

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra biochemických věd

**Využití tkáňových řezů při studiu  
biotransformace xenobiotik**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Kateřina Lněničková

**Prohlášení**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové

Kateřina Lněničková

### **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala vedoucí diplomové práce Doc. Ing Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícný přístup při řešení dané práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Haně Bártíkové, Ph.D. za pomoc a rady v experimentální části práce. Dále bych chtěla poděkovat všem členům katedry biochemických věd za ochotu pomoci a poradit.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

Kandidát: Kateřina Lněničková

Školitel: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití tkáňových řezů při studiu biotransformace xenobiotik

Tkáňové řezy jsou unikátním *in vitro* modelem. Zachování architektury tkáně jim poskytuje výhodu, které v buněčných suspenzích nemůže být docíleno. Zároveň mají menší nároky na počet potřebných laboratorních zvířat než perfundované orgány. Využití tkáňové řezy našly především v biochemických, toxikologických, fyziologických a farmakologických studiích. Cílem diplomové práce bylo zavedení optimálních podmínek pro přípravu a inkubaci řezů. Pro účel testování byla používána játra a tenké střevo potkana laboratorního (*Rattus norvegicus*, kmen *Wistar*). Pro sledování životnosti řezů byly testovány tři metody – MTT test, NR-test a aktivita laktátdehydrogenasy (LDH). Metoda sledování úniku LDH do média poskytla nej přesnější hodnoty a byla upřednostněna u všech následných experimentů. Životnost řezů po 24 h byla velmi nízká. Specifická aktivita glutathion-S-transferasy stanovená ve střevních řezech byla nízká a po 24 h došlo k významnému poklesu. Aktivita UDP-glukuronosyltransferasy byla úspěšně stanovena pouze v jaterních řezech a střevních plátcích. Žádná z isoformů cytochromu P450 (1A1, 1A2, 3A, 2B) nebyla detekována. Jako nejlepší inkubační systém se ze získaných výsledků jeví jeden 210  $\mu\text{m}$  tlustý jaterní řez s průměrem 8 mm v jedné jamce 24 jamkové destičky ponořený v 0,5 ml inkubačního média. Pro střevní řezy (350  $\mu\text{m}$  i 400  $\mu\text{m}$  tlusté) je vhodným inkubačním systémem 24 jamková deska s 0,5 ml média a s 3 řezy v každé z jamek.

# ABSTRACT

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Kateřina Lněničková

Supervisor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of diploma thesis: The use of tissue slices in xenobiotic biotransformation studies

Precision-cut tissue slices are a unique *in vitro* model. Maintaining the tissue architecture gives them an advantage that can not be achieved in cell suspensions. They are also less demanding for number of required laboratory animals than perfused organs. The tissue slices are used mainly in biochemical, toxicological, physiological and pharmacological studies. The aim of this project was to establish optimal conditions for preparation and incubation of precision-cut tissue slices. The liver and small intestine of laboratory rats (*Rattus norvegicus*, Wistar strain) were used for tissue slices preparation. Three methods of monitoring of tissue slices viability were tested - MTT assay, NR-assay and the activity of lactate dehydrogenase (LDH). Monitoring of LDH leakage into the medium provided the most accurate values and this method was used in all subsequent experiments. Viability of slices after 24 h was very low. Specific activity of glutathione S-transferase detected in the intestinal slices was low and there was a significant decline after 24 h. UDP-glucuronosyl transferase activity was successfully detected only in liver slices and intestinal punches. None of cytochrome P450 isoforms (1A1, 1A2, 3A, 2B) was detected. From our results, one liver slice (210 micron thick and 8 mm diameter) per one well in 24-well plates (each well contains 0.5 ml of incubation medium) was the best incubation system for liver tissues. Appropriate incubation system for intestinal slices (350 micron or 400 micron thick) is a 24-well plate, each well contains three intestinal slices and 0.5 ml of the medium.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Tkáňové řezy</b>	<b>9</b>
2.1.1	Vývoj techniky pro tkáňové řezy	9
2.1.2	Obecné možnosti využití tkáňových řezů	10
2.1.3	Požadavky na tvorbu kvalitního tkáňového řezu	11
2.1.3.1	Tloušťka řezů	11
2.1.3.2	Vhodný tvar	11
2.1.3.3	Udržovací médium	12
2.1.3.4	Pravidla získávání živočišných tkání pro tvorbu řezů	13
2.1.4	Preinkubace orgánových řezů	13
2.1.5	Inkubace orgánových řezů	13
2.1.5.1	Dynamická orgánová kultivace	14
2.1.5.2	Inkubace v jamkových destičkách	14
2.1.5.3	Jiné systémy inkubace	14
2.1.6	Homogenizace	15
2.1.7	Životaschopnost řezů	15
2.1.8	Nejčastěji studované tkáně	15
2.1.8.1	Ledviny	15
2.1.8.2	Plíce	16
2.1.8.3	Játra	16
2.1.8.4	Tenké a tlusté střevo	17
2.1.9	Sledování životnosti buněk tkáňových řezů	18
2.1.9.1	Měření aktivity laktátdehydrogenasy	18
2.1.9.2	MTT test	19
2.1.9.3	Neutrální červeně	19
<b>2.2</b>	<b>Biotransformace xenobiotik</b>	<b>20</b>
2.2.1	I. Fáze biotransformace	21
2.2.1.1	Enzymy redukující karbonylovou skupinu	21
2.2.1.2	Cytochrom P450	22
2.2.2	II. Fáze biotransformace	24
2.2.2.1	UDP-glukuronosyltransferasa	24
2.2.2.2	Glutathion-S-transferasa	24
2.2.3	III. Fáze biotransformace	25
<b>2.3</b>	<b>Látky testované na tkáňových řezech</b>	<b>26</b>
2.3.1	Urinal Akut®	26
2.3.1.1	Anthokyaniny	26
2.3.1.2	Proanthokyanidiny	28
2.3.2	Doxorubicin	30
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemikálie, přístroje, biologický materiál</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Pracovní postupy</b>	<b>35</b>
4.2.1	Příprava ultratenkých tkáňových řezů	35
4.2.1.1	Příprava ultratenkých řezů z potkaních jater	36
4.2.1.2	Příprava ultratenkých řezů z potkaních střev	36

4.2.2	Preinkubace .....	37
4.2.3	Optimalizace inkubace jaterních řezů bez ovlivnění jejich funkce.....	37
4.2.4	Inkubace s doxorubicinem .....	38
4.2.5	Inkubace tkáňových řezů s Urinalem Akut® .....	38
4.2.5.1	Inkubace jaterních řezů s Urinalem Akut® .....	38
4.2.5.2	Inkubace střevních plátků s Urinalem Akut® .....	39
4.2.5.3	Inkubace střevních řezů s Urinalem Akut® .....	39
4.2.6	Uchovávání tkáňových řezů.....	39
4.2.7	Příprava subcelulárních frakcí z tkáňových řezů .....	39
4.2.8	Stanovení koncentrace bílkoviny .....	40
4.2.9	Stanovení životnosti tkáňových řezů .....	41
4.2.9.1	Stanovení laktátdehydrogenasy u tkáňových řezů .....	41
4.2.9.2	Test cytotoxicity - Neutral Red uptake test .....	43
4.2.9.3	Test cytotoxicity - MTT test .....	43
4.2.10	Stanovení enzymů I. fáze biotransformace u tkáňových řezů.....	44
4.2.10.1	Stanovení aktivity isoformem cytochromu P450 .....	44
4.2.11	Stanovení enzymů II. fáze biotransformace u tkáňových řezů.....	46
4.2.11.1	Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy .....	46
4.2.11.2	Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy .....	47
4.2.12	Kvantifikace proteinu GST a CBR1 při ovlivnění tkáňových řezů .....	49
4.2.12.1	Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu .....	49
4.2.12.2	Imunobloting.....	52
4.2.12.3	Detekce – barvení blotu s protilátkou.....	52
4.2.12.4	Chemiluminiscenční detekce .....	54
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>Optimalizace tvorby tkáňových řezů.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2</b>	<b>Odezva jaterních řezů na cytotoxickou látku .....</b>	<b>56</b>
5.2.1	Vliv doxorubicinu - první experiment.....	56
5.2.2	Vliv doxorubicinu - druhý experiment.....	58
<b>5.3</b>	<b>Hodnocení životnosti střevních řezů .....</b>	<b>60</b>
<b>5.4</b>	<b>Ovlivnění Urinalem Akut® .....</b>	<b>61</b>
5.4.1	Hodnocení cytotoxicity .....	61
5.4.1.1	Ovlivnění jaterních řezů .....	61
5.4.1.2	Ovlivnění střevních plátků .....	62
5.4.1.3	Ovlivňování střevních řezů.....	63
5.4.2	Hodnocení metabolické aktivity .....	65
5.4.2.1	Ovlivnění enzymů I. fáze biotransformace.....	65
5.4.2.2	Ovlivnění enzymů II. fáze biotransformace.....	65
<b>5.5</b>	<b>Detekce proteinu GST a CBR1 v ovlivněných tkáňových řezech .....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>77</b>

# 1 ÚVOD

Z důvodů etických, ekonomických i legislativních byl a stále je poháněn vývoj nových *in vitro* metod spolu se zdokonalováním těch stávajících. Jejich úkolem je poskytnutí úplnějších a přesnějších dat z oblastí jako je biochemie, farmakologie, fyziologie a toxikologie. Tak vznikla široká paleta nejrůznějších metod od perfundovaných orgánů po subcelulární frakce. V osmdesátých letech dvacátého století C. L. Krumdieck navrhl plně automatizovaný mikrotom pro přípravu nepoškozených řezů z čerstvé tkáně s přesně definovanou tloušťkou.

Rozšíření této metody do celého světa proběhlo velice rychle. V současné době je často využívána pro své výhody, které výzkumníkům poskytuje. V první řadě tvorba ultratenkých řezů vyhovuje etickým požadavkům, neboť je redukován počet pokusných zvířat. Další výhodou představuje snížení finančních nákladů, zachování architektury tkáně a přetrvání mezibuněčné komunikace.

Cílem této diplomové práce bylo zavedení metody tkáňových řezů pro další experimenty. Hlavním požadavkem bylo stanovení optimálních parametrů, které udrží funkčnost dané tkáně co nejdéle. Jednalo se o délku inkubace, množství inkubačního média na jeden řez, systém inkubace a rozměry samotného řezu. Pro hodnocení životnosti tkáňových řezů a jejího ovlivnění testovanými látkami bylo nezbytné upravit metodiku cytotoxických testů. Jaterní tkáň prošla procesem optimalizace jako první. V druhé části diplomové práce byla pozornost zaměřena na tkáň tenkého střeva.

Metabolická aktivita byla hodnocena v jaterních i střevních řezech. Z enzymů I. fáze biotransformace byla stanovována aktivita cytochromu P450 a hodnocen byl i obsah karbonylreduktasy 1. Specifická aktivita byla určena u UDP-glukuronosyltransferasy a glutathion-S-transferasy, tedy enzymů II. fáze biotransformace.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Tkáňové řezy

Predikce metabolismu xenobiotik a jejich toxických účinků v rané fázi vývoje léčivých látek zůstává zásadním problémem. Pravidlo tří R (Replace, Refine, Reduce) vytvořené Russellem a Burchem (1959) zvýšilo zájem o vývoj *in vitro* metody, dovolující mezidruhovou aplikaci. V souvislosti s tím byl Pracovní seminář 20 Evropského centra pro validaci alternativních metod (ECVAM) věnován použití tkáňových řezů pro farmakotoxikologické studie a potvrdil jejich významnost (Morin et al. 2013).

#### 2.1.1 Vývoj techniky pro tkáňové řezy

Vývoj prvních metod pro *in vitro* zkoumání tkáňových řezů začal ve dvacátých letech dvacátého století. V počátcích byla nejužívanější tzv. "free hand" metoda, jejímž principem je krájení tkáně uložené ve speciální matrici. Následovalo vytvoření jednodušších mikrotonů jako byl Stadie-Riggs mikroton, jehož pomocí se daly získat řezy tlusté 0,5 mm. Použitím těchto technik však bylo obtížné získat reprodukovatelná data. Ani životnost nebyla dostatečná pro dlouhodobé experimenty. Navzdory těmto limitujícím skutečnostem byly tkáňové řezy široce využívány. Jako materiál pro jejich přípravu sloužily tkáně různých orgánů (mozek ledviny, játra, plíce, srdeční a hladká svalovina, lymfatické tkáně, placenta, mléčná žláza, nadledviny, štítná žláza i tkáně trávicího traktu). Pro získání cenných biochemických, fyziologických, toxikologických a farmakologických dat mohl být zdroj zkoumaných tkání člověk, primát, všechna laboratorní i domácí zvířata a některé exotické druhy (Bach et al. 1996).

Plně automatizované, přesné a spolehlivé kráječe, které byly schopné připravit tkáňové řezy pro reprodukovatelné metabolické studie, začaly být využívány teprve nedávno. V osmdesátých letech minulého století C. L. Krumdieck navrhl plně automatizovaný mikroton (Obr. 1) pro přípravu nepoškozených, velmi tenkých nativních řezů. Od tohoto objevu došlo již k řadě vylepšení (Červenková et al. 2001).



Obr. 1: Krumdieck Tissue Slicer - Model MD4000

### **2.1.2 Obecné možnosti využití tkáňových řezů**

V současné době jsou tkáňové řezy používány pro metabolické studie přírodních i syntetických látek. Hlavní zájem je zaměřen na játra, neboť se jedná o tkáň s nejvyšší metabolickou aktivitou v těle. Své využití tkáňové řezy našly i ve studiu orgánové fyziologie. Poskytují výbornou příležitost sledovat efekty parakrinních a autokrinních stimulů. V klinické praxi získaly uplatnění jako diagnostická technika při orgánových transplantacích (Červenková et al. 2001).

Výhody tkáňových řezů:

- Redukce množství potřebných laboratorních zvířat.
- Udržování vyšší úrovně biologické organizace, která může lépe odrážet reakci cílového orgánu.
- Zachování diferencovaného stavu umožňuje komunikaci mezi buňkami i jejich interakci s matrix.
- Funkční heterogenita kultivované tkáně, která může být lépe zachována v tkáňových řezech.
- Není potřeba použít proteolytické enzymy (které jsou obvykle užívány k izolaci buněk) a díky tomu nedochází k trávení důležitých bílkovin na povrchu buněk.

### **2.1.3 Požadavky na tvorbu kvalitního tkáňového řezu**

Optimální příprava a inkubace orgánových řezů je základem pro udržení jejich životaschopnosti a funkčnosti. Je důležité připravit řezy se správnou tloušťkou, ve vhodném médiu a dodržet podmínky vhodné inkubace.

#### **2.1.3.1 Tloušťka řezů**

Významným faktorem ovlivňujícím životaschopnost tkáňových řezů je jejich tloušťka. Pokud je tento parametr správně zvolený, jsou řezy schopny přežít několik hodin až dní. Při přípravě příliš tenkých řezů (méně než 100  $\mu\text{m}$ ) dochází k výraznému poškození povrchu a řezy se trhají. Naopak u příliš tlustých řezů (více jak 500  $\mu\text{m}$ ) dochází vlivem kyslíkové deprivace v jejich centru k vytvoření skupiny mrtvých buněk. Vhodně zvolená tloušťka spolu s patřičně syćeným médiem zabezpečují přístup dostatečného množství kyslíku ke všem buňkám v řezu (Krumdieck 2013).

#### **2.1.3.2 Vhodný tvar**

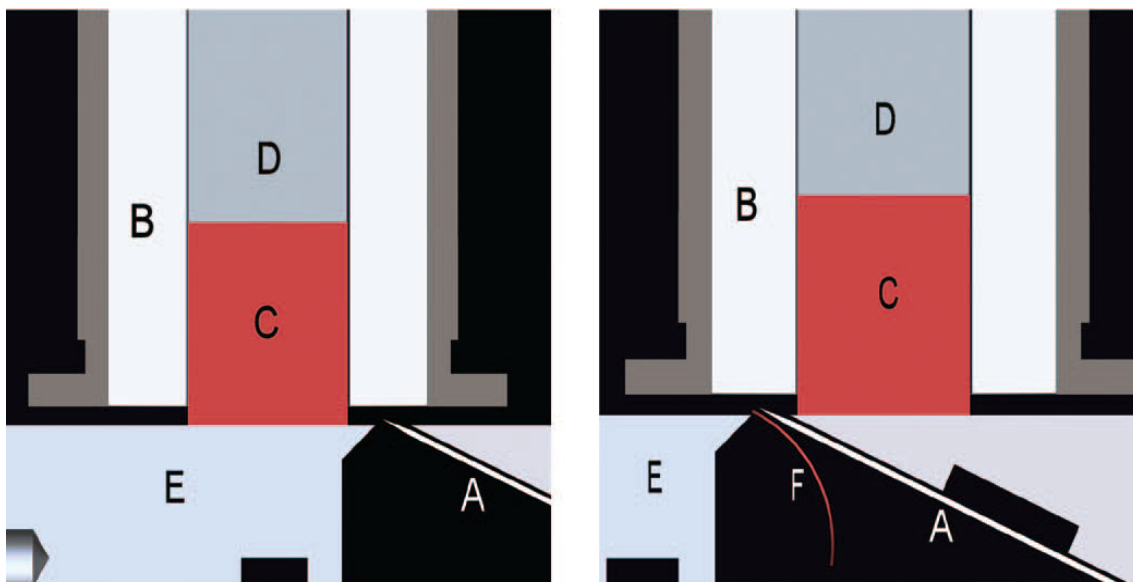
Pro zkoumání a porovnávání výsledků je nezbytná uniformita geometrie řezů. Tkáňový kráječ tedy musí být schopen tvořit řezy odpovídajícího tvaru a rozměrů. Tento problém je vyřešen tvorbou cylindrického jádra vykrojeného z tkáně pomocí specifického tvořítka s daným průměrem. Vhodný průměr byl zjišťován metodou pokus-omyl. Standardní průměr válečku je 8 mm, ale k dispozici jsou průměry 3, 5 a 10 mm. Všechny tkáňové válečky by měly být uchovávány na ledu v chladném izotonickém roztoku (Fisher, Vickers 2013). Tkáňový váleček je poté vložen do otvoru stejného průměru a imobilizován vyváženým pístem. To zabezpečuje jednotný tvar a tloušťku řezů (Krumdieck 2013).

Pro vytvoření co nejpřesnějšího válečku tkáně, byl navržen speciální přístroj. Základem jeho konstrukce je laboratorní vrtačka s ostrou železnou trubicí (požadovaného průměru) umístěnou uprostřed. Tato trubice je schopná rotovat při různých rychlostech ponořená do chlazeného izotonického roztoku (Krumdieck 2013).

### 2.1.3.3 Udržovací médium

Významným faktorem pro vytvoření kvalitního tkáňového řezu je fyziologické izotonické médium. Chrání tkáň před změnami tonicity a zajišťuje dostatečnou lubrikaci tkáně, což snižuje její poškození hrozící během celého procesu krájení. Výhodou je i možnost udržovat teplotu na 2 až 4°C a tím minimalizovat poškození navozené hypoxií. Vodné prostředí je výhodné i z hlediska manipulace s právě vytvořenými řezy, které mohou být jemně přesunuty do zásobní nádoby pomocí mírného proudu média. Řezy se tak nehromadí v blízkosti ostří a nepoškodí se (Krumdieck 2013).

Mechanismus tvorby tkáňového řezu na přístroji Krumdieck live tissue microtome je uveden na obrázku 2.



Obr. 2: Tvorba tkáňového řezu na přístroji Krumdieck live tissue microtome. Mechanismus zahrnuje: (A) ostří kráječe, (B) pevný držák tkáně, (C) tkáňový váleček, (D) tkáňový píst, (E) pevná deska kráječe, (F) tkáňový řez.

Vertikálně uložený váleček tkáně (C) je jemně přitlačován k desce (E) pístem (D). Celý tkáňový váleček je propojen s ramenem, které s ním pohybuje přes oscilující ostří (A) uložené pod úhlem 20° (Krumdieck 2013).

#### **2.1.3.4 Pravidla získávání živočišných tkání pro tvorbu řezů**

Upřednostňovanou technikou je hypotermie orgánu v chladném izotonickém médiu. Tato metoda vyžaduje, aby orgány nebyly vystaveny ischemii při tělní teplotě, a byly okamžitě po usmrcení zvířete přeneseny do chladného uchovávacího média. I při rychlé manipulaci dochází časem k pomalým biodegradačním procesům jako je hromadění kyseliny mléčné, snížení buněčného pH, proteolýza, lipolýza a peroxidace lipidů. Doba uchovávání v těchto podmínkách je tedy omezena a může se lišit u jednotlivých živočišných druhů (Fisher, Vickers 2013).

#### **2.1.4 Preinkubace orgánových řezů**

Při inkubacích kratších jak 6 hodin je vyžadována preinkubace ve finálním médiu bez testovaných látek za podmínek inkubace. Pokud je kultivační čas v rozsahu 6-12 hodin je tato preinkubace doporučena. Preinkubace může trvat 30 minut až 2 hodiny a jejím účelem je odstranění odumřelých buněčných zbytků vzniklých během celého procesu tvorby tkáňového řezu (Fisher, Vickers 2013).

Podle Petera H. Bacha (1996) je preinkubace nutná vždy, neboť většina inkubačních médií má rovnováhu iontů odlišnou od chladného uchovávacího média. Dalším uváděným důvodem je obsah antioxidantů v uchovávacím roztoku, který by mohl ovlivnit testy chemických látek. Při metabolických studiích je doporučena kratší preinkubační doba (například 10-30 minut) a pro experimenty toxikologické je tato doba prodloužena tak, aby došlo k obnovení normální hladiny draselných iontů (např. 1-2 hodiny) (Bach et al. 1996).

Při delší inkubaci je nutné měnit médium každých 24 hodin. Tím se zajistí doplnění živin a odstraní se odpadní látky uvolněné buňkami (Fisher, Vickers 2013).

#### **2.1.5 Inkubace orgánových řezů**

Podmínkou úspěšné inkubace řezu je zachování architektury tkáně a biotransformačních reakcí. Kromě parametrů samotného řezu vyžaduje kvalitní inkubace tvorbu takového systému, který umožní difúzi kyslíku a živin do všech buněk a zabrání tím jejich nekróze (Fisher, Vickers 2013). Pro tkáňové řezy je využíváno několik inkubačních systémů.

### **2.1.5.1 Dynamická orgánová kultivace**

Krátce po uvedení Krumdieckova kráječe na trh byla vytvořena dynamická orgánová kultivace ('Dynamic Organ Culture', DOC). Řezy se opatrně pomocí špachtle umístí do středu titanové sítě, která leží ve válci z teflonu nebo titanu. Pro zajištění optimální životnosti řezů se, v případě, že jich bude použito více na jeden válec, musí umísťovat vzdálené aspoň 4 mm od sebe. Tím se zamezí jejich slepování. Celý válec je vložen do skleněné scintilační lahvičky o objemu 20 ml a napuštěné 1,7 ml média. Lahvičky mají 1 mm velké otvory. Velikost je zvolena tak, aby při rotaci lahvičky nedocházelo k odpařování média, a aby byl zároveň usnadněn přístup kyslíku k řezům. Za podmínek daných DOC jsou řezy vystaveny střídavě médiu a atmosféře. To umožňuje optimální výměnu plynů (de Kanter et al. 2002).

### **2.1.5.2 Inkubace v jamkových destičkách**

Dalším systémem jsou vícejamkové destičky, kdy počet jamek může být 6, 12 nebo 24, přičemž do každé jamky je možno umístit 1-3 řezy (Fisher, Vickers 2013). U inkubačních systémů s jamkovou destičkou závisí výměna plynů na velikosti povrchu rozhraní médium-vzduch. Šestijamkové i dvanáctijamkové destičky byly prokázány jako dostačující systémy s optimální výměnou plynů a v porovnání s DOC jsou finančně výhodnější (de Kanter et al. 2002).

### **2.1.5.3 Jiné systémy inkubace**

Využívanými možnostmi jsou také Erlenmeyerovy baňky. Baňka o objemu 50 ml může sloužit k inkubaci 4 - 6 řezů. V baňce s objemem 125 ml může být uloženo 7 – 12 řezů. Objem média by měl odpovídat 2 ml na jeden řez (Fisher, Vickers 2013).

Ve všech systémech musí docházet k vyrovnané výměně  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$ . DOC byl označen jako výhodnější systém v porovnání s jamkovou destičkou, kde jsou řezy stále ponořeny v médiu. Avšak je zde nebezpečí mechanického poškození řezu při kontaktu s titanovou sítí (de Kanter et al. 2002). Jako vhodné vylepšení se ukázalo použití membránového filtru tvořeného směsí esterů celulózy. Ten se umístí pod každý řez. Jeho využití pomáhá udržet celistvost tkáně a to především v případech, kdy mají řezy méně fibrotické tkáně (Fisher, Vickers 2013).

