

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

**STUDIUM ZMĚN
ANTIOXIDAČNÍ ROVNOVÁHY
V HEPATOCYTECH PO PŮSOBNÍ
XENOBIOTIKY IN VITRO**

Mgr. Tomáš Roušar

Autoreferát disertační práce



Hradec Králové 2008

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

STUDIUM ZMĚN ANTIOXIDAČNÍ ROVNOVÁHY
V HEPATOCYTECH PO PŮSOBENÍ
XENOBIOTIKY *IN VITRO*

Mgr. Tomáš Roušar

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Fyziologie a patologická fyziologie

Hradec Králové

2008

Disertační práce byla vypracována v rámci studia v doktorském studijním programu Fyziologie a patologická fyziologie na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Uchazeč: Mgr. Tomáš Roušar
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové,
Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel: doc. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové,
Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Oponenti: prof. Dr. Hassan Farghali, DrSc.
Farmakologický ústav, 1. lékařská fakulta
Univerzita Karlova v Praze, Albertov 4, 128 00 Praha 2

prof. MUDr. Jaroslav Veselý, CSc.
Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta
Univerzita Palackého, Hněvotinská 3, 775 15 Olomouc

Stanovisko k disertační práci vypracovalo vedení Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, Hradec Králové.

doc. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Předsedkyně komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu
Fyziologie a patologická fyziologie

1. SEZNAM ZKRATEK

AAP	acetaminofen
AAP-GSH	konjugát acetaminofenu a glutathionu
CM-DCFDA	chlóromethyl-2',7'-dichlórodihydro-fluorescein diacetát
CV%	variační koeficient
CYP	cytochrom P-450
GR	glutathionreduktasa
GS-OPA	produkt reakce glutathionu a o-ftaldialdehydu
GSH	glutathion (redukováná forma)
GSSG	glutathion (oxidovaná forma)
GST	glutathion-S-transferasa
HPLC/FL	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorimetrickou detekcí
IF	intenzita fluorescence
λ_{EX}	vlnová délka emise
λ_{EM}	vlnová délka excitace
LDH	laktátdehydrogenasa
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
MRP	Multidrug Resistance-associated Protein
NADH	nikotinamidindinukleotid
NADPH	nikotinamidindinukleotidfosfát
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
NEM	N-ethylmaleimid
OPA	o-ftaldialdehyd
PM	Petriho miska
ROS	reaktivní formy kyslíku
SD	směrodatná odchylka
WP	mikrotitrační destička
WST-1	WST-1 test pro detekci viability buněk

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Glutathion

2.1.1 Struktura a funkce glutathionu

Glutathion je tripeptid složený z L-aminokyselin: cysteinu, glycinu a glutamátu. Tato látka je díky vysokým intracelulárním hladinám (1-10 mmol/l) hlavním nitrobuněčným nebilkoviným thiolem. Nejvyšší koncentrace glutathionu jsou nalézány v hepatocytech, renálních buňkách, erythrocytech, leukocytech, či buňkách čočky. Nižší hladiny jsou nalézány prakticky ve všech buňkách. Extracelulární koncentrace jsou naopak velmi nízké; v plasmě se pohybují v řádech $\mu\text{mol/l}$. Naopak ve žluči hladiny dosahují i hodnot vyšších než 10 mmol/l (Wu *et al.* 2004).

Glutathion se vyskytuje ve dvou formách – redukováné (GSH) a oxidované (GSSG). Dále se glutathion může v buňkách vyskytovat vázaný disulfidickou vazbou na proteiny. Glutathion se podílí na celé řadě fyziologických pochodů. Jeho hlavní funkcí je účast na antioxidační ochraně buňky a to díky mnoha různým mechanismům. Vedle toho se účastní i detoxikačních reakcí, tvorby prostanoidů, regulace buněčného cyklu a celkové redox rovnováhy, či je jeho role nezastupitelná v metabolismu cysteinu (Lu 1999).

Produkce glutathionu probíhá téměř ve všech buňkách těla, největším producentem glutathionu jsou hepatocyty. Játra maximální měrou zodpovídají za extracelulární produkci

glutathionu do krevní plasmy; vedle toho hepatocyty také glutathion aktivně exkretují do žluči. Význam glutathionu uvolňovaného do krevní plasmy je ale při porovnání s důležitostí v intracelulárním prostředí mnohem menší. Největší význam má pro plicní a ledvinné buňky, které jsou největšími konzumenty plasmatického GSH (Akerboom and Sies 1989).

2.1.2 Role glutathionu při biotransformaci

Glutathion je kromě všech již popsanych funkcí také velmi významný při biotransformačních reakcích. Díky přítomnosti -SH skupiny ve své struktuře glutathion reaguje s mnoha elektrofilními sloučeninami (toxiny, lipoperoxidy, organické hydroperoxydy), a to buď přímo, nebo za katalýzy specifických enzymů, které se nazývají glutathion-S-transferasy (GST). Celkem je nyní známo sedm GST podtypů (Mannervik *et al.* 2005). Expresí jednotlivých tříd GST je tkáňově specifická, až na GST π , která je přítomna prakticky ve všech buňkách (Henderson and Wolf 2005).

2.1.3 Možnosti stanovení glutathionu

S ohledem na nezastupitelnost glutathionu v mnoha biochemických pochodech je jeho stanovení pro posouzení redox stavu buňky zcela zásadní. V současné době se pro jeho analýzu používá celá řada principiálně odlišných metod; ideální analytická metoda by měla disponovat vysokou specifitou, sensitivitou, přesností, správností a hlavně by měla poskytovat možnost stanovení jak GSH, tak i GSSG formy glutathionu. Toto vše by navíc mělo být spojeno s co nejmenšími finančními náklady a minimální časovou náročností.

Metody využívající vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) jsou v současné době nejpoužívanější. Jejich hlavní výhodou je separace na chromatografické koloně a následná specifická detekce většinou obou forem glutathionu. HPLC metody kromě selektivní detekce glutathionu obecně nabízejí vysokou sensitivitu. Jejich velkou nevýhodou je ale velká časová náročnost a také nemalé finanční náklady na provoz. (Paroni *et al.* 1995; Senft *et al.* 2000).

Dalším hojně užívaným typem stanovení je metoda enzymatická. Princip stanovení spočívá v redukci GSSG pomocí glutathionreduktasy, jež je zároveň doprovázena oxidací další molekuly, u které je detekována změna koncentrace spektrofotometricky. Látky využívané pro detekci redukce GSSG na GSH jsou NADPH, či tzv. Ellmanovo činidlo, neboli 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (Tietze 1969).

Poslední velkou skupinou jsou stanovení fluorimetrická. Ta mohou být založena na detekci fluorescence či fosforescence. Druhý přístup je ale v praxi používán velmi málo z důvodu poměrně velkých omezení (Romero and Mueller-Klieser 1998). Naproti tomu detekce fluorescence je využíváno při stanovení glutathionu poměrně často.

V 70. letech minulého století autoři Hissin a Hilf (Hissin and Hilf 1976) popsali stanovení obou forem glutathionu založené na detekci fluorescenčně aktivní sloučeniny, která vzniká po reakci glutathionu s o-ftaldialdehydem (OPA). Principem je reakce mezi -SH a -NH₂ skupinami GSH s aldehydickými skupinami OPA, po které vzniká izoindolový kruh, který vykazuje velmi vysokou míru fluorescence. Pro stanovení GSSG je potřeba nejprve vystínit GSH. Během optimalizace autoři testovali celou řadu látek, u kterých předpokládali možnost interference. Jakákoliv interference ovšem prokázána nebyla (Hissin and Hilf 1976). Na druhou stranu po uveřejnění metody se případnou interferencí zabývalo několik prací, které ji i za testovaných podmínek prokázaly (Beutler and West 1977; Scaduto 1988). Bez ohledu na možnost interference tato metoda disponuje obecnými výhodami fluorescenčních metod, jako jsou vysoká rychlost, sensitivita a také nízké cenové náklady na celé stanovení. Navíc byla v poslední době publikována práce, ve které byl zcela totožný postup ze spektrofluorimetrické metody aplikován na metodu HPLC, a bylo zjištěno, že k žádné

interferenci nedochází (Kand'ar *et al.* 2007). Proto i spektrofluorimetrickou metodu není možno zcela zahrnout a nadhodnocení hladin glutathionu se spíše než principiálního nedostatku týká metodiky.

2.2 Toxické poškození hepatocytů acetaminofenem

Acetaminofen (4-hydroxyacetanilid, paracetamol) patří v současné době mezi nejvíce využívaná analgetika a antipyretika. Pokud je užíván v doporučených terapeutických dávkách, je považován za zcela bezpečný. Jeho silné toxické účinky se projeví až při předávkování, kdy dochází k poškození jaterních buněk. Publikovaná data z roku 2004 například popisují, že předávkování acetaminofenem je vedoucí příčinou akutního jaterního selhání v USA a Velké Británii (Lee 2004).

2.2.1 Metabolismus acetaminofenu

Acetaminofen (AAP) je po vstupu do jaterních buněk detoxikován mnoha různými mechanismy. Největší část dávky je konjugována s endogenními ligandy, a to s kyselinou glukuronovou (cca 50% dávky), a dále pak s kyselinou sírovou (cca 30%) (Nelson 1990). Kromě dalších minoritních reakcí zbytek dávky vstupuje do první, oxidační fáze biotransformace.

V roce 1973 Dr. Mitchell se svým týmem uveřejnil celkem čtyři odborné články, ve kterých se zabýval mechanismem toxického poškození hepatocytů acetaminofenem (Mitchell *et al.* 1973a). V těchto pracích prokázal, že pro toxické působení AAP je důležitá jeho metabolická aktivace, po které dochází k typické depleci glutathionu. V dalších letech bylo skutečně potvrzeno, že AAP může být oxidován cytochromem P450 (CYP) na toxický metabolit, N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI), který zodpovídá za patologické působení acetaminofenu (Dahlin *et al.* 1984). Při požití terapeutických dávek je na NAPQI ale přeměněno méně než 10% buněk přijatého AAP.

NAPQI je vysoce reaktivní sloučenina, která je za fyziologického stavu v buňce detoxikována reakcí s glutathionem. Tato reakce může probíhat buď spontánně, nebo je katalyzována enzymem glutathion-S-transferasou (Coles *et al.* 1988). Reakcí AAP a GSH vzniká konjugát, 3-(glutathion-S-yl)acetaminofen (AAP-GSH), který je následně hepatocytem exkretován do žluči transportními MRP proteiny (Multidrug Resistance-associated Protein), a to přesněji podtypem MRP-2 (Chen *et al.* 2003).

2.2.2 Toxické působení acetaminofenu

V případě předávkování acetaminofenem dochází k celé řadě patofyziologických pochodů, které mohou vést až k akutnímu jaternímu selhání. Při dávce acetaminofenu vyšší než je dávka terapeutická dochází v hepatocytech k saturaci konjugčních enzymů zajišťujících glukuronidaci a sulfataci. Nadbytek AAP vstupuje do první fáze biotransformace, je oxidován na cytochromu P450 a tím je ve zvýšené míře produkován NAPQI. Tato látka velmi rychle reaguje s GSH, jehož zásoby jsou ale během krátké doby vyčerpány, a proto dochází k charakteristické depleci GSH (Mitchell *et al.* 1973b). Z důvodu své vysoké reaktivity se NAPQI následně váže na -SH skupiny nejrůznějších typů proteinů, čímž vznikají pro AAP toxicitu typické AAP-adukty (Jollow *et al.* 1973; Potter *et al.* 1973). Celá kaskáda následných dějů vede až ke vzniku centrilobulární nekrózy, jež je dalším charakteristickým nálezem u hepatotoxického poškození acetaminofenem (Mitchell *et al.* 1973a). I přes značný pokrok ve studiu jednotlivých mechanismů poškození je ale zajímavé, že přesná příčina nekrózy hepatocytů následkem působení acetaminofenu není zatím zcela známá (Jaeschke and Bajt 2006; Kaplowitz 2004). Do dnešní doby byly zformulovány dvě

teorie, které se snaží princip jaterního poškození vysvětlit. První z nich je metabolická, druhá oxidační (James *et al.* 2003).

