

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
ÚSTAV FYZIOLOGIE**

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

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Tomáš Roušar

Školitel: doc. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.

**Hradec Králové
2008**

**CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY**

**EVALUATION OF THE CHANGES
IN ANTIOXIDANT BALANCE
OF HEPATOCYTES TREATED
WITH XENOBIOTICS *IN VITRO***

Ph.D. THESIS

Mgr. Tomáš Roušar

Supervisor: doc. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.

**Hradec Králové
2008**

„Věda není nic než soubor pokusů, které se povedly.“

Valéry Paul

Na tomto místě bych chtěl upřímně poděkovat své školitelce, doc. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc. za veškerou pomoc během vypracování a sepsání disertační práce a stejně tak i za podnětné rady a názory, kterými usměřňovala moji výzkumnou činnost; sám uznávám, že někdy to „mohlo být asi poměrně nelehké“...

Na dalším, krásném druhém místě bych chtěl také vyslovit velké díky mému věčnému soupeřnickovi, Dr. Ottovi Kučerovi, bez něhož by tato práce po praktické stránce nemohla vzniknout vůbec. Takže: díky, díky, díky. Za častou pomoc v průběhu experimentů a rovněž za podnětné vědecké debaty v průběhu četných vědeckých zahraničních symposií bych chtěl poděkovat také Dr. Pavle Kirakové (roz. Křivákové). Dále bych rád projevil svůj dík za veškerou pomoc Dr. Halce Lotkové, laborantkám Janě, Majce, Monice, Lence, Jitce, super sekretářkám Ivance a Galině, a dále pak i ostatním, kteří se na této práci jakýmkoliv způsobem podíleli (jmenovitě jsou to např. M.V., L.U., P.K., V.K., M.B., M.V., K.T., R.M., H.J., K.R., J.H., Juliane W. a Fox M. či jiní.)

Ač v závěru, ale přesto v neposlední řadě bych chtěl velmi poděkovat celé své rodině za veškerou podporu, které se mi po celou dobu mého, a nejen doktorského, studia dostávalo... (SZUP OQBDD IF QQN XBR)

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 spektrofluorimetrickou metodu založenou na detekci produktu reakce GSH a o-ftaldialdehydu. Optimalizací postupu jsme dosáhli těchto analytických parametrů: GSH (kalibrace: $R^2=1$, 0-500 $\mu\text{mol/l}$; intra-assay: CV% \ll 5%), GSSG (kalibrace: $R^2=0,99$, 0-200 $\mu\text{mol/l}$; intra-assay: CV% $<$ 5%). Dále byla porovnáním naměřených koncentrací s referenční HPLC/FL metodou vypočtena velmi silná korelace, $r=0,99$, mezi oběma stanoveními. Z udávaných hodnot vyplývá, že byla zavedena specifická, citlivá a přesná metoda srovnatelná s HPLC stanovením.

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

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

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.

SEZNAM ZKRATEK

AA	askorbová kyselina
AAP	acetaminofen
AAP-GSH	konjugát acetaminofenu a glutathionu
ALT	alaninaminotransferasa
ATP	adenosintrifosfát
CM-DCFDA	chlóromethyl-2',7'-dichlórodihydro- fluorescein diacetát
CV%	variační koeficient
CYP	cytochrom P-450
Cys	cystein
DCFDA	dichlórodihydrofluorescein diacetát
DHAA	dehydroaskorbová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
eNOS	endotelová NO-synthetasa
FAD(H ₂)	flavinadenindinukleotid
GCS	γ-glutamylcysteinsynthetasa
GGT	γ-glutamyltransferasa
Glu	glutamová kyselina, glutamát
GPx	glutathionperoxidasa
GS	glutathionsynthetasa
GS-OPA	produkt reakce glutathionu a o-ftaldialdehydu
GSH	glutathion (redukováná forma)
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSSG	glutathion (oxidovaná forma)
GSSX	glutathion vázaný na proteiny
GST	glutathion-S-transferasa
GR	glutathionreduktasa
HCl	kyselina chlorovodíková
HClO	kyselina chlorná

4-HNE	4-hydroxynonenal
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HPLC/EC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
HPLC/FL	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorimetrickou detekcí
HPLC/MS	kapalinový chromatograf spojený s hmotnostním spektrometrem
HPLC/UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fotometrickou UV detekcí
HPLC/VIS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fotometrickou VIS detekcí
IF	intenzita fluorescence
IFN- γ	interferon- γ
IL-1	interleukin-1
iNOS	induktivní NO-synthetasa
K-H roztok	Krebs-Henseleitův roztok
λ_{EM}	vlnová délka emise
λ_{EX}	vlnová délka excitace
LDH	laktátdehydrogenasa
LDH-L	laktátdehydrogenasa - leakage
LDL	lipoproteiny o nízké denzitě
LO•	alkoxylový radikál
LOO•	peroxylový radikál
Lys	lysin
MDA	malondialdehyd
MPA	kyselina metafosforečná
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
MPTP	MPT Pore
MRP-2,3	Multidrug Resistance-associated Protein – 2,3
NaOH	hydroxid sodný
NAD(H)	nikotinamiddinukleotid

NADP(H)	nikotinamiddinukleotidfosfát
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
NEM	N-ethylmaleimid
NOS	NO-synthasa
nNOS	neuronová NO-synthetasa
NO (•NO)	oxid dusnatý
•NO ₂	oxid dusičitý
O ₂	molekulární kyslík
¹ O ₂	singletový kyslík
O ₂ ^{•-}	superoxidový radikál
O ₃	ozón
•OH	hydroxylový radikál
ONOO ⁻	peroxynitrit
OPA	o-ftaldialdehyd
PB	fosfátový pufr (Na ⁺)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PM	Petriho miska
PP	fosfátový pufr (K ⁺)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
R ²	determinační koeficient
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SD	směrodatná odchylka
SOD	superoxiddismutasa
tBHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxid
TB	trypanová modř
TNF-α	tumor-nekrotizující faktor
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké denzitě
WP	mikrotitrační destička
24-, 96-WP	mikrotitrační destička s 24, 96 jamkami
WST-1	WST-1 test pro zjištění viability buněk

OBSAH

1. Úvod	13
2. Teoretická část	14
2.1 <i>Reaktivní radikály, volné radikály</i>	14
2.1.1 Superoxidový anion ~ superoxid	15
2.1.2 Hydroxylový radikál	15
2.1.3 Singletový kyslík	16
2.1.4 Peroxid vodíku	16
2.1.5 Ostatní ROS	16
2.1.6 Fyziologické působení ROS	17
2.1.7 Patofyziologické působení RFK	19
2.1.7.1 Lipoperoxidace	19
2.1.7.2 Poškození proteinů a DNA	20
2.2 <i>Antioxidanty</i>	21
2.2.1 Enzymová antioxidantia	22
2.2.2 Neenzymová antioxidantia	22
2.3 <i>Glutathion</i>	27
2.3.1 Struktura a funkce glutathionu	27
2.3.2 Antioxidační role glutathionu	28
2.3.3 Další funkce glutathionu	30
2.3.4 Metabolismus glutathionu a jeho syntéza	30
2.3.4.1 Glutathionreduktasa	31
2.3.4.2 Syntéza glutathionu	32
2.3.4.3 Metabolismus glutathionu	33
2.3.5 Kompartmentizace glutathionu	34
2.3.6 Metody stanovení glutathionu	36
2.3.6.1 HPLC metody	36
2.3.6.2 Spektrofotometrické metody	37
2.3.6.3 Spektrofluorimetrické metody	37
2.3.6.4 Porovnání metod analýzy glutathionu	38

2.4	<i>Biotransformace a detoxikace xenobiotik</i>	40
2.4.1	Játra – morfologie, funkce, význam	40
2.4.2	Základní mechanismy biotransformace xenobiotik	42
2.4.3	Role glutathionu při biotransformaci	45
2.5	<i>Acetaminofen a jeho hepatotoxické působení</i>	46
2.5.1	Metabolismus acetaminofenu	46
2.5.2	Toxické působení acetaminofenu	48
2.5.3	Role ROS v toxickém působení acetaminofenu	49
2.5.4	Ostatní mechanismy účastnící se toxicity acetaminofenu	51
2.5.5	Překvapivé nálezy při studiu toxicity acetaminofenu	52
3.	Cíle práce	54
4.	Experimentální část	55
4.1	<i>Seznam chemikálií použitých při stanoveních</i>	55
4.2	<i>Příprava roztoků</i>	56
4.3	<i>Přístroje a laboratorní pomůcky</i>	59
4.4	<i>Příprava biologického materiálu</i>	60
4.4.1	Pokusná zvířata	60
4.4.2	Izolace hepatocytů a její hodnocení	60
4.4.3	Kultivace potkaních hepatocytů	61
4.5	<i>Optimalizace fluorimetrického stanovení glutathionu</i>	63
4.5.1	Princip stanovení GSH a GSSG	63
4.5.2	Příprava standardů GSH a GSSG	63
4.5.3	Příprava vzorků (lyzáty hepatocytů)	64
4.5.4	Spektrofluorimetrické stanovení - postup	64
4.5.4.1	Instrumentace	65
4.5.4.2	Optimalizace metody – podmínky detekce	65
4.5.4.3	Stanovení analytických parametrů fluorimetrické metody	66
4.5.4.4	Korelace s HPLC/FL metodou	66

<i>4.6 Studium hepatotoxického účinku acetaminofenu</i>	68
4.6.1 Inkubace kultivovaných hepatocytů s acetaminofenem	68
4.6.2 Stanovení laktátdehydrogenasy	68
4.6.2.1 Princip stanovení	69
4.6.2.2 Provedení stanovení LDH	69
4.6.3 WST-1 test	69
4.6.3.1 Princip WST-1 testu	70
4.6.3.2 Postup při WST-1 testu	70
4.6.4 Syntéza albuminu	70
4.6.4.1 Princip stanovení syntézy albuminu	70
4.6.4.2 Postup stanovení syntézy albuminu (ELISA)	71
4.6.5 Stanovení koncentrace glutathionu	71
4.6.6 Stanovení intracelulární produkce ROS	71
4.6.6.1 Princip stanovení ROS pomocí DCFDA	72
4.6.6.2 Postup stanovení produkce ROS	72
4.6.7 Stanovení aktivity glutathionreduktasy	73
4.6.7.1 Princip stanovení aktivity GR	73
4.6.7.2 Postup stanovení aktivity GR	73
4.6.8 Stanovení proteinů	73
4.6.8.1 Princip stanovení proteinů	73
4.6.8.2 Postup stanovení proteinů	74
<i>4.7 Studium příčin inhibice glutathionreduktasy nalezené u AAP toxicity</i>	75
4.7.1 Příprava glutathionreduktasy	75
4.7.2 Produkce AAP-GSH konjugátu	75
4.7.3 Studium inhibice GR v přítomnosti AAP-GSH	76
<i>4.8 Statistická analýza</i>	76

5. Výsledky	77
5.1 <i>Optimalizace fluorimetrického stanovení glutathionu</i>	77
5.1.1 Optimalizace detekčních podmínek	77
5.1.2 Stanovení analytických parametrů	80
5.1.3 Korelace s HPLC/FL metodou	81
5.2 <i>Studium hepatotoxického účinku AAP in vitro</i>	82
5.2.1 Testování vlivu AAP na viabilitu buněk	82
5.2.2 Vliv AAP na funkční kapacitu hepatocytů	85
5.2.3 Vliv AAP na redox stav hepatocytů	85
5.2.2 Vliv AAP toxicity na aktivitu glutathionreduktasy	87
5.3 <i>Studium příčin inhibice glutathionreduktasy nalezené během charakterizace AAP toxicity</i>	88
5.3.1 Příprava AAP-GSH konjugátu	88
5.3.2 Vliv přítomnosti AAP-GSH na aktivitu GR	89
6. Diskuze	92
7. Závěr	108
8. Seznam literatury	109

1. Úvod

Hepatotoxický účinek určitých látek může být zapříčiněn mnoha způsoby. Nejčastěji se navíc na patologickém působení podílí hned několik mechanismů. Příkladem takového hepatotoxinu je i acetaminofen. Tato sloučenina a její toxický účinek jsou v současné době velmi intenzivně zkoumány. O to více je ale překvapující, že principiální mechanismus toxického působení acetaminofenu není do dnešního dne ještě do detailu poznán.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Reaktivní formy kyslíku, volné radikály

Definicí je radikál popsán jako: jakákoli chemická molekula (atom, ion), která ve své valenční sféře má jeden nebo více nepárových elektronů. Vznik radikálů je možný více způsoby, a to homolytickým štěpením kovalentní vazby v molekule (vznikají 2 radikály, z nichž každý si ponechá jeden elektron), adicí elektronu, anebo odtržením elektronu z valenční sféry.

Volný radikál je jakýkoli radikál schopný existence po jakkoli krátkou dobu. Společnou vlastností je přítomnost nepárového elektronu na atomu kyslíku. Do této skupiny patří hydroxylový radikál, alkylperoxylový radikál, alkoxylový radikál a superoxidový radikál (tab. I). Vedle těchto sloučenin se pod termín reaktivní formy kyslíku (ROS) zahrnují také elektroneutrální molekuly: kyselina chlorná, oxid dusnatý, singletový kyslík a ozón (Racek and Holeček 1999; Zima *et al.* 1996). Někdy jsou navíc z této skupiny samostatně vydělovány sloučeniny, které ve své struktuře obsahují atom dusíku – reaktivní formy dusíku (RNS), kam patří například oxid dusnatý nebo peroxynitrit.