Pro inkubace delší jak 8 hodin je vhodné do média přidat antibakteriální (např. gentamicin nebo streptomycin) a antifungální (fungizon) složku v takovém množství, aby byla zajištěna mikrobiální nezávadnost (Bach et al. 1996).

### **2.1.6 Homogenizace**

V metabolických studiích, po inkubaci tkáňových řezů s xenobiotiky, je pro získání výsledků nezbytná jejich homogenizace v kultivačním médiu. Xenobiotika a jejich metabolity totiž mohou být zachyceny v řezech a z testování samotného média by se jejich celková hladina nezjistila. Z homogenátu je možné získat celkové informace o obsahu mateřské látky i jejích metabolitů (Lake, Price 2013).

### **2.1.7 Životaschopnost řezů**

Vyšetření pomocí světelného mikroskopu ukázalo, že tkáňové řezy jsou schopné, při vhodném zacházení, udržet si svou normální architekturu po dobu až 7 dnů. To bylo potvrzeno pomocí elektronového mikroskopu, který odhalil, že po celou dobu takto dlouhé kultivace nedošlo k porušení celistvosti jádra ani organel, a že buňky měly dostatek mitochondrií i drsného endoplazmatického retikula (Fisher, Vickers 2013).

Jednou z možností jak zvýšit životaschopnost jaterních řezů je úprava kultivačního média. Jejich metabolická aktivita totiž zapříčiňuje hromadění lipidů ve vakuolách a zároveň ukládání nově syntetizovaného glykogenu. Kumulaci glykogenu v řezech je možné snížit změnou množství inzulínu, glukagonu a kortikosteronu v kultivačním médiu (Fisher, Vickers 2013).

Životaschopnost a zároveň funkční aktivitu řezů dokazuje schopnost obnovy a udržení buněčné energie (ATP), doplňování hladiny redukovaného glutathionu, udržování úrovně intracelulárního  $K^+$  (Fisher, Vickers 2013). Stabilní hladiny draselných iontů svědčí o neporušenosti membrány (Červenková et al. 2001).

### **2.1.8 Nejčastěji studované tkáně**

#### **2.1.8.1 Ledviny**

Primární funkcí ledvin je eliminovat odpadní produkty organismu a regulovat celkové množství vody a solí v těle. Proto jsou ledvinné buňky vystaveny velkému množství látek, které tam jsou zaneseny krví (de Kanter et al. 2002).

Renální řezy mají významný přínos pro vývoj nových léčivých látek. Testování potenciálních léčivých látek v tomto *in vitro* systému může odhalit jejich toxicitu již v časném stádiu jejich vývoje. Nefrotoxické efekty se projevují nejvíce v proximálním

tubulu ledvin. Proto je tkáň pro řezy často tvořena pouze kůrou ledvin. Ledviny se po vyjmutí z těla sagitálně rozříznou a dřev se odstraní. Z takto připravené tkáně se připraví tkáňové válečky a ty se krájí na řezy tlusté 200-250 mikrometrů (Baverel et al. 2013).

### **2.1.8.2 Plíce**

Buňky dýchacího systému mohou být xenobiotikům vystaveny cestou jejich inhalace nebo pomocí systémové cirkulace. Epitel dýchacích cest se skládá z více než dvaceti typů buněk, ale nejdůležitější buňky pro metabolismus xenobiotik a jejich toxicitu jsou alveolární a Clara buňky. Oba tyto buněčné typy mají odlišnou enzymatickou výbavu pro metabolismus xenobiotik (de Kanter 2002).

#### Plicní řezy

Plíce je nutné před krájením řezů naplnit 0,5% agarózovým gelem skrz tracheu nebo hlavní bronchus. Tím zůstanou plicní sklípky otevřené (Morin et al. 2013). Plicní laloky nesmí mít žádné řezy ani poškození před naplněním, jinak by mohlo docházet k úniku agarózy a plíce by se nenaplnily. Jakmile jsou plíce kompletně naplněny, trachea nebo hlavní bronchus by měly být uzavřeny, plastické sáčky s ledem by měly obklopotvat plicní laloky. Takto připravené plíce se uloží na 60 minut do chladu (při teplotě 4°C), což urychlí proces krystalizace. Pokud se jedná o plíce větší, nakrájí se na 2 cm tlusté pláty a z nich se pak vykrajují tkáňové válečky, které jsou takto připraveny pro krájení na mikrotomu. Plicní řezy budou v uchovávacím médiu plavat, proto musí být při krájení stále zachováno proudění roztoku, které udrží řezy dostatečně daleko od krájecího ostří. Pro plicní řezy se doporučuje tloušťka 450-550 µm (Fisher, Vickers 2013).

Hlavní pozornost jsme věnovali játrům a střevům, neboť praktická část diplomové práce byla zaměřena na tyto tkáně.

### **2.1.8.3 Játra**

Savčí játra váží asi 2,5-5% z celkové hmotnosti těla a obsahují mnoho typů buněk. Hlavním typem jsou hepatocyty, které zaujímají 60-80% všech buněk jaterní tkáně lidí i potkanů. Kromě hepatocytů jsou játra tvořena Kupfferovými, endothelovými, pit buňkami (jaterní forma NK buněk), Ito buňkami (lipocyty) a cholangiocyty (což jsou buňky žlučových cest) (Lake, Price 2013).



### Jaterní řezy

Játra savců představují hlavní orgán biotransformace xenobiotik a jsou taky častým místem projevu jejich toxicity. Pro studium těchto účinků se jako *in vitro* systém často využívají tkáňové řezy. Oproti izolovaným hepatocytům mají hned několik výhod. Biotransformační aktivita se soustředí i do jiných buněčných typů jaterní tkáně, avšak ty v suspenzích hepatocytů zastoupeny nejsou. Tkáňové řezy zachovávají architekturu jater, což znamená, že odpovídá nejen jejich buněčné složení, ale i komunikace mezi buňkami nadále funguje. Mechanické krájení sice vyvolá poškození na povrchu řezu, avšak proteolytické enzymy používané při izolaci hepatocytů vedou k rozsáhlejším škodám (Lake, Price 2013).

Bylo prokázáno, že během inkubace se snižuje hladina enzymů biotransformace xenobiotik. Jako jedna z možných variant se studuje kryoprezervace řezů před inkubací, aby se tomuto úbytku zabránilo (Lake, Price 2013).

#### **2.1.8.4 Tenké a tlusté střevo**

Střevo je hlavním místem vystaveným xenobiotikům po orálním podání léčiv nebo látek obsažených v jídle a pití. Při tomto ohrožování epiteliálních buněk střevní mukózy může dojít k výraznému poškození a zároveň zvýšenému prostupu toxických látek do krevní cirkulace. Pokud poranění není příliš rozsáhlé, je tomuto potenciálnímu systémovému narušení zabráněno pomocí regenerační schopnosti v relativně krátkém čase (několik minut). To může být jedna z příčin, proč tento škodlivý efekt zůstává někdy nezjištěn (Niu et al. 2013).

Střevní epiteliální buňky vytváří velké množství proteinů, které interagují s xenobiotikem a podporují jeho eflux do střevního lumen nebo do systémové cirkulace. Tyto procesy významně ovlivňují biologickou dostupnost přítomných látek a jejich metabolitů (Possidente et al. 2011). Nejrozsáhlejší nadrodinu těchto transportérů tvoří ATP-binding cassette (ABC) transportéry.

Kromě výše uvedených funkcí si střevo zachovává i vlastní metabolickou aktivitu. Obecně platí, že mnoho (ale ne všechny) izoformy cytochromu P450 vykazují vyšší aktivitu proximálně a směrem k tlustému střevu se aktivita snižuje. Naproti tomu aktivita UDP-glukuronosyltransferasy a sulfotransferasy vykazuje méně výrazný gradient snižování v tenkém střevě a v tlustém střevě je jejich exprese vyšší (Niu et al. 2013).

Střevo je tedy studováno jako cílový orgán toxického působení xenobiotik, místo jejich metabolismu a zároveň jako vstupní brána do organismu (Niu et al. 2013).

### Střevní řezy

Jedna z možností, jak studovat metabolické procesy v různých částech tlustého i tenkého střeva, je vykrojení stejně velkých částí střevní stěny. Tímto způsobem se získá vzorek, kde jsou zastoupeny všechny buněčné typy a zachována je i komunikace mezi nimi. Tloušťka těchto preparátů je však velká a zásobování všech buněk kyslíkem a živinami může být nedostačující. To je jeden z důvodů, proč dochází k rozvoji techniky pro využití střevních řezů (de Kanter et al. 2005). Před samotným krájením velmi tenkých řezů je nezbytné střevo vyplnit a zalít 3% nízkotajícím agarózovým gelem tak, aby bylo možné vytvořit válcové jádro potřebných rozměrů (de Kanter et al. 2005). To umožní tvorbu řezů na mikrotonu stejným způsobem jako u jater a jiných pevných tkání.

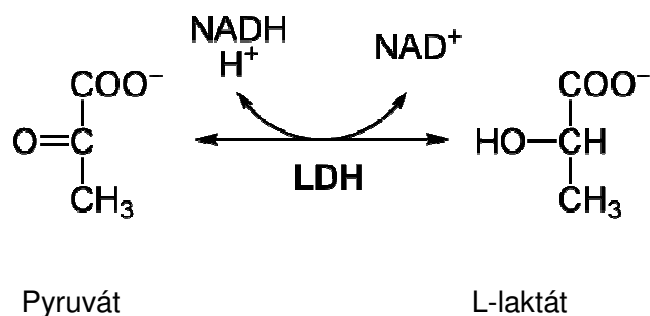
### **2.1.9 Sledování životnosti buněk tkáňových řezů**

Životaschopnost buněk je jedním ze základních parametrů, který by měl být sledován při manipulaci s tkáňovými řezy. Používané zkoušky jsou povahy histologické, morfologické nebo histochemické.

Jedním z uváděných biochemických markerů životnosti buněk je hladina draselných iontů. Vypovídá o neporušenosti plasmatické membrány a odráží funkčnost sodno-draselné pumpy. Přímé měření ATP může dodat ještě přesnější představu o intracelulární energii.

#### **2.1.9.1 Měření aktivity laktátdehydrogenasy**

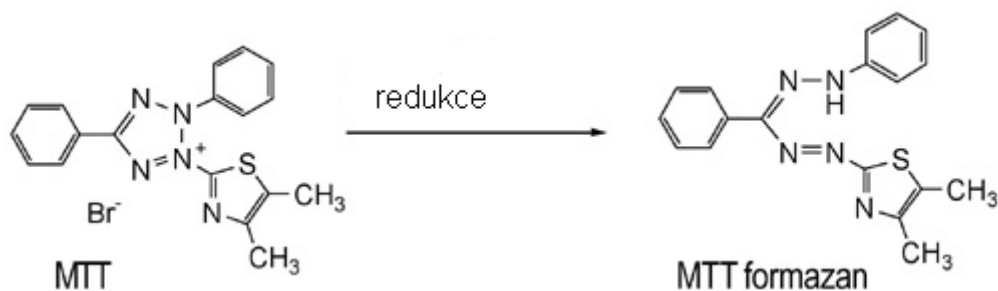
Měření aktivity enzymu, uvolňovaného do média po narušení cytoplasmatické membrány, je jednou z často využívaných metod. Konkrétním příkladem je měření aktivity laktátdehydrogenasy (LDH). Tento nitrobuněčný enzym se podílí na oxidoredukčních dějích v organismu a je spjat s posledním krokem anaerobní glykolýzy, přeměny pyruvátu na L-laktát (Obr.3). Kofaktorem této reakce je NADH, respektive  $\text{NAD}^+$  (při zpětném chodu reakce). Spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm je pak možné stanovit úbytek (respektive přírůstek) NADH.



Obr. 3: Schéma reverzibilní reakce katalyzované laktátdehydrogenasou.

### 2.1.9.2 MTT test

Jednou z nejčastěji používaných metod měření buněčné viability a proliferace je hodnocení metabolické přeměny 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT). K redukci množství MTT dochází pouze v mitochondriích živých buněk (Obr. 4). Mitochondriální dehydrogenasy přeměňují žlutý, ve vodě rozpustný MTT na formazan, který má fialové zbarvení a je ve vodě nerozpustný. Bylo zjištěno, že MTT formazan je uložen intracelulárně ve formě granulí, především v perinukleárním prostoru (Liu et al. 1997). Absorbance naměřená u vzniklého MTT formazanu je úměrná počtu živých buněk.

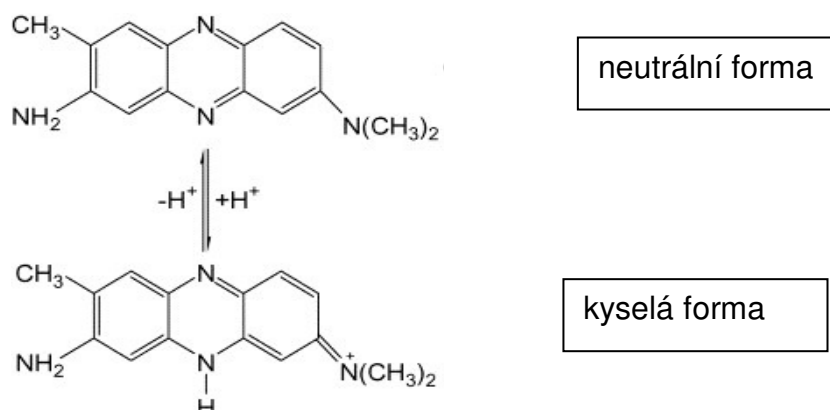


Obr. 4: Přeměna MTT na MTT formazan.

### 2.1.9.3 Neutrální červeň

V případě cytotoxického testu s neutrální červení (NR) nejde o proces založený na enzymatické katalýze. NR je slabě kladně nabitě barvivo (Obr. 5), které je vychytáváno a vázáno živými buňkami. Prochází přes buněčnou membránu a je hromaděno v lysozomech. V lysozomech je nižší pH než v okolní cytoplazmě a NR tam získává náboj a je vázána v matrix lysozomu. Ztráta gradientu pH při poškození buňky

vede ke zvýšené propustnosti membrány a uvolnění NR. Množství neutrální červeně akumulované v buňkách je přímo úměrné množství živých buněk.



Obr. 5: Strukturální rovnováha NR ve vodném roztoku (Shang et al. 2007)

## 2.2 Biotransformace xenobiotik

Všechny organismy jsou nevyhnutelně vystavovány neustálému působení cizorodých látek. Fyzikální vlastnost, která umožňuje mnohým xenobiotikům být vstřebávána kůží, plícemi, nebo gastrointestinálním traktem, je jejich lipofilita. V jejich eliminaci to může představovat překážku, neboť lipofilní sloučeniny mohou být často reabsorbovány. V důsledku toho je eliminace xenobiotik závislá na jejich konverzi na látky ve vodě rozpustné. Tento proces, nazývaný biotransformace, je katalyzovaný enzymy obsaženými především v játrech, ale i v jiných tkáních. Důležitým důsledkem biotransformace je změna fyzikálních vlastností, které zvýhodňují absorpci (lipofilita), na vlastnosti, které upřednostňují vylučování močí a stolicí (hydrofilita) (Parkinson 2001).

Enzymy katalyzující biotransformační reakce často určují intenzitu a trvání účinku léčiv a hrají klíčovou roli v jejich toxicitě a tumorogenitě. Nicméně, některé chemické látky stimulují syntézu enzymů zapojených do xenobiotické biotransformace. Tento proces, známý jako enzymová indukce, je adaptivní a reverzibilní reakce na expozici xenobiotikům. Enzymová indukce umožňuje některým xenobiotikům urychlení jejich vlastní biotransformace a eliminace (Parkinson 2001).

Reakce katalyzované biotransformačními enzymy se tradičně dělí do dvou skupin, a to reakce I. fáze a II. fáze. Reakce I. fáze zahrnují hydrolýzu, redukci a oxidaci. Tyto reakce odhalí, nebo připojí funkční skupiny (např. -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH nebo -COOH) a většinou vedou pouze k mírnému zvýšení hydrofility. II. Fáze biotransformace zahrnuje glukuronidaci, sulfataci, acetylaci, methylaci, konjugaci s glutathionem a aminokyselinami jako jsou glycin, taurin a glutamová kyselina. Kofaktory těchto reakcí reagují s funkčními skupinami xenobiotika, které buď byly

přítomny v jeho molekule, nebo vznikly v průběhu I. fáze. Produkty těchto reakcí jsou nejčastěji látky silně hydrofilní (Parkinson 2001). Následovat může III. fáze, která představuje odstranění metabolitů z buňky pomocí efluxních transportérů (Bains 2010).

## **2.2.1 I. Fáze biotransformace**

Funkční skupiny vzniklé během této fáze jsou často místem pro reakce II. fáze. Níže jsou přiblíženy pouze ty enzymy, jejichž hladiny a aktivity jsme během praktické části diplomové práce stanovovali.

### **2.2.1.1 Enzymy redukující karbonylovou skupinu**

Rozmanité karbonylové sloučeniny jsou přítomny v potravě, léčivech a polutantech z prostředí. Především aldehydy a chinony jsou sloučeniny velice reaktivní. Aldehydy napadají nukleofilní centra proteinů a nukleových kyselin. Chinony jsou zase zdrojem oxidativního stresu. Organismus si pro detoxifikaci těchto nebezpečných sloučenin vytvořil hned několik enzymatických systémů (Matsunaga et al. 2006). Enzymy redukující karbonylovou skupinu se rozdělují do tří nadrodin:

- Aldo-ketoreduktasy (AKR)
- Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)
- Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)

#### **Karbonylreduktasa**

Strukturálně patří karbonylreduktasa (CBR) do nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (Parkinson 2001). Do této nadrodiny se řadí více jak 3 000 proteinů, které většinou vykazují nízkou strukturální podobnost, avšak mají řadu společných vlastností. CBR vykazuje širokou substrátovou specifitu pro xenobiotika obsahující karbonylovou skupinu. Nalézt můžeme tuto rodinu enzymů ve všech tkáních lidského těla, především v játrech, plicích, zažívacím traktu, kůži, srdci, ledvinách a mozku. Zatím byly objeveny tři lidské izoformy, CBR1, CBR3 a CBR4 (Bains 2010).

#### **Karbonylreduktasa 1**

Lidská CBR1 je monomerní cytosolický enzym, který katalyzuje dvouelektronovou redukci biologicky a farmakologicky aktivních substrátů pomocí NADPH jako kofaktoru.

Například, CBR1 přeměňuje silný mediátor horečky, prostaglandin E2 (PGE2), na méně aktivní metabolit, prostaglandin E2 $\alpha$ . Nedávné studie ukázaly, že transkripce CBR1 v plicích a játrech je během febrilní reakce snížena, aby se potlačil katabolismus PGE2 (Gonzales-Covarrubias et al. 2007).

CBR1 hraje hlavní roli v metabolismu protinádorových antracyklinů, doxorubicinu a daunorubicinu. Vzniklé C-13 alkoholy cirkulují v plazmě, avšak nemají již protinádorovou aktivitu, a naopak u některých pacientů vyvolávají závažnou kardiotoxicitu (Gonzales-Covarrubias et al. 2007).

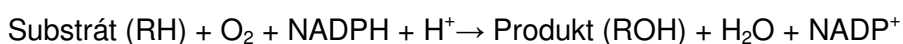
My jsme pomocí imunoblotingu po elektroforéze prokazovali přítomnost CBR1 v cytosolu jaterních i střevních řezů.

### 2.2.1.2 Cytochrom P450

Systém cytochromu P450 je nadrodinou hemoproteinů, které katalyzují biotransformaci velkého množství xenobiotik i endogenních látek. Více jak 3 000 enzymů začleněných do tohoto enzymatického systému se vyskytuje v nejrůznějších živočišných a rostlinných druzích. U člověka je známo přibližně 60 forem. Svou katalytickou aktivitu vykazují u více jak 40 různých typů reakcí, ale jako nejvýznamnější z nich se jeví hydroxylace (Dostálek et al. 2006).

Společnou vlastností všech enzymů sdružených pod název cytochrom P450 je přítomnost hemoproteinu typu b. Pátým ligandem vázaným na železo porfyrinového jádra je thiolátový anion (pocházející z cysteinu) a šestým se v průběhu reakce stává molekula kyslíku. V bakteriálních buňkách je cytochrom P450 přítomen volně v cytosolu. Naproti tomu, v eukaryotických buňkách je převážná většina pevně vázána na membrány endoplazmatického retikula, mitochondrií, případně jádra (Dostálek et al. 2006).

Základní reakcí, katalyzovanou cytochromem P450, je monooxygenace, při které je jeden atom kyslíku inkorporován do substrátu a druhý je redukován na vodu. K rozštěpení molekuly kyslíku je nutná redukce cytochromu P450. NADPH je nezbytný pro tuto redukci, neboť slouží jako dárce dvou elektronů pro monooxygenasový systém cytochromu P450 (Parkinson 2001). Při jedoelektronové oxidaci vzniká reaktivní oxidant a molekula vody. V případě dvoelektronové oxidace je vytvořen monooxygenasový produkt a cytochrom P450 se regeneruje (Dostálek et al. 2006). Monooxygenaci znázorňuje následující rovnice:



Zdroj kyslíku pro monoxygenaci cytochromem P450 mohou představovat i peroxidy. Ovšem jejich reakční mechanismus je odlišný (Dostálek et al. 2006).

Transferu elektronů z NADPH na cytochrom P450 slouží dva odlišné elektronové transportní systémy. Elektrony pro mitochondriální CYP jsou přenášeny z NADPH přes adrenodoxinreduktasu na adrenodoxin a z něj pak na cytochrom P450. V případě mikrosomálního cytochromu P450 je touto komponentou NADPH-cytochrom P450-reduktasa, která je vázaná v membráně (Dostálek et al. 2006).

### **Klasifikace cytochromu P450**

Vzhledem k rozsáhlému počtu zástupců enzymového systému cytochrom P450, bylo nezbytné zavést systémové názvosloví. Nadrodina cytochromu P450 (značena CYP) je rozdělena podle podobnosti aminokyselinové struktury do rodin (značeny arabskou číslicí). Všichni členové jedné rodiny vykazují nejméně 40% sekvenční podobnost. Velkými písmeny se označují jednotlivé podrodiny, jejichž členové sdílí podobnost nejméně 50% (Dostálek et al. 2006). Zástupci rodin 1, 2 a 3 metabolizují především xenobiotika, jako jsou léčiva a polutanty z prostředí. Členové ostatních rodin CYP mají za hlavní substráty endogenní látky.

Hladiny jednotlivých izoforem cytochromu P450 se mohou u každého jednotlivce značně lišit. Faktorů, které ovlivňují úroveň exprese tohoto enzymového systému, je mnoho. Kromě genetického polymorfismu to může být konzumace alkoholu, kouření, strava, věk, pohlaví a působení podávaných léčiv. Následkem jsou pak rozdíly v plazmatických hladinách léčivých látek a jejich metabolitů (Miksys, Tyndale 2012).

#### Podrodina CYP1A

Zástupci, především CYP1A1 a CYP1A2, se významně podílejí na biotransformaci xenobiotik u člověka. Podobnost těchto dvou forem je až 70%, avšak zastoupení v jednotlivých tkáních se liší. CYP1A1 se vyskytuje především v mozku, plicích, gastrointestinálním traktu, srdci, lymfocytech a pouze v nízkých hladinách v játrech. Forma CYP1A2 se nachází především v játrech a na biotransformaci xenobiotik se podílí daleko větší měrou (Dostálek et al. 2006).

#### Podrodina CYP2B

Významným zástupcem této, dosud méně probádané, skupiny je u člověka CYP2B6. Tato forma se vyskytuje ve vysokých hladinách v nervovém systému, ale obsažena je i v jiných tkáních (Dostálek et al. 2006). Studován je CYP2B6 především v souvislosti s biotransformací látek, ovlivňujících centrální nervový systém.

### Podrodina CYP3A

Tato podrodina je považována za nejdůležitější z celého enzymatického systému cytochromu P450. Je to dáno jejím vysokým podílem na biotransformaci endogenních i exogenních látek. Především formy CYP3A4 a CYP3A5, které mají největší zastoupení v játrech a trávicím traktu, mají zásluhu na 52% z celkové metabolické aktivity cytochromu P450 (Dostálek et al. 2006).

V průběhu praktické části diplomové práce jsme stanovovali v mikrosomální frakci aktivitu izoform 1A1, 1A2, 3A a 2B. Pro tento účel jsme použili relativně specifické sustráty ethoxyresorufin, methoxyresorufin a benzyloxyresorufin.