Metabolická teorie se zakládá na předpokladu, že kovalentní vazba NAPQI s -SH skupinami proteinů vede ke změně jejich aktivity. Tato teorie je ale nyní s ohledem na zjištění, že aktivita většiny proteinů není díky vazbě s AAP změněna, spíše zamítnuta. Druhou teorií vysvětlující poškození buněk po působení acetaminofenu je teorie oxidační, ve které hraje ústřední roli oxidační stres, resp. reaktivní formy kyslíku (ROS).

Oxidační stres je obecný název pro stav, při kterém dochází k nerovnováze mezi oxidačními a antioxidačními pochody ve prospěch reakcí oxidačních. Nezastupitelnost glutathionu v antioxidačním systému, kam náleží kromě samotného glutathionu také na glutathionu závislé enzymy, má za následek fakt, že jeho vyčerpání po reakci s NAPQI vede k celkovému rozvratu antioxidační ochrany buňky. Proto bylo i předpokládáno, že právě toto je mechanismus, který způsobuje poškození hepatocytů a následně i jejich smrt. I když je tato, oxidační teorie nejspíše velmi blízko skutečnosti, přesto s její pomocí veškeré publikované nálezy vysvětlit nelze.

2.2.3 Překvapivé nálezy při studiu AAP toxicity

I přes značný pokrok v popisu principů toxického poškození hepatocytů acetaminofenem, existují recentní práce, jejichž nálezy nelze jakýmkoliv v současnosti známým mechanismem vysvětlit.

Jedná se například o práci týmu prof. Wolfa (Henderson *et al.* 2000), která se zabývala studiem toxicity u GST π knock-out myši. Testovaným předpokladem této práce bylo, že GST π defektní myši by měly být k AAP toxicitě mnohem více vnímavé v porovnání s kontrolními zvířaty, a to z důvodu snížené detoxikační schopnosti. Nalezené výsledky ale oproti předpokladům ukazovaly na pravý opak. GST π knock-out myši totiž překvapivě vykazovaly v porovnání s kontrolami signifikantně vyšší rezistenci k AAP poškození.

Druhou zajímavou prací zabývající se popisem mechanismů AAP toxicity je odborný článek dr. Rzucidla (Rzucidlo *et al.* 2000). Tento autor pracoval s transgenními myšmi, které měly zvýšené intracelulární hladiny glutathionu z důvodu zesílené exprese glutathionsynthetasy. Cílem práce bylo u mutantních myši prokázat vyšší rezistenci k působení acetaminofenu díky zvýšeným buněčným hladinám GSH. Předpoklady se ale opět lišily od nalezených výsledků, kdy se ukázalo, že u transgenních myši došlo k výrazně vyšší míře poškození v porovnání s kontrolními zvířaty.

Nalezené výsledky obou prací nebyly ani v jednom případě uspokojivě vysvětleny a ani do dnešních dnů nebyl nalezen mechanismus, který by nastolené otázky vyřešil, a proto výše uvedené příklady dokládají stálou přítomnost nejasností ve studiu AAP toxicity.

3. CÍLE PRÁCE

Obsah disertační práce je zaměřen na základní výzkum oxidačního stresu, a to jak po stránce metodické, tak i aplikované. Cíle lze rozdělit do třech samostatných oddílů.

- I.) Optimalizace spektrofotometrického stanovení obou forem glutathionu
 - zavedení a optimalizace spektrofotometrické metody pro stanovení obou forem glutathionu
 - určení analytických parametrů zavedené spektrofotometrické metody
 - porovnání spektrofotometrické metody s referenční HPLC/FL

- 2.) Modelové toxické poškození potkaních hepatocytů acetaminofenem (*in vitro*)
 - zavedení a popis modelu toxického poškození kultivovaných potkaních hepatocytů acetaminofenem
 - využití metod k detekci oxidačních pochodů během působení acetaminofenu (ROS-sondy, glutathion, glutathionreduktasa)
- 3.) Zjištění příčin inhibice glutathionreduktasy nalezené během toxického poškození potkaních hepatocytů acetaminofenem (*in vitro*)

4. METODIKY

4.1 Optimalizace spektrofluorimetrického stanovení glutathionu

Hissin a Hilf v roce 1976 (Hissin and Hilf 1976) popsali stanovení obou forem glutathionu, GSH i GSSG, které bylo založeno na detekci fluorescence emitované produktem reakce mezi GSH a o-ftaldialdehydem, OPA. Vlastním principem této metody je reakce $-SH$ a $-NH_2$ skupin glutathionu s aldehydickými skupinami OPA, kterou vzniká substituovaný isoindolový kruh (GS-OPA) vykazující vysoký výtěžek fluorescence. Výhodou reakce je její průběh za standardních laboratorních podmínek a během krátké doby. Pro stanovení GSSG je do postupu nutno zahrnout další dva kroky. Nejprve je nutné vystinit ve vzorku přítomný GSH pomocí N-ethylmaleimidu (NEM), a následně je potřeba převést oxidovanou formu GSSG zpět na GSH. Dále je již princip reakce shodný se stanovením GSH, kdy je do roztoku přidán OPA, a po jeho zreagování s GSH je detekována fluorescence při $\lambda_{EX} / \lambda_{EM} = 350 / 420$ nm.

Pomocí funkce 3D-scan byly analyzovány vlnové délky excitace (λ_{EX}) a emise (λ_{EM}) standardů po reakci s OPA a to odděleně u stanovení GSH a GSSG. Výsledné λ_{EX} a λ_{EM} odpovídající fluorescenčním maximům byly použity pro další stanovení. Jako optimální byly v případech GSH i GSSG zjištěny $\lambda_{EX} = 335$ nm, $\lambda_{EM} = 420$ nm.

Dalším testovaným parametrem byla teplota detekce. Celkem byly porovnány dvě teploty 4 °C a 20 °C. Porovnáním absolutních hodnot intenzit fluorescence (IF) stejných vzorků a standardů, a také vyhodnocením variačních koeficientů (CV%) opakovaných měření pro každou z teplot byla jako optimální určena teplota 4 °C. Za této teploty, stejně jako za optimálních vlnových délek excitace a emise, byly prováděny další experimenty.

Kromě stanovení optimální teploty jsme se při detekci zaměřili také na zjištění optimálního pH detekce. Hodnotu pH jsme totiž považovali za důležitý faktor, jenž může také ovlivňovat míru IF, a to jak z kvantitativního, tak i z kvalitativního hlediska.

OPA kromě specifické reakce s GSH může reagovat i s nejrůznějšími thioley, aminokyselinami či aminy (Scaduto 1988). Fluorescenční spektra těchto vzniklých komplexů jsou ale velmi pravděpodobně odlišná od spektra komplexu GS-OPA. Případná interference aminokyselin či aminů by se tedy měla selektovat od naší cílené specifické detekce GS-OPA pomocí změny hodnoty pH, která v původní práci byla pH 8 pro GSH, a pH 11 pro GSSG (Hissin and Hilf 1976). Z těchto důvodů jsme testovali IF vzorků při různých hodnotách pH: pro stanovení GSH to bylo pH 6 a 8, pro stanovení GSSG hodnoty pH 4, 6, 8, 11. Hodnoty pH byly upravovány až po reakci GSH a OPA za podmínek shodných s původně publikovanými (Hissin and Hilf 1976). Úprava pH byla prováděna pomocí přídatků HCl (1 mol/l), přičemž výsledný objem roztoku byl shodný u všech testovaných hodnot pH.

4.2 Toxické poškození hepatocytů acetaminofenem

4.2.1 Izolace a kultivace hepatocytů

Hepatocyty byly izolovány z jater potkanů (samci kmene Wistar, 180 – 240 g, Biotest) mírně modifikovanou metodou dvoustupňové kolagenasové (Collagenasa Cruda, Sevapharma) perfuze jater (Berry *et al.* 1991). Po izolaci byla ihned stanovena viabilita buněk barvením trypanovou modří (Trypan blue, Sigma-Aldrich). K pokusům byly použity pouze hepatocyty jejichž viabilita po izolaci byla vyšší než 90 %. Poté byla určena denzita buněk pomocí Bürkerovy komůrky.

Před kultivací hepatocytů je důležité zjištění jejich počtu, které se provádí v Bürkerově komůrce klasickým způsobem ve 2 x 25 velkých čtvercích (nejčastěji po zředění 100x). S ohledem na to je následně suspenze hepatocytů naředěna na výslednou koncentraci.

Kultivace primokultur hepatocytů jsme prováděli na Petriho miskách (PM) a na 24- a 96-jamkových mikrotitračních destičkách (WP) kolagenovaných kolagenem typu I (from rat tail, Sigma-Aldrich). Potřebnou denzitu buněk pro kultivaci získáme naředěním původní suspenze hepatocytů pomocí kompletního Williamsova média E. Hepatocyty jsou poté inkubovány 2 hodiny v CO₂ inkubátoru (5% CO₂, 37 °C). Toto je dostatečná doba pro přichycení živých buněk ke kolagenu a vytvoření buněčného monolayeru. Poté následuje odsátí média s nepřichycenými buňkami a jeho výměna za médium další. To již může obsahovat testovanou chemickou látku rozpuštěnou opět ve Williamsově médiu E, popř. se může jednat pouze o Williamsovo médium E pro testování vzorků kontrolních. Primokultury hepatocytů jsou poté opět ponechány požadovanou dobu v CO₂ inkubátoru (5% CO₂, 37 °C) až do konce inkubace.

4.2.2 Toxické působení acetaminofenu

Po izolaci potkaních hepatocytů a jejich následném přisednutí po 2 hodinách byl na hepatocytech studován toxický vliv acetaminofenu. V kompletním Williamsově médiu E byl rozpuštěn acetaminofen (40 mmol/l) a z tohoto roztoku byla ředěním vytvořena řada pěti koncentrací (1; 2,5; 5; 10; 20 mmol/l AAP). Tyto roztoky byly následně připipetovány k buňkám, a to v objemech: 2 ml/l PM; 300 µl/l jamka v 24-WP; 100 µl/l jamka v 96-WP. Zároveň byly vždy připraveny také kontrolní buňky, ke kterým bylo připipetováno pouze kompletní Williamsovo médium E. Buňky byly inkubovány s acetaminofenem po různé dlouhou dobu (1 – 24 hod.) dle typu použitého stanovení. Nejčastěji byly využívány inkubační intervaly 3 h, 12 h a 24 hod. Po uplynutí doby inkubace bylo médium obsahující AAP odstraněno a hepatocyty byly zpracovány dle potřeb daného stanovení. Při sledování AAP toxicity byly u hepatocytů sledovány tyto biochemické parametry: aktivita laktátdehydrogenasy (LDH), LDH-leakage, aktivita buněčných dehydrogenas (WST-1 test), syntéza albuminu, koncentrace GSH a GSSG, intracelulární produkce ROS a aktivita glutathionreduktasy (GR).