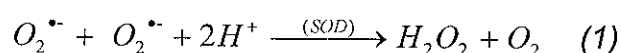
Chemické molekuly náležící mezi ROS jsou díky přítomnosti kyslíku a zároveň díky radikálové povaze velmi reaktivní. Svě nestability, způsobené výskytem nepárového elektronu ve valenční sféře, se volný radikál snaží zbavit doplněním elektronu. Toho docilují odtržením elektronu z nejrůznějších molekul.

Tab. I: Přehled reaktivních forem kyslíku (Zima *et al.* 1996)

Reaktivní formy kyslíku	Vzorec	Biol. Poločas
Hydroxylový radikál	•OH	10^{-9} s
Alkoxylový radikál	LO•	10^{-6} s
Singletový kyslík	$^1\text{O}_2$	10^{-5} s
Peroxylový radikál	LOO•	7 s
Oxid dusnatý	•NO	1-10 s
Semiquinonový radikál	Q•	dny
Peroxid vodíku	H_2O_2	dle aktivit enzymů
Superoxidový radikál	$\text{O}_2^{\bullet-}$	dle aktivity SOD

2.1.1 Superoxidový anion ~ Superoxid

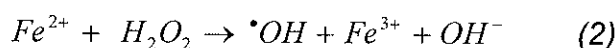
Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) vzniká z molekulárního kyslíku jednoelektronovou adicí. Produkce je hlavně zajištěna v mitochondriích během dýchacího řetězce a při fagocytóze. Další místo tvorby bylo zjištěno v endotelových buňkách. Jeho oxidační schopnost není příliš vysoká. Ve vodném prostředí dvě molekuly $O_2^{\bullet-}$ spontánně dismutují za vzniku O_2 a H_2O_2 . Tato reakce může být ale také katalyzována specifickým enzymem, superoxidodismutasou (SOD) (1), za jejíž přítomnosti je dismutace urychlena nejméně tisícinásobně. Význam $O_2^{\bullet-}$ je tedy hlavně v umožnění produkce dalších ROS (Gutteridge 1995; Halliwell and Gutteridge 2007).



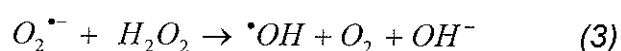
2.1.2 Hydroxylový radikál

Tento radikál je ze všech ROS nejvíce reaktivní a v důsledku toho je i jeho poločas reakce v porovnání s ostatními kyslíkovými radikály velmi krátký. Jeho vysoká oxidační schopnost má za následek reakce s nejrůznějšími biologickými molekulami, jako jsou nukleové kyseliny, proteiny, lipidy, sacharidy.

Hydroxylový radikál ($\bullet OH$) může vznikat mnoha způsoby. Nejznámějšími jsou působení γ -záření na molekuly vody a dále pak tzv. Fentonova reakce (2). Při ní dochází ke vzniku $\bullet OH$ po reakci dvojmocného železa s peroxidem vodíku.



Další možností vzniku hydroxylového radikálu v lidském organismu je Haber-Weissova reakce (3), kdy $\bullet OH$ vzniká po vzájemné reakci peroxidu vodíku a superoxidového radikálu (Gutteridge 1995; Zima *et al.* 1996).



2.1.3 Singletový kyslík

Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) je excitovaná forma molekulárního kyslíku (O_2). Molekulární kyslík má třetí největší elektronegativitu ze všech prvků, a proto by měl být mnohem více reaktivní, než je tomu ve skutečnosti. Jeho schopnost reagovat je částečně blokována díky výskytu dvou nepárových elektronů v molekule, které nabývají stejných spinových kvantových čísel. Pokud ovšem je tato spinová restrikce porušena, a spiny se stávají opačnými, reaktivita kyslíku se zvyšuje. Tak je tomu právě u excitované formy $^1\text{O}_2$ (Gutteridge 1995).

2.1.4 Peroxid vodíku

Jakmile jakákoli buňka produkuje superoxidové radikály, díky jejich dismutaci (1) je zároveň zdrojem další ROS, a to peroxidu vodíku (H_2O_2). Kromě toho H_2O_2 vzniká také pomocí různých enzymů (glukózaoxidasa, urát oxidasa). H_2O_2 je velmi stabilní a v nepřítomnosti kovových iontů i málo reaktivní. Díky své stabilitě a dobré rozpustnosti v tucích snadno opouští místo svého vzniku, difunduje membránami a putuje dále mezibuněčným prostorem (Gutteridge 1995; Halliwell and Gutteridge 2007). Jeho hlavní význam tedy nespočívá ve vlastní škodlivosti, ale v tom, že podporuje tvorbu dalších, vysoce reaktivních kyslíkových radikálů (2) (3).

2.1.5 Ostatní ROS

Peroxylové ($\text{LOO}\bullet$) a alkoxylové radikály ($\text{LO}\bullet$) vznikají hlavně při lipoperoxidaci způsobené ostatními volnými radikály.

Oxid dusnatý ($\bullet\text{NO}$) je silně lipofilní látka. Jeho důležitou fyziologickou funkcí v organismu je účast na regulaci cévního tonu. Z patofyziologického působení je důležité uvolnění kovových iontů z vazby na proteiny v přítomnosti $\bullet\text{NO}$, což umožňuje tvorbu dalších ROS (Halliwell and Gutteridge 2007). Další reaktivní formou kyslíku s přítomností dusíku v molekule je oxid dusičitý ($\bullet\text{NO}_2$).

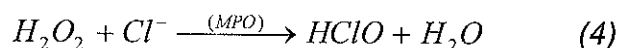
Ozón (O_3) je velmi silný oxidant, který je pro organismus velmi škodlivý, přičemž dokáže poškozovat veškeré biomolekuly v těle.

2.1.6 Fyziologické působení ROS

ROS hrají důležitou a nezastupitelnou roli v mnoha fyziologických pochodech v organismu. Účastní se nejrůznějších dějů, např. regulace cévního tonu, fagocytózy, metabolismu prostaglandinů a leukotrienů, a dále pak se podílejí na oplození vajíčka či při reakcích závislých na cytochromu P450.

Vazoaktivní působení ROS je hlavně zajištěno produkcí •NO. Tato látka způsobuje relaxaci hladké svaloviny cév díky aktivaci guanylátcyklasy. Oxid dusnatý vzniká v buňkách při přeměně L-argininu na L-citrulin, která je zajišťována specifickým enzymem - NO-synthasou (NOS). V těle se vyskytují celkem tři druhy NOS: indukibilní NOS (iNOS), endoteliální NOS (eNOS), neuronová NOS (nNOS), jejichž názvy jsou odvozeny od hlavního místa vzniku. nNOS a eNOS se zahrnují mezi NO-synthasy konstitutivní se stálou produkcí •NO, jehož vytvářené množství je stejné za všech podmínek. Naproti tomu iNOS tvoří •NO až po stimulaci určitými faktory. V ovlivňování cévního tonu ROS se také uplatňují superoxidové radikály tvořené endotelem, jež inhibují účinek NO• (Bast *et al.* 1991; Halliwell and Gutteridge 2007; Racek and Holeček 1999).

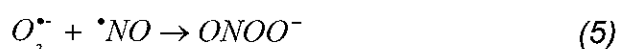
Další velmi důležitou roli hrají ROS při imunitních reakcích, a to obzvláště při fagocytóze. Zde se uplatňuje celá škála sloučenin, mezi něž patří: •OH, O₂^{•-}, •NO, HClO, H₂O₂. Pro produkci většiny těchto ROS je zapotřebí aktivace imunitních buněk (neutrofilních granulocytů, makrofágů). Po aktivaci je například produkována kyselina chlorná. Tato látka se silnými oxidačními účinky je syntetizována z chloridových iontů a peroxidu vodíku v přítomnosti enzymu myeloperoxidasy (MPO) v cytoplasmě daných buněk (4).



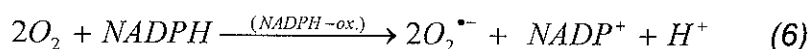
MPO je metaloprotein se čtyřmi navázanými hemovými skupinami a je přítomna v azurofilních granulech neutrofilů a lyzozomech makrofágů. Vedle přímého baktericidního a fungicidního účinku se HClO také účastní tvorby dalších vysoce reaktivních ROS, které jsou taktéž baktericidní. Takto vzniká v imunitních buňkách například •OH nebo singletový kyslík.

Kromě reakcí spojených s HClO se na fagocytóze podílí také •NO. Při imunitních reakcích má hlavní význam indukibilní forma NOS. iNOS

se vyskytuje v největší míře v makrofázích. Produkce •NO je umožněna aktivací imunitních buněk nejrůznějšími zánětlivými faktory (TNF- α , IFN- γ , IL-1) a iNOS-syntetizované množství •NO je v porovnání s oběma konstitutivními NO-synthasami až tisícinásobné. Kromě přímého baktericidního účinku se •NO podílí společně se superoxidovými radikály na vzniku dalších ROS, peroxynitritů (ONOO⁻) (5). Tyto sloučeniny způsobují opět silné oxidační poškození pohlcených mikroorganismů a mimoto se rozkládají za vzniku •OH a •NO₂ (Bast *et al.* 1991; Racek and Holeček 1999).



Při fagocytóze hraje důležitou roli také produkce superoxidových radikálů, která je zajištěna hlavně enzymem NADPH-oxidasou. Tento enzym vedle NOS patří k hlavním producentům ROS. Katalyzuje vznik O₂^{•-}, a to jednoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku (6)



Exprese NADPH-oxidasy byla zjištěna u neutrofilů, makrofágů, monocytů a B-lymfocytů (Racek and Holeček 1999). V klidovém stavu buňky je enzym inaktivní a ke stimulaci dochází po aktivaci buňky mnoha podněty (TNF- α , IFN- γ , komplement). Vlastní O₂^{•-} jsou málo reaktivní, ale jejich hlavní význam spočívá v účasti na následných reakcích, které vyúsťují v produkci vysoce reaktivních ROS (HClO, H₂O₂, •OH, ONOO⁻) (1) (3) (5).

Kromě již zmiňovaných enzymů mezi důležité producenty ROS patří také xanthinoxidasa. Tento enzym se účastní metabolismu purinových bazí, kdy napomáhá přeměně hypoxanthinu na xanthin, resp. xanthinu na kyselinu močovou. Složením je to flavoprotein obsahující přechodné kovy molybden a železo, a proto je schopen předávat elektrony na molekulární kyslík, čímž vznikají H₂O₂ nebo O₂^{•-} (Halliwell and Gutteridge 2007).

Vazbou volných radikálů a iontů železa je zajištěna funkce cytochromu P450 jakožto oxidační jednotky pro endogenní i exogenní látky. V několika krocích zde dochází k přenosu O₂ ze vzniklých peroxidů na metabolizovanou

molekulu, peroxidy jsou odbourávány a daná molekula je oxidována (Bast *et al.* 1991; Yasui *et al.* 2005).

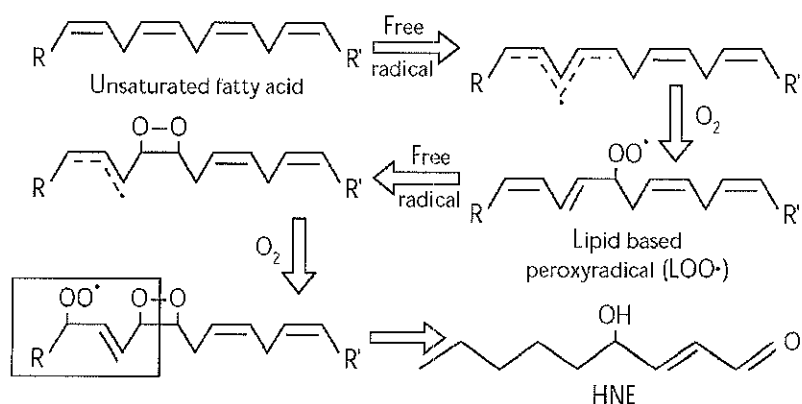
2.1.7 Patofyziologické působení ROS

2.1.7.1 Lipoperoxidace

K účinku volných radikálů jsou nejvíce citlivé mastné kyseliny, a to především polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). PUFA se vyskytují jako neesterifikované v buněčných membránách, a dále pak vázané ve fosfolipidech.

Nejvíce reaktivní ve vztahu k PUFA se jeví hydroxylový radikál. Ten díky své vysoké oxidační schopnosti napadá lipidový řetězec a z $-CH_2-$ skupiny odštěpí jeden vodík. Tímto se vytvoří radikál $-C^*H-$, jenž vykazuje taktéž vysokou reaktivitu. Proto dále reaguje s O_2 za vzniku peroxylového radikálu, který ihned napadá další řetězec PUFA, odnímá z něho další atom vodíku, a tímto kromě hydroperoxidu vzniká další uhlíkový radikál (obr. 1). Jeden jediný iniciační radikál ($\bullet OH$) tak může způsobit pomocí řetězové reakce poškození až několika tisíc řetězců PUFA. Takto pak vznikají velká množství hydroperoxidů, jež slouží jako substrát pro následné reakce, jako je např. vznik toxických aldehydů, mezi které patří malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Gutteridge 1995; Halliwell and Gutteridge 2007).