## **2.2.2 II. Fáze biotransformace**

### **2.2.2.1 UDP-glukuronosyltransferasa**

Glukuronidace představuje hlavní cestu, která usnadňuje eliminaci lipofilních xenobiotik i tělu vlastních látek. Jedná se o reakci katalyzovanou rodinou enzymů nazývaných UDP-glukuronosyltransferasa (UGT) (King et al. 2000). Ty katalyzují reakci v přítomnosti kofaktoru, kterým je UDP-glukuronová kyselina. Konečnými produkty jsou glukuronid a UDP (Parkinson 2001).

Lidská UGT se dělí do tří základních podrodin. Savčí enzymy této rodiny jsou vázány na membránu endoplazmatického retikula jaterní tkáně, ledvin a střevní sliznice. V menší míře se vyskytuje i v mozku a placentě. Naproti tomu, u většiny rostlinných a bakteriálních zástupců se nachází UGT volně rozpuštěna (Wu et al. 2011).

Biologické účinky léčiv jsou touto přeměnou na glukuronid výrazně utlumeny, nebo úplně eliminovány. Avšak u morfinu je tomu naopak. Tvoří výjimku, neboť jeho glukuronid je až dvacetkrát aktivnější než mateřská látka (Dostálek et al. 2006).

Pro stanovení aktivity UGT jsme použili spektrometrické stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid.

### **2.2.2.2 Glutathion-S-transferasa**

V tomto případě dochází ke konjugaci široké škály elektrofilních xenobiotik s tripeptidem glutathionem. Glutathion je složen z glycinu, cysteinu a glutamové kyseliny. Silně nukleofilní thiolová skupina cysteinu se naváže na elektrofilní centrum



substrátu a výsledným produktem této konjugace jsou thioethery. Celá reakce je katalyzována glutathion-S-transferasou (GST) (Parkinson 2001).

Glutathion-S-transferasa má velký význam v biotransformaci potencionálních kancerogenů. Svou katalytickou aktivitou podporují přeměnu chemických kancerogenů na neaktivní metabolity a jejich eliminaci. V některých případech však může docházet i k jevu opačnému, tedy že indukuje kancerogenní aktivitu některých sloučenin (Dostálek et al. 2006).

GST je rodina enzymů vyskytujících se u živočichů, rostlin, kvasinek i bakterií (Puglisi 2012). Zároveň je rozdělena do dvou podrodin. První je ve vodě rozpustná, vyskytuje se v cytosolu a dělí se do osmi tříd (alpha, kappa, mí, omega, pí, sigma, theta a zeta). Druhá je zabudována do membrány. Je spojována s ochranou membrány před oxidativním stresem a nazývá se MAPEG (membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) (Luo et al. 2011). Membránově vázaná mikrosomální GST je charakterizována strukturální i genetickou odlišností od cytosolické formy (Board et al. 1997).

My jsme pro stanovení aktivity GST použili jako substrát 1-chloro-2,4-dinitrobenzen. Pomocí imunoblotingu po elektroforéze jsme v cytosolu jaterních i střevních řezů zjišťovali hladiny  $\mu$ -GST.

### **2.2.3 III. Fáze biotransformace**

III. Fáze biotransformace zahrnuje export metabolitů, z II. fáze i nekonjugovaných metabolitů z I. fáze, přes plazmatickou membránu do extracelulárního prostoru. Tento proces zajišťují v membráně zakotvené transportéry. V tomto případě nejde o chemickou přeměnu molekuly, jak tomu bylo v předešlých fázích, ale zabráňuje se hromadění metabolitů v buňce, což je pro její detoxikaci podstatný proces.

Hlavní rodinou přenašečů jsou ABC transportéry (ATP-binding cassette). Tyto transmembránové proteiny zajišťují eflux širokého spektra endogenních i exogenních látek za současného spotřebování energie v podobě ATP. Nejdůležitějším zástupcem je P-glykoprotein, který se významně podílí na metabolismu xenobiotik. Bohužel se nachází i v membránách nádorových buněk a často tak nese vinu za rezistenci nádorové tkáně k podávaným léčivům (Bains 2010).

## 2.3 Látky testované na tkáňových řezech

### 2.3.1 Urinal Akut<sup>®</sup>

Pro ovlivnění jaterních a střevních řezů jsme si zvolili roztok připravený z přípravku Urinal Akut<sup>®</sup> vyráběným firmou Walmark<sup>®</sup>. Tento doplněk stravy obsahuje extrakt z plodů brusnice velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon*). Jejimi hlavními účinnými látkami jsou anthokyaniny a proanthokyanidiny.

#### 2.3.1.1 Anthokyaniny

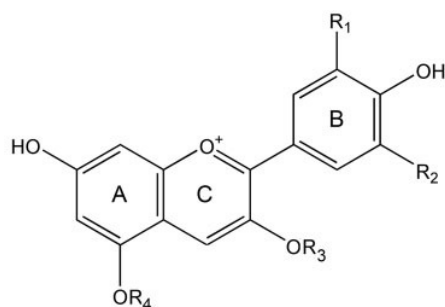
Anthokyaniny představují významnou skupinu flavonoidů, která je zodpovědná za zbarvení většiny květin, ovoce a listů krytosemenných rostlin (Andersen, Jordheim 2006). Barevný rozsah je odvozen z jejich struktury a z jejich schopnosti tvořit rezonanční struktury vlivem změn pH (Bagchi et al. 2004). To umožňuje jejich modré, fialové, purpurové a dokonce černé zbarvení (Kowalczyk et al. 2003).

#### **Struktura**

Anthokyaniny se skládají z aglykonu (anthokyanidinu) a cukerné složky (Obr. 6). Mezi anthokyaninové monosacharidové jednotky, které se váží na aglykon v poloze 3, nebo 3 a 5, je řazena glukóza, galaktóza, rhamnóza, arabinóza, xylóza a glukuronová kyselina (Andersen, Jordheim 2006).

Více jak 65% anthokyaninů s identifikovanou strukturou je acylováno. Rozmanitost anthokyaninů je úzce spojena s povahou, počtem a vazebnou pozicí acylových zbytků (Andersen, Jordheim 2006).

Zatímco celkově bylo identifikováno 31 monomerních anthokyanidinů, struktura 90% všech anthokyaninů je založena na pouhých šesti aglykonech. Mezi tuto základní šestici patří pelargonidin (Pg), cyanidin (Cy), peonidin (Pn), delphinidin (Dp), petunidin (Pt), a malvidin (Mv) (Andersen, Jordheim 2006).



Aglykon	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pelargonidin	-H	-H
Cyanidin	-OH	-H
Peonidin	-OCH <sub>3</sub>	-H
Delphinidin	-OH	-OH
Petunidin	-OCH <sub>3</sub>	-OH
Malvidin	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>: -H nebo cukerný zbytek

Obr. 6 : Základní struktura anthokyaninů

### Farmakokinetika a metabolismus

U lidí i zvířat se anthokyaniny absorbují ze zažívacího traktu v nezměněné formě jako glykosidy a jejich absorpce i eliminace je rychlá. Nicméně účinnost jejich absorpce je relativně slabá. Méně než jedno procento perorálně podávané dávky je absorbováno a vyloučeno z těla. Eliminovány jsou močí v podobě nezměněného glykosidu nebo methylovaných derivátů (Wang, Stoner 2008).

### Biologická aktivita

Hlavní léčebné přínosy související s příjmem anthokyaninů zahrnují antioxidační ochranu a udržování integrity DNA. Anthokyaniny také slouží jako protizánětlivé a protimutagenní látky a zajišťují kardioprotekci tím, že udržují cévní permeabilitu. Studie prokázaly, že doplňování stravy ovocem, bohatým na anthokyaniny, bylo účinné při snižování oxidativního stresu spojeného se stárnutím. Doplňování stravy anthokyaniny po dobu 68 měsíců zpomalilo, na věku závislé, snižování neuronálních a kognitivních funkcí zlepšením antioxidačního statutu (Bagchi et al. 2004).

### **Ovlivnění nádorového růstu**

Vedle antioxidačního účinku je u anthokyaninů studováno jejich působení na nádorovou tkáň. Delphinidin (více než jiné anthokyanidiny) vykazuje inhibici vaskulárního endotheliálního růstového faktoru (VEGF). Indukuje fosforylaci receptoru pro VEGF, a tím přerušuje jeho signalizační dráhu. Schopnost inhibice angiogeneze je důležitou vlastností této molekuly a může být užitečná v prevenci a léčbě rakoviny (Lamy et al. 2005).

### **Ovlivnění enzymů II. fáze**

Výsledky studie, prováděné na potkanech léčených anthokyanidiny, ukázaly v jaterní tkáni zvýšení antioxidační kapacity, včetně pozitivního vlivu na enzymy spřažené s glutathionem (glutathionreduktasy, glutathionperoxidasy a glutathion-S-transferasy) a zvyšování GSH obsahu. Kromě toho, aktivita NAD(P)H-chinonoxidoreduktasy byla v rámci terapie anthokyaniny také podpořena. To ovlivňuje funkci obranného systému proti programované buněčné smrti indukované peroxidem vodíku (Shih et al. 2007).

### **2.3.1.2 Proanthokyanidiny**

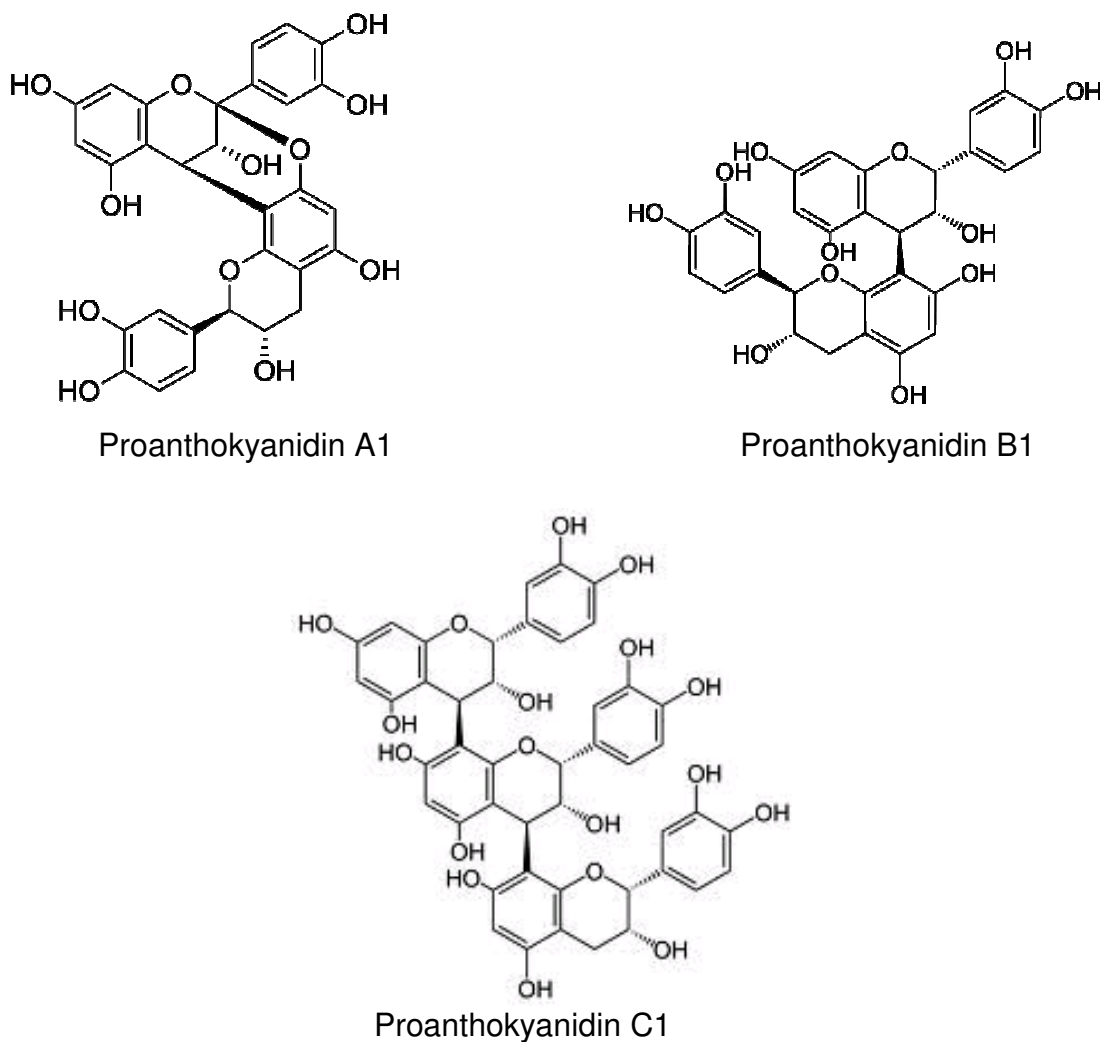
Proanthokyanidiny představují velkou skupinu fenolických sloučenin, které se vyskytují ve všech dřevinách a v některých bylinách.

#### **Struktura**

Proanthokyanidiny jsou oligomery nebo polymery, které mají jako základní jednotku flavan-3-ol (katechiny). Jejich ethanolicke roztoky jsou při vyšších teplotách nestabilní a rozkládají se na anthokyanidiny.

Proanthokyanidiny skupiny B (dimery) a C (trimery) jsou charakterizovány tím, že jednoduchá vazba, která propojuje flavanové jednotky mezi uhlíkem C-4 na původní molekule a na molekule rozšiřující řetězec se váže v poloze C-8 nebo C-6 (Obr. 7) (Ferreira et al. 2006).

Brusinky obsahují proanthokyanidiny ze skupiny A, které jsou méně běžné než typ B, a které mají navíc své podjednotky spojeny epoxidovou vazbou (Obr. 7) (Kolečkář et al. 2012).



Obr. 7: Struktury zástupců třech proanthokyanidinových skupin (A, B, C).

### Farmakokinetika a metabolismus

Vstřebávání proanthokyanidinů ze zažívacího traktu je ovlivněno stupněm jejich polymerace. Při studiích *in vitro* bylo prokázáno, že proanthokyanidiny obsahující 1-3 podjednotky jsou vstřebávány bez větších obtíží. Pokud však molekula obsahovala 6 a více jednotek, transport přes střevní stěnu u nich prakticky neprobíhal. V případě takto velkých molekul však často dochází, v silně kyselém prostředí žaludeční kyseliny, k jejich rozkladu na vstřebatelné monomery a dimery. Absorpce proanthokyanidinů závisí na jejich povaze a dalších faktorech, jako je například stav trávicího traktu, množství podaných látek a úroveň exprese trávicích enzymů (Kolečkář et al. 2012).

### Biologická aktivita

Po konzumaci brusinkového džusu byla v lidské moči pozorována antiadhezivní aktivita. Výsledky Howella a jeho kolektivu (2005) naznačují, že přítomnost

proanthokyanidinů skupiny A v brusinkách může zvýšit bakteriální antiadhezivní aktivitu v močových cestách a tím přispívat k udržení jejich zdraví (Howell et al. 2005).

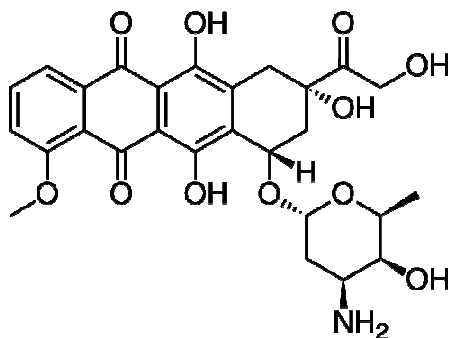
Stejně jako anthokyaniny mají i proanthokyanidiny silné antioxidační vlastnosti. Mezi mechanismy tohoto působení patří zhášení volných radikálů, chelatace kovů a inhibice lipidové peroxidace (Kolečkář et al. 2012).

U proanthokyanidinů se vyskytují i další neméně významné účinky. Patří mezi ně antimutagenní aktivita, protizánětlivý účinek, kardioprotektivní působení, příznivé ovlivnění průběhu diabetu mellitu 2. typu, nebo inhibice systému renin-angiotensin-aldosteron. Na objasnění mechanismů většiny z nich se však stále ještě čeká (Kolečkář et al. 2012).

### 2.3.2 Doxorubicin

Léčivem, které jsme používali pro ovlivnění jaterních řezů, byl doxorubicin (Obr. 8).

Doxorubicin je anthracyklinové cytostatikum izolované z kultur *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Jedná se o hydroxyderivát daunorubicinu. Anthracykliny jsou skupina cytostatik běžně používaných pro léčbu některých typů leukémií, Hodgkinova lymfomu, rakoviny prsu, žaludku nebo vaječnicků, myeloidní leukémie a jiných nádorových onemocnění (Blažková et al. 2012).



Obr. 8: Struktura doxorubicinu.

#### **Mechanismus účinku**

Základní mechanismus cytotoxického působení doxorubicinu na maligní buňky je interkalace jeho planárního anthracenového jádra do provazců DNA. Tím je inhibována aktivita RNA a DNA polymerasy. Doxorubicin může také vyvolávat zlomy šroubovice DNA v důsledku inhibice topoisomerasy II. Třetí cestou jeho působení je poškození buněk způsobené tvorbou volných semichinonových radikálů,

které s kyslíkem vytvářejí reaktivní peroxidy. Peroxidové radikály poškozují buněčné membrány a jsou odpovědné též za kardiotoxické účinky léčiva (Bains 2010).

### **Nežádoucí účinky**

Nejzávažnějším vedlejším účinkem, který limituje podávání této velmi účinné léčivé látky, je kardiotoxicita. Vyskytnout se mohou akutní poruchy srdečního rytmu, nebo projevy pozdní kardiotoxicity, jejichž nejzávažnější formou je srdeční selhání. Z tohoto důvodu by před zahájením léčby doxorubicinem měla být vyhodnocena srdeční funkce a během terapie je vhodné pokračovat v jejím sledování. Hranice kumulativní dávky je uváděna v rozmezí 400-550 mg/m<sup>2</sup>. Dalšími, neméně závažnými, nežádoucími účinky jsou myelosuprese a imunosuprese. Doxorubicin může také indukovat toxicitu souběžné protinádorové léčby. Jedním z významných faktorů zvyšujících toxicitu doxorubicinu je poškození jater (Souhrn informací uvedených u přípravku Doxorubicin medac 2 mg/ml infuzní roztok, 2012).

Z výše uvedeného vyplývá, že je velmi žádoucí zacílit účinky takto toxické látky pouze na buňky nádorové. K tomuto účelu byl využit liposomální přenašeč, který usnadnil zacílení doxorubicinu a snížil riziko srdečního poškození. Je tak zároveň umožněno podávání vyšší kumulativní dávky (Blažková et al. 2012).

### **Farmakokinetika a metabolismus**

Doxorubicin je podáván intravenózně. Pomalé infúze vedly ke snížení kardiotoxicity více, než jiné cesty podávání prodlužující cirkulaci léčiva v organismu (Bains 2010). Metabolizován a eliminován je doxorubicin velmi rychle a jeho hlavní cestou vyloučení z těla je žlučový systém. Proto je poškození jater tak významný faktor ovlivňující jeho toxicitu (Souhrn informací uvedených u přípravku Doxorubicin medac 2 mg/ml infuzní roztok, 2012).

Existují tři hlavní metabolické cesty anthracyklinů, jednoelektronová redukce, dvouelektronová redukce a deglykosidace (reakce katalyzovaná cytochromem P450). V případě doxorubicinu je upřednostňovaná dvouelektronová redukce na sekundární alkohol, méně účinný 13-dihydroderivát doxorubicinol. Tato reakce je katalyzována několika různými redukčními enzymy. V srdci je to AKR1A, zatímco v játrech má převahu CBR1. Schopnost tvořit doxorubicinol byla prokázána i u CBR3 (Thorn et al. 2010).

Kardiotoxicita doxorubicinu je částečně spjata i s obsahem železa v buňkách, neboť dochází k vytvoření komplexů doxorubicin-Fe<sup>3+</sup>, které mohou být redukovány na doxorubicin-Fe<sup>2+</sup>. V přítomnosti kyslíku pak vznikají volné radikály a reaktivní

peroxydy, které poškozují buněčné membrány. Použití dexrazoxanu (látka chelatující železo) snižuje kardiotoxicitu doxorubicinu vznikající touto cestou (Bains 2010).

Produkce reaktivních kyslíkových radikálů probíhá u doxorubicinu také enzymatickou cestou. Jednoelektronová redukce chinonové části molekuly doxorubicinu vede ke vzniku volného semichinonového radikálu. Reakce probíhá především NADPH-dependentními reduktasami (AKR a CBR) a vzniklým produktem je 13-dihydroderivát doxorubicinol. Ten pak spustí kaskádu tvorby kyslíkových a dusíkových radikálů. Tyto reaktivní sloučeniny významně poškozují srdce, především díky nízkému obsahu antioxidantních enzymů v kardiomyocytech (Bains 2010).

Přestože ke konjugaci metabolitů doxorubicinu v malé míře dochází, nejví se tato metabolická cesta jako důležitá (Bains 2010).

Renální clearance doxorubicinu je nízká. Pouze 12% z celkové dávky se objeví v moči v průběhu 6 dnů léčby. Významná je clearance jaterní. Biotransformaci podléhá pouze asi polovina z celkového množství léčiva, přibližně 50% léčiva je vyloučeno z těla v nezměněné formě (Thorn et al. 2010).



### 3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zavést metodu tkáňových řezů z jater a střeva potkana pomocí přístroje Krumdieck Tissue Slicer a posoudit možnosti využití tkáňových řezů při studiu biotransformace xenobiotik. Pro dosažení cíle bylo provedeno:

1. Zavedení metody tkáňových řezů z jater a střev potkana laboratorního (*Rattus norvegicus*, kmen *Wistar*)
2. Zavedení metod pro sledování životnosti řezů
  - stanovení aktivity laktátdehydrogenasy
  - cytotoxický test s neutrální červení
  - test metabolické přeměny 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidu (MTT) na formazan
3. Sledování cytotoxického působení doxorubicinu
4. Sledování aktivit biotransformačních enzymů v subcelulárních frakcích tkáňových řezů a jejich ovlivnění xenobiotickou látkou
5. Statistické vyhodnocení naměřených výsledků

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie, přístroje, biologický materiál

#### Chemikálie

- Akrylamid, Sigma
- Medium RPMI-1640, Gibco
- Neutral red solution, Sigma
- Nikotinamid adenin dinukleutid, Merck
- Roztok bicinchoninové kyseliny, Sigma
- Roztok síranu měďnatého, Sigma
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Merck
- Ostatní běžné chemikálie čistoty p.a.

#### Přístroje

- Analytické váhy Scaltec SBC 22
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos
- CO<sub>2</sub> inkubátor Hera cell
- Homogenizátor Potter S
- Laboratorní magnetická míchačka
- Laminární box Aura 2000 M.A.C.
- Luminiscenční spektrofotometr Perkin Elmer LS 50 B
- pH metr Thermo Orion Model 410
- Roller Mythic blood mixer 12
- Spektrofotometr Tecan Infinite M 200
- Thermoblok s nástavcem Thermomixer Eppendorf
- Tkáňový kráječ Krumdieck Tissue Slicer MD4000
- Třepačka Heidolph Unimax 1010
- Ultracentrifuga Beckman
- Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls Bandelin HD 2070

#### Biologický materiál

Játra a střeva byla získána z laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*, kmen *Wistar*). K naší potřebě byli vybíráni samice i samci ve věku 10 - 11 týdnů.

## 4.2 Pracovní postupy

### 4.2.1 Příprava ultratenkých tkáňových řezů

#### Příprava Earleho vyváženého roztoku solí

Všechny složky Earleho vyváženého roztoku solí (EBSS) (tab. 1) byly naváženy a rozpuštěny v redestilované vodě. Na jedna potkaní játra bylo spotřebováno přibližně 1000 ml pufru. Před použitím byl pufr ještě suplementován D-glukózou na 25 mM roztok ( $M_r = 180,16 \text{ g/mol}$ , bylo přidáno 3,5 g/l).

Tab. 1: Složení EBSS pufru.

	$M_r$ (g/mol)	c (mM)	koncentrace (g/l)
chlorid vápenatý (anhyd.)	111	1,80	0,20
síran hořečnatý ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	246	0,81	0,20
chlorid draselný (KCl)	75	5,33	0,40
hydrogenuhličitan sodný ( $\text{NaHCO}_3$ )	84	26,19	2,20
chlorid sodný (NaCl)	58	117,24	6,80
dihydrogenfosfát sodný ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	138	1,01	0,14
D-glukóza	180	5,56	1,00
fenolová červeň	398	0,03	0,01

#### Příprava média RPMI (s obsahem L-glutaminu)

Toto inkubační médium bylo suplementováno v laminárním boxu dle rozpisu v tab. 2. Uvedené objemy odpovídají objemu média s přidávanými suplementy.