Pro hodnocení viability buněk jsme využili stanovení aktivity LDH a také WST-1 test. Principem stanovení aktivity LDH (LDH-kit; Sigma Aldrich, SRN) je měření nárůstu absorbance při $\lambda = 340$ nm z důvodu produkce NADH při přeměně laktátu na pyruvát. Aktivita LDH byla stanovována v médiu, a dále pak jako poměr aktivity v médiu vůči celkové aktivitě jako tzv. LDH-leakage. WST-1 test (Roche, SRN) je založen na detekci aktivity intracelulárních dehydrogenas pomocí přeměny nebarevného substrátu na produkt, který lze detekovat spektrofotometricky. Syntéza albuminu byla stanovována metodou ELISA (Rat Albumin ELISA Quantitation Kit; Bethyl, USA) pomocí specifických protilátek proti potkanímu albuminu. Hladiny GSH a GSSG byly analyzovány HPLC/FL metodou (Kand'ár *et al.* 2007) založenou na reakci mezi GSH a o-ftaldialdehydem. Produkce ROS byla zjišťována přímou metodou pomocí tzv. ROS sond, které se po reakci s ROS oxidují a následkem toho

vzniká fluoreskující sloučenina. My jsme použili sondu CM-DCFDA (5-, 6-chlórromethyl-2',7'-dichlóródihydrofluorescein diacetát; Molecular Probes, USA), která byla před vlastní analýzou s buňkami inkubována 45 minut. Po výměně roztoku byl následně výsledný signál vyjádřen jako procentuální nárůst produkce ROS za jednu hodinu inkubace. Posledním stanovením prováděným u hepatocytů inkubovaných s AAP bylo zjištění aktivity glutathionreduktasy. Ta byla měřena díky poklesu absorbance NADPH za přítomnosti GSSG v nadbytku (Carlberg and Mannervik 1975).

4.3 Studium příčin inhibice glutathionreduktasy nalezené u AAP toxicity

Při testování inhibice byly využívány dva druhy glutathionreduktasy – z potkaních hepatocytů a standardně používaná GR z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Hepatocytární GR byla připravována ze suspenze izolovaných hepatocytů, které byly po centrifugaci (10 minut, 28 g, 15 °C) lyzovány v deionizované vodě pětisekundovou sonikací. Po té byla opět provedena centrifugace (10 minut, 8.000 g, 4 °C) a získaný supernatant byl odpipetován a uskladněn při -20 °C v mikrozkrumkách až do doby analýzy. Pro stanovení inhibice byly použity vzorky s aktivitou 0,025 U/mg glutathionreduktasy, a to jak u hepatocytární, tak i u kvasinkové GR.

Pro přípravu AAP-GSH konjugátu jsme se rozhodli použít elektrochemickou metodu, která byla publikována v roce 2007 (Madsen *et al.* 2007). Principem vzniku AAP-GSH je elektrochemická oxidace acetaminofenu na NAPQI, který ihned reaguje s GSH přítomným v roztoku. Touto reakcí vzniká 3-(glutathion-S-yl)acetaminofen, který je již stabilní. Postup byl realizován přesně v souladu s publikovaným stanovením. Elektrochemická oxidace AAP byla prováděna při potenciálu +600 mV po dobu 1 hodiny, po které byl roztok skladován při 4 °C do doby jeho dalšího použití.

Princip stanovení aktivity glutathionreduktasy byl shodný s již uvedeným, kdy byl sledován pokles absorbance NADPH při $\lambda = 340$ nm. Aktivita GR byla měřena v prostředí fosfátového pufru, kde její výsledná koncentrace byla během všech experimentů byla 0,01 U/mg. Vlastní inhibice glutathionreduktasy byla studována po přidavku roztoku obsahujícího AAP-GSH konjugát do jamky mikrotitrační destičky; výsledná koncentrace AAP-GSH v jedné jamce byla nakonec 1 $\mu\text{mol/l}$, popř. 1,5 $\mu\text{mol/l}$. (Analyzovaný roztok tedy obsahoval GR, GSSG, NADPH, AAP-GSH, a dále také AAP a GSH.)

Vliv AAP-GSH na enzymovou aktivitu byl testován u obou druhů GR, kvasinkové i hepatocytární. Pokles absorbance byl sledován během 30 nebo 60 minut a následně, po vyjádření závislosti absorbance ~ čas, byly výsledky porovnány s kontrolními hodnotami. Ty byly získány analýzou GR aktivity v roztoku, jenž byl složen ze všech látek s totožnými koncentracemi, kromě AAP-GSH konjugátu.

Protokoly pokusů *in vitro* byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání podle zákona č. 246/92 Sb. v platném znění, §17, 3c. při Lékařské fakultě v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze.

4.4 Statistické zpracování výsledků

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. Statistická významnost vlivu daného parametru byla testována pomocí one-way ANOVA. Po ní bylo k porovnání hodnot s hodnotami kontrolními využito Dunnettova post hoc testu. Při testování dvou skupin mezi sebou byl pro otestování normality využit Studentův t-test. Hladina významnosti u všech využitých testů byla $p = 0,05$ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). K statistické analýze byl využit software GraphPad Prism 4.03 for Windows, GraphPad Software, USA.

5. VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace spektrofluorimetrického stanovení glutathionu

Při spektrofluorimetrickém stanovení GSH a GSSG jsme testovali vliv změn vlnových délek excitace a emise, teploty a pH na intenzitu fluorescence, přesnost a opakovatelnost. Takto byly zjištěny optimální podmínky pro analýzu (pro srovnání v závorce uvádíme také původní hodnoty z práce Hissina a Hilfa (Hissin and Hilf 1976): $\lambda_{EX} / \lambda_{EM} = 335 / 420$ nm (350 nm / 420 nm); teplota detekce $T = 4$ °C (20 °C); pro GSH i GSSG pH 6 (pH 8 (GSH), pH 12 (GSSG)).

Zdůvodnění takto změněných podmínek detekce jsou takováto: snížení teploty z původních 20 °C na 4 °C vede ke zvýšení intenzity fluorescence až o 25%. Při testování hodnoty pH roztoku při detekci obou stanovení bylo prokázáno, že se vzrůstající hodnotou pH sice intenzita fluorescence roste, s ní ale zároveň roste i absolutní hodnota koncentrace a stejně tak i klesá přesnost stanovení; pro ilustraci uvádíme hodnoty CV% pro stanovení hladin GSH ve vzorcích při pH 6 a pH 8: $c_{GSH} = 20$ μ mol/l, $CV\%_{pH\ 6} = 3,67\%$, $CV\%_{pH\ 8} = 10,64\%$; $c_{GSH} = 6$ μ mol/l, $CV\%_{pH\ 6} = 2,68\%$, $CV\%_{pH\ 8} = 15,99\%$. U stanovení GSSG byl podobný trend nalezen i u snižujících se hodnot pH. S ohledem na mnohem nižší zjištěné hodnoty variačního koeficientu CV% a také na absolutní hodnoty koncentrací bylo jako optimální pH určeno pH 6.

Po optimalizaci podmínek reakce a detekce jsme pro stanovení obou forem glutathionu zjistili analytické parametry metody. Bylo prokázáno, že optimalizovaná fluorimetrická metoda stanovení GSH a GSSG je velmi přesná (u vzorků i standardů $CV\% < 5\%$) a stejně i u obou kalibrací bylo dosaženo ideálních hodnot (pro GSH, $R^2 = 1$; pro GSSG, $R^2 = 0,9999$). Stanovením koncentrací GSH a GSSG v totožných vzorcích pomocí optimalizované spektrofluorimetrické metody a HPLC/FL metody byl zjištěn korelační koeficient, r. Pro obě spektrofluorimetrická stanovení byla nalezena velmi silná korelace s HPLC/FL metodou, a to $r = 0,99$. Kromě vysokého korelačního koeficientu jsme také zjistili, že i absolutní hodnoty koncentrací GSH, ale i GSSG jsou si při porovnání metod velmi blízké.

Ze všech výše uvedených výsledků vyplývá, že byla zavedena a optimalizována spektrofluorimetrická metoda pro stanovení obou forem glutathionu, u které byla prokázána vysoká přesnost a opakovatelnost. Po srovnání s HPLC/FL metodou byla navíc zjištěna vysoká míra korelace mezi oběma metodami. Z velmi blízkých absolutních hodnot koncentrací GSH i GSSG lze navíc vyvodit, že úpravou detekčních podmínek byla zajištěna specifita detekce komplexu GS-OPA.

5.2 Studium hepatotoxického účinku acetaminofenu v podmínkách *in vitro*

Extracelulární LDH aktivita v médiu byla analyzována po 4, 12 a 24 hodinách. Po prvních čtyřech hodinách inkubace s AAP nebylo nalezeno signifikantní zvýšení aktivity LDH u žádné z koncentrací. To nastalo u tří nejvyšších koncentrací AAP až po 12 h inkubace, přičemž po 24 h byly statisticky významné rozdíly oproti kontrolním hodnotám nalezeny u všech dávek AAP. Jedinou koncentrací, u které nedošlo k uvolnění LDH do média byla 1 mmol/l AAP. LDH-leakage byla stanovována pouze po 24 hodinách od začátku inkubace, kdy byl patrný jasný nárůst LDH uvolněné z buňky v závislosti na dávce AAP.

Druhým testem charakterizujícím viabilitu buněk je WST-1 test, který je zaměřen na detekci aktivity intracelulárních dehydrogenas. Tento test, který jsme použili v časových intervalech 1, 3, 6, 12, 18 a 24 h inkubace s AAP, ukázal na signifikantní rozdíly v enzymové aktivitě mezi buňkami už po jedné hodině AAP inkubace. V tento interval u koncentrací 5, 10 a 20 mmol/l AAP enzymová aktivita buněk klesla na cca 80% aktivity kontrolních vzorků. Během další doby pokračoval pokles signálu, přičemž po 12 hodinách inkubace byla nalezena

snížená aktivita dehydrogenas u všech koncentrací AAP. Od 18 h inkubace již nebyla u koncentrace 20 mmol/l nalezena žádná detekovatelná aktivita, u ostatních koncentrací AAP byl znatelný další pokles.

Stanovení produkce albuminu bylo prováděno pouze po 24 h inkubace s AAP. Po uplynutí této doby byla zjištěna signifikantní redukce produkce albuminu u koncentrace 5 mmol/l AAP a vyšších. V porovnání s kontrolními buňkami bylo stanoveno snížení produkce albuminu u koncentrace 5 mmol/l AAP o 48%, 10 mmol/l o 53% a u 20 mmol/l o 90%.

K charakterizaci prooxidačních pochodů během toxického poškození acetaminofenem jsme použili přímé stanovení intracelulární produkce ROS pomocí sondy CM-DCFDA. Produkce ROS byla měřena po 3, 12 a 24 h inkubace s AAP. Již v prvním časovém intervalu bylo prokázáno signifikantní zvýšení tvorby ROS u koncentrací 10 a 20 mmol/l AAP. Po 12 a 24 hodinách inkubace bylo prokázáno zvýšené množství produkovaných ROS u všech koncentrací s výjimkou 1 mmol/l a 2,5 mmol/l AAP. Dvanáctihodinová inkubace s AAP zapříčinila na dávce závislý signifikantní nárůst produkce ROS od 410% (5 mmol/l AAP) do 770% (20 mmol/l AAP) v porovnání s kontrolními hepatocyty. Po 24 h inkubace byla zjištěna statisticky zvýšená tvorba ROS u buněk inkubovaných s koncentracemi 5, 10 a 20 mmol/l AAP, a to v rozmezí 90% - 490% po srovnání s kontrolami.

Glutathion, a to jak redukovaný tak oxidovaný, jsme stanovovali po 24 h inkubace s AAP, a detekovatelné hladiny GSH jsme našli kromě kontrol (62,9 ± 6,8 μmol/l) pouze u hepatocytů inkubovaných s 1 mmol/l AAP (41,29 ± 2,8 μmol/l **). Naproti tomu GSSG byl detekovatelný u všech koncentrací AAP. Jeho koncentrace byly: (5,9 ± 1,7 μmol/l) kontroly, (5,54 ± 1,1 μmol/l) 1 mmol/l AAP, (1,5 ± 0,3 μmol/l **) 2,5 mmol/l AAP a (0,48 ± 0,1 μmol/l **) pro 5 mmol/l AAP. Vyšší koncentrace AAP způsobily u hladin GSSG pokles srovnatelný s koncentrací 5 mmol/l AAP.