Veškeré sloučeniny vytvářené během lipoperoxidace (hydroperoxidy, lipoperoxidy, cytotoxické aldehydy) jsou příčinou poškození struktur buněčných membrán, bílkovin a membránově vázaných enzymů. Následkem toho dochází k poruchám homeostázy a metabolismu buněk.



Obr. 1: Mechanismus lipoperoxidace PUFA (Halliwell and Gutteridge 2007)

Kromě mastných kyselin reagují ROS také s cholesterolem, kdy po vzájemné reakci vznikají oxysteroly, peroxidy, hydroperoxidy a epoxidy cholesterolu. Tyto látky mají podobný účinek jako produkty peroxidace mastných kyselin, neboť působí na buněčné membrány a enzymové komplexy. Následkem toho se projevuje jejich cytotoxicita, mutagenita, kancerogenita či aterogenicita (Smith and Johnson 1989; Soška 1993).

Mezi oxysteroly patří hydroperoxycholesteroly, ketocholesteroly a hydroxycholesteroly. V časných fázích lipoperoxidace nejprve vznikají hydroxycholesteroly a 7-hydroxyperoxycholesteroly, které mohou být dále přeměňovány na 7-ketocholesteroly (Brown *et al.* 1997; Koelsch *et al.* 2000).

2.1.7.2 Poškození proteinů a DNA

Proteiny jsou napadány volnými radikály ($\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$), které způsobují jejich fragmentaci, agregaci, zesíťování a tím i změnu jejich vlastností a následně i funkcí, jež zajišťují. ROS napadají postranní řetězce aminokyselin (nejčastěji tryptofan, methionin, cystein), které jsou poté oxidovány. Vedle kyslíkových forem volných radikálů však mohou s bílkovinami reagovat i reaktivní formy dusíku, peroxyinitridy, které zřetězené aminokyseliny, např. tryptofan, fenylalanin, tyrosin, nitrují (Jensen 2003). Narozdí od lipoperoxidace však při oxidaci proteinů nedochází k produkci dalších volných radikálů, které by spouštěly následné reakční kaskády.

Kromě volných radikálů mohou s bílkovinami reagovat také peroxidy, hydroperoxidy a toxické aldehydy produkované při lipoperoxidaci – MDA, 4-HNE. Působením těchto látek vznikají po reakci s danými typy aminokyselin další karbonylové sloučeniny na bočních řetězcích s amino- a sulfhydrylovými skupinami (Hallivell *et al.* 1992). Vedle toho mohou karbonyly také vznikat neenzymovou glykací proteinů.

Dalšími molekulami, které jsou poškozovány účinkem volných radikálů jsou nukleové kyseliny. Z reaktivních forem kyslíku je s DNA schopen reagovat nejčastěji pouze $\bullet\text{OH}$, který napadá sacharidovou kostru řetězce DNA a způsobuje její fragmentaci. $\bullet\text{OH}$ může poškozovat jak jadernou, tak mitochondriální DNA. Druhým mechanismem, kterým $\bullet\text{OH}$ působí na nukleové kyseliny, je přímá oxidace jednotlivých bází. Takto vznikají nové

nukleotidy, např. 8-hydroxyguanin, 8-oxy-7,8-dihydro-2-deoxyguanosin, aj. Ty mohou přímo poškozovat řetězec DNA, anebo některé, díky své schopnosti spárovat se s jinými nukleotidy, způsobují mutace (Loft and Poulsen 1996; Štípek and kol. 2000). Reparační mechanismy nukleových kyselin jsou schopny tyto oxidované báze za určitých podmínek rozpoznat a vyštěpit, a díky tomu je možné tyto markery poškození DNA analyzovat. Důsledkem mutací a fragmentací DNA je mutageneze, kancerogeneze, či apoptóza.

2.2 Antioxidanty

Obecně lze antioxidanty rozdělit do několika skupin dle jejich chemických vlastností, či funkce (tab. II). Časté dělení antioxidantů je na hydrofilní a lipofilní, extra- a intracelulární, a dále také dle jejich povahy na enzymové a neenzymové. Mezi nejvýznamnější antioxidační enzymy patří superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa a katalasa. Do druhé skupiny látek s neenzymovými vlastnostmi patří například kyselina močová, glutathion, thioly, transferin, ceruloplasmin a antioxidační vitaminy.

Tab. II: Přehled antioxidantů

Proteinové antioxidanty	Neproteinové antioxidanty
superoxiddismutasa	α , γ – tokoferol
glutathionperoxidasa	vitamin C
katalasa	glutathion
glutathion-S-transferasa	kyselina močová
thioredoxin	β -karoten
peroxiredoxiny	flavonoidy
transferin, feritin	koenzym Q ₁₀
albumin, ceruloplasmin	bilirubin

2.2.1 Enzymová antioxidantia

Základní úlohou superoxiddismutasy je katalýza dismutace superoxidových radikálů za vzniku peroxidu vodíku (1). Celkem jsou známy tři izoenzymy SOD: Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD. U člověka se SOD vyskytuje ve všech buňkách těla, nejvyšší koncentrace byla zjištěna v játrech. V buňce se SOD vyskytuje v mitochondriích (Mn-SOD) a v buněčném cytosolu (Cu,Zn-SOD). Proto lze nalezení Mn-SOD v plasmě považovat za indikátor poškození mitochondrií, např. u infarktu myokardu (Cord 2000; Zima *et al.* 1996).

V lidském těle se vyskytuje jediný metaloprotein, který obsahuje ve své struktuře atomy Se. Je to enzym glutathionperoxidasa, která se v buňkách nalézá, stejně jako SOD, v cytosolu a mitochondriích. Její hlavní funkcí je ochrana polynenasycených mastných kyselin před oxidací díky rozkladu peroxidů a organických hydroperoxidů za současné oxidace glutathionu (viz níže) (Bast *et al.* 1991; Halliwell and Gutteridge 2007; Holeček and Racek 1994).

Katalasa obsahuje ve své struktuře hemovou skupinu, pomocí které je schopná katalyzovat přeměnu dvou molekul H_2O_2 za vzniku vody a kyslíku. Místem vzniku a účinku katalasy v buňce jsou peroxisomy (Bast *et al.* 1991; Holeček and Racek 1994).

2.2.2 Neenzymová antioxidantia

Kyselina močová je schopná zhaset velmi reaktivní $\bullet OH$ a 1O_2 . Kromě toho také váže ionty železa a mědi, čímž zabraňuje amplifikaci produkce dalších ROS.

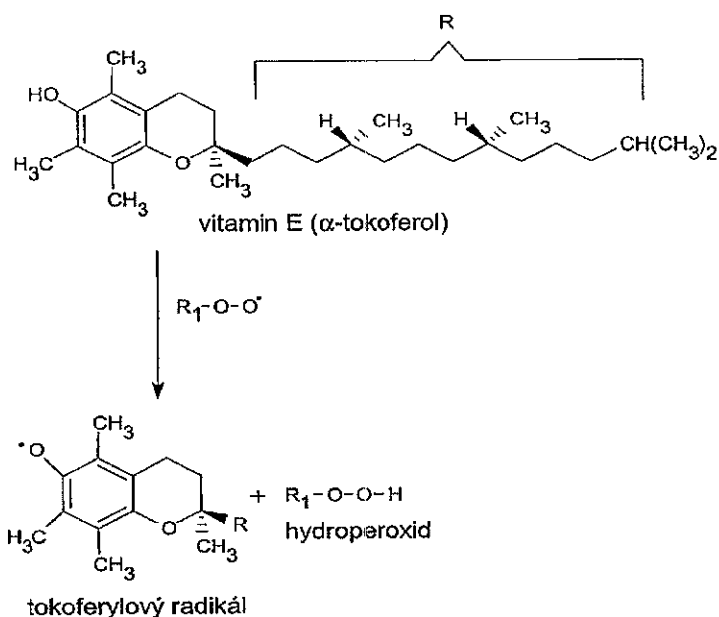
Díky vazbě iontů kovů lze za antioxidanty považovat i plasmatické proteiny ceruloplasmin (váže 6 atomů Cu) a transferin (váže 2 atomy Fe). Ceruloplasmin navíc pomáhá oxidovat Fe^{2+} na Fe^{3+} (Bast *et al.* 1991).

Jako scavenger působí i další plasmatický protein, albumin, který váže Cu^+ ionty. Jejich reakcí s peroxidem vodíku vznikají $\bullet OH$, které ovšem hned reagují s albuminem, jímž jsou zhaseny. Díky své vysoké koncentraci v krvi je albumin považován za jeden z nejdůležitějších extracelulárních antioxidantů.

Na antioxidační ochraně organismu se velkou měrou podílejí vitaminy. Lze je rozdělit dle několika hledisek; nejčastěji se používá dělení na vitaminy lipofilní – membránové (karotenoidy, vitamin E) a hydrofilní (vitamin C).

Pod pojem vitamin E se zahrnuje skupina lipofilních látek, tokoferolů, jež se od sebe odlišují odchylkami ve struktuře. Patří sem α -, β -, γ -, δ - tokoferol, z nichž nejvýznamnějším antioxidantem je α -tokoferol. α -tokoferol je hlavní lipofilní antioxidační látka, v krvi se vyskytuje vázána v LDL a VLDL částicích. Tímto způsobem je také umožněn jeho transport. Zásobárnou α -tokoferolu v těle jsou játra.

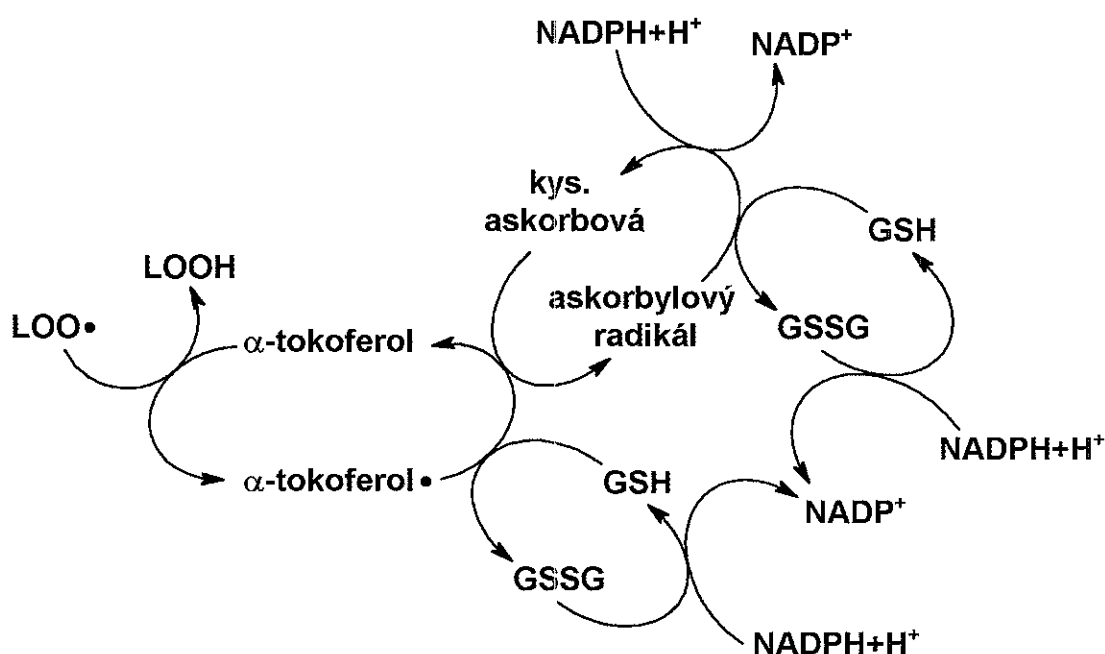
α -tokoferol reaguje s hydroxylovými, peroxylovými a alkoxylovými radikály a také s $^1\text{O}_2$. Po reakci s volným radikálem (např. alkoxylový radikál) vzniká z α -tokoferolu tokoferylový fenoxylradikál, v němž je nepárový elektron vázán na kyslíku (obr. 2). Stabilita tokoferylového radikálu je vyšší než u jakéhokoli volného radikálu, s kterým reaguje, a dosahuje až několika hodin (McCay and 1985). Vzniklý tokoferylový radikál je nutné regenerovat, jinak by byly zásoby α -tokoferolu rychle vyčerpány. Regenerace je zajištěna reakcí na rozhraní lipofilní a vodné fáze pomocí kyseliny askorbové nebo glutathionu (obr. 3) (Halliwell and Gutteridge 2007).



Obr. 2: Vznik tokoferylového radikálu (Štípek and kol. 2000)

Hlavní funkcí α -tokoferolu je ochrana PUFA v buněčných membránách. Poměr mezi množstvím PUFA a α -tokoferolu je 220 mol PUFA : 1 mol α -tokoferolu (Holeček and Racek 1994). Jeho lipofilita a tím i možnost být vázán v membráně je zajištěna přítomností postranního řetězce (McCay and 1985).

Antioxidační ochrana α -tokoferolu hlavně spočívá v zábraně rozvoje lipoperoxidační kaskády (Kerr *et al.* 1996), kdy přeměňuje alkylperoxylové radikály na hydroperoxydy, s kterými následně reaguje glutathionperoxidasa. Ochrannou funkci také plní v cytochromu P450.