Tab. 2: Rozpis pro doplnění RPMI média.

	$M_r$	100 ml	200 ml	500 ml	1000 ml
5 % FBS		5 ml	10 ml	25 ml	50 ml
0,5 mM L-methionin	149,2	0,0075 g	0,015 g	0,0375 g	0,075 g
50 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin	50 mg/ml	100 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	1000 $\mu\text{l}$

Příprava na krájení tkáňových řezů byla zahájena již den předem. Připraven byl pufr a médium bylo suplementováno. Všechny části kráječe, které měly přijít do kontaktu s pufr, byly ostříhány 70% lihem. Po uschnutí byl rozložený kráječ překryt alobalem a umístěn do chladicí místnosti (8°C). Do chladicí místnosti byl nachystán i připravený pufr.

#### 4.2.1.1 Příprava ultratenkých řezů z potkaních jater

V den experimentu byl studený EBSS pufr s D-glukózou provzdušňován 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> přibližně 1 hodinu. Kráječ (Obr. 9) byl poskládán a naplněn pufrem. Připraven byl táč s ledem, kádinkou na řezy a Petriho miskou s filtračním papírem na přípravu válečků. Ihned po vypreparování byla játra vložena do kádinky se studeným provzdušněným pufrem EBSS, která byla umístěna v boxu s ledem. Vykrajovací trubičkou, o průměru 8 nebo 5 mm, byly vykrojeny válečky bez roztřepených okrajů. Válečky se následně umístily do nástavce v přístroji Krumdieck podle jejich průměru. Krájené řezy měly tloušťku přibližně 200 – 250 μm. K manipulaci s nimi byla používána zahnutá kopistka.



Obr. 9: A) Krumdieck Tissue Slicer - Model MD4000. Naplněn pufrem a připraven k použití. B) Připravené jaterní řezy s průměrem 8 mm.

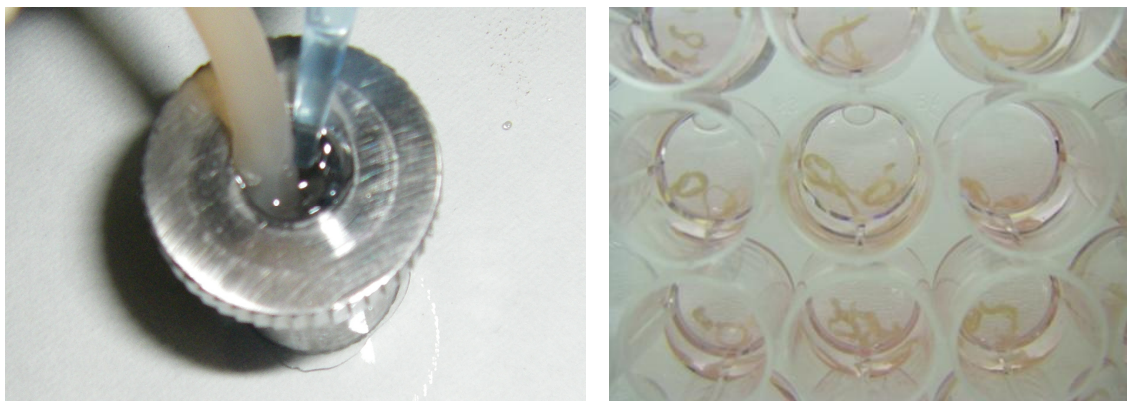
#### 4.2.1.2 Příprava ultratenkých řezů z potkaních střev

##### Příprava 3% agarózového gelu

Navážka 0,045 g agarózy byla v mikrozkuhavce doplněna 1,5 ml 0,9% roztoku NaCl. Mikrozkuhavka byla umístěna do thermomixeru předehřátého na 70 °C. Při této teplotě s rychlostí třepání 450 rpm došlo po 5 minutách k rozpuštění.

Po usmrcení potkana byla střeva okamžitě vložena do Petriho misky s provzdušněným EBSS pufrem. V Petriho misce na ledu byla střeva propláchnuta 0,9% NaCl roztokem a nastříhána na přibližně deseticentimetrové úseky, které byly následně opatrně provlečeny dutou umělohmotnou trubičkou. Na jedné straně byl konec střeva uzavřen pomocí parafilmu, druhým koncem bylo naplněno 3% agarózovým gelem a ponecháno na Petriho misce s EBSS pufrem do zatuhnutí

agarózy. Naplněné střevo bylo opatrně z trubičky vyjmuto. Nástavec pro fixaci tkáně z Krumdieck kráječe byl umístěn mimo přístroj tak, aby agarózový gel nemohl protékat. V jeho dutině bylo přidrženo agarózou naplněné střevo a z vnější strany bylo zalito agarózovým gelem (Obr. 10). Po jeho zatuhnutí byl zbytek střeva odstřižnut a nástavec i se střevem byl vložen do přístroje, který byl již naplněn EBSS puforem. Před jeho spuštěním byla nastavena tloušťka řezů na 400  $\mu\text{m}$  (případně 350  $\mu\text{m}$ ). Celý proces probíhal v chladu (8 °C).



Obr. 10: Tvorba válečku pro střevní řezy (vlevo) a střevní řezy připravené k preinkubaci (vpravo).

#### **4.2.2 Preinkubace**

Médium bylo předehříváno na 37 °C minimálně 0,5-1 hodinu před krájením. Před každou inkubací byla vždy provedena preinkubace. Její trvání a podmínky byly vždy stejné. Řezy byly preinkubovány v suplementovaném RPMI médiu bez testovaných látek. Objem média v jedné jamce byl dán jejich velikostí. U 12 jamkové desky 1 ml, u 24 jamkové 0,5 ml a u 96 jamkové 0,2 ml. Preinkubace probíhala při 37 °C v atmosféře 95 % O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. Po 30 minutách následovala výměna média a inkubace.

#### **4.2.3 Optimalizace inkubace jaterních řezů bez ovlivnění jejich funkce**

V prvním kroku do média nebyla přidána žádná testovaná látka. Sledovanými faktory byl čas, velikost řezů a počet řezů, připadajících na jednu jamku.

Na kráječi Krumdieck byly vytvořeny nejdříve řezy s průměrem 8 mm a tloušťkou 210  $\mu\text{m}$ . Do jedné jamky (24 jamkové desky) byly umístěny 1, 2 a 3 řezy, pokaždé osm paralelních vzorků. Ke každému z nich bylo pipetováno 0,5 ml RPMI

média. Po 30 minutové preinkubaci bylo toto médium odpipetováno a nahrazeno stejným množstvím čerstvého média. Inkubace probíhala při 37°C v atmosféře 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. U poloviny vzorků byla ukončena po 2 hodinách, zbylá polovina desky byla inkubována celkem 24 hodin.

Hned po nakrájení řezů s 8 mm průměrem byly připraveny řezy s průměrem 5 mm o tloušťce 210 µm. Tyto řezy byly umístěny do 96 jamkové desky, vždy jeden řez na jednu jamku. Po 30 minutové preinkubaci byla zahájena inkubace řezů. U poloviny vzorků byla ukončena po 2 hodinách. Zbylá polovina byla inkubována 24 hodin. Životnost řezů byla hodnocena podle naměřené aktivity LDH a u menších řezů s průměrem 5 mm i testem cytotoxicity MTT.

#### **4.2.4 Inkubace s doxorubicinem**

Cytotoxické ovlivnění jaterních řezů doxorubicinem (DOX) bylo sledováno v závislosti na čase a koncentraci DOX. Všechny řezy měly průměr 8 mm. Rozděleny byly podle tloušťky na 200 µm a 210 µm. Inkubace probíhala při 37°C v atmosféře 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> ve 24 jamkových deskách, vždy jeden řez v jedné jamce. Koncentrace DOX v inkubačním RPMI médiu byly 0,5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM. Kontrolu v každé desce tvořily řezy v 0,5 ml čistého RPMI média (bez DOX). Pro každou koncentraci, včetně kontroly, byly připraveny 4 paralelní vzorky. Ukončování inkubace probíhalo v intervalech 2, 4, 24 hodin od ukončení preinkubace. Životnost buněk v řezu byla stanovena aktivitou LDH a hodnocením pomocí NR.

#### **4.2.5 Inkubace tkáňových řezů s Urinalem Akut<sup>®</sup>**

##### **Roztok Urinalu Akut<sup>®</sup>**

Pro přípravu tohoto roztoku byla 1 tableta rozpuštěna v 10 ml redestilované vody a vzniklý roztok byl 100 x zředěn opět redestilovanou vodou. Naměřený obsah anthokyanidinů, obsažených v jedné tabletě po hydrolyze vzorku, byl 1,6 mg. Výsledná koncentrace anthokyanidinů v roztoku byla 1,6 µg/ml.

##### **4.2.5.1 Inkubace jaterních řezů s Urinalem Akut<sup>®</sup>**

Zvolena byla tloušťka řezů 210 µm a průměr 8 mm. Připraveny byly dvě 24 jamkové desky. U obou desek byla provedena půlhodinová preinkubace v čistém RPMI médiu. První deska sloužila jako kontrola a v každé její jamce byl jeden řez v 0,5 ml čistého RPMI média. V druhé byly řezy ponořeny do 0,5 ml média s obsahem

rozpuštěného Urinalu Akut<sup>®</sup>. Desky byly umístěny do otáčivého stojanu a inkubovány 24 hodin při 37°C v atmosféře 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.2.5.2 Inkubace střevních plátků s Urinalem Akut<sup>®</sup>**

Potkaní střevo bylo propláchnuto fyziologickým roztokem a v Petriho misce na ledu skalpelem rozřezáno na čtverečky přibližně 1,5 x 1,5 cm. Každá jamka (12 jamkové desky) obsahovala jeden tento čtvereček a 1 ml RPMI média. U šesti z nich bylo médium suplementováno roztokem z Urinalu Akut<sup>®</sup>. Inkubace probíhala 24 hodin při 37°C v atmosféře 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. V průběhu inkubace byla deska uložena na otáčivém stojanu. Pro další hodnocení byla používána pouze mukóza, která byla z plátků opatrně oddělena pomocí skalpelu.

#### **4.2.5.3 Inkubace střevních řezů s Urinalem Akut<sup>®</sup>**

Střevní řezy, připravené podle postupu uvedeného výše, byly do jamek umístěovány po třech. V každé jamce bylo 0,5 ml média. V každé ze tří desek bylo takto naplněno 20 jamek. Jedna deska sloužila jako kontrola v čase 0 h, proběhla zde pouze preinkubace a inkubace byla ukončena ihned po výměně média. V druhé desce byly řezy inkubovány v čistém RPMI médiu po dobu 24 h. U třetí desky proběhla inkubace s médiem suplementovaným roztokem Urinalu Akut<sup>®</sup>. I v případě třetí desky byla délka inkubace stanovena na 24 h.

#### **4.2.6 Uchovávání tkáňových řezů**

Po řádně provedené inkubaci byly tkáňové řezy testovány okamžitě, pokud to povaha testu vyžadovala. V opačném případě byly tkáňové řezy i jejich inkubační média pro další analýzy uchovávány zmražené při teplotě -20°C. Jejich rozmražování probíhalo za pokojové teploty v čas potřeby.

#### **4.2.7 Příprava subcelulárních frakcí z tkáňových řezů**

##### Fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4

Nejdříve byl připraven 0,1 M roztok Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> rozpuštěním 35,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O v 1000 ml redestilované vody. Rozpuštěním 3,9 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 250 ml redestilované vody byl připraven 0,1 M roztok NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Oba roztoky byly

za stálého míchání a měření pH slévány v jeden roztok v takovém poměru, aby vznikl pufr s pH 7,4.

Před přípravou subcelulárních frakcí byly tkáňové řezy rozmrazeny při pokojové teplotě. Řezy inkubované za stejných podmínek byly zváženy a homogenizovány společně. První homogenizace proběhla ve skleněném homogenizátoru s pístem v 10 ml fosfátového pufru za snížené teploty. Následovala krátká sonifikace ultrazvukovým homogenizátorem. Homogenáty byly přelity do centrifugačních kyvet a vloženy do vhodného rotoru předchlazené centrifugy Heraeus k prvnímu točení. První točení trvalo 20 minut při 4°C a 5000 g. Supernatant byl opatrně přelit do čisté centrifugační kyvety a stáčen ve stejném rotoru na 20 000 g při 4°C po dobu 60 minut. Supernatant z druhého točení byl přelit do centrifugační kyvety pro ultracentrifugu Beckman. Kyveta byla uzavřena víčkem a vložena do rotoru vychlazené ultracentrifugy. Po důkladném zašroubování víka rotoru a přišroubování rotoru k centrifuze byl spuštěn 65 minutový program na 105 000 g při 4°C.

Supernatant, vytvořený 3. točením, představoval frakci s obsahem cytosolu. Byl opatrně rozpipetován do mikrozkuhavek a zamražen v hlubokomrazícím boxu na -80°C.

Peletka, obsahující mikrosomy, vzniklá 3. točením byla resuspendována pomocí ultrazvukového homogenizátoru. Množství fosfátového pufru s 20% (v/v) glycerolu, ve kterém byla peletka resuspendována, bylo vypočítáno podle hmotnosti biologického materiálu před homogenizací. Přidáváno bylo o 0,2 ml tohoto roztoku více, než bylo navážené množství v gramech. Mikrosomální frakce byla slita do kádinky, za stálého míchání rozpipetována do malých mikrozkuhavek a okamžitě zamražena v hlubokomrazícím boxu na -80°C.

#### **4.2.8 Stanovení koncentrace bílkoviny**

Metoda BCA je založena na reakci proteinů s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty v alkalickém prostředí. Měďnaté ionty tak přecházejí na  $\text{Cu}^{1+}$ , které v prostředí s pH 10 tvoří stabilní barevné komplexy s bicinchoninovou kyselinou (BCA). Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkovin ve vzorku a měří se spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm.

##### Reakční roztoky

Roztok A:  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , BCA v 0,1 M NaOH

Roztok B: 4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Pracovní roztok C: připraven smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 50:1



### Kalibrační křivka

Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA). V den měření byl připraven 1% BSA roztok (0,5 ml 20% BSA bylo doplněno do 10 ml redestilovanou vodou) a z něj bylo připraveno 6 vzorků o přesně známé koncentraci bílkovin (tab. 3). Naměřené hodnoty pak sloužily k vytvoření kalibrační křivky.

Tab. 3: Rozpis na ředění bílkoviny pro získání kalibračních hodnot.

	Koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	Roztok 1% BSA ( $\mu\text{l}$ )	Destilovaná voda ( $\mu\text{l}$ )
1	0	0	500
2	200	10	490
3	400	20	480
4	600	30	470
5	800	40	460
6	1000	50	450

Mikrosomální nebo cytosolové frakce byly 10x naředěny. Každý vzorek byl naředěn do dvou mikrozkuvek a z každé z nich byly vytvořeny 4 paralelní vzorky. Celkově tedy proběhlo osm paralelních měření pro každý stanovovaný vzorek.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 10  $\mu\text{l}$  vzorku pro stanovení bílkoviny. Slepý vzorek (pouze 10  $\mu\text{l}$  destilované vody) byl napipetován do první jamky. Multikanálovou pipetou byly jamky následně doplněny 200  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku G. Po řádném promíchání byla provedena inkubace trvající 30 minut při 37°C. Po ukončení inkubace byla, na spektrofotometrickém přístroji Tecan Infinite M200, změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Od naměřených absorbancí vzorků byl odečten průměr hodnot naměřených u slepých vzorků.

## **4.2.9 Stanovení životnosti tkáňových řezů**

### **4.2.9.1 Stanovení laktátdehydrogenasy u tkáňových řezů**

Laktátdehydrogenasa (LDH) je nitrobuněčný enzym. Při narušení cytoplasmatické membrány je uvolněn do okolního prostředí (média). Jejimi substráty jsou laktát a  $\text{NAD}^+$ , jež se mění na pyruvát a  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Přírustek NADH je možné

stanovit spektrofotometricky při 340 nm. Stejně je možné sledovat reakci v obráceném směru.



#### Tris-HCl pufr (0,1 M, pH 8,9)

Navážka 1,212 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu byla rozpuštěna v 80 ml redestilované vody. Za stálého míchání a kontroly pH na pH metru bylo pomocí 1 M HCl upraveno pH roztoku na 8,9. Objem byl následně doplněn do 100 ml redestilovanou vodou.

#### Reakční roztok

Reakční roztok byl připravován v čas potřeby. Proto bylo připraveno jen nezbytné množství, které nebylo vždy stejné (podle počtu vzorků). Obsahoval 5 mM  $\text{NAD}^+$  a 50 mM laktátu v Tris-HCl pufru. Na 1 ml reakčního roztoku tak vycházely navážky 0,003317 g  $\text{NAD}^+$  a 0,005605 g laktátu.

Před zahájením měření byl vzorek zředěn podle potřeby redestilovanou vodou. Po přípravě reakčního roztoku bylo 50  $\mu\text{l}$  zředěného vzorku napipetováno do 96 jamkové desky s kulatým dnem a multikanálovou pipetou bylo přidáno do každé jamky 200  $\mu\text{l}$  reakčního roztoku. Následně bylo spuštěno měření na spektrofotometrickém přístroji Tecan Infinite M200. Měřena byla absorbance při vlnové délce 340 nm. První měření po 30 sekundách, následované třemi měřeními v intervalu 60 sekund.

#### Aktivita LDH

$$a = \frac{\Delta A \cdot V_c \cdot 1000}{\epsilon \cdot V_v \cdot l} \quad (\mu\text{M}/\text{min})$$

$\Delta A$  – rozdíl absorbance za 1 minutu, případně směrnice křivky

$V_c$  – celkový objem reakční směsi (v ml)

$V_v$  – objem vzorku (v ml)

$l$  – délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,9 cm

$\epsilon$  – molární absorpční koeficient,  $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

1000 – přepočítání na  $\mu\text{M}$

#### 4.2.9.2 Test cytotoxicity - Neutral Red uptake test

Tento test je založen na schopnosti, která je vlastní zdravým buňkám, hromadit ve svých lysozomech vitální barvivo neutrální červeň (NR). Při fyziologickém pH je toto barvivo neutrální a může být pasivně transportováno přes buněčnou membránu. Lysozomy udržují pH nižší než okolní cytoplazma. Neutrální červeň vstupující do lysozomu získává náboj, a proto již nemůže prostoupit zpět do cytoplazmy. Udržování protonového gradientu na membráně lysozomu je energeticky náročné. Ztráta gradientu pH při poškození buňky nebo buněčné smrti způsobují zvýšení prostupnosti membrány a uvolnění zadržené neutrální červeně.

Po inkubaci řezů bylo odsáto veškeré médium a do každé jamky bylo napipetováno 200  $\mu$ l RPMI média s roztokem neutrální červeně o koncentraci 40  $\mu$ g/ml. Následující 3 hodiny probíhala inkubace v Thermobloku při teplotě 37°C. Médium bylo po této době opět odsáto a řezy 2x opláchnuty v 0,5 ml PBS pufru (fosfátový pufr s NaCl, pH 7,4). Objem 0,5 ml je určen pro 24 jamkové destičky. Do každé jamky bylo přidáno 400  $\mu$ l lyzačního roztoku (1% CH<sub>3</sub>COOH v 50% EtOH) a destička byla 30 minut třepána v Thermomixeru při rychlosti třepání 800 rpm. 200  $\mu$ l obsahu jamek bylo přepipetováno do 96 jamkové desky s kulatým dnem a na Tecanu Infinite M200 při 540 nm byla změřena absorbance.

Výsledky byly vyhodnoceny v procentech, kdy kontrolní řezy představovaly 100% životnost. Od všech hodnot byla odečtena hodnota absorbance blanku (jamky s médiem bez tkáňových řezů).

#### 4.2.9.3 Test cytotoxicity - MTT test

Tento test životnosti buněk, spočívá v přeměně žlutého, ve vodě rozpustného, substrátu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidu (MTT) na fialový, ve vodě nerozpustný, produkt formazan. Tato přeměna je katalyzována mitochondriálními dehydrogenasami živých buněk.

##### Roztok MTT

Navážka 3 mg MTT byla rozpuštěna v 1 ml fosfátového pufru 0,1 M, pH 7,4. K rozpouštění byl použit ultrazvuk.

##### Lyzační roztok - 0,08 M HCl v isopropanolu

2 ml 4 M HCl se smísily s 98 ml isopropanolu.

Po inkubaci řezů v 96 jamkové destičce bylo do každé jamky napipetováno 25 µl roztoku MTT, který byl předehřátý na 37°C. Roztok MTT byl přidán přímo k inkubačnímu médiu. Řezy byly 1 hodinu inkubovány s MTT v inkubátoru při 37°C, v atmosféře 95% O<sub>2</sub> / 5%CO<sub>2</sub>. Médium bylo následně odpipetováno. Do každé jamky bylo přidáno 50 µl lyzačního roztoku (včetně slepých vzorků). Destičky s řezy byly ponechány na třepačce na 30 min při 37°C a při rychlosti třepání 700 rpm, aby došlo k lyzování řezů. K lyzaci všech řezů nedošlo, proto bylo nutné přepipetovat roztok do čisté mikrotitrační destičky, ve které mohla být změřena absorbance. Toto měření proběhlo na spektrofotometru Tecan Infinite M200 při vlnové délce 595 nm.

Životnost tkáňových řezů byla vyjádřena jako % absorbance, kdy absorbance naměřená u vzorků z kontrolních řezů (v čase T = 0 h) představovala 100%.

#### **4.2.10 Stanovení enzymů I. fáze biotransformace u tkáňových řezů**

##### **4.2.10.1 Stanovení aktivity isoform cytochromu P450**

Metoda je založena na přidání substrátu, specifického pro enzym, jehož aktivita je spjata s určitou isoformou cytochromu P450 v mikrosomální frakci. Každá isoforma metabolizuje svůj specifický substrát (Tab. 4) na fluoreskující produkt, resorufin. Přírůstek fluorescence, vyvolaný tvorbou resorufinu, je detekován spektrofluorimetry.

Tab. 4: Přehled enzymů, jejich substrátů a isoform cytochromu P450.

Enzym	Substrát	Isoformy cytochromu P450
Ethoxyresorufin-O-deethylasa (EROD)	ethoxyresorufin	1A1, částečně 1A2
Methoxyresorufin-O-demethylasa (MROD)	methoxyresorufin	1A2, částečně 1A1
Benzyloxyresorufin-O-dearylasa (BROD)	benzyloxyresorufin	3A, 2B

##### Tris-HCl pufr (0,1 M, pH 7,4)

Navážka 1,21 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu byla rozpuštěna v 75 ml redestilované vody. Za stálého míchání a měření pH bylo pomocí 1 M HCl upraveno pH roztoku na 7,4. Následně byl objem doplněn na 100 ml.

#### Kofaktor 0,1 M MgCl<sub>2</sub>

Navážka 0,2033 g MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O byla rozpuštěna v 10 ml redestilované vody.

#### Roztok substrátu

Zvolený substrát byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu v takovém množství, aby výsledná koncentrace tohoto roztoku byla 0,5 mM.

#### Roztok NADPH

Navážka 36,09 mg NADPH byla v mikrozkuhavce rozpuštěna přidáním 866 µl Tris-HCl pufru (0,1 M, pH 7,4).

Nejdříve byly na počítači navoleny parametry pro obsluhu luminiscenčního spektrofotometru. Vlnové délky měření byly nastaveny na  $\lambda_{\text{excitační}} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emisní}} = 585 \text{ nm}$ . Nastavení excitační štěrby bylo na 10 nm a emisní štěrby na 20 nm. Nastavená teplota byla 37°C, délka inkubace 2 minuty, emisní filtr byl otevřený (open) a míchání pomalé (low). Pro ověření funkčnosti přístroje byla změřena intenzita 10 µl standardního přídávku resorufinu (o koncentraci 0,5 µM) v 990 µl Tris-HCl pufru. Intenzita 5 pmol resorufinu v kyvetě (používána byla kyveta Hellma-semimikro) se pohybuje kolem 30. Do kyvety bylo postupně pipetováno 910 µl Tris-HCl pufru, který byl průběžně zahříván na 37°C v titrační baňce v termostatu. Dále 50 µl kofaktoru 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 25 µl mikrosomální frakce (koncentrace bílkovin nesměla překročit 1 mg/ml a před každým měřením byl vzorek promíchán na laboratorní míchačce) a 5 µl roztoku substrátu. Na počítači byla nastavena hodnota base line na nulu. Následně byl spuštěn záznam fluorimetru. Po 20 sekundách temperování bylo přidáno 10 µl NADPH, a tím byla odstartována reakce. Po 80 sekundách od startu byl vzrůst fluorescence lineární a ve 100. sekundě od startu bylo přidáno 10 µl standardního přídávku resorufinu. Ve 120. sekundě bylo měření ukončeno. Obsah kyvety byl odsát a kyveta byla 3x propláchnuta redestilovanou vodou. Takto byla kyveta připravena na další měření.