Posledním z vyšetřovaných parametrů během AAP toxicity bylo stanovení aktivity glutathionreduktasy. Aktivita tohoto enzymu byla stanovována celkem po třech časových intervalech inkubace - 3, 12 a 24 h. Již po 3 hodinách byl nalezen signifikantní pokles aktivity u všech koncentrací AAP. Snížení aktivity u všech koncentrací acetaminofenu kromě 1 mmol/l AAP přetrvávalo až do konce inkubace po 24 h. Výsledné aktivity po 24 h byly u kontrol; 1, 2,5, 5; 10 a 20 mmol/l AAP - 56,5 ± 1,8; 52,2 ± 3,4; 49,5 ± 1,0; 44,5 ± 1,7; 34,9 ± 4,5 and 21,8 ± 0,7 U/mg proteinu.

5.3 Studium příčin inhibice glutathionreduktasy nalezené při charakterizaci AAP toxicity

K přípravě AAP-GSH konjugátu byl využit publikovaný postup (Madsen *et al.* 2007), kdy je acetaminofen elektrochemicky oxidován na NAPQI, který dále reaguje s GSH za vzniku AAP-GSH. V souladu s původní prací jsme potvrdili, že je AAP oxidováno při +400 mV, nicméně pík odpovídající zpětné redukci na AAP na záznamu patrný nebyl. Toto bylo nejspíše způsobeno pomalou rychlostí změny potenciálu (100 mV/s) v našem experimentu, kdy NAPQI byl redukován nebo hydrolyzován ještě dříve, než potenciál dosáhl popisované hodnoty -370 mV (Dahlin and Nelson 1982; Madsen *et al.* 2007). Vlastní příprava AAP-GSH byla prováděna při +600 mV po dobu 60 minut. Výsledná koncentrace AAP-GSH v roztoku byla vypočtena z Faradayova zákona na cca 2,5 μmol/l.

Aktivita glutathionreduktasy byla sledována pomocí poklesu absorbance NADPH (λ = 340 nm). Jako množství GR vhodné pro testování vlivu AAP-GSH jsme zvolili 0,01 U/mg, které je sice velmi malé, ale na druhou stranu mohlo lépe vypovídat o případném vlivu nízké koncentrace AAP-GSH. Doba testování aktivity glutathionreduktasy u obou sledovaných typů, byla 30 a 60 minut. Analýza byla započata přidáním roztoku s AAP-GSH do jamky mikrotitrační destičky s GR, NADPH a GSSG. Po ukončení experimentů byly výsledné hodnoty porovnány s kontrolní aktivitou GR, která byla získána za stejných podmínek a v přítomnosti totožných koncentrací všech sloučenin vyjma AAP-GSH.

Porovnáním zjištěných aktivit vůči kontrolnímu signálu bylo pro kvasinkovou GR určeno, že po 30 minutách inkubace s AAP-GSH dochází k poklesu enzymové aktivity až o 40% (pro 1 $\mu\text{mol/l}$ AAP-GSH v měřeném roztoku). Při testování vlivu AAP-GSH na aktivitu hepatocytární glutathionreduktasy byly použity naprosto totožné podmínky přípravy roztoků i detekce jako při stanovení aktivity kvasinkové GR. Hepatocytární GR byla proto naředěna tak, aby její výsledná aktivita v roztoku byla také 0,01 U/mg. Stejně jako u kvasinkové GR byla také u hepatocytární glutathionreduktasy prokázána inhibice v přítomnosti AAP-GSH. Míra inhibice u hepatocytární GR je mnohem větší. Srovnáním výsledné aktivity po 30 minutové inkubaci s AAP-GSH vůči aktivitě v kontrolních vzorcích bylo totiž zjištěno, že hepatocytární GR je v přítomnosti 1 $\mu\text{mol/l}$ AAP-GSH inhibována o 97%.

Z popsáných nálezů je zjevné, že jsme prokázali inhibiční vliv AAP-GSH konjugátu na aktivitu glutathionreduktasy, a to překvapivě u obou testovaných druhů GR.

6. DISKUSE

I. Optimalizace fluorimetrického stanovení glutathionu

Glutathion se vyskytuje ve dvou formách, redukované, GSH a oxidované, GSSG. S ohledem na jeho důležitost v mnoha biochemických pochodech je tedy velmi důležité pro objektivní posouzení redox stavu buněk znát intracelulární hladinu obou forem glutathionu, resp. jejich vzájemný poměr. Proto naším cílem bylo zavést a optimalizovat metodu, která by byla specifická, sensitivní, rychlá a hlavně také co nejméně finančně náročná.

V současné době je pro stanovení glutathionu k dispozici široké spektrum metod. Nejvíce jsou používány metody HPLC, stejně tak často se ale používá i spektrofotometrické enzymatické metody. Výhodou obou metod je specifita stanovení a poměrně vysoká sensitivita, nevýhodou jsou naopak poměrně vysoké cenové náklady, a také nízká rychlost analýzy. Z důvodu potřeby stanovení glutathionu u velkého množství vzorků jsme se tedy snažili najít metodu další, která by kromě sensitivity a specifity navíc disponovala také nízkými náklady a velkou rychlostí jednotlivých analýz. Jako metodu zohledňující tyto požadavky jsme po studiu literatury zvolili metodu fluorimetrickou.

Principem spektrofluorimetrické metody dle Hisina a Hilfa je reakce mezi GSH a o-ftaldialdehydem, po které vzniká izoindolová sloučenina vykazující velmi vysoký výtěžek fluorescence při detekci $\lambda_{\text{EX}} = 350 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{EM}} = 420 \text{ nm}$ (Hissin and Hilf 1976). Toto stanovení GSH i GSSG bylo autory považováno za velmi selektivní, neboť jimi nebyla prokázána jakákoliv interference u mnoha různých sloučenin. Na druhou stranu ihned po uveřejnění této metody byla publikována práce, ve které Beutler a West dokládají, že spektrofluorimetrickou metodou naměřené koncentrace GSSG jsou vysoce nadhodnoceny, což je pravděpodobně způsobeno blíže nespecifikovanou interferencí (Beutler and West 1977). Další doklad interference byl popsán v práci Scaduta (Scaduta 1988), který testoval vliv různých aminů, thiolů a aminokyselin na výslednou intenzitu fluorescence a prokázal, že u mnoha látek skutečně k interferenci dochází. Z těchto důvodů byla spektrofluorimetrická metoda stále méně využívána, a to zvláště pro stanovení GSSG. V roce 1997 byla prezentována další práce, jejímž cílem bylo porovnání metod stanovení GSH a GSSG (Floreani *et al.* 1997); jednalo se o čtyři metody - enzymatickou, HPLC, komerčně dodávanou spektrofotometrickou a fluorimetrickou. Z výsledků bylo jasně patrné, že ačkoliv HPLC je zcela srovnatelná s metodou enzymatickou, tak spektrofluorimetrická metoda dle Hissina a Hilfa se od nich svými výsledky velmi odlišuje. Při měření hladin GSH a GSSG v srdeční a jaterní tkáni byly nalezené hodnoty totiž shodné jen u hodnot GSH, a to navíc pouze v srdeční tkáni. V jaterní tkáni byly fluorimetrickou metodou získané hodnoty GSH v porovnání s referenční HPLC

metodou, sníženy dvakrát a u hodnot GSSG naopak docházelo k navýšení zjištěných koncentrací v průměru osmkrát. Tyto rozdíly v naměřených hladinách GSSG byly opět přisouzeny pravděpodobně interferenci. Z těchto důvodů byla tedy vyloučena fluorimetrická metoda z metod, které jsou doporučovány k analýze GSSG.

V roce 2007 byla publikována práce, která popisovala stanovení GSH a GSSG pomocí HPLC/FL (Kand'ár *et al.* 2007). Princip a postup reakce byl totožný se stanovením dle Hissina a Hilfa, rozdílné bylo jenom to, že konečný roztok obsahující vzniklý GSH OPA byl následně detekován na C₁₈ chromatografické koloně, ale při stejných λ_{EX} a λ_{EM} jako v originální práci. Zajímavé bylo zjištění, že na chromatografických záznamech kromě píku, který odpovídal GS-OPA, nebyla žádná další detekovaná sloučenina. Tento nálezy byl ale v rozporu s údaji o interferenci uvedenými výše (Beutler and West 1977; Floreani *et al.* 1997; Scaduto 1988).

Během naší práce na optimalizaci spektrofluorimetrického stanovení GSH a GSSG jsme se zaměřili na zjištění optimálních podmínek reakce a detekce. Nejprve jsme testovali vlnové délky excitace a emise. Z výsledků vyplynulo, že optimální hodnotou pro obě stanovení jsou vlnové délky 335/420 nm, a ne původně publikované 350/420 nm (Hissin and Hilf 1976). Takovouto změnou vlnových délek jsme dosáhli vzrůstu intenzity fluorescence o cca 20%.

Dalším testovaným parametrem byla teplota detekce. Porovnávali jsme intenzitu fluorescence a přesnost stanovení celkem u dvou teplot: 4 °C a 20 °C. Jak jsme i očekávali, tak snížením teploty bylo dosaženo dalšího vzrůstu sensitivity, a to průměrně o 25%. Tento jev lze vysvětlit pomocí obecně přijímaného principu, že s klesající teplotou se zpomaluje pohyb molekul a tím se i snižuje počet jejich vzájemných srážek. Z tohoto důvodu tedy za snížené teploty mají molekuly menší možnost se nabyté energie zbavit nezářivým přechodem – srážkou, a proto dochází k nárůstu emise energie ve formě světla, které detekujeme jako fluorescenci.

Posledním optimalizovaným faktorem, u kterého byl předpokládán vliv na IF, byla hodnota pH. U stanovení GSH se při stanovení standardně používá fosfátového pufru o pH 8. Při tomto pH jsme stanovovali přesnost (CV%) a výsledky jsme porovnali s hodnotami získanými při pH 6. Překvapivě bylo zjištěno, že všechny hodnoty CV%, a to jak pro standardy, tak i pro vzorky, jsou mnohem nižší při pH 6 než při pH 8.

Vliv pH na detekovanou IF byl také testován u stanovení GSSG. V Hissinem a Hilfem publikovaném postupu stanovení GSSG je nejprve z roztoku vystižen GSH pomocí N-ethylmaleimidu. Následně je vzorek inkubován v prostředí 0,1 M NaOH a po přidání OPA dojde k reakci se vzniklým GSH. U standardního postupu dochází k detekci IF už po tomto kroku, kdy má roztok cca pH 11. My jsme ale do reakčního postupu zavedli krok další, pomocí něhož je u výsledného roztoku hodnota pH snížena na pH 6. Toto bylo provedeno s ohledem na zjištění, že naměřená IF (a tím i koncentrace GSSG) je zřetelně ovlivňována silou pH. Bylo totiž zjištěno, že při pH 11, stejně jako za velmi kyselého pH, dochází k nárůstu absolutní míry IF, resp. koncentrace, a to až na pětinašobek hodnoty nalázané při pH 6. Tyto výkyvy jsme přisoudili právě možné interferenci ostatních látek, což i bylo potvrzeno pomocí analýzy 3D fluorescenčních spekter, kdy se změnou pH byly na 3D záznamu nalázané nové fluorescenční signály, zatímco jiné se naopak vytrácely. Námí zjištěný nárůst IF v souvislosti s pH navíc vysvětluje rozdílné poznatky popsané v odborných pracích. Beutler (Beutler and West 1977) a stejně tak i Floreani (Floreani *et al.* 1997) používali postup přesně totožný s původním (detekce při pH 11), a proto jimi naměřené hodnoty GSSG byly zvýšeny z důvodu růstu interference. Naopak článek s HPLC/FL stanovením glutathionu (Kand'ár *et al.* 2007) pro detekci použil mobilní fázi s pH 6, při němž žádná interference prokázána nebyla.

S ohledem na výše uvedené údaje byly určeny optimální podmínky ($\lambda_{\text{EX}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 420 \text{ nm}$; $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH } 6$), za nichž byly stanoveny analytické parametry pro stanovení GSH: kalibrace – linearita ($0 - 500 \text{ } \mu\text{mol/l}$), $R^2 = 1,00$; intra-assay, $\text{CV}\% \ll 5\%$; stanovení GSSG: kalibrace, linearita ($0 - 200 \text{ } \mu\text{mol/l}$), $R^2 = 0,999$; intra-assay, $\text{CV}\% < 5\%$. Námi získané analytické parametry stanovení dosahují v porovnání s daty uvedenými Floreaniem (Floreani *et al.* 1997) mnohem lepších hodnot.