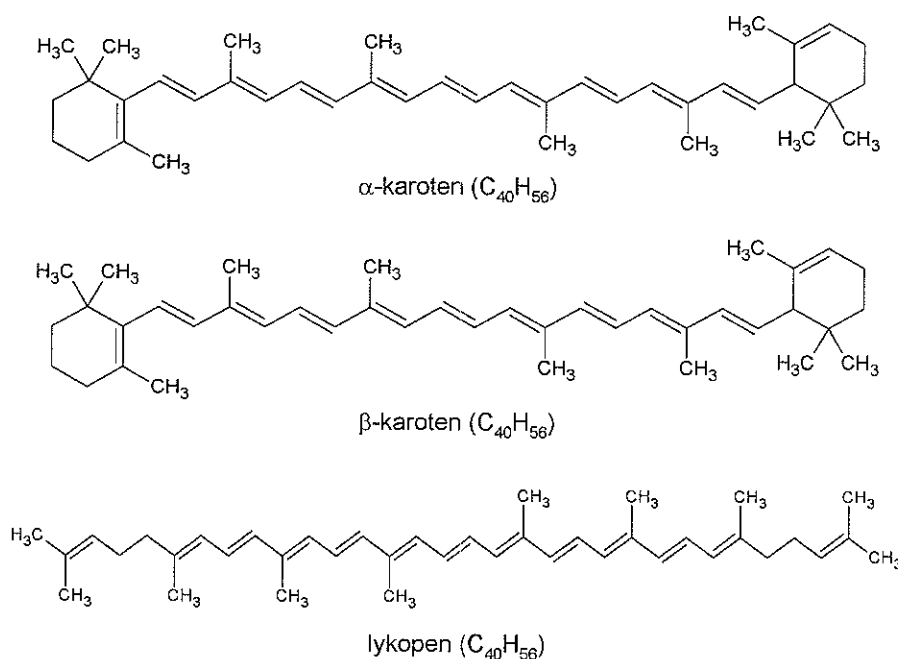
Obr. 3: Regenerace antioxidačních vitaminů

Další skupinu antioxidačních vitaminů tvoří karotenoidy, kam patří více než 600 do dnešní doby poznanych sloučenin. Z hlediska významu pro člověka jsou nejdůležitější α -, β -karoten, lykopen, zeaxanthin a lutein. Ty se dají dále rozdělit dle provitaminové aktivity, kterou disponují (α -, β -karoten), resp. nedisponují (lykopen).

Obecně lze karotenoidy popsat jako látky s řetězcem tvořeným dvěma polovinami s 20 uhlíky v každé části, jenž obsahuje různý počet konjugovaných vazeb (Stahl and Sies 1996). Karotenoidy působí jako antioxidační látky hlavně v lipofilním prostředí, a to i za nízkého parciálního tlaku kyslíku.

Nejvýznamnějšími z nich jsou β -karoten a lykopen (Holeček and Racek 1994) (obr. 4).

β -karoten, jako každý člen skupiny karotenoidů, zřáhá singletový kyslík. Dále pak je schopen reagovat s peroxylovými radikály a hydroxylovým radikálem (Halliwell and Gutteridge 2007; Stahl and Sies 1996).

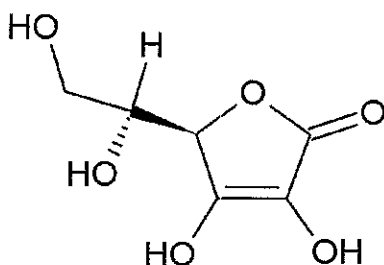


Obr. 4: Přehled vybraných karotenoidů

Nejvýznamnějším hydrofilním vitamínem je vitamin C, který se v buňkách nalézá ve 2 formách: oxidované – kyselina dehydroaskorbová (DHAA) a redukováné – kyselina askorbová (AA) (obr. 5). Obě tyto sloučeniny vykazují vitamínovou aktivitu. DHAA je oproti AA v těle relativně nestabilní, protože může podléhat nevratným reakcím. V buňkách se vyskytuje hlavně AA, DHAA je za fyziologických podmínek ihned redukována zpět na AA (Racek *et al.* 2000).

Kyselina askorbová hraje v těle důležitou a nezastupitelnou roli v mnoha procesech. Jedná se o hydroxylační biosyntetické reakce, např. syntéza hydroxyprolinu, prokolagenu, karnitinu, noradrenalinu, nebo účast na metabolismu cholesterolu. Vedle toho je tento vitamin důležitým antioxidantem (Racek *et al.* 2000; Štípek and kol. 2000; Zima *et al.* 1996).

Během evoluce primátů tato vývojová větev savců ztratila schopnost biosyntézy AA z důvodu poškození genu pro L-gulonolaktonoxidasu. Proto se zvýšila oxidační zátěž pro lidské buňky a docházelo ke zvýšení incidence mutací. Role AA jako antioxidantu je nezastupitelná, a proto musí být pro zajištění dostatečné hladiny v krvi přijímána potravou.



Obr. 5: Kyselina askorbová

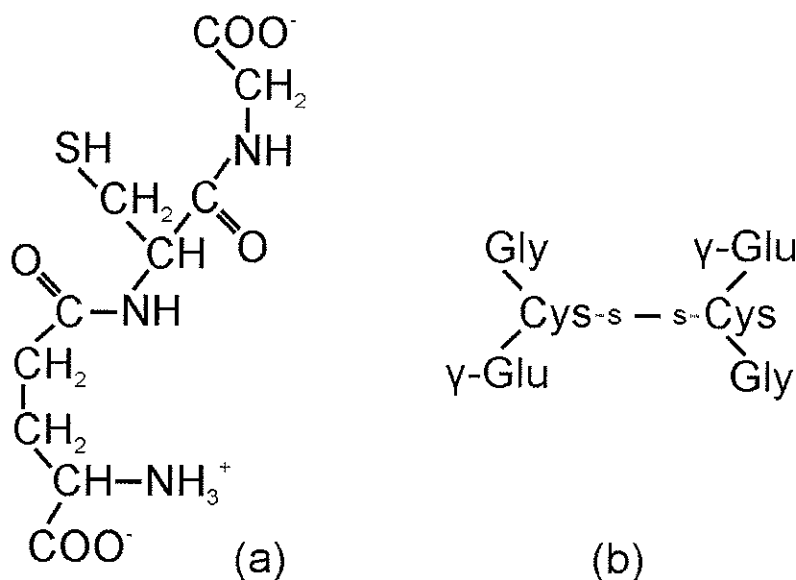
AA působí jako scavenger $O_2^{\bullet-}$, 1O_2 , $\bullet OH$, peroxylových radikálů. Dále je schopná reagovat i s HClO. S těmito ROS reaguje díky své hydrofilitě ve vodném prostředí, v cytosolu. Se superoxidem dává vzniknout peroxidu vodíku a hydroxylový radikál redukuje na vodu. Kromě těchto přímých antioxidačních mechanismů AA také zajišťuje regeneraci tokoferolového radikálu (obr. 5). Ta je uskutečňována na rozhraní lipofilní a hydrofilní fáze, kdy opět vzniká α -tokoferol a oxidovaný askorbylový radikál. Ten může být regenerován účinkem GSH či flavonoidů, nebo podléhá dismutaci za vzniku DHAA a AA (Racek *et al.* 2000; Štípek and kol. 2000).

2.3 Glutathion

2.3.1 Struktura a funkce glutathionu

Glutathion je tripeptid složený celkem ze tří aminokyselin, je to γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin. Tato látka je díky vysokým intracelulárním hladinám (1-10 mmol/l) hlavním nitrobuňčným nebílkovinným 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 (obr. 6) – redukované (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 i účastní detoxikačních reakcí, tvorby prostanooidů, regulace buněčného cyklu a celkové redox rovnováhy, či je jeho role nezastupitelná v metabolismu cysteinu.



Obr. 6: Chemická struktura glutathionu.

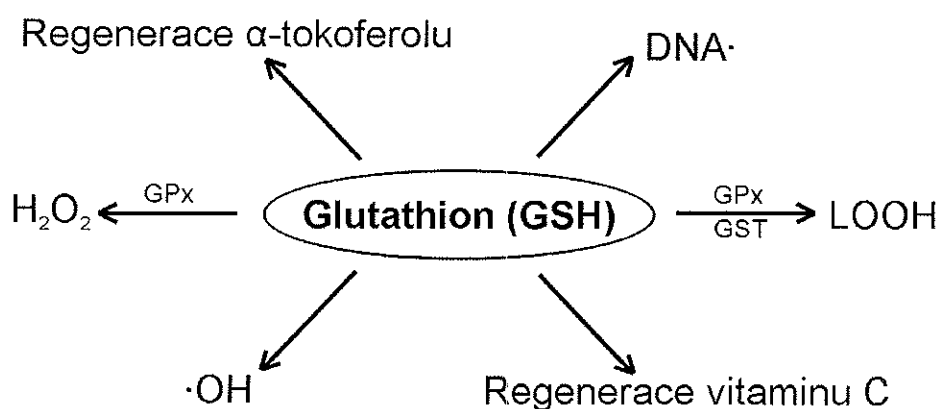
(a) GSH, redukována forma glutathionu; (b) GSSG, oxidovaná forma glutathionu

Funkce glutathionu se odvíjí od jeho jedinečné struktury. Díky přítomnosti cysteinu a jeho -SH skupiny je redukovaný glutathion schopen se oxidovat na disulfidickou formu GSSG, což je hlavně využíváno při antioxidačních pochodech. Druhou důležitou vlastností jeho molekuly je přítomnost γ -glutamylvé vazby. Tato vazba, která je velmi neobvyklá, chrání glutathion před naštěpením všudypřítomnými peptidasami buňky; jediným enzymem, který je schopen specifického štěpení glutathionu, je γ -glutamyltranspeptidasa. Koncový glycin navíc chrání glutathion před působením γ -glutamylcyklotransferasy (Lu 1999).

2.3.2 Antioxidační role glutathionu

V buňce je poměr mezi koncentracemi redukované, GSH, a oxidované, GSSG, formy glutathionu pečlivě regulován a za fyziologického stavu je vyšší než 100:1. Poměr koncentrací se ale za patologických stavů může zcela zásadně měnit ve prospěch GSSG, a proto je tento poměr velmi důležitým parametrem používaným k posouzení oxidačního stavu buňky.

Glutathion je jedním z nejdůležitějších hydrofilních intracelulárních antioxidantů. Jeho antioxidační funkce spočívá buď v schopnosti přímé reakce s ROS (např. s hydroxylovým radikálem, peroxylovými a alkoxylovými radikály, aj.), anebo je využíván jako substrát při reakcích katalyzovaných glutathion-dependentními enzymy. Další funkcí je také schopnost zpětně redukovat oxidovanou DNA, stejně jako regenerovat ostatní látky antioxidačního systému (obr. 7) (Halliwell and Gutteridge 2007).



Obr. 7: Antioxidační působení glutathionu
 ($\cdot OH$, hydroxylový radikál; $LOOH$, lipoperoxidy; $DNA\cdot$, DNA radikál;
 GPx, glutathionperoxidasa; GST, glutathion-S-transferasa)

Velmi důležitými antioxidantními enzymy, které ke své činnosti využívají glutathion, jsou glutathionperoxidasy (GPx). Tyto enzymy, jako jediné biomolekuly v lidském těle, obsahují ve své struktuře atom selenu. Rozdělují se do několika skupin a jejich hlavní funkcí je redukce různorodých toxických látek, např.: alkoxylových radikálů, lipoperoxidů či hydroperoxidů cholesterolu na organické alkoholy, za současné oxidace GSH na GSSG. Vedle toho jsou také některé typy Se-dependentních glutathionperoxidas schopny reakce s peroxidem vodíku.

V současné době jsou známy celkem čtyři typy Se-dependentních glutathionperoxidas, které se odlišují svojí funkcí, tkáňovou lokalizací a strukturou (Williams *et al.* 1998). Nejdéle známá glutathionperoxidasa, GPx-1, je tetramerní protein, který zabezpečuje detoxikaci jak organických hydroperoxidů, tak i peroxidu vodíku. Tato peroxidasa je přítomna ve většině tkání narozdíl od GPx-2, jejíž exprese je lokalizována pouze v buňkách gastrointestinálního traktu a jater. Glutathionperoxidasa-3 (GPx-3) je, stejně jako GPx-1, tetramerním glykoproteinem, který je ale sekretován do tělních tekutin. Tento enzym je schopný redukovat organické hydroperoxydy a zároveň i peroxid vodíku. Protože ale GPx-3 ke své funkci potřebuje sloučeninu poskytující elektrony, a koncentrace GSH, který slouží jako typický donor elektronů ostatních glutathionperoxidas, jsou v extracelulárním prostředí velmi nízké, je tento enzym schopný oxidovat i jiné molekuly, např. thioredoxin. Posledním typem glutathionperoxidasy je GPx-4, což je unikátní monomerní membránový enzym schopný redukce fosfolipidových peroxidů a ostatních hydroperoxidů s výjimkou peroxidu vodíku (Sharma *et al.* 2004; Yang *et al.* 2001).

Na antioxidantní ochraně se kromě Se-dependentních glutathionperoxidas účastní i další enzymy, a to glutathion-S-transferasy. Tyto enzymy se podílejí především na konjugačních reakcích během biotransformace xenobiotik. Kromě toho jsou ale díky schopnosti detoxikace organických lipoperoxidů také důležité při antioxidantních pochodech v buňkách. Protože ale neobsahují atom selenu, je tato aktivita nazývána Se-independentní (Yang *et al.* 2001).