Na počítači byla odečtena směrnice k, intenzita začátku přídávku resorufinu (číslo A) a intenzita konce přídávku resorufinu (číslo B).

Vypočet aktivity jednotlivých isoform:

$$a = \frac{k}{B - A} \cdot n \cdot D \cdot 60 \text{ (pmol/ml mikrosomů/min)}$$

$k$	směrnice
$A$	intenzita začátku přidavku resorufinu
$B$	intenzita konce přidavku resorufinu
$n$	látkové množství standardního přidavku v jednom ml (5 pmol)
$D$	zředění (např. při použití 25 $\mu$ l mikrosomů je zředění 40)
60	přepočet na minuty

#### **4.2.11 Stanovení enzymů II. fáze biotransformace u tkáňových řezů**

##### **4.2.11.1 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy**

Základem metody bylo spektrofotometrické stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid za enzymové katalýzy UDP-glukuronosyltransferasy (UGT).

Substrát: 0,556 mM p-nitrofenol (p-NF)

Navážka 1,16 mg p-NF byla pomocí ultrazvuku rozpuštěna v 15 ml redestilované vody.

Konjugační činidlo: UDP-glukuronová kyselina (UDP-GA)

Navážka 1,05 mg UDP-GA byla rozpuštěna v 1,5 ml redestilované vody.

Tris-HCl pufr (0,6 M, pH 7,4)

Navážka 0,5 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu byla rozpuštěna v 10 ml redestilované vody a pomocí 1 M HCl se za stálého míchání a měření pH upravilo pH pufru na 7,4. Celkový objem byl doplněn redestilovanou vodou na 15 ml.

Detergent

Navážka 50 mg neionogenního detergentu Slovasol pro aktivaci UGT byla rozpuštěna v 1 ml redestilované vody.

Stop roztok

Jako roztok zastavující reakci sloužila 3% (w/v) kyselina trichloroctová.

### Neutralizační roztok

1M NaOH

Ze známých hodnot koncentrace proteinu ve vzorku mikrosomální frakce bylo vypočítáno množství detergentu, které bylo k tomuto vzorku přidáno. Poměr detergent : protein (w/w) byl zvolen 1:2. 100 µl rozmraženého vzorku mikrosomů s roztokem detergentu bylo inkubováno 20 minut při teplotě 4°C. V mezičase byla v mikrozkuvkách, umístěných na ledu, připravena reakční směs. Pro jeden vzorek mikrosomů se připravilo 4-6 paralelních vzorků a 2-3 slepé paralelní vzorky, kde byla místo UDP-GA pouze redestilovaná voda. Do každé mikrozkuvky bylo napipetováno 30 µl Tris pufru, 30 µl p-NF a 30 µl UDP-GA. Reakce byla zahájena přidáním 10 µl vzorku mikrosomů s detergentem. Mikrozkuvky byly promíchány a vloženy do lázně na 20 minut při 37°C. Reakce byla po uplynulém čase ukončena přesunem mikrozkuvek do ledu a přidáním 50 µl stop roztoku. Deproteinovaný roztok byl centrifugován 3 minuty při rychlosti 5000 otáček za minutu. 50 µl supernatantu bylo přidáno k 50 µl neutralizačního roztoku, který byl předem rozpipetován do mikrotitrační destičky. Došlo ke zbarvení, které bylo fotometricky detekováno. Hodnota absorbance odpovídala množství nezreagovaného p-nitrofenolu. Hodnoty absorbance vzorků byly odečteny od absorbancí slepých vzorků.

### Výpočet

Pro výpočet aktivity UGT byla stanovena absorbance 100% množství p-NF, které do reakce přidáváme. Zjištěna byla smícháním 30 µl p-NF, 30 µl Tris-HCl pufru, 40 µl redestilované vody a 50 µl stop roztoku. To vše bylo promícháno a 50 µl bylo odebráno do mikrotitrační destičky k 50 µl neutralizačního roztoku již připraveného v jamkách. Následně byla změřena absorbance.

#### **4.2.11.2 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy**

Principem této metody je spektrofotometrické stanovení množství produktu z reakce katalyzované glutathion-S-transferasou (GST). Jako substrát slouží 1-chloro-2,4-dinitrobenzen, který je konjugován s glutathionem v přítomnosti GST. Vzniklý produkt S-2,4-dinitrofenylglutathion má žluté zbarvení a může být tedy detekován při vlnové délce 340 nm.

Substrát: 0,1 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)

Navážka 30,4 mg CDNB byla rozpuštěna v 1,5 ml 95% ethanolu.

Konjugační činidlo: 0,1 M redukovaný glutathion

Navážka 46,1 mg redukovaného glutathionu (GSH) byla rozpuštěna v 1,5 ml redestilované vody.

0,1 M fosfátový pufr pH 6,5

Nejdříve byl připraven 0,1 M roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  rozpuštěním 1,79 g v 50 ml redestilované vody. V další kádince bylo rozpuštěno 0,78 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v 50 ml redestilované vody. Pufr byl připraven za stálé kontroly pH, smísením obsahů první a druhé kádinky v poměru přibližně 1:3 tak, aby bylo získáno výsledné pH 6,5.

Reakční směs

Reakční směs byla připravena těsně před měřením v potřebném množství s ohledem na počet vzorků. Složena byla z fosfátového pufru, substrátu a roztoku konjugačního činidla v poměru 48:1:1.

Před začátkem měření byly ručně nastaveny parametry na přístroji UV-VIS spektrofotometr HELIOS  $\beta$ . Vlnová délka byla zadána 340 nm, počet cyklů byl 4, přičemž jeden cykl trval 60 sekund a počet měřených kyvet byl 7 (5 vzorků a 2 slepé vzorky). Když byl přístroj nachystán, do každé ze sedmi kyvet bylo pipetováno 980  $\mu\text{l}$  reakční směsi. První dvě kyvety byly do celkového objemu 1 ml doplněny 20  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru. Kyveta byla překryta parafilmem a několikrát překlopena. Tím byl roztok protřepán. V přístroji pak byly tyto kyvety uloženy v polohách 6 a 7. Do zbývajících 5 kyvet bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  cytosolu a byly protřepány stejným způsobem. Umístěny byly do pozic 1-5. Ihned bylo spuštěno měření a na přístroji se objevovaly naměřené absorbance. Průměrná absorbance naměřená u slepých vzorků byla od ostatních naměřených hodnot odečtena.

Poměr konjugovaného substrátu se vypočítá z odečtené absorbance po 1 minutě s použitím extinčního koeficientu  $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  při vlnové délce 340 nm. Jednotka enzymové aktivity je dána jako množství enzymu katalyzující přeměnu 1  $\mu\text{mol}$  S-2,4-dinitrofenylglutathionu za minutu (při použití 1 mM GSH a 1 mM CDNB). Specifická aktivita byla vyjádřena jako aktivita v 1 mg proteinu.



## **4.2.12 Kvantifikace proteinu GST a CBR1 při ovlivnění tkáňových řezů**

### **4.2.12.1 Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu**

Při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu dochází k separaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Zahřátím vzorku za denaturačních a redukčních podmínek dochází k jeho denaturaci a navázání molekul dodecylsulfátu sodného, který udělí proteinu vysoký záporný náboj přímo úměrný jeho hmotnosti. Po umístění gelu do elektrického pole dojde k rozdělení molekul podle velikosti jejich záporného náboje.

#### **Zásobní roztoky:**

##### 4 M HCl roztok

Do 150 ml redestilované vody bylo přidáno 88 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Následně byl objem doplněn na 250 ml redestilovanou vodou.

##### Tris - HCl pufr (0,5 M, pH 6,8)

Navážka 6 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu byla rozpuštěna v 75 ml redestilované vody. Za stálého míchání a kontroly pH bylo pomocí 4 M HCl, upraveno pH pufru na 6,8. Objem byl doplněn redestilovanou vodou na 100 ml.

##### Tris - HCl pufr (1,5 M, pH 8,8)

Navážka 18,5 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu byla rozpuštěna v 75 ml redestilované vody. Za stálého míchání a kontroly pH bylo pomocí 4 M HCl, upraveno pH pufru na 8,8. Objem byl následně doplněn redestilovanou vodou na 100 ml.

##### 10% roztok SDS

Navážka 10 g dodecylsulfátu sodného byla rozpuštěna v 80 ml redestilované vody. Po rozpuštění byl roztok doplněn na 100 ml redestilovanou vodou.

##### 0,05% bromfenolová modř (BFB)

Navážka 0,005 g bromfenolové modři byla rozpuštěna v 10 ml redestilované vody.

##### Zásobní roztok akrylamid/bis-akrylamid

Po celou dobu přípravy práce probíhala v rukavicích, s rouškou a s nejvyšší opatrností. Navážka 30 g akrylamidu a 0,8 g bis-akrylamidu byla rozpuštěna za stálého

míchání v malém množství redestilované vody. Po rozpuštění byl roztok doplněn na 100 ml redestilovanou vodou.

#### Koncentrovaný elektrodový pufr

Navážky 72 g glycinu, 15 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu a 5 g dodecylsulfátu sodného byly rozpuštěny v 900 ml redestilované vody. Za stálého míchání a měření pH bylo, pomocí 4 M HCl, upraveno pH roztoku na 8,3. Následně byl roztok doplněn na 1000 ml redestilovanou vodou.

#### Zásobní vzorkový pufr

Připraven byl smícháním 1,3 ml redestilované vody, 1,0 ml Tris-HCl pufru (0,5 M, pH 6,8), 2,0 ml glycerolu, 3,0 ml 10% roztoku SDS a 0,6 ml 0,05% roztoku BFB.

#### Isobutanol nasycený vodou

Smíchán byl isobutanol s redestilovanou vodou. V horní vrstvě byl tak vytvořen isobutanol nasycený vodou.

#### **Pracovní roztoky:**

##### 10% roztok persíranu amonného (APS)

Tento roztok byl připraven těsně před použitím rozpuštěním navážky 0,025 g persíranu amonného v 250 µl redestilované vody.

##### Separáčnı gel 12,5%

V kádince bylo smícháno 3,2 ml redestilované vody, 2,5 ml Tris – HCl pufru (1,5 M, pH 8,8), 4,2 ml roztoku akrylamid/bis-akrylamid a 0,1 ml 10% roztoku SDS. Následně bylo přidáno 100 µl 10% roztoku APS a 8 µl tetramethylethylendiaminu. Vzniklé množství vystačilo na dva gely.

##### Zaostřovací gel 4%

V kádince bylo smícháno 3,12 ml redestilované vody, 1,26 ml Tris - HCl pufru (0,5 M, pH 6,8), 0,5 ml roztoku akrylamid/bis-akrylamid a 0,05 ml 10% roztoku SDS. Následně bylo přidáno 100 µl 10% roztoku APS a 8 µl tetramethylethylendiaminu. Takto bylo připraveno množství pro dva gely.

### Elektrodový pufr

70 ml koncentrovaného elektrodového pufru bylo smícháno s 280 ml redestilované vody.

### Vzorkový pufr

K potřebnému množství zásobního vzorkového pufru byl přidán 2-merkptoethanol v poměru 50  $\mu$ l 2-merkptoethanolu na 1 ml zásobního vzorkového pufru.

Na přípravu polyakrylamidového gelu byl připraven nalévací stojánek, sklo, sklo se spacerem, spony a hřeben. Skla byla přiložena na sebe a spojená sponami byla postavena na gumovou podložku nalévacího stojánku, kde byla přichycena vrchním kolíkem. Mezi takto připravená skla bylo zahájeno nalévání čerstvě připraveného separačního gelu, a to do výšky přibližně 4,5 ml od spodního okraje. Gel byl převrstven přibližně 200  $\mu$ l vodou nasyceným isobutanolem, a takto byl ponechán polymerovat 45 minut. Po uplynutí této doby byl isobutanol opatrně slit, vypláchnut redestilovanou vodou a místo bylo opatrně vysušeno filtračním papírem. V tuto chvíli byl nanesen mezi skla, již připravený, zaostřovací gel. Opatrně byl následně vsunut hřeben a gel byl ponechán polymerovat v lednici minimálně dvě hodiny, většinou však přes noc.

Před zahájením samotné elektroforézy bylo nezbytné naředit vzorky proteinu redestilovanou vodou tak, aby koncentrace proteinu byla 2  $\mu$ g/ $\mu$ l. Připravený roztok vzorku byl smíchán se vzorkovým pufrem v poměru 1:1 a v mikrozkumavce byl vložen do předehřátého termobloku na 3 minuty povařit. V mezičase byl z gelu opatrně vyjmut hřeben a vzniklé jamky byly propláchnuty vodou. Pro další postup byl připraven stojánek, jehož vnitřní těsnění bylo očištěno a lehce potřeno tukem. Skla s gelem byla vložena do stojánku a celý stojánek byl přesunut do vaničky. Do horního elektrodového prostoru bylo nalito asi 125 ml elektrodového pufru tak, aby byl ponořen celý gel. Spodní elektrodový prostor byl naplněn elektrodovým pufrem tak, aby hladina byla nad spodním okrajem gelu. Do všech jamek v gelu, vyjma obou krajních, bylo pomocí nanášecího bloku pipetováno malé množství vzorku (maximálně 50  $\mu$ l) a do jedné jamky 5  $\mu$ l molekulárního standardu s definovanou velikostí jednotlivých fragmentů. Po vyjmutí nanášecího bloku byla vanička vložena do ledové lázně, přiklopena víčkem a připojena ke zdroji. Na zdroji bylo nastaveno konstantní napětí 100 V a přístroj byl spuštěn. Když vzorek dosáhl rozdělovacího gelu, napětí bylo zvýšeno na 200 V. Jakmile čelo dosáhlo spodního okraje gelu, zdroj byl odpojen, stojánek byl vytáhnut z vaničky a horní elektrodový pufr byl odlit.

#### **4.2.12.2 Imunobloting**

##### Blotovací pufr

Navážka 6,06 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu a 28,8 g glycinu byla rozpuštěna v 500 ml redestilované vody. Následně bylo přidáno 400 ml methanolu a objem byl doplněn na 2000 ml redestilovanou vodou.

Po ukončení elektroforézy byla skla s gelem okamžitě ponořena do blotovacího pufru. Pomocí klínek byla skla rozevřena a gel odříznut od zaostřovacího gelu a spaceru. Pro označení prvního nanášeného vzorku byl odříznut i horní roh separačního gelu v jeho blízkosti. Separační gel byl oddělen od skla a ponechán několik minut volně plavat v blotovacím pufru. Nyní bylo důležité správně sestavit blotovací sendvič. Všechny části sendviče byly nejdříve namočeny v blotovacím pufru. Na spodní straně byla bílá houbička a na ní silný filtrační papír. Následoval polyakrylamidový gel, na který byla položena PVDF (polyvinyliden difluoridová), případně nitrocelulózová membrána s odstřiženým pravým rohem, překrytá silným filtračním papírem. Navrch byla ještě položena bílá houbička a celý sendvič byl vložen do blotovacího zařízení. Blotování probíhalo při konstantním napětí 100 V.

#### **4.2.12.3 Detekce – barvení blotu s protilátkou**

##### **Reakční roztoky**

##### Tris - HCl pufr (0,1 M, pH 8,0)

Navážka 12,11 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu byla rozpuštěna v 800 ml redestilované vody a pH pufru bylo upraveno za stálého míchání pomocí 4 M HCl na požadovaných 8,0. Roztok byl doplněn redestilovanou vodou na 1000 ml.

##### Roztok TBST

Navážka 8,77 g NaCl byla rozpuštěna v 300 ml redestilované vody. Po rozpuštění byly přidány 3 ml Tweenu a 100 ml Tris - HCl pufr (0,1 M, pH 8,0). Redestilovanou vodou byl objem doplněn na 1000 ml.

##### Roztok TBS

Navážka 2,19 g NaCl byla rozpuštěna ve 100 ml redestilované vody. Po rozpuštění bylo přidáno 25 ml Tris - HCl pufr (0,1 M, pH 8,0). Získané množství bylo doplněno na 250 ml redestilovanou vodou.

#### Pufr alkalické fosfatázy (AP pufr)

Navážky 6,06 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu a 508 g  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$  byly rozpuštěny v 300 ml redestilované vody. Za stálého míchání a měření pH bylo, pomocí 4 M HCl, upraveno výsledné pH roztoku na 9,5. Objem byl doplněn na 500 ml redestilovanou vodou.

#### Roztok primární protilátky

Navážka 0,075 g mléka byla rozpuštěna v 15 ml roztoku TBST. Přidáno bylo 5  $\mu$ l zásobního roztoku primární protilátky. Používána byla kozí polyklonální protilátka proti GST $\alpha$  nebo GST $\mu$ , králičí polyklonální protilátka proti CBR1 a myší monoklonální protilátka proti  $\beta$ -aktinu.

#### Roztok sekundární protilátky

Navážka 0,075 g mléka byla rozpuštěna v 15 ml roztoku TBST a přidány byly 3  $\mu$ l zásobního roztoku sekundární protilátky. Byly použity protilátky proti primárním protilátkám, tedy protilátka proti kozí polyklonální protilátce proti GST $\alpha$  nebo GST $\mu$ , proti králičí polyklonální protilátce proti CBR1 a proti myší monoklonální protilátce proti  $\beta$ -aktinu.

Po skončení blottingu byl sendvič otevřen a pomocí pinzety byla opatrně vyjmuta membrána. Vložena byla do 25 ml roztoku TBS na jednu minutu za účelem oplachu. Přes noc byla v lednici membrána ponechána v 5% mléku v roztoku TBST (2,5 g mléka v 50 ml roztoku TBST). Druhý den následovala inkubace membrány s protilátkami a jejich promývání. Celý tento proces probíhal v 50 ml samostojné centrifugační zkumavce se šroubovacím uzávěrem, kam byla membrána umístěna tak, aby strana s navázanými proteiny směřovala dovnitř zkumavky. Všechny roztoky, které byly při inkubaci používány, měly pokojovou teplotu. Zkumavky s membránami byly nejdříve naplněny 5 ml roztoku TBST a 5 minut byly ponechány k oplachu na roleru. Roztok TBST byl vyměněn a proces byl zopakován. Membrána byla následně inkubována 45 minut s 15 ml roztoku primární protilátky. Po první inkubaci následoval oplach membrány, kdy byl obsah zkumavky odlit pryč a 5 minut byl prováděn oplach v několika ml roztoku TBST. Tento oplach byl zopakován šestkrát. Teprve potom mohla být membrána opět podrobena 45 minutové inkubaci, tentokrát s 15 ml roztoku sekundární protilátky. Membrána byla opět opláchnuta v přibližně 5 ml roztoku TBST a po 5 minutách byl roztok vyměněn a oplach se mohl opakovat. Opakování proběhlo celkem šestkrát. Po posledním oplachu byl roztok TBST vylit do výlevky a zkumavka s membránou byla naplněna přibližně 5 ml roztoku TBS. Po 5 minutách byl roztok

vyměněn a 5 minutový oplach byl zopakován. Poslední oplach membrány byl prováděn také dvakrát po 5 minutách, ale tentokrát v přibližně 5 ml AP pufru.

#### **4.2.12.4 Chemiluminiscenční detekce**

##### Vývojka (negativní, Fomadon)

Vývojka byla připravována v množství 500 ml. Pro její přípravu byl naředěn koncentrát redestilovanou vodou v poměru 1:14.

##### Ustalovač (univerzální, kyselý, Fomafix)

Naředěním koncentráту redestilovanou vodou v poměru 1:4 bylo připraveno 1000 ml ustalovače.

AP pufr z posledního oplachu byl odlit a zkumavka s membránou byla sundána z roleru a přenesena do temné komory. Membrána byla opatrně vyjmuta ze zkumavky a rozprostřena proteinovou stranou směřující nahoru. Na její povrch byly napipetovány 2 ml substrátu a při tlumeném světle proběhla 5 minut trvající inkubace. Membrána byla opatrně pinzetou vyjmuta ze substrátu a po okapání byla vložena do průsvitné fólie. Membrána byla vodotěsně zabalena, fólie byla otřena od zbytkové vlhkosti a umístěna do kazety. Pod ochranným světlem byl nachystán potřebný počet RTG filmů a podle potřeby byla upravena jejich velikost. Film byl opatrně položen na zabalenou membránu v kazetě, kazeta byla zavřena. Doba osvitů byla měněna podle potřeby na 5, 7 nebo 10 minut. Ihned po expozici byl celý film ponořen do vývojky a neustále s ním bylo mírně, pomocí pinzety, pohybováno. Jakmile byl film dostatečně vyvolaný, byl opláchnut v redestilované vodě a přenesen do ustalovače. Pár minut byl ponechán volně plavat v ustalovači a následně byl opět na několik minut ponořen do redestilované vody. Na závěr byl film ponechán volně schnout.

V případech, kdy bylo žádoucí membránu opětovně použít, byla obalena v potravinářské folii a uskladněna v mrazničce. Po 5 minutovém rozmražení a oplachu v roztoku TBS bylo možné celý proces detekce opakovat.

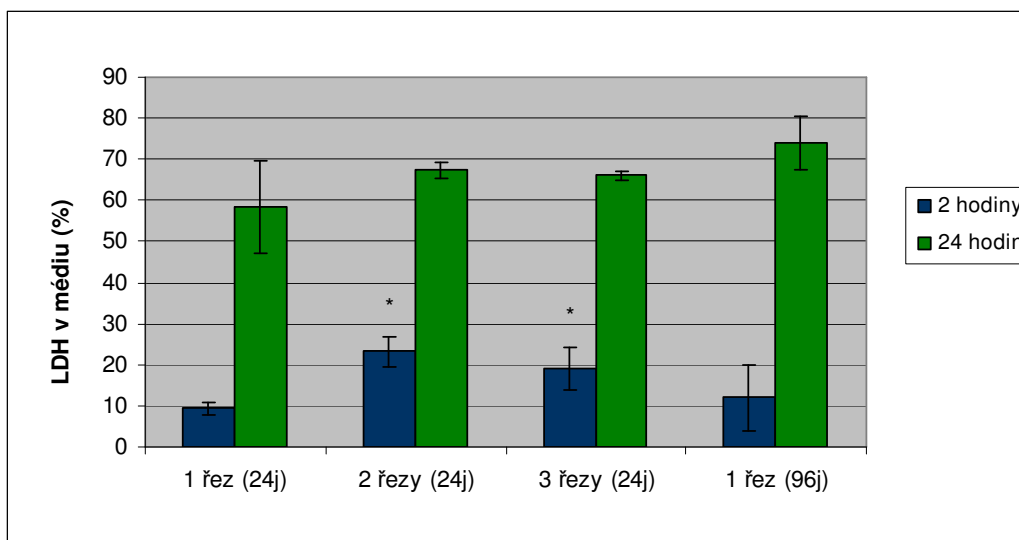
## 5 Výsledky

### 5.1 Optimalizace tvorby tkáňových řezů

Jaterní řezy byly inkubovány bez ovlivnění jejich funkce (kap. 4.2.1.1). Porovnávána byla jejich životnost v závislosti na čase, jejich velikosti, počtu řezů na jamku a délce inkubace. Cílem bylo zjistit nejlepší podmínky pro další experimenty. Jako hodnotící faktor pro pozorování rozdílů životaschopnosti řezů byla zvolena aktivita LDH. Porovnávána byla inkubační schémata:

1. jeden řez (průměr řezu 8 mm) v jedné jamce 24 jamkové desky (1 řez (24j))
2. dva řezy (průměr řezu 8 mm) v jedné jamce 24 jamkové desky (2 řezy (24j))
3. tři řezy (průměr řezu 8 mm) v jedné jamce 24 jamkové desky (3 řezy (24j))
4. jeden řez (průměr řezu 5 mm) v jedné jamce 96 jamkové desky (1 řez (96j))

Aktivita LDH byla měřena v médiu a homogenátu. Životnost řezů byla hodnocena jako podíl aktivity zjištěné v médiu (v %) z celkové aktivity (v médiu a homogenátu řezu) obsažené v jednotlivých jamkách.



\* signifikantní rozdíl vůči 1. schématu ( $p \leq 0,05$ )

Obr. 11: Porovnání procentuálního zastoupení aktivity LDH v médiu jednotlivých inkubačních schémat po 2 a 24 hodinách inkubace.

Po 2 hodinách inkubace byla významně vyšší životnost u prvního schématu v porovnání s druhým a třetím. Po 24 hodinách již vykazované rozdíly mezi jednotlivými schématy nebyly statisticky významné.