Kromě zmíněných parametrů byla také stanovena míra korelace mezi hodnotami GSH a GSSG zjištěnými optimalizovanou spektrofluorimetrickou metodou a HPLC/FL metodou. Bylo použito celkem 10 totožných vzorků a po vyhodnocení koncentrací byla zjištěna téměř ideální korelace ($r = 0,99$) mezi oběma metodami jak pro stanovení GSH, tak i GSSG. Nález velmi vysokého korelačního koeficientu byl navíc také doplněn o zjištění, že koncentrace nalezené ve vzorcích spektrofluorimetrickou metodou jsou zcela srovnatelné s těmi naměřenými HPLC/FL metodou, a to nejen u hodnot GSH, ale i GSSG.

Byla zavedena, optimalizována a popsána spektrofluorimetrická metoda pro stanovení GSH a GSSG. Tuto metodu lze prohlásit za přesnou, senzitivní a hlavně specifickou. V porovnání s metodami HPLC či s enzymatickou metodou poskytuje námi zavedená metoda mnohem vyšší rychlost analýzy (HPLC $\sim 10 \text{ min/vzorek}$; enzymatická $\sim 3 \text{ min/vzorek}$; spektrofluorimetrická $\sim 10 \text{ s/vzorek}$) a stejně tak i nižší cenové náklady.

V současné době, i přes práce spektrofluorimetrickou metodou zpochybňující, cituje ročně původní práci Hissina a Hilfa okolo 80 odborných prací, které fluorimetrické stanovení GSH v biologickém materiálu použijí. Námi doložená optimalizace metody zvyšuje přesnost i citlivost celého stanovení, a proto jsou tyto výsledky díky četnému praktickému využití velmi významné.

II. Modelové toxické poškození potkaních hepatocytů acetaminofenem *in vitro*

Acetaminofen patří mezi v současné době často používaná antipyretika a analgetika. Při jeho předávkování ale dochází k toxickému poškození jaterních buněk, po kterém následuje objevení typické centrilobulární nekrózy, popř. akutního jaterního selhání. Ačkoliv je tato problematika velmi intenzivně zkoumána, přesná příčina nekrózy hepatocytů ještě není stále známá.

Celkem byly do současné doby pro vysvětlení toxických účinků navrženy dvě teorie, metabolická a oxidační. Žádná z nich ale beze zbytku nedokáže vysvětlit všechny nálezy, které byly do této doby na poli AAP toxicity publikovány (Jaeschke and Bajt 2006).

Metabolická teorie je založena na předpokladu, že toxický účinek AAP je zapříčiněn vazbou metabolitu acetaminofenu, tzv. NAPQI, na $-\text{SH}$ skupiny proteinů, což by následně mělo vést k poškození jejich funkce. Protože ale u absolutní většiny proteinů, u kterých byly AAP-adykty detekovány, žádný významný pokles aktivity nebyl prokázán, byla metabolická teorie jako hlavní příčina AAP toxicity odmítnuta (James *et al.* 2003).

Druhá, oxidační teorie byla formulována s ohledem na depleci glutathionu v buňce. K ní dochází v důsledku detoxikace nadměrného množství NAPQI produkovaného v CYP. NAPQI ihned po vzniku reaguje s přítomným GSH a vzniká AAP-GSH konjugát. Během krátké doby jsou ale zásoby glutathionu vyčerpány, což vede k mnoha dalším patofyziologickým pochodům, které souvisí s absencí glutathionu v biochemických reakcích. Jednou z hlavních rolí glutathionu je antioxidantní funkce, a proto při nízké koncentraci GSH dochází k nárůstu prooxidačních dějů, které jsou v rámci této teorie považovány za hlavní příčinu buněčné smrti. Na druhou stranu ale i tato oxidační teorie zatím nedokáže dát odpovědi na některé otázky pramenící z výsledků publikovaných v odborných pracích.

My jsme se během naší výzkumné práce zaměřili na charakterizaci toxického poškození kultivovaných potkaních hepatocytů. Tyto buňky byly inkubovány po stanovenou

dobu (v rozmezí 1 - 24 hod.) s acetaminofenem o koncentraci: 1; 2,5; 5; 10; nebo 20 mmol/l. Námi zvolené dávky AAP byly při porovnání s koncentracemi standardně používanými u myších hepatocytů vyšší, neboť potkani hepatocyty vykazují mnohem vyšší rezistenci k působení AAP (Mitchell *et al.* 1973a; Tee *et al.* 1987).

U buněk inkubovaných s AAP jsme nejprve testovali změny ve viabilitě, a to pomocí dvou testů, prvním bylo stanovení LDH v médiu a následně i LDH leakage, druhým byl WST-1 test, který slouží k detekci aktivity intracelulárních dehydrogenas. Oba dva testy prokázaly pokles viability hepatocytů po 12 hod. inkubace. Před touto dobou nebyly u LDH testu patrné jakékoli změny viability buněk. WST-1 test ale prokázal signifikantní pokles viability již po první hodině inkubace u třech nejvyšších koncentrací AAP, a i v dalších časových intervalech po 3 a 6 hod. hodnoty setrvaly snížené. Rozdílným nálezem u těchto dvou testů byl také popis změn viability u nejnižší, 1 mmol/l koncentrace AAP. U ní totiž WST-1 indikoval změny ve viabilitě po 12 hodinách, které přetrvaly až do konce inkubace. Naproti tomu stanovení aktivity LDH neukázalo jakékoli změny ani po 24 hod. Dalším důležitým výsledkem nalezeným pomocí WST-1 testu bylo zjištění, že dehydrogenasová aktivita u nejvyšší, 20 mmol/l koncentrace AAP již od 18. hodiny inkubace zcela vymizí. Námi zjištěné výsledky srovnávající LDH a WST 1 testy jsou v souladu s publikovanými údaji, v kterých bylo prokázáno, že WST-1 test odpovídá na změny viability mnohem citlivěji a přesněji, než-li je tomu u LDH testu (Kikkawa *et al.* 2005).

K detekci případného výskytu oxidačního stresu během inkubace hepatocytů s AAP jsme se rozhodli využít přímého stanovení produkce ROS s využitím ROS sondy, CM-DCFDA. Tato látka je po reakci s ROS oxidována, což vede ke změně jejich spektrálních vlastností, a tím je umožněna spektrofluorimetrická detekce. Získané výsledky ukázaly na dávce striktně závislý nárůst produkce ROS ve všech měřených časových intervalech. Zvýšená produkce ROS nalezená po 3 hodinách inkubace u všech testovaných skupin buněk, včetně kontrol, byla pravděpodobně způsobena postizolačním stresem hepatocytů. Z tohoto důvodu byly výsledné hodnoty kromě vyjádření v procentuálním nárůstu také poměrně vztahy k signálu kontrolních vzorků, čímž byl tento vliv eliminován.

Produkce ROS byla detekována u všech koncentrací vyjma 1 mmol/l AAP, kde nebyl prokázán žádný rozdíl při porovnání s kontrolními hodnotami. U koncentrací 10 a 20 mmol/l AAP byla překvapivě detekována zvýšená produkce ROS i po 24 hod., i když z WST-1 testu vyplývá, že po této době inkubace byla viabilita buněk velmi redukována, či dokonce úplně vymizela. Náš nález lze vysvětlit tím, že CM-DCFDA je schopen reagovat s mnoha látkami, které jsou velmi stabilní a přetrvávají i v mrtvých buňkách (Halliwell and Whiteman 2004). Tento nález je navíc ve shodě s recentně publikovanou prací (Bajt *et al.* 2004).

Ze získaných výsledků vyplývá, že pro případné testování hepatoprotektivních látek (N-acetylcystein, S-adenosylmethionin) na potkaních hepatocytech by bylo nejvhodnější použití koncentrace AAP 5 mmol/l, a to zvláště u 24 hod. inkubace.

Kromě snížených hodnot produkce albuminu a také pro AAP toxicitu typického poklesu hladin glutathionu jsme dále testováním aktivity glutathionreduktasy zjistili, že je její aktivita významným způsobem inhibována. Protože jsme se v žádné ze zatím publikovaných prací s takovýmto nálezem nesetkali, začali jsme tím podrobněji zabývat. (Jedinou prací, která uvádí sníženou aktivitu GR u hepatocytů inkubovaných s AAP, je práce autorů Zhu a Lei (Zhu and Lei 2006). V této práci byl testován vliv působení AAP na transgenní myši a výsledky byly srovnávány s kontrolní, wild-type skupinou, u které byly právě nalezeny, i když statisticky nevýznamně, snížené aktivity glutathionreduktasy a thioredoxinreduktasy. Tyto nálezy byly ale autory ponechány bez povšimnutí...)

III. Studium příčin inhibice GR nalezené během charakterizace AAP toxicity

Glutathionreduktasa je intracelulární enzym, jehož hlavní funkcí je zpětná redukce GSSG na GSH. Význam tohoto enzymu tedy vzrůstá v případech, kdy je v buňce produkováno větší množství GSSG (např. oxidační stres).

Námi zjištěné výsledky ukázaly, že aktivita GR je snížena v buňkách u všech koncentrací AAP, až na 1 mmol/l AAP. Například po 12 hod. inkubace dosahovala aktivita GR v buňkách s 10 mmol/l AAP pouze 60% kontrolních hodnot, u koncentrace 20 mmol/l AAP dokonce jen 50%. Navíc bylo zřetelné, že aktivita GR je inhibována v závislosti na dávce AAP. Příčina tohoto poklesu by mohla být vysvětlena pomocí mechanismu uplatňovaného při toxickém působení acetaminofenu, kdy po vyčerpání buněčných zásob GSH dochází k vazbě NAPQI na -SH skupiny proteinů. Tyto proteiny lze následně detekovat pomocí navázaných AAP-adtů. Tímto způsobem byla nalezena celá řada enzymů (Jaeschke and Bajt 2006; James *et al.* 2003), u kterých ale nebyla zjištěna víceméně žádná významná změna aktivity (Pumford *et al.* 1997). AAP-adtů byly i detekovány u enzymů účastnících se metabolismu glutathionu, např. GPx a GST (Cohen *et al.* 1997; Qiu *et al.* 1998), a navíc glutathionreduktasa -SH skupiny potřebné pro reakci s NAPQI ve své struktuře skutečně obsahuje (Vander Jagt *et al.* 1997). Přesto ale u GR přítomnost AAP-adtů potvrzena nebyla. Druhou možností, jak nalezenou inhibici GR objasnit, by mohla být její poměrně vysoká citlivost k oxidačnímu stresu. Do dnešní doby bylo skutečně publikováno několik prací, které popisují snížení GR aktivity v přítomnosti produktů lipoperoxidace (Vander Jagt *et al.* 1997), či ROS (Tabatabaie and Floyd 1994). Na druhou stranu ale bylo zároveň zjištěno, že GR aktivita není jakýmkoliv způsobem redukována v přítomnosti peroxidu vodíku (Vessey and Lee 1993).

Protože nalezený pokles aktivity glutathionreduktasy mohl být dle našeho názoru velmi důležitým faktorem při hepatotoxickém působení, rozhodli jsme se tento jev, navzdory výše uvedeným možným vysvětlením a s ohledem na nově vyvstalé souvislosti popsané v literatuře (Jaeschke and Bajt 2006), dále a podrobněji zkoumat.

Naše hypotéza se zakládala na myšlence, že glutathionreduktasa je inhibována za přítomnosti určitého metabolitu acetaminofenu, kterým byl dle našeho názoru s vysokou pravděpodobností AAP-GSH konjugát. Kvůli potvrzení této hypotézy jsme se rozhodli tento konjugát připravit a následně otestovat jeho případný vliv na aktivitu GR.