Velmi významnou rolí glutathionu je také účast na regeneraci antioxidantních vitaminů (obr. 5). S ohledem na jeho hydrofilní povahu je

schopen regenerovat α -tokoferol a kyselinu askorbovou (Meister 1994). Ze všech výše popsaných údajů je více než patrné, že glutathion má zcela nezastupitelné místo v antioxidačním systému.

2.3.3 Další funkce glutathionu

Kromě role glutathionu v antioxidačním systému je tento tripeptid důležitý i v dalších ohledech. Cystein je pro buňky velmi významná aminokyselina, která ale nemůže být krví přenášena ve volné podobě, protože je tato forma pro buňky toxická. Cystein totiž ve vodném prostředí poměrně rychle autooxiduje na cystin, což může být spojeno i s tvorbou volných radikálů (Lu 1999). Proto je hlavní transportní formou a zásobárnou cysteinu glutathion. V buňce je potom po rozštěpení z glutathionu uvolněn cystein, který je dle potřeby začleněn opět do glutathionu, proteinů, nebo je dále degradován.

Glutathion se podílí také na regulaci aktivity nejrůznějších proteinů pomocí tzv. glutathionylace (Pastore *et al.* 2003). Díky své schopnosti vázat se na -SH skupinu bílkovin s nimi tvoří glutathionylované proteiny, čímž je chrání proti možné oxidaci během oxidačního stresu, popř. tak mění jejich aktivitu (Sies 1999).

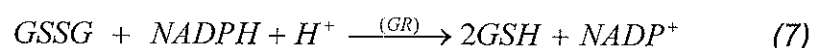
2.3.4 Metabolismus glutathionu a jeho syntéza

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. Velký význam má pro plicní a ledvinné buňky, které jsou největšími konzumenty plasmatického GSH (Akerboom and Sies 1989).

Při udržování intracelulární hladiny redukovaného glutathionu se uplatňují dva typy pochodů – ke zvýšení hladin redukované formy GSH přispívá syntéza *de novo* a kromě toho také zpětná redukce oxidované formy pomocí glutathionreduktasy.

2.3.4.1 Glutathionreduktasa

Stejně jako thioredoxinreduktasa a lipoamiddehydrogenasa patří i glutathionreduktasa (GR) do skupiny dimerických flavoenzymů, které katalyzují přenos dvou elektronů díky přítomnosti flavinadeninukleotidu (FAD) ve své struktuře (Williams *et al.* 2000). Glutathionreduktasa ($M_r = 104$ kDa) se skládá ze dvou identických podjednotek, na nichž jsou umístěna vazebná místa jak pro NADPH, tak pro GSSG (obr. 8). Její hlavní funkcí je tedy zpětná redukce GSSG na GSH za přítomnosti NADPH (7). Vlastní redukce je zajištěna přítomností FAD kruhu, který je umístěn v centru podjednotky v blízkosti vazebných míst pro GSSG a NADPH (Meister and Anderson 1983). Celou posloupnost kroků zpětné redukce GSSG na GSH lze rozdělit na dvě části.



V první fázi vede zachycení NADPH ve struktuře glutathionreduktasy pomocí specifického místa, které je tvořeno aminokyselinami Lys66 a Glu201, k redukci FAD vázaného glutathionreduktasou na $FADH_2$. Glutathionreduktasa obsahuje ve své struktuře aktivní disulfidické místo tvořené dvěma molekulami cysteinu – Cys58 a Cys63. Toto aktivní místo je v klidovém stavu oxidované, neboli oba dva cysteiny jsou vzájemně propojeny disulfidickým můstkem. Jakmile je ale flavinadeninukleotid redukován pomocí NADPH, dojde ihned k transferu elektronů z $FADH_2$ na Cys58-Cys63. Tím vzniká stabilní redukováná forma enzymu se dvěma volnými cysteinovými zbytky, přičemž Cys63 zůstává dále svázaný s oxidovaným FAD. Naproti tomu volnou -SH skupinou disponuje Cys58, který se tak stává nukleofilem a zodpovídá za iniciaci vlastní redukce GSSG v druhé části reakce. V ní se velmi reaktivní Cys58 váže na GSSG, z něhož se uvolní jedna molekula GSH. Zbytek zůstává vázaný na Cys58 ve formě smíšeného disulfidu. Následně Cys63 reaguje s Cys58, vzniká opět disulfidický můstek a navíc je uvolněna druhá molekula redukové formy glutathionu (Vander Jagt *et al.* 1997).



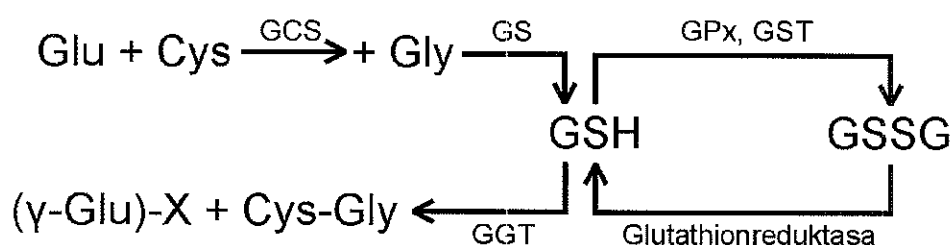
Obr. 8: 3D struktura glutathionreduktasy (Wikipedia)

2.3.4.2 Syntéza glutathionu

Syntéza glutathionu sestává ze dvou následných, na ATP-závislých reakcí; první je zakončena vznikem γ -glutamylcysteinu, a při druhé již vzniká molekula glutathionu (obr. 9). Pro vznik molekuly γ -glutamylcysteinu je za současné spotřeby jedné molekuly ATP nutná reakce mezi cysteinem a glutamovou kyselinou, která je regulována pomocí enzymu γ -glutamylcysteinsynthetasy (GCS). Tento enzym, nazývaný také γ -glutamylcysteinligasa, o molekulové hmotnosti 104 kDa je heterodimerem dvou podjednotek propojených disulfidickým můstkem. První z podjednotek je těžká, GCS_h ($M_r = 73$ kDa) a zajišťuje jak katalytickou aktivitu, tak i zpětnou inhibici produkce γ -glutamylcysteinu díky přítomnosti vazebného místa pro GSH. Naproti tomu druhá, lehká podjednotka γ -glutamylcysteinsynthetasy,

GCSI ($M_r = 31$ kDa), reguluje aktivitu vlastního holoenzymu vazbou glutamové kyseliny. Zpětná regulace GCS glutathionem probíhá tak, že GSH redukuje disulfidovou vazbu mezi podjednotkami vedoucí ke konformačním změnám a následnému zvýšení afinity pro vazbu glutathionu namísto glutamátu (Meister and Anderson 1983; Wu *et al.* 2004).

Po vzniku γ -glutamylcysteinu již dochází pouze k navázání molekuly glycinu za přítomnosti ATP pomocí glutathionsynthetasy ($M_r = 108$ kDa), což je homodimerický enzym, jehož aktivita již není žádným způsobem regulována z důvodu vysoké specifity obou vazebných míst (Anderson and Meister 1983). Proto k regulaci syntézy glutathionu dochází pouze při vzniku γ -glutamylcysteinu a jeho produkce je závislá na dostupnosti cysteinu, aktivitě přítomné GCS a také na kontrole syntézy γ -glutamylcysteinynthetasy, resp. zvýšení syntézy mRNA, regulaci translace mRNA a ovlivnění stability nasyntetizované mRNA pro tvorbu GCS (Lu 1999).



Obr. 9: Metabolismus glutathionu

(GCS, glutamylcysteinylsynthetasa; GS, glutathionsynthetasa; GPx, glutathionperoxidasa; GST, glutathion-S-transferasa; GGT, gama-glutamyltransferasa)

2.3.4.3 Metabolismus glutathionu

Vedle zvyšování hladiny glutathionu se na udržování celkové koncentrace glutathionu uvnitř buněk podílí také procesy, které koncentraci GSH snižují (obr. 9). Do této skupiny dějů, převážně enzymatických, náleží již zmíněné reakce související s činností glutathionperoxidasy a glutathion-S-transferasy. Vedle toho se ale na snižování hladiny glutathionu podílí také další důležitý enzym, a to γ -glutamyltranspeptidasa (GGT).

Tento enzym je součástí membrán většiny buněk, kde se vyskytuje na jejich extracelulární straně, popř. v endoplasmatickém retikulu. Nejvyšší

exprese GGT je nalézána v buňkách ledvin, vysoké koncentrace GGT obsahují také buňky jater, plic, srdce, mozku a tenkého střeva (Kuntz and Kuntz 2006). Hlavní funkcí GGT ($M_r = 68$ kDa) je přenos γ -glutamylové skupiny z různých sloučenin (např. z glutathionu) na další molekuly. Po transportu glutathionu ven z buňky je γ -glutamylová skupina odtržena a vzniká dipeptidická molekula cysteinylglycinu. γ -glutamyl je nejčastěji hned navázán na další aminokyselinu, která je zpětně přenesena do buňky pomocí specifických membránových přenašečů γ -glutamylovaných aminokyselin (Baker *et al.* 1990). Vedle tohoto mechanismu může ale γ -glutamyltranspeptidasa katalyzovat také další reakce, kdy γ -glutamylová skupina je autotranspeptidací přenesena na další molekulu glutathionu – vzniká γ -glutamylglutathion, nebo kdy dochází k nevratné hydrolyze vazby a vzniká volná glutamová kyselina a molekula cysteinylglycinu (Anderson and Meister 1983; Meister and Anderson 1983). Vzniklý cysteinylglycin je dále štěpen všudypřítomnými dipeptidasami a jednotlivé aminokyseliny jsou následně pomocí aminokyselinových transportérů přeneseny zpět do buňky.

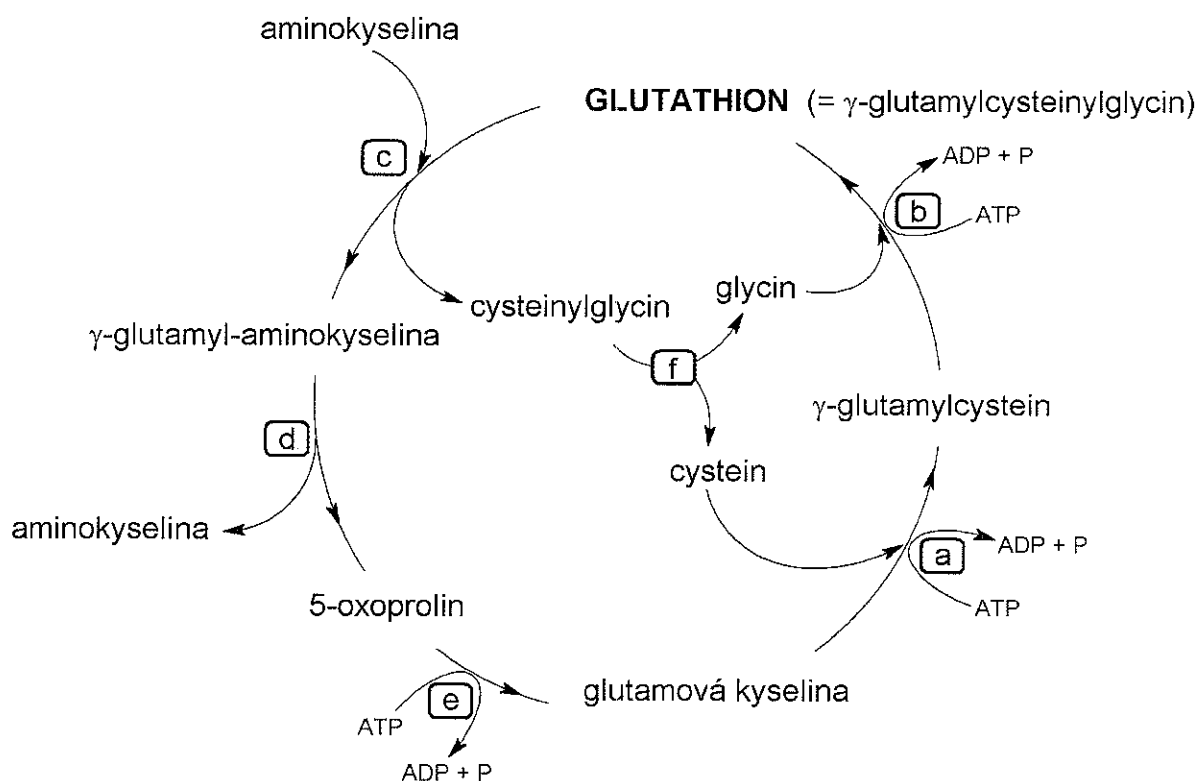
Část metabolismu glutathionu a reakcí závislých na γ -glutamyltranspeptidase jsou součástí tzv. γ -glutamylového cyklu (obr. 10). Kromě výše popsaných reakcí, kdy z glutathionu po jeho exportu ven z buňky a následném rozštěpení vzniká cysteinylglycin a γ -glutamylový zbytek je přenesen na další aminokyselinu, se do tohoto cyklu řadí ještě reakce, které umožňují recyklaci glutamátu. Aminokyseliny s glutamátem navázaným γ -vazbou jsou totiž transportovány zpět do buňky (Lash and Putt 1999), kde je z nich pomocí γ -glutamylcyklotransferasy vytvořena volná aminokyselina a γ -glutamylový zbytek je převeden na 5-oxoprolin. Ten je dále pomocí oxoprolinasy přeměněn opět na glutamát (Halliwell and Gutteridge 2007).