### **MTT test**

Tento test životnosti buněk byl použit u jaterních řezů s průměrem 5 mm umístěných po jednom v 96 jamkové desce. Hodnoceny byly řezy s ukončenou inkubací po 2 a 24 hodinách (tab. 5). K lyzaci řezů během metody MTT nedošlo, bylo tedy třeba roztok opatrně odpipetovat (10  $\mu$ l) do prázdné jamky a objem doplnit na 50  $\mu$ l lyzačním roztokem.

Tab. 5: Životnost jaterních řezů s průměrem 5 mm stanovená pomocí MTT testu.

<b>Doba inkubace (h)</b>	<b>Absorbance <math>\pm</math> SD</b>
<b>2</b>	0,333 $\pm$ 0,022
<b>24</b>	0,234 $\pm$ 0,020

Po 24 hodinách poklesla aktivita o 29,6% v porovnání s hodnotami naměřenými po 2 hodinové inkubaci. Tuto metodu jsme dále nepoužívali, neboť nedošlo k lyzaci řezů a tím se značně snížila přesnost celého měření.

## **5.2 Odezva jaterních řezů na cytotoxickou látku**

Zvolenou cytotoxickou látkou byl doxorubicin (DOX) a jeho efekt na buňky jaterních řezů byl sledován ve dvou odlišných experimentech. Při prvním experimentu byla nejvyšší koncentrace DOX 25  $\mu$ M. V druhém pokusu bylo pro zvýšení rozdílu životnosti řezů přidáno inkubační médium o koncentraci 50  $\mu$ M DOX.

### **5.2.1 Vliv doxorubicinu - první experiment**

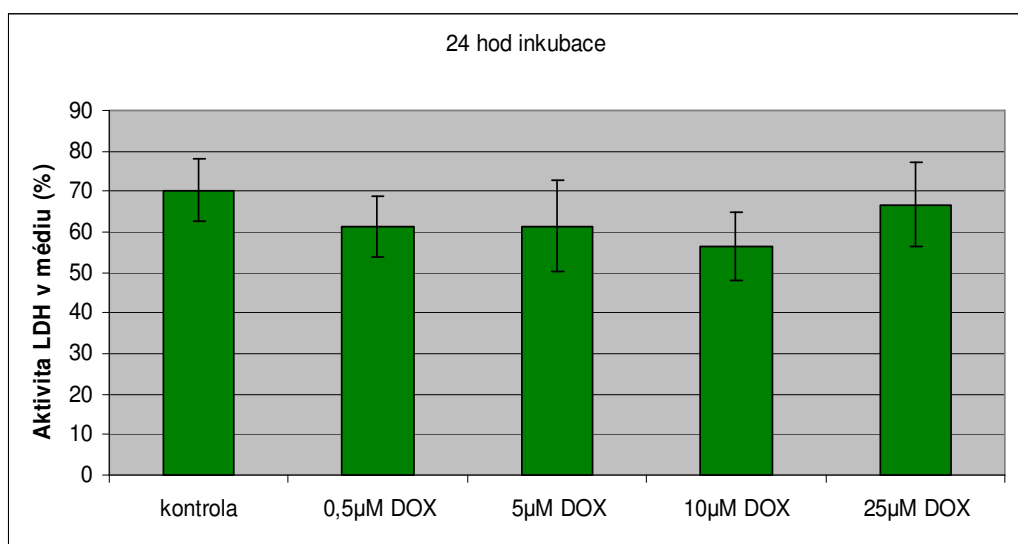
#### **Stanovení aktivity laktátdehydrogenasy**

Měření aktivity LDH v médiu probíhalo průběžně a po 24 hodinách byla stanovena i v homogenátu (tab. 6). Stanovení probíhalo po předchozí inkubaci popsané podle postupu v kapitole 4.2.4, kdy řezy byly ovlivňovány různými koncentracemi DOX.



Tab 6. Aktivita LDH po 24 hodinách inkubace.

DOX ( $\mu\text{M}$ )	Aktivita LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	
	Médium	Homogenáty
	24 h	24 h
0	191,91 $\pm$ 68,48	76,97 $\pm$ 13,31
0,5	121,81 $\pm$ 47,20	70,50 $\pm$ 10,77
5	129,58 $\pm$ 62,96	69,15 $\pm$ 7,95
10	95,16 $\pm$ 48,25	65,56 $\pm$ 11,53
25	152,56 $\pm$ 69,50	76,76 $\pm$ 13,88



Obr. 12: Procentuální zastoupení LDH uvolněné do inkubačního média po 24 hodinách.

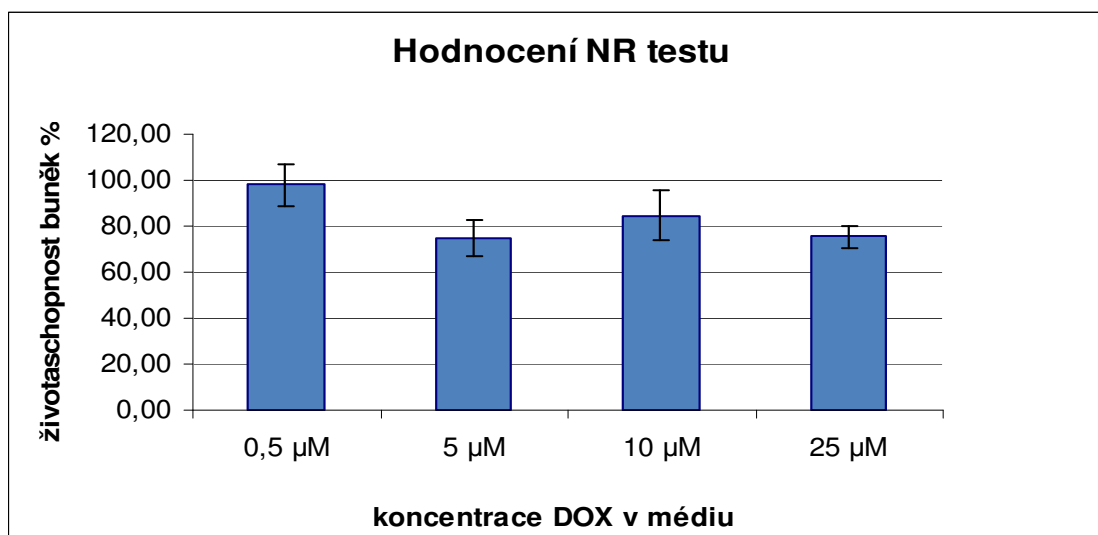
Po 24 hodinách byla životnost jaterních řezů ovlivňovaných DOX srovnatelná s kontrolou.

### Stanovení cytotoxicity testem s neutrální červení

V prvním experimentu s DOX byla hodnocena cytotoxicita po 24 hodinách pomocí testu s neutrální červení (kap. 4.2.9.2). Absorbance naměřena po 24 hodinách v kontrolních řezech s nulovou koncentrací DOX byla stanovena jako 100% životnost řezu. Aritmetický průměr takto odvozené životnosti a jeho směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce 7 a graficky znázorněny na obrázku 13.

Tab. 7: Životaschopnost buněk získaná metodou NR-testu.

DOX ( $\mu\text{M}$ )	Životaschopnost (%)	Směrodatná odchylka
0,5	97,97	9,31
5	74,64	7,76
10	84,52	10,83
25	75,22	5,01



Obr. 13: Grafické znázornění životaschopnosti řezů po 24 hodinách inkubace ovlivňované doxorubicinem v různých koncentracích.

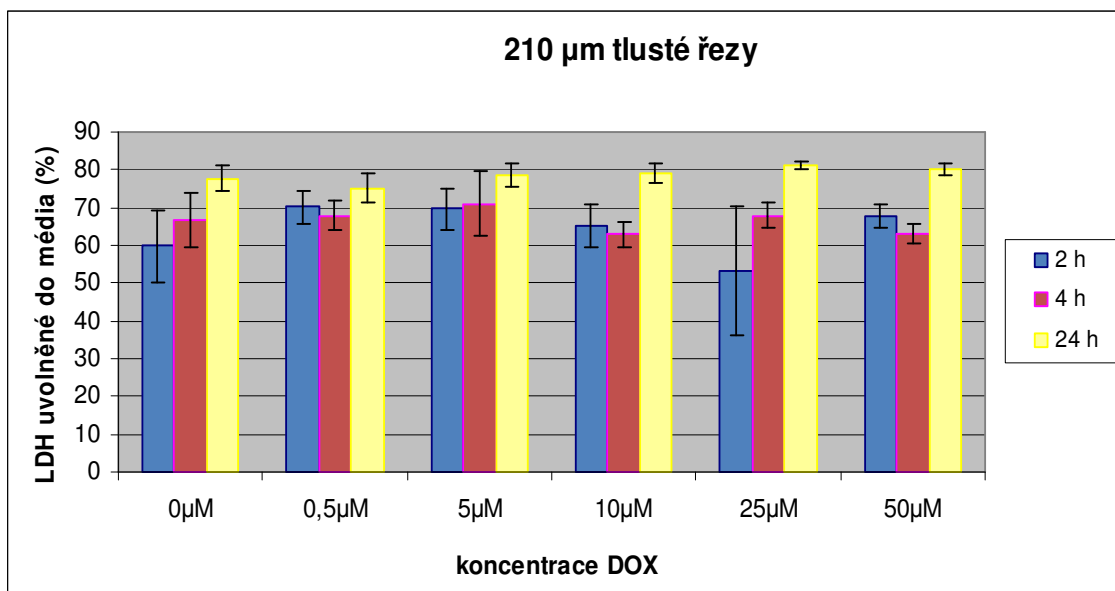
Z vytvořeného grafu (Obr. 13) se jeví rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi DOX jako statisticky málo významné, neboť řezy po 24 hodinách vykazují vysokou úmrtnost i bez ovlivnění cytotoxickými látkami. Tato metoda se neosvědčila, neboť lyzace řezů nebyla úplná. U dalších měření jsme ji již nepoužívali.

### 5.2.2 Vliv doxorubicinu - druhý experiment

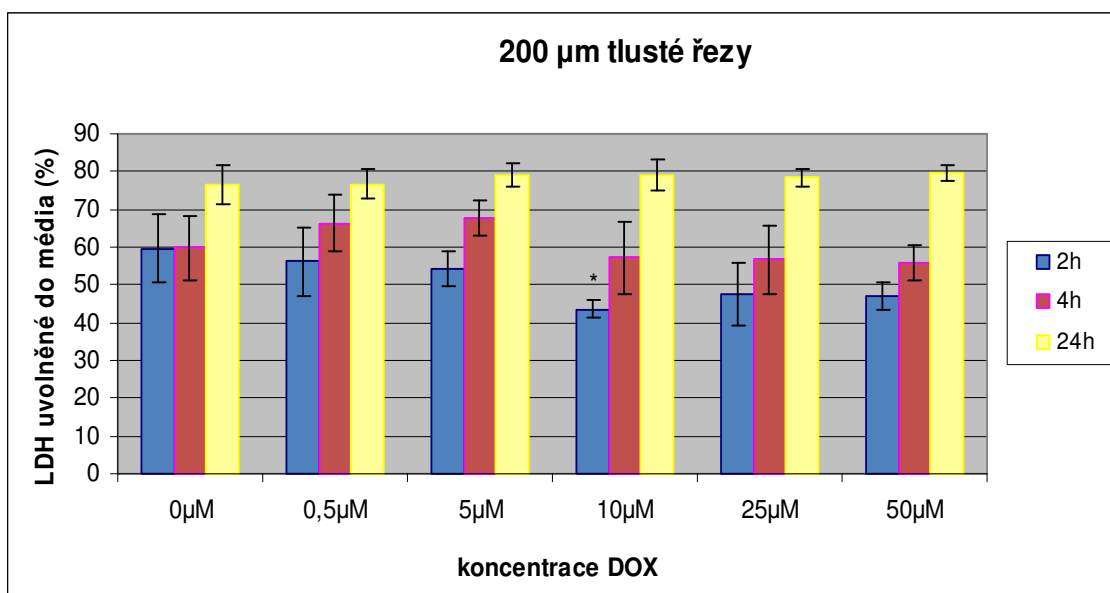
Při opakování předchozího experimentu došlo k několika změnám. Jedna řada kontrolních řezů v čistém médiu bez doxorubicinu byla nahrazena řezy inkubovanými v médiu s doxorubicinem o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ . Druhou obměnou bylo vytvoření řezů s odlišnou tloušťkou. První deska obsahovala řezy 210  $\mu\text{m}$  tlusté, v druhé desce byla tloušťka 200  $\mu\text{m}$ . Hodnocení životnosti probíhalo obdobně jako v případě prvního experimentu s doxorubicinem. Nejdříve byla stanovena aktivita LDH a proveden NR-test.

### Stanovení aktivity laktátdehydrogenasy

Při stanovování aktivity LDH bylo vyjádřeno procentuální zastoupení uvolněné LDH do inkubačního média. Jako 100% byl brán součet aktivity v médiu a homogenátu po 24 hodinách inkubace. Naměřené hodnoty jsou ilustrovány na obrázku 14 a 15.



Obr. 14: Procenta LDH uvolněné do inkubačního média jaterními řezy s tloušťkou 210 µm.



\* signifikantní rozdíl vůči kontrole 0 µM DOX ( $p \leq 0,05$ )

Obr. 15: Procenta LDH uvolněné do inkubačního média jaterními řezy s tloušťkou 200 µm.

V případě 210  $\mu\text{m}$  tlustých řezů nebylo pozorováno významné ovlivnění životnosti jaterních řezů doxorubicinem.

Řezy tlusté 200  $\mu\text{m}$  v inkubačním médiu s koncentrací 10  $\mu\text{M}$  doxorubicinu po dvou hodinách vykazovaly nižší koncentraci LDH v médiu než kontrola. Po ukončení 24 hodinové inkubace byla u všech řezů nízká životnost bez statisticky významných rozdílů.

### 5.3 Hodnocení životnosti střevních řezů

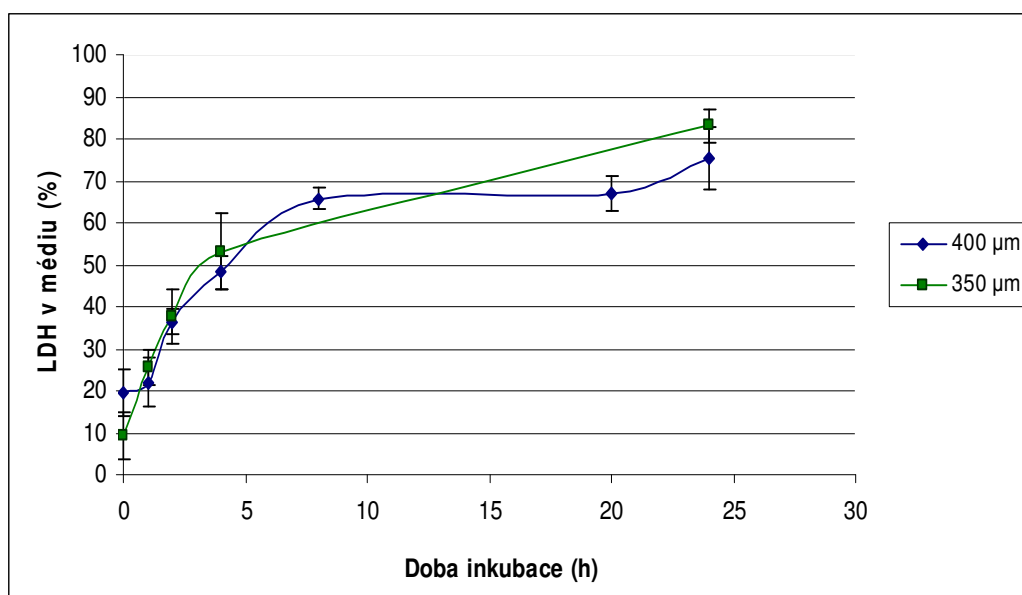
Porovnávány byly střevní řezy o tloušťce 400  $\mu\text{m}$  (Tab. 8) a 350  $\mu\text{m}$  (Tab. 9). Jejich inkubace byla ukončována v přesně daných inkubačních intervalech.

Tab. 8: Aktivita LDH naměřená v médiu a homogenátu střevních řezů o tloušťce 400  $\mu\text{m}$ .

400 $\mu\text{m}$		
čas (h)	Aktivita LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) $\pm$ SD	
	Médium	Homogenát
0	121,29 $\pm$ 46,54	472,60 $\pm$ 89,01
1	129,90 $\pm$ 39,82	459,84 $\pm$ 79,37
2	222,31 $\pm$ 32,84	387,25 $\pm$ 53,28
4	381,67 $\pm$ 55,18	424,31 $\pm$ 116,99
8	433,84 $\pm$ 22,59	226,38 $\pm$ 20,13
20	452,02 $\pm$ 31,48	228,23 $\pm$ 51,40
24	435,76 $\pm$ 45,24	144,02 $\pm$ 45,10

Tab. 9: Aktivita LDH naměřená v médiu a homogenátu střevních řezů o tloušťce 350  $\mu\text{m}$ .

350 $\mu\text{m}$		
čas (h)	Aktivita LDH ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) $\pm$ SD	
	Médium	Homogenát
0	31,00 $\pm$ 17,78	311,59 $\pm$ 27,51
1	105,43 $\pm$ 45,86	305,32 $\pm$ 106,01
2	135,74 $\pm$ 32,24	233,17 $\pm$ 93,13
4	194,60 $\pm$ 31,18	170,95 $\pm$ 45,84
24	304,05 $\pm$ 52,34	61,02 $\pm$ 13,44



Obr. 16: Procentuálně vyjádřená aktivita LDH v inkubačním médiu v jednotlivých časových intervalech.

Rozdíly mezi jednotlivými tloušťkami řezů nejsou výrazné. Významný je pokles životnosti řezů po 4 h, kdy LDH uvolněná do inkubačního média je kolem 50%.

## 5.4 Ovlivnění Urinalem Akut®

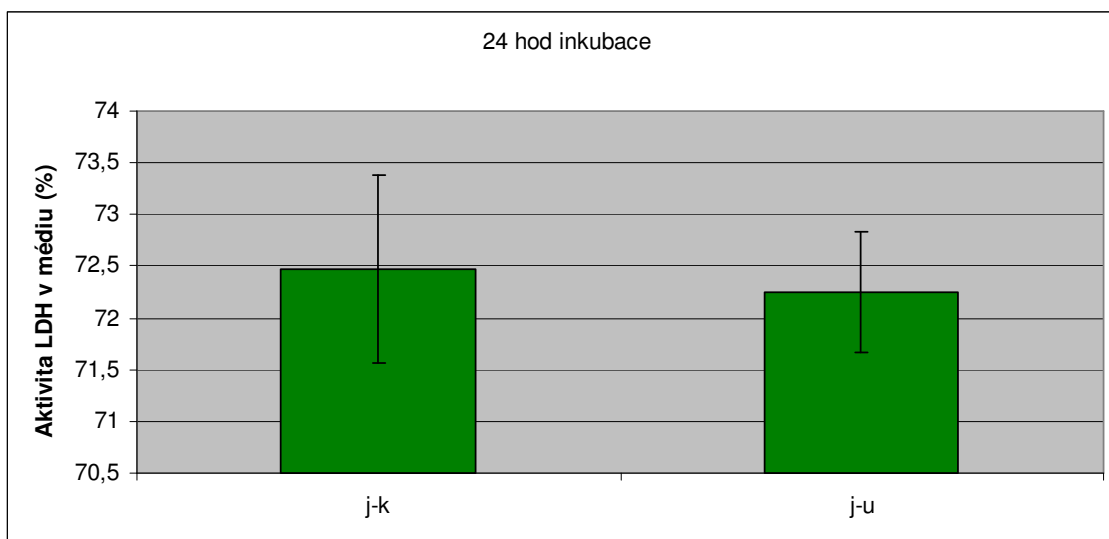
### 5.4.1 Hodnocení cytotoxicity

#### 5.4.1.1 Ovlivnění jaterních řezů

Příprava a inkubace jaterních řezů probíhala podle kapitoly 4.2.5.1. Řezy byly rozděleny do dvou skupin. První skupinou byly jaterní řezy bez Urinalu Akut® v inkubačním médiu (j-k). Druhá skupina (j-u) představovala řezy inkubované s tímto roztokem. Aktivita LDH byla měřena v médiu a homogenátu řezů (Tab. 10). Homogenát řezů byl pro další testování zpracován na mikrosomální a cytosolickou frakci podle postupu v kapitole 4.2.7.

Tab. 10: Aktivita LDH naměřená v médiu a homogenátu jaterních řezů.

	<b>j-k</b>	<b>j-u</b>
<b>Aktivita LDH v médiu (<math>\mu\text{M}/\text{min}</math>) <math>\pm</math> SD</b>	414,99 $\pm$ 36,19	418,41 $\pm$ 36,19
<b>Aktivita LDH v homogenátu (<math>\mu\text{M}/\text{min}</math>) <math>\pm</math> SD</b>	157,61 $\pm$ 54,98	160,47 $\pm$ 7,62



Obr. 17: Procentuální vyjádření LDH v médiu jaterních řezů

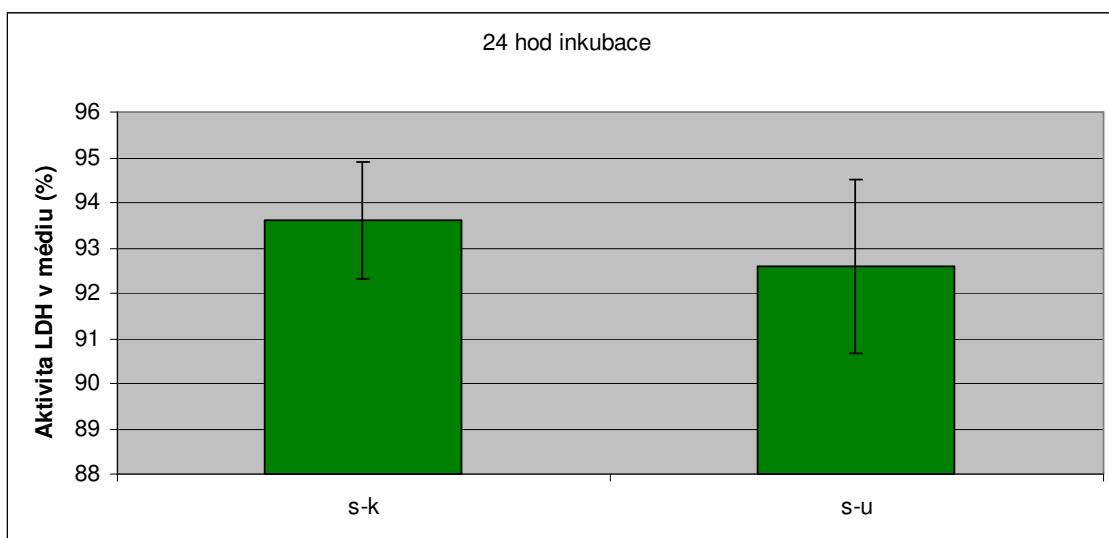
Po 24 hodinové inkubaci s roztokem Urinalu nedošlo k žádnému ovlivnění životnosti jaterních řezů.

#### 5.4.1.2 Ovlivnění střevních plátek

Střevní plátky byly připraveny a inkubovány podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.5.2. Střevní plátky označované jako kontrolní (s-k) byly inkubovány v RPMI médiu bez roztoku Urinalu Akut®. Střevní plátky s Urinalem Akut® byly značeny s-u. Po inkubaci byla ze střevních plátků seškrabána mukóza a ve vzniklém homogenátu byla stanovena aktivita LDH (tab. 11). Podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.7 byla z tohoto homogenátu připravena cytosolická a mikrosomální frakce.

Tab. 11: Aktivita LDH naměřená v médiu a homogenátu střevních plátků.

	<b>s-k</b>	<b>s-u</b>
<b>Aktivita LDH v médiu (<math>\mu\text{M}/\text{min}</math>) <math>\pm</math> SD</b>	356,23 $\pm$ 58,44	287,27 $\pm$ 61,79
<b>Aktivita LDH v homogenátu (<math>\mu\text{M}/\text{min}</math>) <math>\pm</math> SD</b>	24,12 $\pm$ 9,06	21,94 $\pm$ 3,85



Obr. 18: Procentuální vyjádření LDH v médiu střevních plátků.

Inkubace střevních plátků s Urinalem Akut<sup>®</sup> životnost řezů významně neovlivnila. V obou případech je životnost po 24 hodinách velice nízká (viz obr. 18).