Pro přípravu AAP-GSH jsme se rozhodli použít postup popsaný nedávno (Madsen *et al.* 2007), kde je AAP-GSH připraven elektrochemickou reakcí. Během preparace dochází v prostředí fosfátového pufru nejprve k elektrochemické oxidaci AAP na NAPQI, který dále reaguje s glutathionem přítomným v roztoku; autory udávaná doba, během níž dojde k reakci mezi NAPQI a GSH, je 130 ms (Madsen *et al.* 2007). Protože naše podmínky přípravy byly zcela totožné jako v originální práci, můžeme tedy předpokládat, že jsme roztok obsahující AAP-GSH připravili také. Případný vliv AAP-GSH na aktivitu glutathionreduktasy byl testován standardním postupem, kdy po přidání konjugátu do roztoku byla sledována změna poklesu absorbance (rozpad NADPH při $\lambda = 340$ nm) při porovnání s kontrolním vzorkem, který AAP-GSH neobsahoval.

Námi nalezené výsledky byly velmi překvapivé, neboť se nám podařilo potvrdit naši hypotézu, že glutathionreduktasa je skutečně inhibována v přítomnosti AAP-GSH konjugátu. Celkem jsme testovali vliv dvou koncentrací AAP-GSH u dvou typů glutathionreduktasy - kvasinkové (*Saccharomyces cerevisiae*) a hepatocytární (z potkana). U GR z kvasinek jsme prokázali inhibiční vliv u obou koncentrací AAP-GSH, kdy koncentrace (pouhých!!!) 1 μ mol/l AAP-GSH dokázala inhibovat aktivitu GR o 40% (během 30 minut). Mnohem překvapivější byl ale vliv AAP-GSH na aktivitu hepatocytární GR, u které byla za stejných podmínek jako u kvasinkové GR, čili v přítomnosti pouze 1 μ mol/l AAP-GSH, prokázána inhibice aktivity o 97% !!! Tento náš nález svědčí o tom, že ačkoliv kvasinková GR je

vývojově velmi vzdálena glutathionreduktase potkana (savců), přesto je v přítomnosti AAP-GSH inhibována. Proto lze z tohoto tedy i vyvodit, že námi objevený mechanismus je nejspíše zcela obecným, a inhibice glutathionreduktasy konjugátem AAP-GSH se bude vyskytovat u testovaných myši, a stejně tak i u člověka.

Popisovaný nález inhibice glutathionreduktasy přináší úplně nové souvislosti a důsledky do mechanismu toxicity acetaminofenu, popř. zcela mění pohled na některé reakce, jejichž význam byl do tohoto nálezu považován za nezpochybnitelný. Důkazem toho je posouzení role samotného konjugátu acetaminofenu (resp. NAPQI) a glutathionu.

Jakmile je acetaminofen oxidován na cytochromu P450, vzniká NAPQI, který se ihned váže s přítomným GSH za vzniku AAP-GSH konjugátu. Tato produkce konjugátu může být navíc katalyzována enzymaticky glutathion-S-transferasou (Coles *et al.* 1988). Konjugace NAPQI a GSH byla dosud považována za protektivní mechanismus, kterým se hepatocyt brání proti vazbě NAPQI na -SH skupiny buněčných proteinů. Konjugát AAP-GSH je dále z buňky transportován pomocí MRP-2 proteinu, který je umístěn v kanalikulární, bazolaterální membráně hepatocytů.

Navzdory výše uvedenému a do dnešní doby obecně přijímanému mechanismu bylo poměrně nedávno uveřejněno několik odborných prací, které dospěly k nečekaným, resp. úplně opačným výsledkům, než jaké při plánování experimentů očekávaly. V roce 2000 publikoval prof. Wolf se svým týmem práci (Henderson *et al.* 2000), ve které se zabýval popisem AAP toxicity u GST- π knock-out myši. Izoenzym glutathion-S-transferasy, GST- π , je potvrzený katalyzátor produkce AAP-GSH konjugátu v jaterních buňkách (Coles *et al.* 1988; Henderson and Wolf 2005). Oproti předpokladům ale autoři analýzou výsledků dospěly k závěru, že GST- π knock-out myši mají mnohem vyšší rezistenci k toxickému působení AAP při porovnání s kontrolními zvířaty. Vysvětlení tohoto překvapivého nálezu připisali možné, glutathion-S-transferasou-katalyzované redox cyklizaci a zvýšení oxidačního stresu, popř. roli GST- π jako inhibitoru stresem indukovatelné Jun N-terminální kinasy (Henderson *et al.* 2000).

Výše zmíněná práce přinesla velmi překvapivé výstupy. Předpoklady autorů byly takové, že v nepřítomnosti GST- π by mělo dojít ke zvýšení míry acetaminofenem způsobené hepatotoxicity (Henderson *et al.* 2000). Poskytnutá vysvětlení autorů sice přinesla možná řešení jejich nálezů, na druhou stranu ale mohou být tato neočekávaná zjištění vysvětlena jednodušším způsobem, pokud v úvahu vezmeme námi zjištěná fakta o inhibici GR.

Lze předpokládat, že myši hepatocyty díky deficitu enzymu GST- π produkují mnohem menší množství AAP-GSH. V souvislosti s tím vede nižší hladina AAP-GSH konjugátu k nižší inhibici glutathionreduktasy, což dále vede ke snížení toxicity. Toto zdůvodnění je možno podložit i přímým nálezem autorů, kteří zjistili, že u wild-type a GST- π knock-out myši dochází po inkubaci s AAP k rozdílnému návratu koncentrací GSH na původní hladiny (Henderson *et al.* 2000). Během experimentů byly hladiny glutathionu stanovovány během pěti hodin od doby podání AAP. Bylo zjištěno, že koncentrace GSH byly v průběhu testování sníženy u obou myších kmenů, u knock-out myši ale zůstaly hladiny GSH vždy vyšší než u wild-type. Dalším zajímavým nálezem je rozdíl v chování hladin GSH po 5 hodinách od podání AAP. U wild-type totiž hladiny zůstaly na velmi nízkých hodnotách, u knock-out myši ale došlo k návratu koncentrací GSH na hladiny srovnatelné se stavem před podáním acetaminofenu. Kvůli vysvětlení tohoto fenoménu autoři testovali změny exprese enzymů účastnících se syntézy glutathionu, γ -glutamylcysteinsynthetasy a glutathionsynthetasy, jakékoli změny v expresi těchto enzymů byly ale vyloučeny. Protože tedy změny návratu koncentrací GSH na původní hodnoty u knock-out myši nemohou být vysvětleny touto cestou, je velmi pravděpodobné, že odlišná rychlost obnovy GSH hladin nalezená u testovaných myších kmenů může být zapříčiněna rozdílnou aktivitou glutathionreduktasy.

Hypotéza o tom, že AAP-GSH konjugát není pouze produkt detoxikace acetaminofenu, ale naopak, že je to velmi škodlivá látka, byla podložena našimi výsledky z testování vlivu AAP-GSH na aktivitu GR *in vitro*. Navíc jsme na výše uvedeném případu prokázali, že zvýšená hladina AAP-GSH následkem přítomnosti GST- π vede k prohloubení hepatocytárního poškození. Pro další podporu naší hypotézy jsme se snažili najít ještě jiný mechanismus, který by také mohl vést ke zvýšení intracelulární koncentrace AAP-GSH a skutečně jsme takový našli. V jedné práci byla testována AAP toxicita na mutantních myších, které měly zvýšené hladiny GSH (Rzucidlo *et al.* 2000). Pokud je naše hypotéza správná, pak myši se zvýšenou koncentrací GSH by měly vykazovat vyšší vnímavost k AAP toxicitě.

V roce 2000 publikoval Dr. Rzucidlo práci zaměřenou na vyšetřování akutní toxicity acetaminofenu u transgenních myší se zvýšenou koncentrací GSH v játrech, která byla způsobena stimulací exprese glutathionsynthetasy (Rzucidlo *et al.* 2000). Cílem práce bylo prokázat, že zvýšení hladin GSH by mělo vést ke snížené toxicitě. Nález se ale naprosto rozcházel s předpoklady, neboť bylo překvapivě zjištěno, že transgenní myši vykazovaly mnohem větší vnímavost k AAP toxicitě než wild-type myši. U transgenních myší byla vyšší hepatotoxicita prokázána pomocí větších histopatologických změn a také díky vyšším hladinám sérové aktivity ALT v porovnání s wild-type. Vysvětlení těchto překvapivých nálezů nebylo vůbec v práci zmíněno, ačkoliv s ohledem na naše zjištění je příčina popsaných nálezů zcela zřejmá. V buňkách, ve kterých dochází ke zvýšené syntéze GSH, je také mnohem rychleji a ve větší míře tvořen AAP-GSH konjugát, což opět vede, v porovnání ke kontrolám, k zesílení inhibičního působení na glutathionreduktasu, a tím i ke zvýšení AAP toxicity.

I když v poslední době publikované práce naznačovaly, že hlavním patologickým mechanismem zodpovědným za AAP toxicitu je otevření MPTP - Mitochondrial Permeability Transition Pore (James *et al.* 2003; Kon *et al.* 2004), přesto tímto principem nelze vysvětlit ani jeden z případů podrobně rozebraných výše (Henderson *et al.* 2000; Rzucidlo *et al.* 2000).

Mitochondrial Permeability Transition (MPT) může být stimulována mnoha podněty, které většinou vznikají, pokud se v buňce odehrává patologický proces. Proto k MPT dochází při zvýšeném oxidačním stresu či při růstu intracelulárních hladin Ca^{2+} (He and Lemasters 2002). Mezi tyto stimuly otevření MPTP rozhodně ale nepatří zvýšená hladina GSH, která je nalézána v buňkách transgenních myší v práci Dr. Rzucidla (Rzucidlo *et al.* 2000). Kromě tohoto je i obecným nedostatkem MPT teorie o původu toxického působení acetaminofenu absence specifického stimulu, který by vedl k otevření MPTP.

Možnost, že by tímto stimulem mohl být NAPQI, který by se vázal na -SH skupiny proteinů v MPTP, jejichž oxidace vede k otevření póru, byla popsána nedávno (Chen *et al.* 2003). S ohledem na vysokou reaktivitu NAPQI s -SH skupinami by tento princip mohl být i pravděpodobný. Na druhou stranu ale je tato domněnka v příkrém rozporu s nálezem v již popisovaném článku (Henderson *et al.* 2000), protože pokud by tato hypotéza o otevření MPTP díky vazbě NAPQI byla správná, pak by u GST- π deficientních myší mělo docházet k mnohem většímu buněčnému poškození než u kontrol. Toto je ale přesný opak toho, co je popsáno ve skutečnosti.

S ohledem na fakta uvedená v této práci se domníváme, že nejdůležitějším patologickým mechanismem v AAP toxicitě je přetrvávající snížená koncentrace glutathionu sama o sobě. Ta má příčinu v typické depleci GSH díky reakci s NAPQI, ale také v blokaci obnovy hladin glutathionu z důvodu inhibice glutathionreduktasy AAP-GSH konjugátem.

Z tohoto závěru vyplývá, že hlavním zdrojem AAP toxicity není přímé působení NAPQI či, do dnešní doby zatím blíže neurčená, specifická tvorba ROS či RNS. Naproti tomu se zdá být vysoce pravděpodobné, že hlavním patologickým mechanismem je právě prolongovaná deplece glutathionu, která následně vede ke všem v literatuře popisovaným

patologickým procesům, jako je např. zvýšení produkce ROS a RNS, lipoperoxidace, či otevření MPTP (Jaeschke and Bajt 2006; James *et al.* 2003).

Důkazem pro toto tvrzení jsou i závěry odborných prací, které se snažily najít zdroj zvýšené tvorby ROS, popř. RNS, při AAP toxicitě (Hinson *et al.* 1998; Michael *et al.* 2001). Jejich zkoumáním bylo zjištěno, že pokud byla u testovaných objektů zablokována tvorba NO, pak sice nedocházelo k nitraci biomolekul, ale celkový dopad toxického působení AAP na buňky se překvapivě vůbec nezměnil. Toto mělo, jak bylo prokázáno, důvod v upřednostnění lipoperoxidačních pochodů před nitračními, jež byly předem zablokovány.