2.3.5 Kompartimentizace glutathionu v buňce

Glutathion se v buňkách vyskytuje jak v cytosolu, tak i v organelách. V cytosolu se nalézá cca 85% glutathionu, zbytek je obsažen v mitochondriích (10%), jádře, endoplasmatickém retikulu či peroxisomech (Bellomo *et al.* 1992; Meredith and Reed 1982). Protože mitochondrie neobsahují enzymy schopné

syntézy glutathionu, je do nich glutathion transportován pomocí specifických membránových přenašečů (Mårtensson *et al.* 1990; Meister 1995).

Přibližně 15% z celkové buněčné koncentrace glutathionu (GSH + 2xGSSG) se nalézají ve vázané formě (Wu *et al.* 2004), a to hlavně v endoplasmatickém retikulu. Zajímavostí tohoto kompartmentu je, že zde poměr koncentrací GSH a GSSG dosahuje mnohem nižších hodnot, cca 2:1, než-li běžně nalézáný poměr 100:1 v buněčném cytosolu, poměr na proteiny vázaného glutathionu (GSSX) k volně se vyskytujícímu celkovému glutathionu je dokonce 1:1 (Bass *et al.* 2004). Tato skutečnost pravděpodobně souvisí se syntézou proteinů a jejich post-translačními úpravami, kdy je třeba udržet redox potenciál nezbytný pro oxidaci částí proteinů, např. pro vytvoření disulfidických můstků. Stejně tak je i zvažována možnost, že vázaný glutathion slouží jako jeho zásobárna buňce.



Obr. 10: Syntéza a metabolismus glutathionu
 ((a), γ -glutamylcysteinsynthetasa; (b), glutathionsynthetasa;
 (c), γ -glutamyltranspeptidasa; (d), γ -glutamylcyklotransferasa;
 (e), oxoprolinasa; (f), peptidasa)

2.3.6 Metody pro 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 ale zohledňovat přesně dané parametry. Měla by 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. Přehled v současnosti používaných metod je uveden v tabulce III.

2.3.6.1 HPLC metody

Metody využívající vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) jsou v současné době nejpoužívanější. Jejich hlavní výhodou je separace na chromatografické koloně a následná specifická detekce, a to většinou GSH i GSSG. HPLC se používá ve spojení s mnoha typy detekcí, jako je např. spektrofotometrická (HPLC/UV/VIS) či fluorimetrická detekce (HPLC/FL). U těchto metod je vždy nutno postup ještě doplnit o krok derivatizace, kterou je molekula glutathionu substituována nějakým chromo- nebo fluoroforem (Paroni *et al.* 1995; Senft *et al.* 2000; Yan and Huxtable 1995).

Dalším typem je detekce elektrochemická (HPLC/EC), u které derivatizace nutná není a navíc je možno během jedné analýzy stanovit obě formy glutathionu. V poslední době je také využíváno spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS), což ale není metoda vhodná pro analýzu velkého množství vzorků (Camera and Picardo 2002; Pastore *et al.* 2003).

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.

2.3.6.2 Spektrofotometrické metody

Mezi spektrofotometrické metody patří nejčastěji užívaná metoda, metoda enzymatická (recyklační). 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 (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina). Tato látka se během reakce se vznikajícím GSH sama štěpí a díky tomu je detekován nárůst absorbance při 412 nm (Tietze 1969). Tímto způsobem mohou být stanoveny koncentrace jak GSH, tak i GSSG. Pro stanovení oxidované formy samotné je ale třeba z roztoku nejprve vystínit GSH. Toho bylo dříve dosahováno pomocí N-ethylmaleimidu, nyní je ale častěji používán 2-vinylpyridin či jeho analoga (Pastore *et al.* 2003).

Hlavní výhodou enzymatické metody je možnost stanovení obou forem glutathionu, vysoká sensitivita i specifita. Naopak hlavní nevýhodou je nemožnost úplné automatizace a dále také vyšší cenové náklady související s použitím enzymu a NADPH.

2.3.6.3 Spektrofluorimetrické metody

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 v praxi 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). Tuto reakci, která probíhá velmi rychle a za standardních laboratorních podmínek, popsali poprvé Cohn a Lyle v roce 1966 (Cohn and Lyle 1966). Principem je reakce mezi $-SH$ a $-NH_2$ skupinami GSH s aldehydickými skupinami OPA, po které vzniká izoindolový kruh, který vykazuje velmi vysokou míru fluorescence. Pro stanovení GSSG je stejně jako u enzymatické metody

potřeba nejprve vystínit GSH. Toto je zajištěno přidáním N-ethylmaleimidu (NEM).

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.

2.3.6.4 Porovnání metod pro analýzu glutathionu

S ohledem na nutnost analýzy hladin glutathionu během jakékoliv výzkumné práce zabývající se oxidačním stresem a jinými souvisejícími patofyziologickými pochody je potřeba mít k dispozici vhodnou metodu, která bude zohledňovat většinu výše uvedených požadavků. Již uvedená stanovení glutathionu, stejně tak jako další (kapilární zónová elektroforéza, plynová chromatografie či nukleární magnetická rezonance), není jednoduché kvůli jejich velké odlišnosti mezi sebou porovnat (tab. III). Proto byla i publikována práce (Floreani *et al.* 1997), jejímž cílem byla komparace výsledků, které byly získány čtyřmi metodami (enzymatická, fluorimetrická, fotometrická a HPLC jako referenční).

Bylo zjištěno, že enzymová metoda je zcela srovnatelná s metodou HPLC a to u stanovení GSH i GSSG. Fluorimetrická metoda byla shledána jako nevyhovující, a to především při analýze koncentrací GSSG, které byly vysoce nadhodnocené. Vysvětlením se zdála být možnost interference, která se v biologickém materiálu se složitou maticí mohla vyskytovat. Naproti tomu byla v poslední době publikována práce, ve které byl postup ze spektrofluorimetrické metody aplikován na metodu HPLC, a bylo zjištěno, že k žádné interferenci nedochází (Kand'ár *et al.* 2007). Proto i spektrofluorimetrickou metodu není možno zcela zavrhnout a nadhodnocení hladin glutathionu se spíše než principiálního nedostatku týká metodiky.

Tab. III: Přehled a porovnání metod pro stanovení glutathionu

Počet " + " vyjadřuje hodnocení daného parametru,
kdy " +++ " znamená nejlepší.

(GR – glutathionreduktasa, OPA – o-ftaldialdehyd)

Typ metody	Specifita	Sensitivita	Náklady	Doba analýzy
HPLC (+UV/VIS, EC, FL)	+++	++	+	+
Enzymatická (GR)	+++	++	++	++
Fluorimetrická (OPA)	+ (???)	++	+++	+++

2.4 Biotransformace a detoxikace xenobiotik

V přítomnosti cizorodých a potencionálně nebezpečných látek se organismus snaží tyto sloučeniny odstranit. Jejich eliminace z organismu může probíhat mnoha způsoby, kdy u plyných látek je využito vydýchání plícemi a u hydrofilních sloučenin vyloučení močí. Lipofilní látky ale není možné z těla odvést ani jednou z popsaných cest, a proto je nutné je nejprve převést na látky ve vodě rozpustné. K tomuto účelu má organismus k dispozici celou kaskádu chemických pochodů, během nichž se látky ve vodě původně nerozpustné stávají ve vodě rozpustnými. Ty jsou již z těla jednoduše eliminovatelné. Za kaskádu biotransformačních pochodů je zodpovědný v největší míře pouze jediný orgán v těle, a to játra. Z tohoto důvodu se ale právě játra stávají častým místem poškození xenobiotiky a toxiny.

2.4.1 Játra – morfologie, funkce, význam

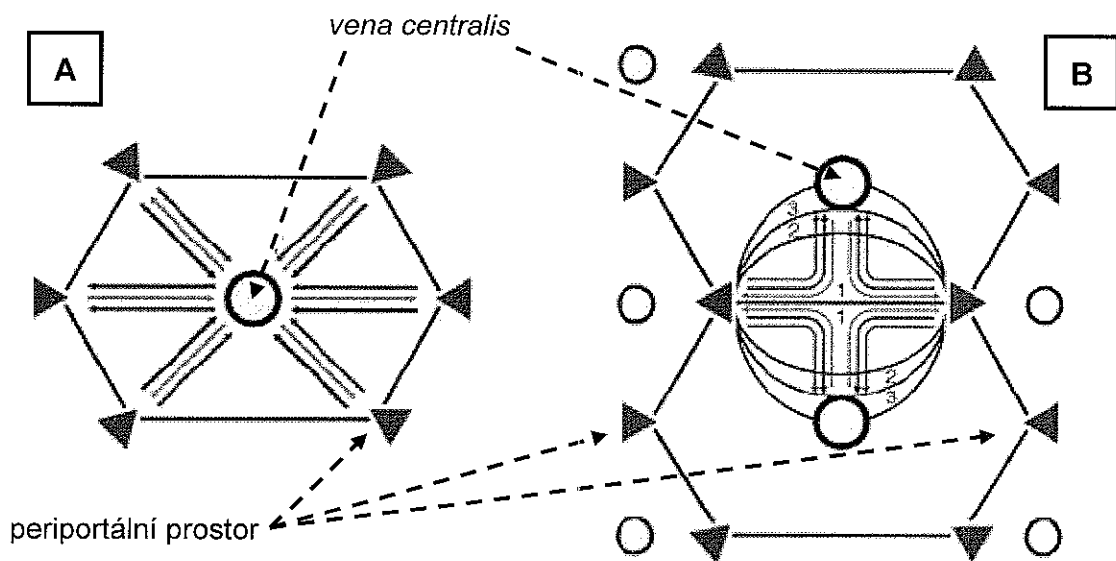
Játra mají kromě biotransformace celou řadu dalších, pro organismus také zcela nezastupitelných funkcí, jako jsou např. syntéza plasmatických proteinů, regulace bazálního metabolismu, účast na metabolismu tuků, cukrů, bílkovin, tvorba žluči či mnoho dalších.

S ohledem na to, že játra jsou centrem metabolismu, je i jejich funkce velmi dobře uzpůsobeno krevní zásobením. Průtok krve játry je velký, činí asi 1400 ml/min, přičemž 1000 ml přivádí *vena portae* a 400 ml přichází cestou *arteria hepatica*. *Vena portae*, která se dále postupně větví do jaterních sinusoid, zabezpečuje přívod krve z nepárových orgánů dutiny břišní, tedy také ze střeva. Proto je tato krev bohatá na živiny, zatímco *arteria hepatica* přivádí do jater krev s vysokým obsahem kyslíku. Krev z jaterních sinusoid je odváděna do *venae centrales*, které se spojují do *venae hepaticae*. Ty již ústí do dolní duté žíly.

Podle klasického morfologického pohledu je základní stavební jednotkou jater jaterní lobulus orientovaný kolem centrální žíly, složený z mnoha hepatocelulárních destiček uspořádaných odstředivě od *v. centralis*. Každá hepatocelulární destička je tvořena dvěma vrstvami hepatocytů. Tyto buňky jsou polarizovány, strana obrácená k sinusoidám vytváří cévní (sinusoidální) pól, opačný pól buňky je přivrácen k terminálnímu žlučovému kanálku, který je

tvořen prostorem mezi dvěma vrstvami hepatocytů, a je proto nazýván pólem žlučovým (kanalikulárním). Dva k sobě přiléhající hepatocyty vytvářejí mezi sebou neprostupnou bariéru pomocí „tight junctions“ a tím na žlučovém pólu vznikají základy žlučových kanálků. Ty se postupně spojují do intra- a následně do interlobulárních žlučovodů, které odvádějí vzniklou žluč do *ductus hepaticus dexter et sinister* ústících do *ductus hepaticus communis*. Ten již po spojení s vyústěním vývodu ze žlučníku odvádí žluč do duodena cestou *ductus choledochus* (Kuntz and Kuntz 2006).

Periportální a perivenózní hepatocyty se navzájem liší především enzymovou výbavou a množstvím a uspořádáním buněčných organel, což je důvodem jejich rozdílné metabolické kapacity. Odhalení funkční heterogenity hepatocytů vedlo k přehodnocení názoru na základní stavební jednotku jater. Funkční členění jater na jaterní aciny zohledňuje vzdálenost jednotlivých buněk vzhledem k přívodným cévám. Tímto způsobem se tkáň dělí na zóny 1, 2 a 3 odlišující se dostupností substrátů a saturací kyslíku, přičemž zóna 1 je substráty zásobena nejlépe (obr. 11). Odlišné mikroprostředí je odpovědné za rozdíly v metabolických pochodech, které převládají v jednotlivých zónách acinu. V buňkách zóny 1 je převaha aerobního metabolismu a oxidačně-redukčních reakcí, narozdíl od zóny 3, kde převažuje anaerobní metabolismus a buňky upřednostňují reakce konjugační.