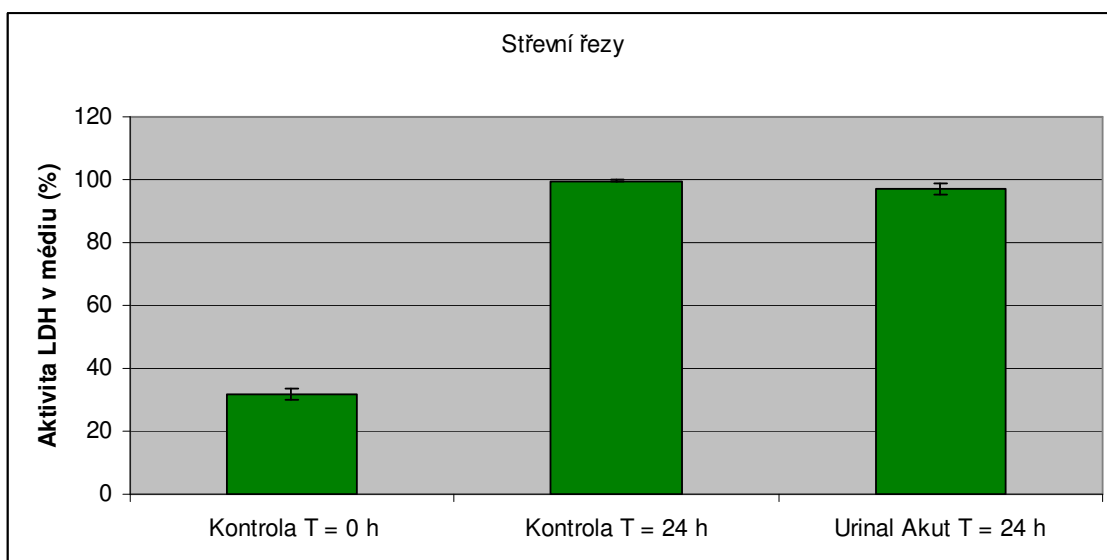
#### 5.4.1.3 Ovlivňování střevních řezů

Zjišťována byla buněčná viabilita a její ovlivnění Urinalem Akut<sup>®</sup>. Střevní řezy byly připraveny podle postupu popsaného v kapitole 4.2.1.2. Měření probíhalo ve dvou oddělených experimentech a inkubace obou experimentů probíhala podle kapitoly 4.2.5.3.

Aktivita LDH byla hodnocena u střevních řezů v čase  $T = 0$  h,  $T = 24$  h a u střevních řezů ovlivněných roztokem Urinalu Akut<sup>®</sup> v čase  $T = 24$  h.

Tab. 12: Aktivita LDH naměřená u střevních řezů z prvního experimentu.

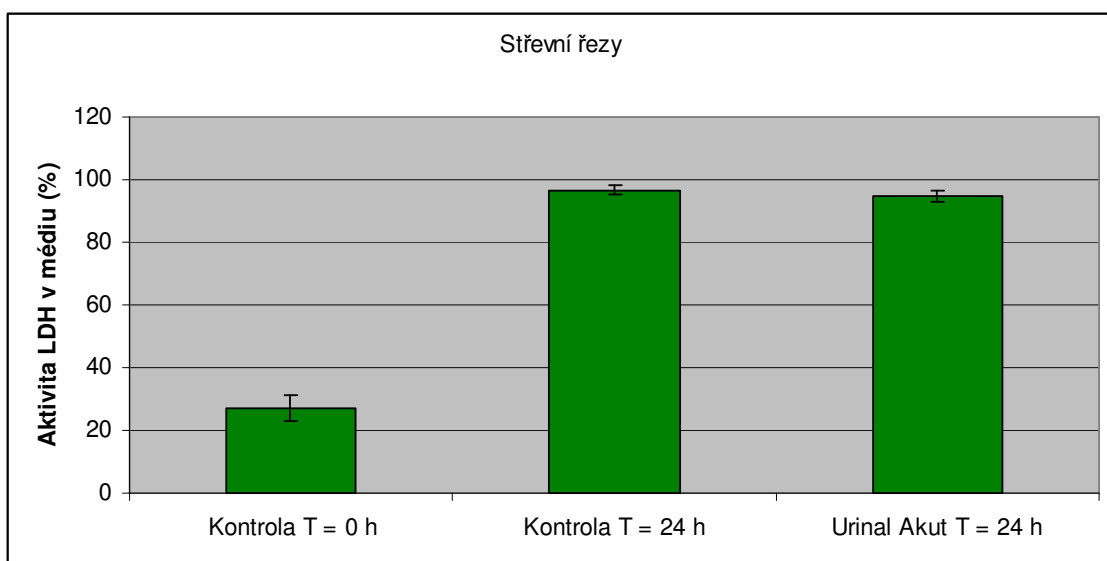
	Kontrola $T = 0$ h	Kontrola $T = 24$ h	Urinal Akut $T = 24$ h
Aktivita LDH v médiu ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) $\pm$ SD	53,66 $\pm$ 6,18	804,68 $\pm$ 72,00	774,61 $\pm$ 56,82
Aktivita LDH v homogenátu ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) $\pm$ SD	117,39 $\pm$ 19,89	4,09 $\pm$ 6,31	31,04 $\pm$ 13,68



Obr. 19: Graf hodnotící LDH uvolněnou do média střevních řezů, vytvořený na základě tabulky 12.

Tab. 13: Aktivita LDH naměřená u střevních řezů z druhého experimentu.

	<b>Kontrola T = 0 h</b>	<b>Kontrola T = 24 h</b>	<b>Urinal Akut T = 24 h</b>
<b>Aktivita LDH v médiu (<math>\mu\text{M}/\text{min}</math>) <math>\pm</math> SD</b>	48,16 $\pm$ 12,68	338,07 $\pm$ 21,25	412,20 $\pm$ 31,34
<b>Aktivita LDH v homogenátu (<math>\mu\text{M}/\text{min}</math>) <math>\pm</math> SD</b>	127,95 $\pm$ 10,21	11,12 $\pm$ 6,04	24,41 $\pm$ 9,22



Obr. 20: Graf hodnotící procento uvolněné LDH do inkubačního média střevních řezů, vytvořený na základě tabulky 13.



Hodnocení obou experimentů (Obr. 19 a Obr. 20) dalo velmi podobné výsledky u střevních řezů inkubovaných bez přídavku Urinalu Akut<sup>®</sup> a řezů, jejichž inkubační médium obsahovalo roztok Urinalu Akut<sup>®</sup>. V obou případech po 24 hodinové inkubaci byla životaschopnost řezů minimální.

## **5.4.2 Hodnocení metabolické aktivity**

### **5.4.2.1 Ovlivnění enzymů I. fáze biotransformace**

Z každého experimentu, sledujícího účinky Urinalu Akut<sup>®</sup>, byla v mikrosomální frakci stanovována aktivita isoformů 1A1, 1A2, 3A, 2B cytochromu P450 (kap. 4.2.10.1). V žádném vzorku však aktivita sledovaných isoformů detekována nebyla.

### **5.4.2.2 Ovlivnění enzymů II. fáze biotransformace**

#### **Stanovení specifické aktivity UDP-glukuronosyltransferasy**

Aktivita UGT byla stanovována u mikrosomálních frakcí jaterních řezů a střevních plátků nebo řezů bez ovlivnění i ovlivněných Urinalem Akut<sup>®</sup> (kap. 4.2.11.1). Výpočet aktivity UGT proběhl pomocí absorbance celkového množství p-NF (0,0167 mol), které bylo přidáváno do reakce a představovalo 100%. Zjištěná aktivita UGT byla vztažena na mg proteinu (tab. 14).

Tab. 14: Specifická aktivita UGT stanovená v mikrosomálních frakcích.

<b>Specifická aktivita UGT (nmol/min/mg) ± SD</b>	<b>j-k</b>	<b>j-u</b>	<b>s-k</b>	<b>s-u</b>
	2,31 ± 1,02	0,93 ± 0,54	0,91 ± 0,54	1,50 ± 1,24

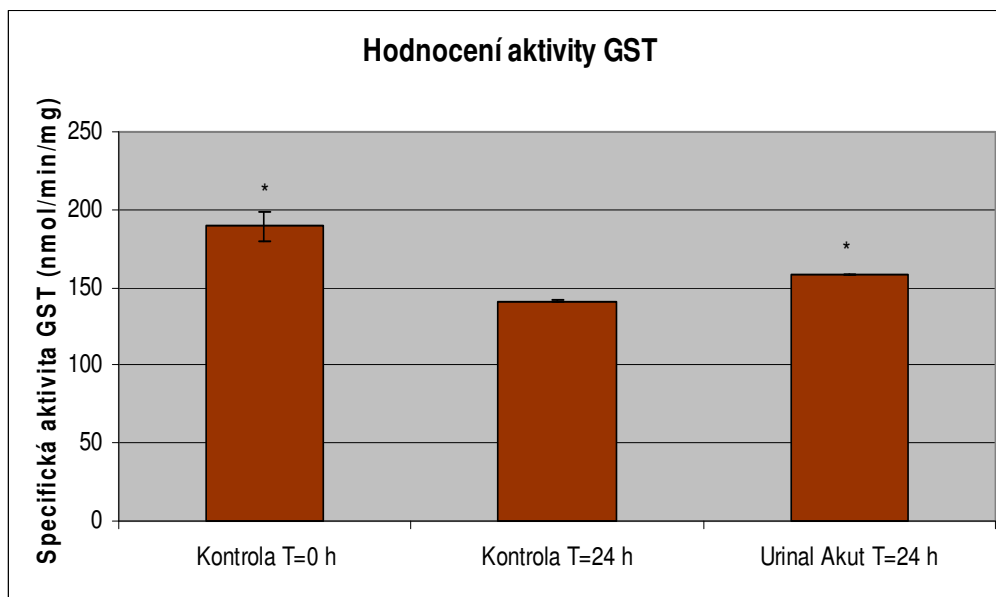
Rozdíly specifických aktivit v jaterních řezech a střevních plátcích nebyly statisticky významné. Ve střevních řezech aktivita UGT detekována nebyla.

#### **Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy**

Aktivita GST byla měřena v cytosolu střevních řezů kontrolních a řezů ovlivněných Urinalem Akut<sup>®</sup>. Stanovení proběhlo spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm (kap. 4.2.11.2). Hodnoty uvedené v tabulkách 15 a 16 jsou aritmetickým průměrem výsledků měření ± směrodatná odchylka.

Tab. 15: Specifická aktivita GST stanovená v jednotlivých cytosolických frakcích získaných z prvního experimentu se střevními řezy.

Specifická aktivita GST (nmol/min/mg) ± SD	Kontrola T=0 h	Kontrola T=24 h	Urinal Akut® T=24 h
		189,09 ± 9,24	140,86 ± 5,39



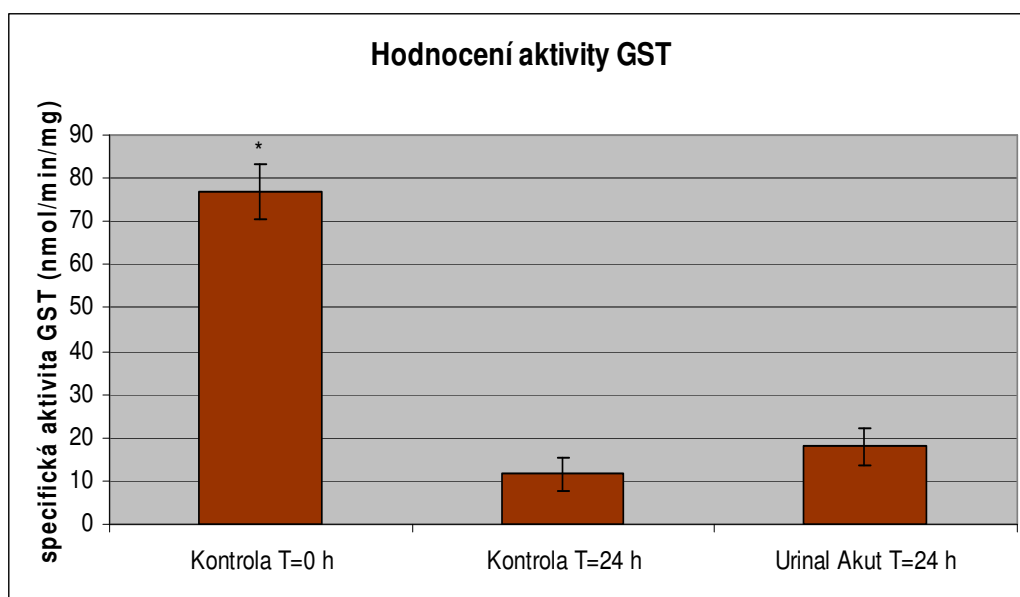
\* signifikantní rozdíl vůči kontrole T=24 h ( $p \leq 0,05$ )

Obr. 21: Porovnání specifické aktivity GST v cytosolické frakci střevních řezů.

Porovnáním naměřených specifických aktivit GST získaných v prvním experimentu se střevními řezy bylo zjištěno, že po 24 h je specifická aktivita mírně snížena. Vyšší hodnoty byly naměřeny u střevních řezů inkubovaných s Urinalem Akut®.

Tab. 16: Specifická aktivita GST v cytosolu střevních řezů získaných v druhém experimentu se střevními řezy.

Specifická aktivita (nmol/min/mg) ± SD	Kontrola T = 0 h	Kontrola T = 24 h	Urinal Akut T = 24 h
		76,74 ± 6,31	11,57 ± 3,84



\* signifikantní rozdíl vůči kontrole T=24 h ( $p \leq 0,05$ )

Obr. 22: Srovnání specifických aktivit naměřených v cytosolu střevních řezů z druhého experimentu.

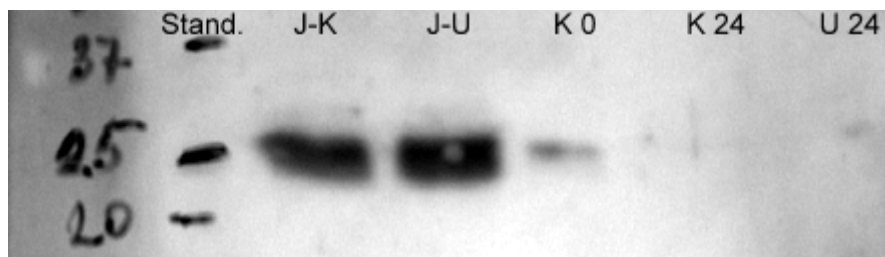
Porovnáním specifických aktivit z druhého experimentu byla nejvyšší hodnota zaznamenána v cytosolu kontrolních střevních řezů v čase 0 h. Po 24 h inkubaci nebyl rozdíl v aktivitách GST statisticky významný. Pokles specifické aktivity po 24 h byl přibližně stejný v obou experimentech.

## 5.5 Detekce proteinu GST a CBR1 v ovlivněných tkáňových řezech

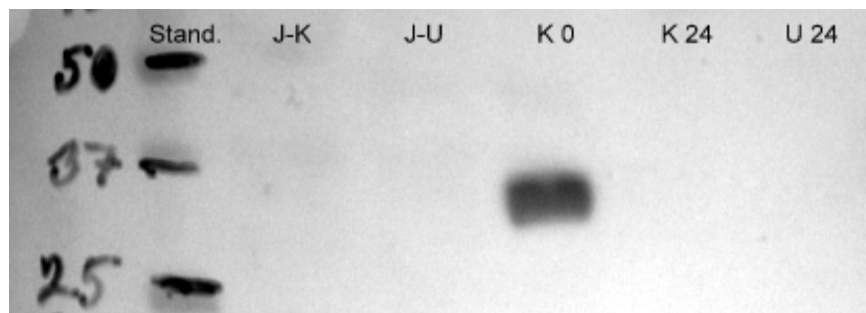
Princip metody elektroforézy na polyakrylamidovém gelu spočívá v separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti (kap. 4.2.12). Metoda detekce takto rozdělených proteinů byla založena na chemiluminiscenční analytické technice. Stanovení obsahu proteinu GST $\mu$  a CBR 1 proběhlo v cytosolické frakci:

- jaterních řezů kontrolních (J-K)
- jaterních řezů ovlivněných Urinalem Akut<sup>®</sup> (J-U)
- střevních řezů kontrolních s ukončenou inkubací v čase 0 (K 0)
- střevních řezů kontrolních s ukončenou inkubací v čase 24 h (K 24)
- střevních řezů inkubovaných 24 h s roztokem Urinalu Akut<sup>®</sup> (U 24)

Standard (Stand.) obsahoval proteiny o definované molekulové hmotnosti a sloužil k vytvoření tzv. žebříku.



Obr. 23: Stanovení obsahu proteinu GST $\mu$ .



Obr. 24: Stanovení obsahu proteinu CBR 1.

Molekulová hmotnost GST $\mu$  je 26 kDa. Přítomnost této isoformy byla prokázána v jaterních řezech a v menší míře ve střevních řezech kontroly T = 0 h (Obr. 23).

Molekulová hmotnost CBR1 odpovídá 30 kDa. Metodou imunoblotování se nám podařilo prokázat její přítomnost pouze u střevních řezů kontroly T = 0 h (Obr. 24).

## 6 DISKUSE

Tkáňové řezy jsou v současné době používány především ke studiu metabolismu syntetických a přírodních látek. Další využití nalézají při vyšetřování orgánové fyziologie, sledování efektu autokrinních a parakrinních stimulů a jako diagnostická technika při orgánových transplantacích. Významný experimentální systém z něj dělá především zachování všech typů buněk s původní architekturou tkáně a udržení vztahů mezi buňkami (Červenková et al. 2001).

Cílem bylo zavést tuto metodu a připravit ji tak pro další experimenty. Základní podmínkou pro splnění tohoto cíle bylo vypracovat přípravu a inkubaci řezů do takové podoby, aby řezy byly kvalitní, stále stejné a aby jejich životnost byla zachována po dostatečně dlouhou dobu. Pro sledování životnosti bylo nezbytné vybrat vhodnou metodu, která je aplikovatelná na tkáňové řezy. Pro jaterní řezy se za účelem stanovení viability používá stanovování hladin draslíku, energetický náboj v podobě ATP, MTT test, únik LDH do inkubačního média a histomorfologická vyšetření (Olinga et al. 1997). Volbou pro naše experimenty byl MTT test, NR test a stanovení aktivity LDH.

První metodou pro posouzení životaschopnosti řezů bylo stanovení aktivity LDH v inkubačním médiu a v homogenátu řezu. Za účelem srovnání jednotlivých výsledků jsme vyhodnotili procento uvolněné LDH do média. Tuto hodnotu jsme získali podílem aktivity LDH v médiu jednotlivých jamek a celkové aktivity LDH připadající na danou jamku (součet aktivity LDH v médiu a v homogenátu). Porovnávali jsme odlišné tloušťky řezů a různé inkubační intervaly. Nejdříve byla naše pozornost zaměřena na jaterní řezy. Tato tkáň je dostatečně pevná a tedy i snadněji zpracovatelná. Sledována byla životnost řezů s průměrem 5 mm a 8 mm. Byla vytvořena čtyři inkubační schémata. Řezy s průměrem 5 mm byly inkubovány v 96 jamkové destičce. Řezy s průměrem 8 mm byly rozděleny do tří skupin. Inkubovány byly ve 24 jamkové destičce, kdy každá jamka obsahovala 1, 2 nebo 3 řezy. Každé schéma mělo inkubační čas 2 h a 24 h. Po 2 hodinách inkubace byla významně vyšší životnost u prvního schématu (1 řez s průměrem 8 mm v jedné jamce) než při inkubaci více řezů v jedné jamce. Příčinou nižší aktivity je pravděpodobně nedostatek živin a kyslíku. Výsledky 5 mm řezů byly s prvním schématem srovnatelné. Po 24 h byla životnost všech řezů srovnatelná a velice nízká. Tento výsledek nepodpořil naše očekávání vytvořená na podkladě jiných studií, které uvádějí zachování potřebné životnosti jaterních řezů po dobu 96 h (de Graaf et al. 2010, Bach et al. 1996). Podobných výsledků dosáhl Kasper s kolektivem (2005), jehož výsledky ukazují zachování stejné

úrovně životnosti po dobu 24 h a její mírné snížení po 48 h (Kasper et al. 2005). Jednotlivé studie mají postupy jen mírně odlišné od těch námi použitých např. velikost jamkové desky, tloušťka řezů, použitá tkáň nebo mikroton.

Další obecně využívanou metodou pro zjištění životnosti buněk je MTT test. Tento test jsme využili při stanovení životnosti řezů s průměrem 5 mm inkubovaných v 96 jamkové destičce. Výsledky ukázaly, že po 24 h poklesla životnost o 29,6% v porovnání s hodnotami naměřenými po 2 h inkubace. Předpokladem provedené metody byla úplná lyzace řezů. K té však nedošlo a barvivo muselo být přepipetováno do jiné desky. Část barviva zůstala v nezlyzovaném řezu, z čehož pramení nepřesnost výsledků. Metoda MTT je u tkáňových řezů používána a její výsledky nejsou v daných studiích nijak zpochybňovány (Kasper et al. 2005, Obatomi et al. 1998).

Hodnocení cytotoxicity testem s neutrální červení je využíváno spíše u buněčných suspenzí. Často je touto metodou sledováno toxické působení rozličných xenobiotik (Khursid et al. 2010, Ayaki, Iwasawa 2010). My jsme se pokusili aplikovat jej na hodnocení životnosti tkáňových řezů. Konkrétně byl NR-test použit pro zhodnocení cytotoxického působení doxorubicinu na jaterní řezy. Toto stanovení proběhlo po 24 h inkubace a výslednou informací byla životaschopnost řezů vyjádřena v procentech. Srovnáním s kontrolními řezy (bez DOX) inkubovanými 24 h, které představovaly 100% životnost, byla životnost významně nižší u řezů inkubovaných s 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$  DOX. NR-test ani test MTT jsme dále nepoužívali pro jejich riziko zkreslení výsledků. Pro ověření životnosti jsme v dalších experimentech upřednostnili stanovení aktivity LDH.

Se zavedenou metodou pro stanovení životaschopnosti jsme hodnotili životnost řezů s rozdílnou tloušťkou řezu. Pro jaterní tkáň je doporučena tloušťka 200-250  $\mu\text{m}$  (Lake, Price 2013). My jsme porovnávali 200  $\mu\text{m}$  a 210  $\mu\text{m}$  tlusté řezy, které byly zároveň ovlivňovány doxorubicinem v koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ . Pro vyjádření životnosti jsme vyhodnotili procento uvolněné LDH do média. Zjištěné hodnoty jsme porovnávali s kontrolou (bez DOX) v časech 2 h, 4 h a 24 h inkubace. V jednotlivých časech byly výsledky u všech koncentrací DOX i u obou rozměrů řezů srovnatelné.

Použitím inkubace, kdy jsou jaterní řezy neustále ponořeny v inkubačním médiu, je možné udržovat jejich životaschopnost po dobu 1-3 dnů. Použitím jiného inkubačního systému lze tuto dobu prodloužit (Bach et al. 1996). Většina jaterních řezů po 24 h inkubaci vykazovalo životnost kolem 20-30%, což je nižší, než by se dalo čekat na základě předešlého tvrzení.

Další námi studovanou tkání byla tkáň střevní. Jako často používané médium pro střevní řezy slouží inkubační Williamsovo E médium doplněné glukózou (25 mM),

gentamicinem (50 mg/ml) a 250 mg/ml fungizonu. V tomto médiu si střevní řezy zachovávají životaschopnost 8-24 h. Stejně tak je využíváno i médium RPMI-1640, které bylo použito i v našich experimentech. U tohoto média však nejsou dostupná data o životaschopnosti řezů v závislosti na čase inkubace (Niu et al. 2013). Předpokládá se životnost obdobná jako u Williamsova E média.

Doporučovaná tloušťka střevních řezů je v intervalu 200-400  $\mu\text{m}$  (Niu et al. 2013). My jsme zjišťovali, zda je významný rozdíl v životnosti řezů o tloušťce 350  $\mu\text{m}$  a 400  $\mu\text{m}$ . Aktivita LDH u 400  $\mu\text{m}$  tlustých řezů byla měřena v čase 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 20 h, 24 h. U řezů s tloušťkou 350  $\mu\text{m}$  byly vynechány časové intervaly 8 h a 20 h. Důvodem byl nedostatek použitelné tkáně. Inkubace probíhala pouze v RPMI médiu bez ovlivnění jinou látkou. Ve výsledcích se neprojevily významné rozdíly mezi danými rozměry řezů. V obou případech byl pokles životnosti v prvních hodinách inkubace poměrně rychlý a životnost řezů po 4 h byla již snížena na přibližně 50%.