Z toho vyplývá, že deplece glutathionu, který za fyziologického stavu hraje zásadní roli antioxidačním systémem (a to jak v detoxikaci NO, tak i produktů lipoperoxidace), vede k převaze prooxidačních procesů, resp. k oxidačnímu stresu. Projevy tohoto stavu mohou být různorodé a závisí na daných podmínkách v buňce. Závěrem lze tedy shrnout, že během AAP toxicity není pravděpodobně přítomen žádný typický a specifický mechanismus zodpovědný za zvýšenou produkci ROS vyjma již popsané deplece glutathionu.

Analýzou výsledků výše uvedených prací a s ohledem na námi zjištěné nálezy bylo prokázáno, že formace AAP-GSH konjugátu a následná inhibice glutathionreduktasy hraje zcela zásadní roli v mechanismu AAP toxicity.

7. ZÁVĚR

I. Byla zavedena a optimalizována spektrofotometrická metoda pro stanovení obou forem glutathionu. Výsledné analytické parametry stanovení při optimalizovaných podmínkách reakce a detekce jsou: pro GSH (kalibrace: $R^2=1$, linearita 0-500 $\mu\text{mol/l}$; intra-assay: CV% \ll 5%), pro GSSG (kalibrace: $R^2=0,99$, linearita 0-200 $\mu\text{mol/l}$; intra-assay: CV% $<$ 5%). Srovnáním naměřených koncentrací u totožných vzorků s HPLC/FL metodou byl zjištěn velmi vysoký korelační koeficient ($r = 0,99$), a to pro stanovení GSH i GSSG. Oproti publikovaným údajům, které popisovaly spektrofotometrickou metodu z důvodu vysoké interference jako nevhodnou k analýze glutathionu, obzvláště GSSG v biologickém materiálu, jsme optimalizací původního postupu dokázali zavést stanovení, jež disponuje vysokou specifičtostí, senzitivitou, nízkými náklady a malou časovou náročností.

II. Testováním toxického vlivu acetaminofenu na potkaních hepatocytech *in vitro* byl v závislosti na dávce acetaminofenu a délce jeho působení potvrzen pokles viability (LDH-test, WST-1), tvorby albuminu a koncentrace glutathionu v buňkách. Dále vedle zvýšené produkce ROS byla také prokázána inhibice glutathionreduktasy závislá na dávce AAP. Snížení aktivity tohoto enzymu, který se podílí zcela zásadním podílem na metabolismu glutathionu, nebylo zatím v žádné odborné práci popisováno, a proto jsme se zaměřili na hledání příčin inhibice. Naši hypotézou, která byla následnými pokusy potvrzena, byla možnost přímého vlivu konjugátu acetaminofenu a glutathionu, AAP-GSH. Prokázali jsme, že hepatocytární glutathionreduktasa je inhibována v přítomnosti AAP-GSH; pro koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ AAP-GSH byla nalezena inhibice hepatocytární GR (0,01 U/mg) o 97%!!! Náš nálezy zcela mění vzhled do mechanismu AAP toxicity a ozřejmuje nálezy popsané v odborné literatuře, které dosud známými poznatky vysvětlitelné nebyly.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AKERBOOM TP, SIES H: Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzymol* 173: 523-534, 1989.
2. BAJT ML, KNIGHT TR, LEMASTERS JJ, JAESCHKE H: Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine. *Toxicol Sci* 80: 343-349, 2004.
3. BERRY M, EDWARDS A, BARRITT G: High-yield preparation of isolated hepatocytes from rat liver. In R. BURDON and P. VAN KNIPPENBERG (eds.): *Isolated Hepatocytes Preparation, Properties and Application*, pp. 15-81, Elsevier, New York, 1991
4. BEUTLER E, WEST C: Comment concerning a fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem* 81: 458-460, 1977.
5. CARLBERG I, MANNERVIK B: Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250: 5475-5480, 1975.
6. COHEN SD, PUMFORD NR, KHAIRALLAH EA, BOEKELHEIDE K, POHL LR, AMOUZADEH HR, HINSON JA: Selective protein covalent binding and target organ toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 143: 1-12, 1997.
7. COLES B, WILSON I, WARDMAN P, HINSON JA, NELSON SD, KETTERER B: The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: a stopped-flow kinetic study. *Arch Biochem Biophys* 264: 253-260, 1988.
8. DAHLIN DC, MIWA GT, LU AY, NELSON SD: N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1327-1331, 1984.
9. DAHLIN DC, NELSON SD: Synthesis, decomposition kinetics, and preliminary toxicological studies of pure N-acetyl-p-benzoquinone imine, a proposed toxic metabolite of acetaminophen. *J Med Chem* 25: 885-886, 1982.
10. FLOREANI M, PETRONE M, DEBETTO P, PALATINI P: A comparison between different methods for the determination of reduced and oxidized glutathione in mammalian tissues. *Free Radic Res* 26: 449-455, 1997.
11. HALLIWELL B, WHITEMAN M: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142: 231-255, 2004.
12. HE L, LEMASTERS JJ: Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett* 512: 1-7, 2002.
13. HENDERSON CJ, WOLF CR: Disruption of the glutathione transferase pi class genes. *Methods Enzymol* 401: 116-135, 2005.
14. HENDERSON CJ, WOLF CR, KITTERINGHAM N, POWELL H, OTTO D, PARK BK: Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12741-12745, 2000.
15. HINSON JA, PIKE SL, PUMFORD NR, MAYEUX PR: Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem Res Toxicol* 11: 604-607, 1998.

16. HISSIN PJ, HILF R: A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74: 214-226, 1976.
17. CHEN C, HENNIG GE, MANAUTOU JE: Hepatobiliary excretion of acetaminophen glutathione conjugate and its derivatives in transport-deficient (TR-) hyperbilirubinemic rats. *Drug Metab Dispos* 31: 798-804, 2003.
18. JAESCHKE H, BAJT ML: Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* 89: 31-41, 2006.
19. JAMES LP, MAYEUX PR, HINSON JA: Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* 31: 1499-1506, 2003.
20. JOLLOW DJ, MITCHELL JR, POTTER WZ, DAVIS DC, GILLETTE JR, BRODIE BB: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 195-202, 1973.
21. KAND'ÁR R, ZÁKOVÁ P, LOTKOVÁ H, KUCERA O, CERVINKOVÁ Z: Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Pharm Biomed Anal* 43: 1382-1387, 2007.
22. KAPLOWITZ N: Acetaminophen hepatotoxicity: what do we know, what don't we know, and what do we do next? *Hepatology* 40: 23-26, 2004.
23. KIKKAWA R, YAMAMOTO T, FUKUSHIMA T, YAMADA H, HORII I: Investigation of a hepatotoxicity screening system in primary cell cultures --"what biomarkers would need to be addressed to estimate toxicity in conventional and new approaches?" *J Toxicol Sci* 30: 61-72, 2005.
24. KON K, KIM JS, JAESCHKE H, LEMASTERS JJ: Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 40: 1170-1179, 2004.
25. LEE WM: Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* 40: 6-9, 2004.
26. LU SC: Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 13: 1169-1183, 1999.
27. MADSEN KG, OLSEN J, SKÖNBERG C, HANSEN SH, JURVA U: Development and evaluation of an electrochemical method for studying reactive phase-I metabolites: correlation to in vitro drug metabolism. *Chem Res Toxicol* 20: 821-831, 2007.
28. MANNERVIK B, BOARD PG, HAYES JD, LISTOWSKY I, PEARSON WR: Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401: 1-8, 2005.
29. MICHAEL SL, MAYEUX PR, BUCCI TJ, WARBRITTON AR, IRWIN LK, PUMFORD NR, HINSON JA: Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice lacking inducible nitric oxide synthase activity. *Nitric Oxide* 5: 432-441, 2001.
30. MITCHELL JR, JOLLOW DJ, POTTER WZ, DAVIS DC, GILLETTE JR, BRODIE BB: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 185-194, 1973a.
31. MITCHELL JR, JOLLOW DJ, POTTER WZ, GILLETTE JR, BRODIE BB: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 211-217, 1973b.
32. NELSON SD: Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Semin Liver Dis* 10: 267-278, 1990.

33. PARONI R, DE VECCHI E, CIGHETTI G, ARCELLONI C, FERMO I, GROSSI A, BONINI P: HPLC with o-phthalaldehyde precolumn derivatization to measure total, oxidized, and protein-bound glutathione in blood, plasma, and tissue. *Clin Chem* 41: 448-454, 1995.
34. POTTER WZ, DAVIS DC, MITCHELL JR, JOLLOW DJ, GILLETTE JR, BRODIE BB: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. 3. Cytochrome P-450-mediated covalent binding in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 203-210, 1973.
35. PUMFORD NR, HALMES NC, MARTIN BM, COOK RJ, WAGNER C, HINSON JA: Covalent binding of acetaminophen to N-10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 501-505, 1997.
36. QIU Y, BENET LZ, BURLINGAME AL: Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Biol Chem* 273: 17940-17953, 1998.
37. ROMERO FJ, MUELLER-KLIESER W: Semiquantitative bioluminescent assay of glutathione. *J Biolumin Chemilumin* 13: 263-266, 1998.
38. RZUCIDLO SJ, BOUNOUS DI, JONES DP, BRACKETT BG: Acute acetaminophen toxicity in transgenic mice with elevated hepatic glutathione. *Vet Hum Toxicol* 42: 146-150, 2000.
39. SCADUTO RC, JR.: Dithiothreitol and amino acids interfere with the fluorometric determination of glutathione with orthophthalaldehyde. *Anal Biochem* 174: 265-270, 1988.
40. SENFT AP, DALTON TP, SHERTZER HG: Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 280: 80-86, 2000.
41. TABATABAIE T, FLOYD RA: Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Arch Biochem Biophys* 314: 112-119, 1994.
42. TEE LB, DAVIES DS, SEDDON CE, BOOBIS AR: Species differences in the hepatotoxicity of paracetamol are due to differences in the rate of conversion to its cytotoxic metabolite. *Biochem Pharmacol* 36: 1041-1052, 1987.
43. TIETZE F: Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27: 502-522, 1969.
44. VANDER JAGT DL, HUNSAKER LA, VANDER JAGT TJ, GOMEZ MS, GONZALES DM, DECK LM, ROYER RE: Inactivation of glutathione reductase by 4-hydroxynonenal and other endogenous aldehydes. *Biochem Pharmacol* 53: 1133-1140, 1997.
45. VESSEY DA, LEE KH: Inactivation of enzymes of the glutathione antioxidant system by treatment of cultured human keratinocytes with peroxides. *J Invest Dermatol* 100: 829-833, 1993.
46. WU G, FANG YZ, YANG S, LUPTON JR, TURNER ND: Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492, 2004.
47. ZHU JH, LEI XG: Double null of selenium-glutathione peroxidase-1 and copper, zinc-superoxide dismutase enhances resistance of mouse primary hepatocytes to acetaminophen toxicity. *Exp Biol Med (Maywood)* 231: 545-552, 2006.