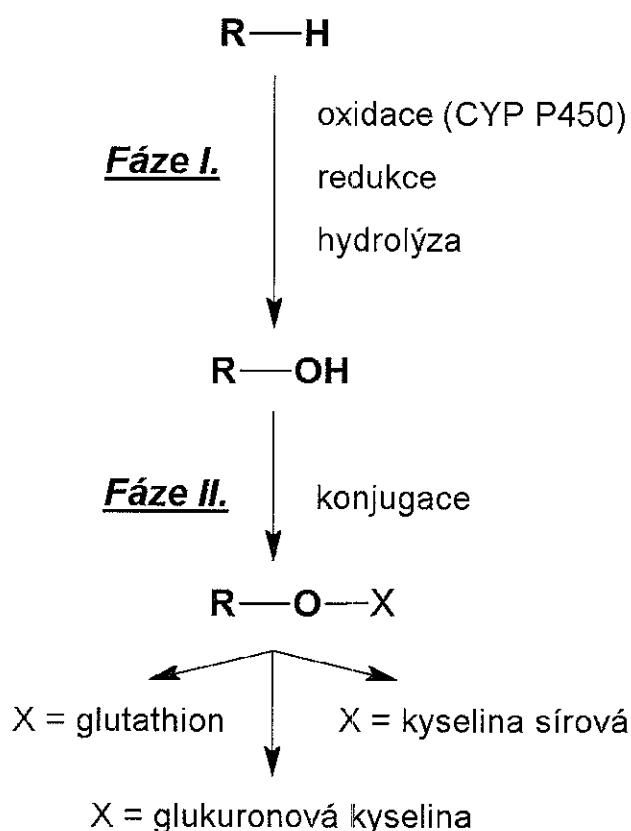


Obr. 11: Členění jaterní architektury - (A), jaterní lobulus; (B), jaterní acinus (Upraveno dle: (Kuntz and Kuntz 2006))

Četné jaterní funkce zajišťují vedle vlastních parenchymových buněk – hepatocytů také buňky neparenchymové. Mezi ně řadíme Kupfferovy buňky, endotelové buňky, epitelové buňky žlučových cest, Ito buňky (hvězdicové buňky) a pit buňky. Hepatocyty, které tvoří vlastní funkční architekturu jater, zodpovídají za převážnou většinu funkcí, které jsou játry v organismu zajišťovány; jeden hepatocyt je schopný až pěti set odlišných biochemických procesů (Kuntz and Kuntz 2006).

2.4.2 Základní mechanismy biotransformace xenobiotik

Xenobiotikem je obecně nazývána látka, která není organismu vlastní a navíc mohou být její účinky škodlivé. Proces biotransformace xenobiotik lze rozdělit do dvou částí – na funkční aktivaci a následnou konjugaci (obr. 12).



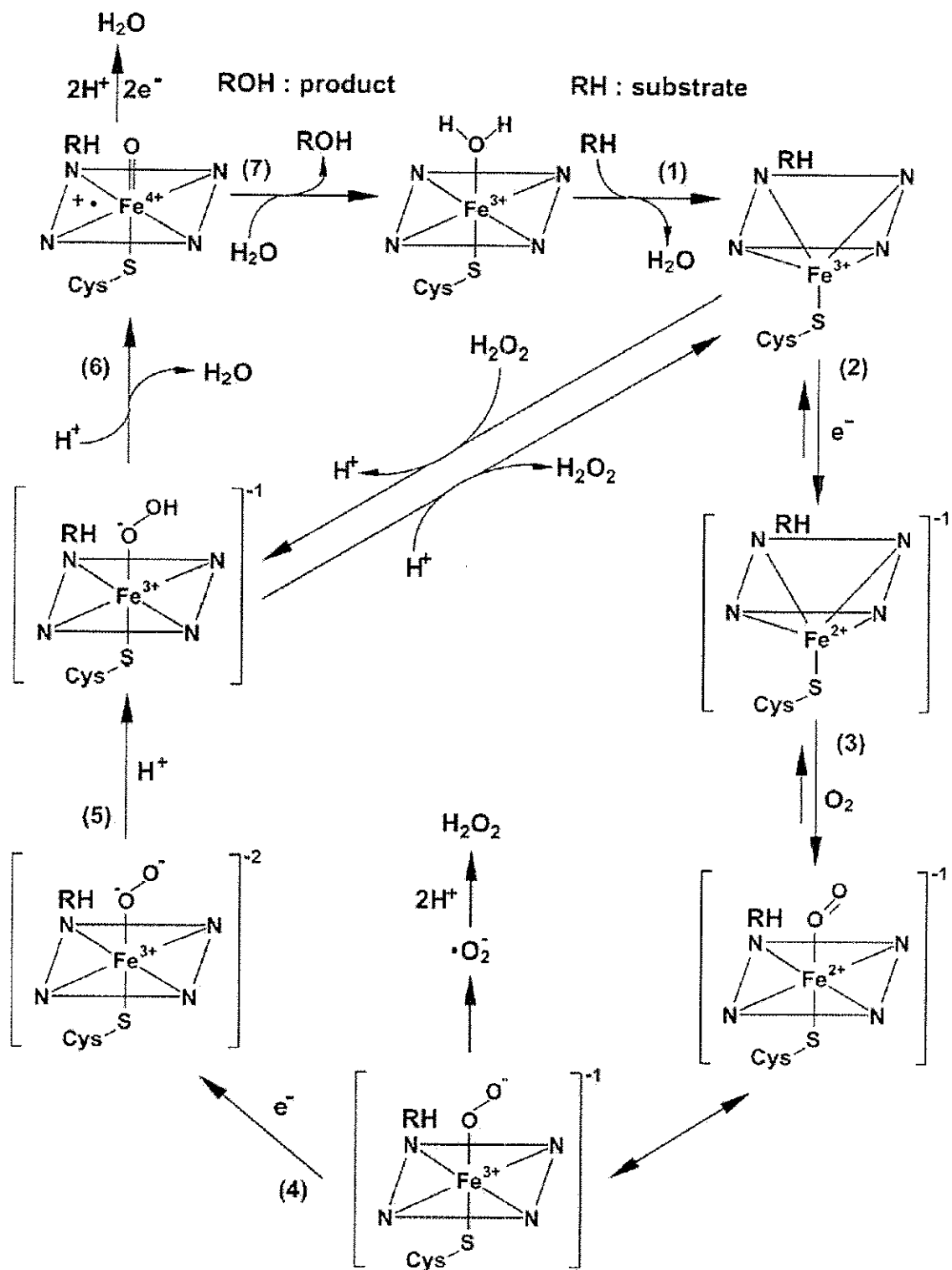
Obr. 12: Schéma biotransformace
($R-H$, lipofilní substrát; $R-OH$, hydrofilní produkt; $R-O-X$, konečný konjugát produktu)

Cílem fáze I. je do struktury sloučeniny zavést, nebo na základě již přítomné funkční skupiny vytvořit hydrofilní skupinu (např. -OH, -COOH, -SH), která u původně lipofilní látky zvýší její rozpustnost ve vodném prostředí. Reakcemi podílejícími se na první fázi jsou oxidace, které je využíváno nejčastěji, a dále pak hydrolýza a redukce. Substrátová specifita enzymů zajišťujících metabolickou aktivaci xenobiotik není většinou příliš vysoká, čímž je zajištěna schopnost buňky pokrýt biotransformaci co největší škály různorodých látek. Jedním z hlavních enzymových systémů, který zajišťuje především oxidaci xenobiotik, je rodina cytochromů P450 (CYP).

Cytochrom P450 představuje soubor mikrosomálních monooxygenas, které mají v aktivním místě vázaný hem. Název cytochrom P450 je odvozen od faktu, že redukovaný CYP po navázání oxidu uhelnatého vykazuje charakteristické absorpční maximum při $\lambda = 450$ nm. Jednotlivé podtypy cytochromu P450 jsou odlišné pouze díky svým apoproteinům, které zajišťují různorodou substrátovou specifitu. Celý enzymový systém je navázán na membránu endoplasmatického retikula, popř. mitochondrií. V současné době je u člověka známo přibližně šedesát různých forem cytochromu P450, které jsou rozřazeny podle daných kritérií do rodin a podrodin (Kuntz and Kuntz 2006).

Hlavní cílem na CYP-závislých reakcích je hydroxylace původní sloučeniny. Podrobné schéma je uvedeno na obrázku (obr. 13), z kterého vyplývá, že oxidace substrátu je prováděna v několika krocích po prvotní redukci atomu železa, následně vazbě molekulárního kyslíku, zpětné oxidaci dvojmocného železa na železo trojmocné a po dalších reakcích. Výsledkem je zavedení -OH skupiny do původní molekuly a její uvolnění z CYP (Yasui *et al.* 2005).

Druhá fáze biotransformace se skládá z konjugačních reakcí, kdy je vzniklá molekula (popř. i původní sloučenina schopná vazby s ligandem) za součinnosti s některým typem transferas konjugována s další hydrofilní sloučeninou. Takto konjugovaná látka je již velmi hydrofilní, a proto může být jednoduše exkretována do žluči a/nebo do moči. Jako endogenní ligandy jsou pro konjugační reakce nejčastěji v hepatocytech využívány kyselina glukuronová, kyselina sírová, glutathion, glycin, taurin a v menší míře také kyselina octová, S-adenosylmethionin a glutamin (Kuntz and Kuntz 2006).



Obr. 13. Schéma oxidace substrátu v CYP P450 (Yasui *et al.* 2005)
(RH, lipofilní substrát; ROH, hydrofilní produkt)

2.4.3 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, které se rozdělují do tříd: alfa (α), mí (μ), pí (π), théta (θ), dzéta (ζ), omega (ω), sigma (σ). Všechny glutathion-S-transferasy jsou rozpustné intracelulární enzymy tvořené dvěma podjednotkami, a to jak homodimerickými, tak i heterodimerickými. Heterodimery se v buňkách přirozeně vyskytují pouze v rámci jedné třídy (Mannervik *et al.* 2005). Expresse jednotlivých tříd GST je tkáňově specifická, až na GST π , která je přítomna prakticky ve všech buňkách (Henderson and Wolf 2005).

Reakce mezi elektrofilní látkou a glutathionem je během biotransformačních pochodů následována odštěpením γ -glutamylvého zbytku pomocí γ -glutamyltranspeptidasy. Ze zbylého cysteinylglycinu s navázanou sloučeninou je dále odštěpen glycin a zbytek molekuly je během několika reakcí přeměněn na substituovanou merkapturovou kyselinu, která je exkretována do žluči (popř. při metabolismu v ledvinách do moči).

2.5 Acetaminofen a jeho hepatotoxické působení

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 hepatocytů, popř. také ledvinných buněk. V roce 2004 například Dr. Lee uveřejnil klinickou studii, v které popisuje, že předávkování acetaminofenem je vedoucí příčinou akutního jaterního selhání v USA a Velké Británii (Lee 2004).

V průběhu mnohaletých výzkumů bylo zjištěno, že za jeho toxické působení je zodpovědný jeden z metabolitů. I když je v poslední době publikováno mnoho odborných prací zabývajících se toxickým působením acetaminofenu, přesto stále zůstávají některé otázky, na které odpovědi zatím známy nejsou.

2.5.1 Metabolismus acetaminofenu

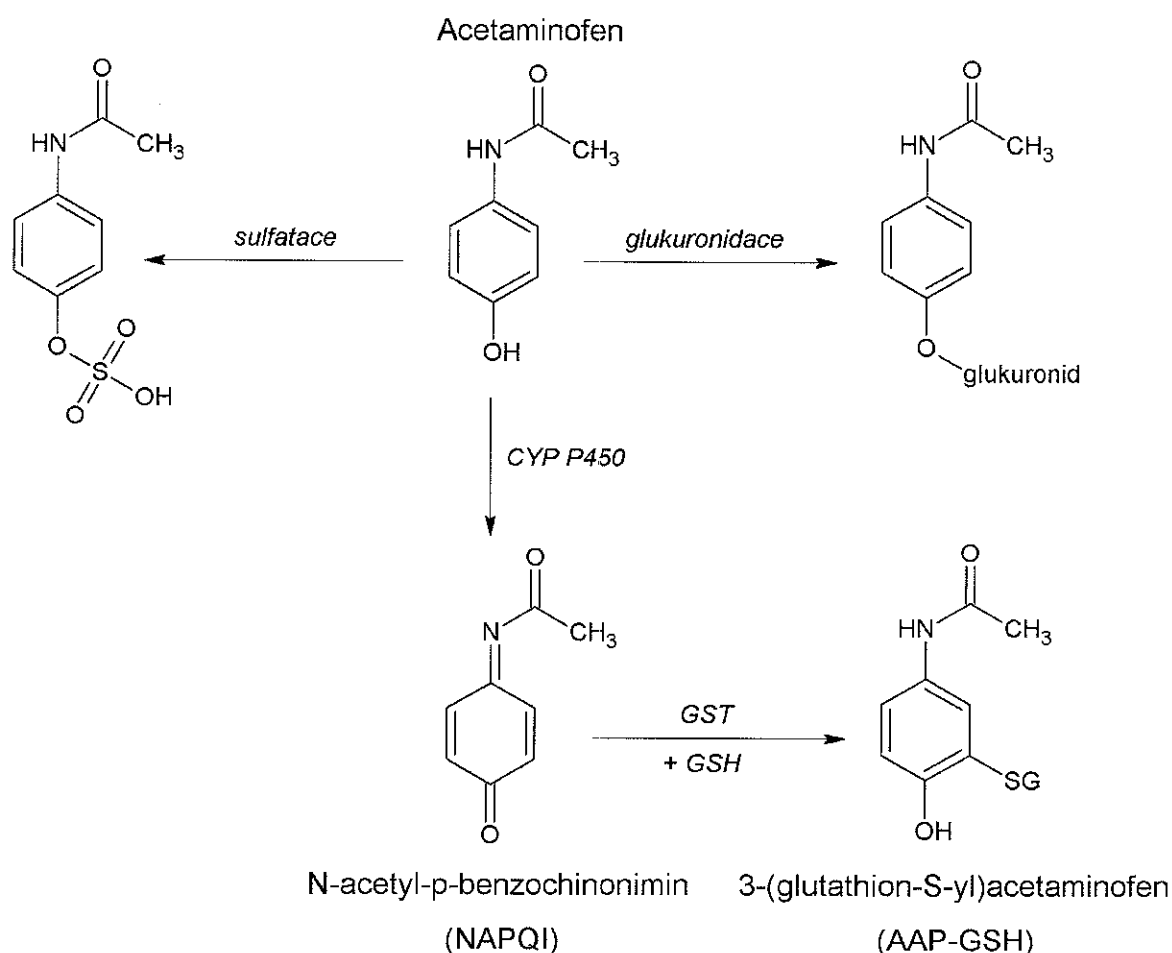
Acetaminofen (AAP) je po vstupu do jaterních buněk detoxikován mnoha různými mechanismy. Největší část dávky je konjugována s endogenními ligandy, a to s kyselinou glukuronovou za součinnosti s UDP-glukuronosyltransferasami (cca 50% dávky), a dále pak s kyselinou sírovou (cca 30%) za katalýzy sulfottransferas (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 (Jollow *et al.* 1973; Mitchell *et al.* 1973a; Mitchell *et al.* 1973b; Potter *et al.* 1973). 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 na toxický metabolit (obr. 14), N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI), který zodpovídá za patologické působení acetaminofenu (Dahlin *et al.* 1984). Při požití terapeutických dávek je ale na NAPQI přeměněno méně než 10% buňkou přijatého AAP. Do dnešních dnů bylo identifikováno několik typů

CYP, které se na formaci NAPQI z AAP podílejí; jsou to cytochromy 1A2, 3A4 a 2A6, za nejvýznamnější je ale obecně uznáván cytochrom 2E1 (Chen *et al.* 1998; Patten *et al.* 1993; Thummel *et al.* 1993).

