné spektrofotometrické stanovení dihydrooracinu se poněkud zkomplikovalo. Původně mělo měření probíhat na spektrofotometru Perkin-Elmer, uzpůsobeném i pro použití mikrotitračních destiček, které by umožnily rychlejší analýzu při větším počtu vzorků a několikanásobně nižší spotřebu analyzovaného materiálu. Po celodenním neúspěšném měření však byla odhalena závažná porucha tohoto přístroje a bylo tedy nutné ve studii pokračovat na katedře fyzikální chemie se spektrofotometrem Aminco Bowman, zde už měření probíhalo bez větších problémů.

Proměřením excitačních a emisních fluorescenčních spekter byly získány dvě různé kombinace vlnových délek pro měření závislosti intenzity fluorescence na koncentraci dihydrooracinu: hodnota excitační vlnové délky 340 nm a emisní vlnové délky 385 nm a druhá kombinace odpovídající hodnotám excitace 359 nm a emise 408 nm. Poté byla změřena závislost intenzity fluorescence na koncentraci dihydrooracinu pro obě možné kombinace vlnových délek a byly porovnány fluorescenční signály. Na základě toho byly vybrány hodnoty pro další měření a to: vlnová délka excitace 359 nm a vlnová délka emise 408 nm, v tomto případě totiž byla intenzita fluorescence téměř dvojnásobná.

Protože při testování aktivity redukčních enzymů bude ve vzorku přítomen i nezreagovaný substrát oracin, bylo třeba zjistit jakým způsobem ovlivňuje intenzitu fluorescence dihydrooracinu a tedy i jeho spektrofotometrické stanovení. Porovnáním

naměřených závislostí bylo zjištěno, že oracin přítomný v roztoku v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  významně snižuje fluorescenční signál u řady roztoků dihydrooracinu do koncentrace 25  $\mu\text{M}$ , přičemž fluorescenční signál 50  $\mu\text{M}$  roztoku DHO zůstává nezměněný. 160  $\mu\text{M}$  oracin už snižuje intenzitu fluorescence u všech kalibračních roztoků DHO a 220  $\mu\text{M}$  množství oracinu přítomné v roztoku způsobuje snížení signálu na polovinu. Dá se tedy předpokládat, že množství oracinu vyšší než 300  $\mu\text{M}$  stanovení zcela znemožní.

Všechny předchozí kroky se soustředily pouze na měření intenzity fluorescence čistého vodného roztoku dihydrooracinu, což není pro prokázání použitelnosti spektrofluorimetrie pro stanovení aktivity enzymů dostatečné. Bylo tedy nutné posoudit vliv biologického materiálu, v tomto případě jaterního cytosolu a mikrosomů. Získané výsledky se navzájem dosti lišily. Zatímco u 0,5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  roztoků DHO velmi malé množství cytosolu (do 5  $\mu\text{l}$ ) vyvolalo zvýšení fluorescenčního signálu, u ostatních roztoků s vyšší koncentrací DHO k výraznější změně intenzity fluorescence nedošlo. Po přidání většího množství cytosolu (10  $\mu\text{l}$  – 50  $\mu\text{l}$ ) už docházelo ke značnému snížení fluorescenčního signálu s výraznějším poklesem u roztoků dihydrooracinu o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ . V případě mikrosomů byl opět pozorován vzestup hodnot fluorescenčního signálu u 0,5  $\mu\text{M}$  roztoků dihydrooracinu, hodnoty intenzity fluorescence u ostatních kalibračních roztoků dihydrooracinu však nebyly příliš ovlivněny ani po přidání 50  $\mu\text{l}$  mikrosomů.

Ze získaných výsledků tedy vyplynulo, že při spektrofluorimetrickém stanovení množství dihydrooracinu v biologickém materiálu je výhodné využít pro měření excitační a emisní vlnové délky při kterých je intenzita fluorescence nejvyšší, což umožní stanovení DHO i v přítomnosti poměrně vysokého množství oracinu, který snižuje fluorescenční signál. Vliv biologického materiálu je nejednotný, závisí ve velké míře na koncentraci dihydrooracinu v roztoku, což je třeba brát při měření v úvahu.

## 7. ZÁVĚR

Tato studie, jejímž cílem bylo zjistit možnosti využití spektrofluorimetrické metody pro stanovení aktivity reduktas oracinu v mikrosomální a cytosolické frakci jaterního homogenátu, přinesla řadu výsledků. Po jejich zpracování a vyhodnocení jsem dospěla k těmto závěrům:

- Nejvýhodnější nastavení vlnových délek pro spektrofluorimetrické stanovení dihydrooracinu je: vlnová délka excitace 359 nm a vlnová délka emise 408 nm. Při těchto hodnotách je fluorescenční signál nejvyšší.
- Přítomnost oracinu v analyzovaném vzorku způsobuje snížení fluorescenčního signálu dihydrooracinu. Při koncentraci oracinu vyšší než 300  $\mu\text{M}$  již množství dihydrooracinu spolehlivě stanovit nelze.
- Vliv biologického materiálu na intenzitu fluorescence dihydrooracinu je nejednoznačný. Zatímco mikrosomy stanovení významněji neruší, cytosol způsobuje výrazné snížení fluorescenčního signálu.
- Spektrofluorimetrické stanovení dihydrooracinu by bylo možné využít pro testování aktivit mikrosomálních redukčních enzymů při volbě konstantní koncentrace substrátu oracinu přibližně do 150  $\mu\text{M}$ .



## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AKR	aldo/ketoreduktasy
DHO	dihydrooracin
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
MDR	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem

## 9. LITERATURA

- Allan, D., Lohnes, D.: Cloning and developmental expression of mouse aldehyde reductase (AKR1A4), *Mech. Develop.*, 94, 2000, 271-275
- Barski, O. Al, Gabbay, K. H., Bohren, K. M.: Aldehyde reductase: Catalytic mechanism and substrate recognition. In: *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 6*, edited by Weiner et al., (Plenum Press, New York), 1996b, 443-450
- Bezáková, Ž. et al.: *Základy farmaceutické analýzy*, Vaprint, 2002
- Felsted, R. L., Bachur, N. R.: Mammalian carbonyl reductases, *Drug Metab. Rev.*, 11, 1980, 1 – 60
- Fišar, Z.: Principy fluorescenční spektroskopie, <http://www1.lf1.cuni.cz/%Ezffisar/fluorescence/default.htm>, 2004
- Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. F., Lewis, M. and Penning, T. M.: Komparative anatomy of the aldo/keto reductase superfamily. *Biochem. J.*, 326, 1997b, 625 – 636
- Jez, J. M., Penning, T. M.: The aldo/keto reductase (AKR) superfamily: an update, *Chem.-Biol. Interact.*, 130 – 132, 2001, 499 – 525
- Kawamura, M., Eisenhofer, G., Kopin, I. J., Kador, P. F., Lee, Y. S., Tsai, J. Y., Fujisawa, S., Lizak, M. J., Sinz, A., Sato, S.: Aldose reductase, a key enzyme in the oxidative deamination of norepinephrine in rats, *Biochem. Pharmacol.*, 58, 1999, 517-524
- Klouda, P.: *Moderní analytické metody*, 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2

- Maser, E., Oppermann, U. C. T.: The 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action, *Eur. J. Biochem.*, 249, 1997, 365-369
- Maser, E.: Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. *Biochem. Pharmacol.*, 49, 1995, 421 – 434
- Mělka, M.: Oracin – preclinical summary report of the research institute for pharmacy and biochemistry. Prague, Czech republic, 1993.
- Miko, M., Poturnajova, M. and Soucek, R.: Cytotoxicity and mode of action of the potential cytostatic drug oracin. *Neoplasma*, 49, 2002. 167 – 1671
- Ohara, H., Miyabe, Y., Deyashiki, Y., Matsuura, K., Hara, A.: Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver, *Biochem. Pharmacol.*, 50, 1995, 221-227
- Oppermann, U. C. T., Maser, E.: Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology*, 144, 2000, 71 – 81
- Seo, H. G., Nishinaka, T., Yabe-Nishimura, Ch.: Nitric oxide up-regulates aldose reductase expression in rat vascular smooth muscle cells: A potential role for aldose reductase in vascular remodeling, *Molec. Pharmacol.*, 57, 2000, 709-717
- Skoog, D. A., West, D. M., Holer, F. J.: *Fundamentals of analytical chemistry*, 7th edition, Saunders college publishing, 1997
- Szotáková, B., Skálová, L., Jílek, P., Buchta, V. and Wsól, V.: Stereospecific reduction of the original anticancer drug oracin in rat extrahepatic tissues. *J. pharm. Pharmacol.*, 55, 2003, 1003 – 1009

- Szotáková, B., Skálová, L., Wsól, V. and Kvasničková, E.: Reduction of the potencial anticancer drug oracin in the rat liver in vitro. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52, 2000, 495 – 500
- Szotáková, B., Wsól, V., Skálová, L. and Kvasničková, E.: Role of cytochrome P4501A in biotransformation of the potenciál anticancer drug oracin. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 51, 1999, 428 – 431
- Szotáková, B., Wsól, V., Trejtnar, F., Skálová, L. and Kvasničková, E.: Studies on the metabolism of the potencial cytostatic drug oracin. Species differences. *Exp. Toxic. Pathol.*, 48 suppl. II, 1996, 377 – 380
- Testa, B.: The nature and functioning of cytochromes P450 and flavincontaining monooxygenases. In: *The metabolism of druha and other xenobiotics. Biochemistry of redox reactions*, editet by Testa B. and Caldwell J., (Academic Press, London), 1995, 41-64, 70-121, 398-399
- Wsól, V., Kvasničková, E., Szotáková, B. and Hais, I. M.: HPLC assay for the separation and characterization of metabolites of the potencial cytostatic drug oracin. *J. chromatogr. B*, 681, 1996, 169 – 175
- Wsól, V., Szotáková, B., Skálová, L., Cepková, H. and Kvasničková, E.: The main metabolit pathway of oracin, a new potencial cytostatic drug in human liver microsomes and cytosol: stereoselectivity of reoxidation of the principal metabolite 11-dihydrooracin to oracin. *Enantiomer*, 5, 2000, 263 – 270
- Wsól, V., Szotáková, B., Skálová, L., Maser, E.: Contribution of aldo/keto reductases to the metabolism of the novel anticancer drug oracin in man. In: *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 12*, (eds) Weiner H., Plapp B., Lindahl R., Maser E., Purdue University Press, West Lafayette, Indiana (2005) 249-255