Další fází praktické části diplomové práce bylo sledování ovlivnění životnosti řezů a také metabolického ovlivnění jaterní a střevní tkáně laboratorního potkana roztokem Urinalu Akut<sup>®</sup>. Tento roztok obsahuje anthokyaniny a proanthokyanidiny, u kterých bylo prokázáno antioxidační působení. Antioxidanty prodlužují životnost buněk. Bylo tedy sledováno, zda vykáží stejný efekt u tkáňových řezů alepší jejich životnost. Abychom mohli zároveň pozorovat změny biotransformačních enzymů, byla doba inkubace stanovena na 24 h. Nejdříve byla sledována životnost řezů (případně střevních plátek) zhodnocením aktivity LDH.

Prvním experimentem se střevní tkání byla 24 h inkubace, kde byly jaterní řezy a střevní plátky v médiu s roztokem Urinalu Akut<sup>®</sup>. Kontrolu tvořily jaterní řezy a střevní plátky inkubované za stejných podmínek, avšak bez roztoku testované látky. Po zhodnocení aktivity LDH v médiích a v homogenátu jaterních řezů a mukózy střevních plátek byla životnost střevních plátek o 20% nižší než životnost jaterních řezů. Ovlivnění Urinalem Akut<sup>®</sup> statisticky významný rozdíl v životnosti nepřineslo.

Při experimentech se střevními řezy byla kontrola dvojí. První byla u střevních řezů bez inkubace a druhá po 24 h inkubace. Řezy ovlivněné roztokem Urinalu Akut<sup>®</sup> byly inkubovány plných 24 h. Stanovení aktivity LDH odhalilo minimální životnost po 24 h inkubace, a to jak u kontrolních řezů, tak i v případě inkubace s testovanou látkou.

Většina studií metabolismu prováděných na střevních řezech trvá nejdéle 3 h (např. Martignoni 2006, van de Kerkhof et al. 2005). Při studiích indukce metabolismu je inkubace prodloužena na 24 h za přísného dohledu nad jejich životností (Khan et al. 2011). Při dlouhodobých studiích se rychle snižuje životnost střevních řezů

a spolu s ní dochází k významnému úbytku biotransformačních enzymů. Ze studie van de Kerkhofa a kolektivu (2007) plyne, že tkáňové řezy z tenkého střeva pro kvantitativní metabolické studie mohou být inkubovány 8-11 h. Pro kvalitativní hodnocení metabolismu připouští i 24-27 h inkubace (van de Kerkhof et al. 2007).

Stejně jako suspenze hepatocytů, jaterní řezy obsahují kompletní zastoupení enzymů I. a II. fáze biotransformace. Hladiny těchto xenobiotika metabolizujících enzymů klesají spolu s inkubačním časem (Lake, Price 2013). V tenkém střevě je aktivita nižší, např. glukuronidace ve střevě dosahuje 49-97% aktivity jater (van de Kerkhof et al. 2005). Tento fakt mohl přispět k některým neuspokojivým výsledkům, kterých bylo v naší práci dosaženo.

Cytochrom P450 je významným biotransformačním systémem buněk a tkáňové řezy projevily vysoký potenciál pro jeho studium. Mnoho prací se zaměřuje na jeho jednotlivé isoformy a možné indukční efekty rozmanitých látek. Aktivita většiny isoform má však klesající tendence (van de Kerkhof et al. 2007). My jsme se pokusili v mikrosomální frakci tkáňových řezů a střevních plátek prokázat aktivitu čtyř isoform cytochromu P450 (1A1, 1A2, 3A, 2B). Žádná z připravených mikrosomálních frakcí však tuto aktivitu nevykazovala. Pravděpodobnou příčinou je v tomto případě, příliš dlouhá inkubační doba (24 h). Navzdory očekávání, k zaznamenání aktivity nedošlo však ani u střevních řezů s inkubační dobou 0 h. Ve střevě je obecně vykazována nižší aktivita než v játrech. Řezy, především střevní obsahují poměrně malé množství tkáně a aktivita enzymů je hůře detekovatelná. Proces přípravy tkáňových řezů je pro buňky tkáně zátěž a může během něho docházet ke ztrátám enzymatické aktivity. S odumřením buněk může zároveň docházet k vyplavení proteas, které degradují enzymy.

Velké množství endogenních a exogenních sloučenin, včetně mnoha léků a jejich metabolitů, je inaktivováno enzymy II. fáze biotransformace. Především se jedná o UDP-glukuronosyltransferasu a glutathion-S-transferasu. Výsledky Tzankové a kolektivu (2011) prokázaly aktivitu UGT i GST ve střevních řezech a udržení stejné hladiny jejich aktivity po dobu 4 h inkubace (Tzankova et al. 2011). Specifická aktivita UGT byla naměřena v nízkých hladinách u střevních plátek a jaterních řezů. Ve střevních řezech již aktivita UGT detekována nebyla. Možné příčiny jsou stejné jako v případě cytochromu P450. Především tedy nedostatečné množství tkáně, traumatizace během tvorby řezu, ztráta aktivity při přípravě subcelulárních frakcí, nebo vyplavení proteolytických enzymů.

Za jeden z mechanismů antioxidační aktivity anthokyaninů je považováno zvyšování hladin glutathionu a zvyšování aktivity enzymů s glutathionem spřažených, včetně glutathion-S-transferasy (Shih et al. 2007). Jiné studie však toto tvrzení vyvrátily



a prokázaly snížení aktivity enzymů II. fáze biotransformace (především GST a UGT) a enzymů z rodiny karbonylreduktas (Srivastava et al. 2007, Szotáková et al. 2013).

Specifickou aktivitu GST jsme stanovovali u střevních řezů. Ve dvou oddělených experimentech byly naměřeny hodnoty mírně odlišné. Zjištěný rozdíl může být důsledkem pomalejšího zpracování materiálu nebo může odrážet skutečnost, že biologický materiál pocházel ze dvou jedinců jejichž metabolická aktivita se mohla lišit. V druhém případě bylo snížení specifické aktivity po 24 h inkubace trochu vyšší. A to jak u kontroly, tak i u střevních řezů s roztokem Urinalu Akut<sup>®</sup> v inkubačním médiu. V prvním z experimentů si vyšší aktivitu zachovaly střevní řezy inkubované s roztokem Urinalu Akut<sup>®</sup>. U druhého experimentu nebyl rozdíl v aktivitě po 24 h statisticky významný. Hodnoty naměřené v prvním z experimentů se střevními řezy se blíží výsledkům získaným Tzankovou a kol. (2011) při hodnocení možností metabolických studií u střevních řezů. Inkubační doba ve zmiňované práci však nepřesáhla 4 h (Tzanková et al. 2011).

U GST jsme prováděli její detekci pomocí elektroforézy a následného imunoblotování. Konkrétním stanovovaným proteinem při této metodě byla isoforma GST $\mu$ . V případě jaterních řezů kontrolních i ovlivněných Urinalem Akut<sup>®</sup> během inkubace byla přítomnost dané isoformy prokázána. Stejně tomu bylo u střevních řezů (z druhého experimentu) v čase 0 h, kde však její koncentrace byla výrazně nižší. U střevních řezů po 24 h inkubace stanovovaný protein prokázán nebyl. Tato zjištění potvrzují předchozí výsledky specifické aktivity GST.

Možnou příčinou snížení koncentrace proteinu a z toho pramenící snížení aktivity GST po 24 h u střevních řezů je vyplavení proteolytických enzymů, které katalyzovaly štěpení tohoto proteinu.

Stejným postupem jen s použitím jiných protilátek jsme zjišťovali, zda je v jaterních a střevních řezech přítomný protein karbonylreduktasy1. Jeho detekce byla úspěšná pouze u střevních řezů, jejichž inkubace byla ukončena v čase 0 h. V cytosolu jaterních a střevních řezů inkubovaných 24 h přítomnost prokázána nebyla. Možné příčiny toho výsledku jsou obdobné jako v případě cytochromu P450 či UGT, především tedy působení proteas.

Metoda přípravy jaterních řezů pomocí přístroje Krumdieck Tissue Slicer byla úspěšně zavedena a připravena tak pro další experimenty. Avšak životnost vykazovaná tkáňovými řezy při inkubaci delší jak 4 h byla velice nízká. Tento aspekt omezuje použití tkáňových řezů především pro metabolické studie. Nákladná, ale úspěšná metoda, jak zvýšit jejich životnost je dynamická inkubace (systém DOC, viz kap. 2.1.5.1). Ve studii Thohana a jeho kolektivu (2001) byl prokázán její příznivý efekt na jaterní řezy ve srovnání se stále ponořenými řezy (Thohan et al. 2001). Další

možností je suplementování inkubačního média inzulinem a glukokortikoidy (Possidente 2011).

## 7 ZÁVĚR

Využití tkáňových řezů otevírá nové možnosti v mnoha oborech. Stále se však jedná o relativně novou metodu a je zapotřebí prozkoumat všechny možnosti, které tento *in vitro* systém nabízí.

Záměrem práce bylo zavést metodu tkáňových řezů pomocí přístroje Krumdieck Tissue Slicer a stanovit optimální podmínky tvorby kvalitních tkáňových řezů. Základní podmínkou pro získání validních informací je současné sledování životnosti řezů. Naše práce hodnotila výsledky tří metod (MTT test, NR test, aktivita LDH). Nejpresnější hodnoty poskytlo sledování úniku LDH do média.

Doba inkubace v našich experimentech nepřekročila 24 hodin. Po uplynutí tohoto intervalu byla životnost jaterních řezů velmi nízká a řezů z tenkého střeva minimální. Ovlivnění cytotoxickou látkou (doxorubicinem) během inkubace významné účinky na životnost nepřineslo. Ani roztok Urinalu Akut<sup>®</sup> životnost řezů neovlivnil.

Během práce nebyla udržena životnost řezů po dostatečně dlouhou dobu pro rozsáhlé metabolické studie. Především sledování indukce enzymatické aktivity a exprese proteinových struktur by bylo obtížné.

Při sledování metabolických vlastností řezů byla měřena aktivita vybraných enzymů I. a II. fáze biotransformace a v případě GST a CBR i detekce odpovídajících proteinů. Po 24 hodinách byla aktivita velmi malá, nebo žádná.

Metoda tvorby tkáňových řezů byla zavedena, avšak před zahájením běžného používání bude potřeba ji dále optimalizovat. Jednou z možností je přidání inzulínu a hydrokortizon 21-hemisukcinátu do inkubačního média.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AKR	aldo-ketoreduktasa
APS	persíran amonný
BCA	bicinchoninová kyselina
BFB	bromfenolová modř
BROD	benzyloxyresorufin-O-dearylasa
CBR	karbonylreduktasa
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CYP	cytochrom P450
DOC	dynamická orgánová kultivace
DOX	doxorubicin
EBSS	Earleho vyvážený roztok solí
EROD	ethoxyresorufin-O-deethylasa
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
LDH	laktátdehydrogenasa
MDR	dehydrogenasa/reduktasa se středně dlouhým řetězcem
MROD	methoxyresorufin-O-demethylasa
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NADH	redukována forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADPH	redukována forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NR	neutrální červeň
p-NF	p-nitrofenol
PGE2	prostaglandin E2
PVDF	polyvinyliden difluoridová membrána
SDR	dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem
SDS	dodecylsulfát sodný
UDP-GA	UDP-glukuronová kyselina
UGT	UDP-glukuronosyltransferasy
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

## 9 LITERATURA

- Andersen, Ø. M. a M. Jordheim. The anthocyanins. In: *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton: CRC press, Taylor & Francis Group, 2006, s. 472-537. ISBN 0-8493-2021-6.
- Ayaki, M. a Iwasawa, A.. Cytotoxicity of prostaglandin analog eye drops preserved with benzalkonium chloride in multiple corneoconjunctival cell lines. *Clinical Ophthalmology*. 2010, roč. 4, s. 919-924. ISSN 1177-5483. DOI: 10.2147/OPHTH.S13406.
- Bagchi, D., C. K. Sen, M. Bagchi a M. Atalay. Anti-angiogenic, Antioxidant, and Anti-carcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula. *Biochemistry (Moscow)*. 2004, roč. 69, č. 1, s. 75-80. ISSN 0006-2979. DOI: 10.1023/B:BIRY.0000016355.19999.93.
- Bach, P.H., Vickers, A.E.M., Fisher, R., Baumann, A., Brittebo, E., Carlile, D.J., Koster, H.J., Lake, B.G., Salmon, F., Sawyer, T.W., Skibinski, G., 1996. The use of tissue slices for pharmacotoxicology studies; the report and recommendations of ECVAM Workshop 20. *ATLA* 24, 893–923.
- Bains, O. S.. *Altered metabolism of daunorubicin and doxorubicin by genetic variants of human aldo-keto and carbonyl reductases*. Vencouver, 2010. Dizertační práce. University of British Columbia.
- Baverel, G., B. Knouzy, C. Gauthier, M. El Hage, B. Ferrier, G. Martin a A. Duplany. Use of precision-cut renal cortical slices in nephrotoxicity studies. *Xenobiotica*. 2013, roč. 43, č. 1, s. 54-62. ISSN 0049-8254. DOI: 10.3109/00498254.2012.725142.
- Blažková, I., S. Dostálová, K. Šmerková, M. Ryvolová, V. Adam, T. Eckschlenger, M. Stiborová a R. Kizek. Protinádorové léčivo Doxorubicin a jeho IN VIVO analýza fluorescenční mikroskopií. *CHEMagazín: časopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi*. Pardubice: Ing. Miloslav Rotrekl, 2012, XXII, č. 5, s. 8-10. ISSN 1210-7409.
- Board, P. G., R. T. Baker, G. Chelvanayagam a L. S. Jermini. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.* 1997, č. 328, s. 929-935.
- Červenková, K., M. Belejová, J. Veselý, Z. Chmela, M. Rypka, J. Ulrichová, M. Modrianský a P. Maurel. Cell suspensions, cell cultures, and tissue slices - important metabolic in vitro systems. *Biomedical Papers*. 2001-12-1, roč. 145, č. 2, s. 57-60. ISSN 12138118. DOI: 10.5507/bp.2001.012.

- De Graaf, I. A. M., P. Olinga, M. H. de Jager, M. T. Merema, R. de Kanter, E. G. Van de Kerkhof a G. M. M. Groothuis. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nature Protocols*. 2010, roč. 5, č. 9, s. 1540-1551. ISSN 1754-2189. DOI: 10.1038/nprot.2010.111.
- De Kanter, R., M. Monshouwer, Meijer a Groothuis. Precision-Cut Organ Slices as a Tool to Study Toxicity and Metabolism of Xenobiotics with Special Reference to Non-Hepatic Tissues. *Current drug metabolism*. 2002, č. 3, s. 39-59. ISSN 1875-5453.
- De Kanter, R., A. Tuin, E. Van de Kerkhof, M. Martignoni, A. L. Draaisma, M. H. de Jager, I. A.M. de Graaf, D. K.F. Meijer a G. M.M. Groothuis. A new technique for preparing precision-cut slices from small intestine and colon for drug biotransformation studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005, roč. 51, č. 1, s. 65-72. ISSN 10568719. DOI: 10.1016/j.vascn.2004.07.007.
- Dostálek, M., E. Janoščíková, J. Juřica a L. Zahradníková. *Farmakokinetika*. Praha: Grada Publishing a.s., 2006, s. 107-138. ISBN 80-247-1464-7.
- Ferreira, D., D. Slade a J. P.J. Marais. Flavans and Proanthocyanidins. In: *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton: CRC press, Taylor & Francis Group, 2006, s. 553-606. ISBN 0-8493-2021-6.
- Fisher, R. L. a A. E. M. Vickers. Preparation and culture of precision-cut organ slices from human and animal. *Xenobiotica*. 2013, roč. 43, č. 1, s. 8-14. ISSN 0049-8254. DOI: 10.3109/00498254.2012.728013.
- Gonzalez-Covarrubias, V., D. Ghosh, S. S. Lakhman, L. Pendyala a J. G. Blanco. A Functional Genetic Polymorphism on Human Carbonyl Reductase 1 (CBR1 V88I) Impacts on Catalytic Activity and NADPH Binding Affinity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007, roč. 35, č. 6, s. 973-980. ISSN 0090-9556. DOI: 10.1124/dmd.107.014779.
- Howell, A. B., J. D. Reed, C. G. Krueger, R. Winterbottom, D. G. Cunningham a M. Leahy. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry*. 2005, roč. 66, č. 18, s. 2281-2291. ISSN 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.05.022.
- Kasper, H.-U., V. Dries, U. Drebber, M. A. Kern, H. P. Dienes a P. Schirmacher. Precision Cut Tissue Slices of the Liver as Morphological Tool for Investigation of Apoptosis. *In vivo*. 2005, č. 19, s. 423-434. ISSN 0258-851x.
- Khan, A. A., E. C.Y. Chow, R. J. Porte, K. S. Pang a G. M.M. Groothuis. The role of lithocholic acid in the regulation of bile acid detoxication, synthesis, and transport

proteins in rat and human intestine and liver slices. *Toxicology in Vitro*. 2011, roč. 25, č. 1, s. 80-90. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.09.011.

- Khursid, A., M. Atif, S. Firdous, S. S. Z. Zaidi, R. Salman a M. Ikram. Study of the efficacy of 5 ALA-mediated photodynamic therapy on human larynx squamous cell carcinoma (Hep2c) cell line. *Laser Physics*. 2010, roč. 20, č. 7, s. 1673-1678. ISSN 1054-660x. DOI: 10.1134/S1054660X10130086.
- King, C., G. Rios, M. Green a T. Tephly. UDP-Glucuronosyltransferases. *Current Drug Metabolism*. 2000-09-01, roč. 1, č. 2, s. 143-161. ISSN 13892002. DOI: 10.2174/1389200003339171.
- Kolečkář, V., Z. Řeháková, E. Brojerová, K. Kuča, D. Jun, K. Macáková, L. Opletal, P. Drašar, L. Jahodář, J. Chlebek a L. Cahlíková. Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita. *Chemické listy*. 2012, č. 106, s. 113-121. ISSN 1213-7103.
- Kowalczyk, E., P. Krzesiński, M. Kura, B. Szmigiel a J. Blaszczyk. Anthocyanins in medicine. *Polish journal of pharmacology*. 2003, č. 55, s. 699-702. ISSN 1230-6002.
- Krumdieck, C. L. Development of a live tissue microtome: reflections of an amateur machinist. *Xenobiotica*. 2013, roč. 43, č. 1, s. 2-7. ISSN 0049-8254. DOI: 10.3109/00498254.2012.724727.
- Lake, B. G. a R. J. Price. Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices. *Xenobiotica*. 2013, roč. 43, č. 1, s. 41-53. ISSN 0049-8254. DOI: 10.3109/00498254.2012.734643.
- Lamy, S.. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis*. 2005, roč. 27, č. 5, s. 989-996. ISSN 0143-3334. DOI: 10.1093/carcin/bgi279.
- Liu, Y., D. A. Peterson, H. Kimura a D. Schubert. Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5- Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*. 1997, č. 69, s. 581-593. ISSN 1471-4159.
- Luo, W., M. Kinsey, J. D. Schiffman a S. L. Lessnick. Glutathione S-Transferases in Pediatric Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2011, roč. 1, č. 39, s. 1-11. ISSN 2234-943x. DOI: 10.3389/fonc.2011.00039.
- Martignoni, M.. *Species and strain differences in drug metabolism in liver and intestine*. Groningen, 2006. Disertační práce. University of Groningen. Vedoucí práce Groothuis, G.M.M.. ISBN 90-367-2713-8.
- Matsunaga, T., S. Shintani a A. Hara. Multiplicity of Mammalian Reductases for Xenobiotic Carbonyl Compounds. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2006, roč. 21, č. 1, s. 1-18. ISSN 1880-0920.

- Miksys, S. a R. F. Tyndale. Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *Journal of psychiatry*. 2012, roč. 37, č. 6. ISSN 1488-2434. DOI: 10.1503/jpn.120133.
- Morin, J-P, J.-M. Baste, A. Gay, C. Crochemore, C. Corbière a C. Monteil. Precision cut lung slices as an efficient tool for in vitro lung physio-pharmacotoxicology studies. *Xenobiotica*. 2013, roč. 43, č. 1, s. 63-72. ISSN 0049-8254. DOI: 10.3109/00498254.2012.727043.
- Niu, X., I. A. M. de Graaf a G. M. M. Groothuis. Evaluation of the intestinal toxicity and transport of xenobiotics utilizing precision-cut slices. *Xenobiotica*. 2013, roč. 43, č. 1, s. 73-83. ISSN 0049-8254. DOI: 10.3109/00498254.2012.729870.
- Obatomi, D.K., S. Brant, V. Anthonypillai, D.A. Early a P.H. Bach. Optimizing preincubation conditions for precision-cut rat kidney and liver tissue slices: effect of culture media and antioxidants. *Toxicology in Vitro*. 1998, roč. 12, č. 6, s. 725-737. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(98)00055-1
- Olinga, P., K. Groen, I. H. Hof, R. de Kanter, H. J. Koster, W. R. Leeman, A. A.J.J.L. Rutten, K. Van Twillert a G. M. M. Groothuis. Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 1997, roč. 38, č. 2. DOI: 10.1016/S1056-8719(97)00060-9.
- Parkinson, A. Biotransformation of xenobiotics. In: *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 6. vyd. New York: McGraw-Hill, 2001, s. 133-224. ISBN 9780071124539
- Possidente, M., S. Dragoni, G. Franco, M. Gori, E. Bertelli, E. Teodori, M. Frosini a M. Valoti. Rat intestinal precision-cut slices as an in vitro model to study xenobiotic interaction with transporters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011, roč. 79, č. 2, s. 343-348. ISSN 09396411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.04.004.
- Puglisi, I., L. Lo Cicero a A. R. Lo Piero. The glutathione S-transferase gene superfamily: an in silico approach to study the post translational regulation. *Biodegradation*. 2012, ISSN 0923-9820. DOI: 10.1007/s10532-012-9604-3.
- Shang, L., X. Zou, X. Jiang, G. Yang a S. Dong. Investigations on the adsorption behavior of Neutral Red on mercaptoethane sulfonate protected gold nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2007, roč. 187, 2-3, s. 152-159. ISSN 10106030. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2006.10.008.
- Shih, P.-H., C.-T. Yeh a G.-C. Yen. Anthocyanins Induce the Activation of Phase II Enzymes through the Antioxidant Response Element Pathway against Oxidative



Stress-Induced Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, roč. 55, č. 23, s. 9427-9435. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf071933i.

- Srivastava, A., C. C. Akoh, J. Fischer a G. Krewer. Effect of Anthocyanin Fractions from Selected Cultivars of Georgia-Grown Blueberries on Apoptosis and Phase II Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, roč. 55, č. 8, s. 3180-3185. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf062915o.
- Szotáková, B., H. Bártíková, J. Hlaváčová, I. Boušová a L. Skálová. Inhibitory effect of anthocyanidins on hepatic glutathione S-transferase, UDP-glucuronosyltransferase and carbonyl reductase activities in rat and human. *Xenobiotica*. 2013, s. 1-7. ISSN 0049-8254. DOI: 10.3109/00498254.2012.756557.
- Thohan, S., M. C. Zurich, H. Chung, M. Weiner, A. S. Kane a G. M. Rosen. Tissue slices revisited: evaluation and development of a short-term incubation for intergrated drug metabolism. *Drug metabolism and disposition*. 2001, roč. 29, č. 10, s. 1337-1342. ISSN 1521-009x.
- Thorn, C. F., C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T. E. Klein a R. B. Altman. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics* (2010).
- Tzankova, V., C. Ivanova, S. Dragoni, N. Danchev a M. Valoti. Precision-cut slices as a tool for studying phase II drug metabolism in rat small intestine in vitro. *Biotechnology*. 2011, roč. 25, č. 1, s. 2279-2283. ISSN 1310-2818. DOI: 10.5504/bbeq.2011.0002.
- Van de Kerkhof, E. G.. Characterization of rat small intestinal and colon precision-cut slices as an in vitro system for drug metabolism and induction studies. *Drug Metabolism and Disposition*. 2005, roč. 33, č. 11, s. 1613-1620. ISSN 0090-9556. DOI: 10.1124/dmd.105.005686.
- Van de Kerkhof, E. G., I. A. M. de Graaf, M. H. de Jager a G. M. M. Groothuis. Induction of Phase I and II Drug Metabolism in Rat Small Intestine and Colon in Vitro. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007, roč. 35, č. 6, s. 898-907. ISSN 0090-9556. DOI: 10.1124/dmd.106.014563.
- Wang, L.-S. a G. D. Stoner. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*. 2008, roč. 269, č. 2, s. 281-290. ISSN 03043835. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.05.020.
- Wu, B., K. Kulkarni, S. Basu, S. Zhang a M. Hu. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011, roč. 100, č. 9, s. 3655-3681. ISSN 00223549. DOI: 10.1002/jps.22568.