9. SOUHRN

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

Druhým cílem této práce byla charakterizace toxického vlivu acetaminofenu (AAP) na potkaní hepatocyty *in vitro*. Příčinou AAP toxicity je jeho přeměna na NAPQI (N-acetyl-p-benzochinonimin), který reaguje s GSH za vzniku AAP-GSH, což způsobuje depleci GSH. Po předávkování AAP následuje nekróza buněk, jež může vyústit až v jaterní selhání. I když je AAP toxicita velmi intenzivně studována, mechanismus poškození není ještě zcela známý. Hepatocyty byly inkubovány s AAP (1-20 mmol/l) v časových intervalech 1-24 hod. Pomocí WST-1 testu zjištěno, že viabilita hepatocytů klesá u všech koncentrací AAP v závislosti na čase, což bylo u nejvyšších koncentrací potvrzeno únikem LDH do média. Kromě jiných markerů jsme také v buňkách stanovovali aktivitu glutathionreduktasy (GR). Překvapivě jsme u všech koncentrací AAP již po 3 hodinách inkubace zjistili na dávce závislý pokles aktivity tohoto enzymu. Dalším studiem mechanismu této inhibice jsme objevili, že glutathionreduktasa je inhibována metabolitem acetaminofenu, který byl až dosud obecně považován za zcela neškodný. Syntézou a následným testováním tohoto metabolitu byla prokázána velmi silná inhibice hepatocytární GR, a to o 97% oproti kontrolám. Tento nález vnáší naprosto nové poznatky do studia AAP toxicity a řadu jich zcela mění.

10. SUMMARY

Glutathione is the most abundant intracellular non-protein thiol. This tripeptide, which occurs as the reduced (GSH) and the oxidized (GSSG) form, belongs among the most potent antioxidants. The aim of present work was to introduce and optimize a glutathione assay that, in comparison to mostly used HPLC methods, would possess low cost and short time of the measurement. We chose the spectrofluorimetric method based on detection of a reaction product between GSH and o-phthalaldehyde. After optimization, we gained following analytical parameters: GSH (calibration: $R^2=1$, 0-500 $\mu\text{mol/l}$; intra-assay: $\text{CV}\% \ll 5\%$), GSSG (calibration: $R^2=0.99$, 0-200 $\mu\text{mol/l}$; intra-assay: $\text{CV}\% < 5\%$). We tested the levels of both GSH and GSSG by optimized method and by HPLC/FL method. We found very strong correlation, $r = 0.99$. We conclude, we established optimized glutathione assay which possessed high specificity, sensitivity, accuracy and, in addition, is comparable to HPLC method.

Another aim of our work was to evaluate the acetaminophen (AAP) toxic influence *in vitro*. The cause of AAP toxicity is found in metabolic activation to NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone imine). This compound reacts with GSH to form AAP-GSH and thus it results in GSH depletion. In AAP overdose, the necrosis of hepatocytes appears and it may lead to acute liver failure. Despite a number of studies, the mechanism of AAP injury remains still unknown in part.

We used rat hepatocytes incubated with AAP (1-20 mmol/l) during 1-24 h time period. Using WST-1, we found time dependent decrease in cell viability in all AAP concentrations. These results were confirmed by LDH test in cells treated with the highest AAP doses. Except of other assays, we tested also the changes of glutathione reductase (GR) activity. Interestingly, we proved the dose dependent decrease of GR activity in all AAP treated cells already after 3 h of treatment. Consequently, we studied the mechanism of GR inhibition and we discovered a significant influence of an AAP metabolite that was considered to be harmless till now. We prepared and tested the influence of this compound and we proved strong inhibition of hepatocyte GR, i.e. by 97% compared to control. Our results provide absolutely new advices into AAP toxicity and lead to new consequences in description of AAP toxic causation.

11. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY UCHAZEČE

Původní práce:

1. Mužáková V., Vojtišck P., Meloun M., Vaňková R., Roušar T., Červinková Z.: Antioxidant vitamin levels do not exhibit negative correlation with the extent of acute myocardial infarction. *Physiol Res*, 2005; 54(6): 623-9. (IF = 1,806)
2. Kučera O., Červinková Z., Lotková H., Křiváková P., Roušar T., Mužáková V., Hěžová R., Kandár R., Rudolf E.: Protective effect of S-adenosylmethionine against galactosamine-induced injury of rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res*. 2006; 55(5): 551-60. (IF = 2,093)
3. Červinková Z., Lotková H., Křiváková P., Roušar T., Kučera O., Tichý L., Červinka M., Drahota Z.: Evaluation of mitochondrial function in isolated rat hepatocytes and mitochondria during oxidative stress. *Altern Lab Anim*. 2007 Jun;35(3):353-61. (IF = 0,71)
4. Lotková H., Červinková Z., Kučera O., Roušar T., Křiváková P.: S-adenosylmethionine exerts a protective effect against thioacetamide-induced injury in primary cultures of rat hepatocytes. *Altern Lab Anim*. 2007 Jun;35(3):363-71. (IF = 0,71)
5. Roušar T., Kučera O., Křiváková P., Lotková H., Mužáková V., Červinková Z.: Evaluation of Oxidative Status in Acetaminophen Treated Rat Hepatocytes Cultured in vitro. *Physiol Res*. 2009, No. 2. (v tisku) (IF = 2,093 pro rok 2006)
6. Skalický J., Mužáková V., Kandár R., Meloun M., Roušar T., Palička V.: Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med*. 2008. (v tisku) (IF = 1,725 pro rok 2006)

Přehledné články:

1. Roušar T., Červinková Z., Mužáková V., Kučera O., Lotková H., Křiváková P.: Glutathion a metody stanovení. *Acta Medica Suppl*. 2005 (48)1; 15-20.
2. Křiváková P., Červinková Z., Lotková H., Kučera O., Roušar T.: Mitochondrie a jejich úloha v buněčném metabolismu. *Acta Medica Suppl*. 2005 (48)2; 57-67.
3. Kučera O., Lotková H., Křiváková P., Roušar T., Červinková Z.: Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro. *Československá fyziologie* 55/2006 č.3; 52-59.

Abstrakta:

1. Mužáková V., Roušar T., Vojtišek P., Skalický J.: Antioxidant vitamin pool in senior population. *Ceni Eur J Publ Health 2004; 12, Suppl, p. 64-66.*
2. Mužáková V., Roušar T., Žáková P., Kand'ar R., Vojtišek P., Skalický J.: Hladina vitamínu C u vybraných skupin starších nemocných. *3th International Conference VITAMINS 2003, Pardubice. Sborník s. 160-161.*
3. Žáková P., Roušar T., Kand'ar R., Ventura K.: Stanovení vitamínu C pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. *3th International Conference VITAMINS 2003, Pardubice. Sborník s. 146-147.*
4. Roušar T., Žáková P., Kand'ar R., Mužáková V., Křenková J.: Studie Vitaminy. *Analytická chemie – Merck 2003, Sborník prací 6. ročníku soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie (ed. Barek J., Ventura K.), Česká společnost chemická, Praha, 2003, 60 – 65.*
5. Roušar T., Mužáková V., Kand'ar R., Vojtišek P.: Evaluation of the oxidative stress in diabetic and hypercholesterolemic senior patients. *4th International Conference VITAMINS 2004, Pardubice. Sborník s. 176-177.*
6. Mužáková V., Roušar T., Vojtišek P., Grofová Z., Skalický J.: Valuation of dietary habits in patients with acute myocardial infarction. *4th International Conference VITAMINS 2004, Pardubice. Sborník s. 84-85.*
7. Mužáková V., Roušar T., Vojtišek P., Skalický J.: Vliv stravovacích zvyklostí na výskyt infarktu myokardu. *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí VI, Podivice, 2004. Sborník s. 161-170.*
8. Roušar T., Mužáková V., Kučera O., Lotková H., Kand'ar R., Červinková Z.: Is it correct to leave out the fluorimetric methods for glutathione assay? *Clin. Chim. Acta 2005; 355, Special Suppl: S 207-208.*
9. Mužáková V., Roušar T., Vojtišek P., Skalický J., Červinková Z.: Suboptimal levels of antioxidant vitamins increase the risk of myocardial infarction in Czech population. *Clin. Chim. Acta 2005; 355, Special Suppl: S 179.*
10. Mužáková V., Hézová R., Kučera O., Roušar T., Lotková H., Červinková Z.: The in vitro effect of S-adenosyl-L-methionine on the function of rat hepatocytes damaged by D-galactosamine. *Clin. Chim. Acta 2005; 355, Special Suppl: S 152.*
11. Roušar T., Červinková Z., Mužáková V., Kučera O., Lotková H., Kand'ar R., Křiváková P.: Stanovení glutathionu v primární kultuře hepatocytů. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2005; 59(5); 272.*
12. Křiváková P., Červinková Z., Kučera O., Lotková H., Roušar T., Kand'ar R., Drahota Z.: Selektivní působení tBHP na enzymy dýchacího řetězce hepatocytů a protektivní účinek SAME. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2005; 59(5); 270-271.*
13. Křiváková P., Červinková Z., Roušar T., Kučera O., Lotková H., Kand'ar R., Drahota Z.: Selective inhibitory effect of tBHP on respiratory chain enzymes in isolated rat hepatocytes and protective effect of SAME. *Mitochondrial Physiology Network 10.9 2005; S92.*
14. Roušar T., Křiváková P., Kučera O., Mužáková V., Lotková H., Bárta P. a Červinková Z.: Glutathion a možnosti jeho stanovení. *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí VIII. Sborník, s. 161-170.*

15. Roušar T., Křiváková P., Kučera O., Lotková H., Mužáková V., Červinková Z.: Analysis of oxidative/antioxidant balance in toxic liver injury. *IMPG SAS, 2006, p. 344.*
16. Kučera O., Roušar T., Křiváková P., Lotková H., Červinková Z.: Model of acetaminophen-induced injury of rat hepatocytes in primary culture. *IMPG SAS, 2006, p. 308.*
17. Křiváková P., Roušar T., Kučera O., Lotková H., Labajová A., Červinková Z., Drahota Z.: Oxidative damage of isolated rat hepatocytes by tert-butylhydroperoxide. *IMPG SAS, 2006, p. 307.*
18. Mužáková V., Skalický J., Kand'ár R., Vojtíšek P., Kovařík J., Richter M., Roušar T.: Oxidative stress and α -tocopherol level in patients with coronary artery disease. Molecular and physiological effects of bioactive food compounds. *COST 926/927, 2006. Sborník, s. 183.*
19. Roušar T., Kučera O., Křiváková P., Mužáková V., Červinková Z.: Optimized fluorimetric assay of glutathione in hepatocyte tissue cultures. *Clin. Chem. Lab. Med. 2007; 45, Special Suppl: S206.*
20. Skalický J., Mužáková V., Kand'ár R., Meloun M., Vojtíšek P., Kovařík J., Roušar T.: Oxidative stress and its impact on development of advanced coronary artery disease. *Clin. Chem. Lab. Med. 2007; 45, Special Suppl: S241.*
21. Mužáková V., Skalický J., Kand'ár R., Meloun M., Kovařík J., Roušar T.: The diminishing of oxidative stress by diet optimization may reduce the occurrence of metabolic syndrome in obese persons. *Clin. Chem. Lab. Med. 2007; 45, Special Suppl: S152.*
22. Roušar T., Kučera O., Křiváková P., Lotková H., Mužáková V., Červinková Z.: Evaluation of glutathione metabolism in cultured rat hepatocytes during acetaminophen injury. *Free Radical Research, Volume 41, Suppl. 1 (Oct. 2007), p. S51-S52.*
23. Mužáková V., Skalický J., Kand'ár R., Zakova P., Kovařík J., Meloun M., Vojtíšek P., Roušar T.: Oxidative stress and inflammatory markers in advanced coronary artery disease. *Free Radical Research, Volume 41, Suppl. 1 (Oct. 2007), p. S43-S44.*
24. Roušar T., Kučera O., Křiváková P., Lotková H., Mužáková V., Červinková Z.: Studium změn redox rovnováhy v kultivovaných hepatocytech během toxického působení acetaminofenu. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2008; 62(2); 126-127.*
25. Kučera O., Lotková H., Křiváková P., Kotraš T., Garnol T., Endlicher R., Mazurová Y., Roušar T., Červinková Z. Zavedení modelu nealkoholického ztukovatění jater na potkanech. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2008; 62(2); 123.*
26. Křiváková P., Kučera O., Roušar T., Lotková H., Endlicher R., Červinková Z.: Vliv acetaminofenu na respiraci potkaních hepatocytů. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2008; 62(2); 124.*

Poděkování: Tato práce vznikla za podpory grantů MSM0021620820 a GAUK 90/2006/C.