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, který je následně hepatocytem exkretován do žluči transportními MRP proteiny (Multidrug Resistance-associated Protein), a to přesněji podtypem MRP-2 (Chen *et al.* 2003). Glukuronáty či sulfáty acetaminofenu jsou do žluči transportovány přes MRP-2 také, zároveň jsou ale transportovány i přes cévní pól hepatocytů převážně díky MRP-3 (Manautou *et al.* 2005).



Obr. 14: Metabolismus acetaminofenu

2.5.2 Toxické působení acetaminofenu

V případě předávkování acetaminofenem (pro člověka tzn. dávku převyšující 140 mg/kg hmotnosti) 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 konjugačních enzymů zajišťujících glukuronidaci a sulfataci. Nadbytek AAP vstupuje do první fáze biotransformace, je oxidován cytochromem 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-adykty (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 (Jaeschke and Bajt 2006; James *et al.* 2003a).

Metabolická teorie se zakládá na předpokladu, že kovalentní vazba NAPQI s -SH skupinami proteinů vede ke změně jejich aktivity, což má za následek buněčnou smrt. Do dnešní doby byla skutečně popsána celá řada proteinů s navázanými AAP-adykty (Pumford *et al.* 1997; Qiu *et al.* 1998); vybrané z nich jsou uvedeny v tabulce IV. U většiny těchto proteinů ale nebyl prokázán žádný vliv vazby s NAPQI na jejich funkci a mírné snížení aktivity bylo zjištěno pouze u některých z nich. Výjimku tvoří glutaminsynthetasa, u které byl prokázán pokles aktivity o více než 50% (Gupta *et al.* 1997). S ohledem na výše uvedené byla hypotéza o přímé metabolické příčině hepatocytární nekrózy spíše zamítnuta.

Druhou teorií vysvětlující poškození buněk po působení acetaminofenu je teorie oxidační, ve které hraje ústřední roli oxidační stres, resp. ROS.

Tab. IV: Přehled proteinů s prokázanými AAP-adykty
(James *et al.* 2003a; Pumford *et al.* 1997)

Název proteinu	Lokalizace
Glutaminsynthetasa	mikrosomy
Glutamátdehydrogenasa	mitochondrie
Glutathionperoxidasa	cytosol, mitochondrie
Tropomyosin 5	cytoskelet
ATP-synthetasa (α -podjedn.)	mitochondrie
Urát oxidasa	peroxisomy
Glutathion-S-transferasa π	cytosol, mitochondrie
Aldehyddehydrogenasa	cytosol, mitochondrie

2.5.3 Role ROS v toxickém působení acetaminofenu

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.

Produkce ROS ve spojení s AAP toxicitou byla prokázána v mnoha pracích (Bajt *et al.* 2004; Knight *et al.* 2001; Rousar *et al.* 2009). Přesná lokalizace produkovaných ROS ale zůstávala neznámá. Jako potenciální zdroj ROS byly postupně studovány mitochondrie, Kupfferovy buňky, či vlastní formace NAPQI v CYP (Jaeschke and Bajt 2006).

Kupfferovy buňky jsou tkáňové makrofágy jater přítomné v sinusoidách a jejich hlavní funkcí je fagocytóza mikroorganismů. Pokud jsou aktivovány, uvolňují do okolí celou řadu látek, mezi něž patří i některé druhy ROS (NO , O_2^{\bullet}) a cytokinů. Hladiny všech těchto látek jsou prokazatelně zvýšeny během toxického působení acetaminofenu, a proto byl i vliv Kupfferových buněk na poškození hepatocytů velmi intenzivně studován. Byla testována inhibice Kupfferových buněk gadolinium chloridem (Blazka *et al.* 1995), stejně tak i jejich

úplná eliminace. Konečné výsledky ovšem nebyly jednoznačné, a s ohledem na ně byl význam Kupfferových buněk v mechanismu AAP toxicity relativizován (James *et al.* 2003a).

S Kupfferovými buňkami částečně souvisí i další testovaný mechanismus, u něhož byla předpokládána účast na toxickém působení acetaminofenu. Jedná se o produkci superoxidu. Tato sloučenina náleží mezi ROS, a její hlavní patofyziologický význam spočívá v účasti na reakcích, kterými vznikají další ROS (1) (3) (5). K produkci $O_2^{\bullet-}$ dochází mimo jiné i po aktivaci leukocytů (neutrofilů, makrofágů), kdy je zvýšena aktivita NADPH-oxidasy (6). Vzniklý $O_2^{\bullet-}$ následně může přecházet přes membránu leukocytu do okolní tkáně, což u AAP toxicity bylo považováno za pravděpodobné. S ohledem na tento předpoklad byla u myši s defektní podjednotkou NADPH-oxidasy testována vnímavost k AAP (James *et al.* 2003b). Zjištěná míra hepatotoxicity byla ale zcela srovnatelná s kontrolními zvířaty a navíc byla objevena i stejná míra nitrace tyrosinu, což vedlo k závěru, že zvýšená produkce ROS působících během toxického působení acetaminofenu nemá původ v okolních leukocytech.

Dalším potenciálním zdrojem ROS je zvýšená produkce oxidu dusnatého, která byla u AAP toxicity prokázána. V centrilobulárních buňkách, u nichž byly zjištěny nekrotické změny i přítomnost AAP-aduktů, byla také prokázána zvýšená nitrace tyrosinu (Hinson *et al.* 1998). Nitrace tyrosinu svědčí pro produkci peroxynitritu, který vzniká po reakci mezi NO a superoxidem (5). Tato reakce je rychlejší než dismutace superoxidu a je pouze závislá na difúzi obou reaktantů. Vzniklý peroxynitrit je velmi reaktivní a je schopen reagovat s biomolekulami, jako např. s DNA, lipidy, či proteiny. Za fyziologického stavu je peroxynitrit detoxikován reakcí s glutathionem (Halliwell and Gutteridge 2007; Sies 1999). S ohledem na depleci GSH charakterickou pro toxické působení AAP se zdálo, že ONOO⁻ může být hlavní příčinou hepatocytárního poškození. Dalším úkolem tedy bylo určit přesnou lokalizaci tvorby NO a stejně tak i potvrdit význam peroxynitritu během AAP toxicity.

Úloha oxidu dusnatého byla testována u myši, u nichž byla NOS inhibována, popř. byly iNOS-deficientní (Michael *et al.* 2001). Porovnáním výsledků s kontrolami bylo kupodivu zjištěno, že mezi nimi není v histologickém obrazu jaterní tkáně žádný signifikantní rozdíl, a to i když u kontrolních myši

byly dle předpokladu prokázány vyšší hladiny dusitanů v séru, stejně tak jako vyšší míra nitrace ve tkáni. Překvapivým nálezem bylo i několikanásobné zvýšení míry lipoperoxidace u iNOS-deficientních myší v porovnání s kontrolami. Tyto výsledky mohou být vysvětleny následujícím způsobem. Superoxid s oxidem dusnatým reaguje za vzniku ONOO⁻ a následná nitrace vede k buněčnému poškození; nepřítomnost NO vede k tomu, že ze superoxidového radikálu se během následných reakcí tvoří ROS, které již zodpovídají za zvýšenou lipoperoxidaci nalézanou u iNOS-deficientních myší.

Uvedená data dále potvrzují, že oxidační teorie popisující původ poškození je nejspíše velmi blízko skutečnosti. Na druhou stranu ale přesný mechanismus poškození dosud nebyl popsán a dosud publikované údaje pouze napovídají, že poškození buněk má příčinu v celé řadě dějů, které následují po vyčerpání zásob celulárního GSH. Důkazem pro toto tvrzení je i zjištění, že hladiny ROS se v buňkách zvyšují až po depleci buněčného GSH (Bajt *et al.* 2004).

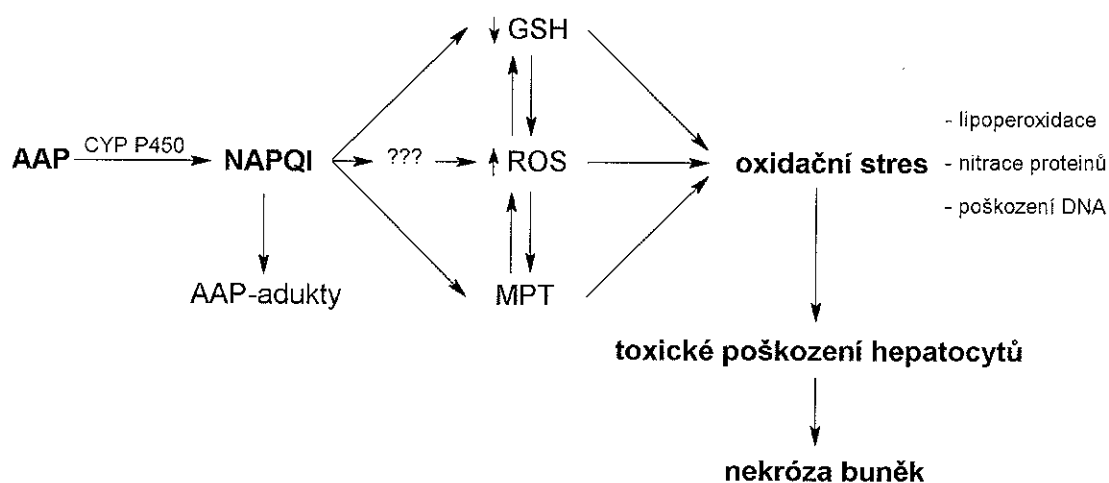
2.5.4 Ostatní mechanismy účastníci se toxicity acetaminofenu

Jedním z dalších mechanismů, které jsou v poslední době intenzivně studovány ve spojitosti s toxickým působením AAP, je otevření MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore) (Kon *et al.* 2004; Masubuchi *et al.* 2005; Reid *et al.* 2005). MPTP je mitochondriální membránový pór, při jehož otevření dochází k úniku solutů s molekulovou hmotností menší než 1500 ven z mitochondrií. Toto vede k rozpojení oxidativní fosforylace, uvolnění iontů a energetických substrátů do cytosolu, swellingu mitochondrií a případně i k apoptóze buňky (He and Lemasters 2002). Jedním ze stimulů aktivace MPTP může být oxidace přiléhajících -SH skupin, což pravděpodobně je princip účasti MPTP na AAP toxicitě, kdy se na tyto -SH skupiny může vázat NAPQI. Tato vazba následně spouští otevření MPTP, které vede k produkci ROS a dalším pochodům (James *et al.* 2003a).

Mezi další mechanismy, u nichž byl studován podíl na poškození buněk během toxického AAP působení, se řadí např. působení cytokinů či DNA-fragmentace (Jaeschke and Bajt 2006; James *et al.* 2003a).

2.5.5 Překvapivé nálezy při studiu AAP toxicity

I přes značný pokrok v popisu principů toxického poškození hepatocytů acetaminofenem, které jsou shrnuty na obrázku 15, existují recentní práce, jejichž nálezy nelze jakýmkoliv v současnosti známým mechanismem vysvětlit.



Obr. 15: Mechanismus toxického působení acetaminofenu

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. V případě nepřítomnosti GST (v tomto případě podtypu GST π) by totiž vzniklý NAPQI měl reagovat s GSH v mnohem menší míře než za přítomnosti enzymu, a proto by se jeho toxický účinek měl projevit v míře zvýšené. 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, který by u hepatocytů měl tyto buňky chránit, resp. by mělo i přes toxické poškození docházet k nižší depleci glutathionu. Předpoklady se ale opět lišily od nalezených výsledků, kdy se ukázalo, že u transgenních myší 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. Výše uvedené příklady tedy 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.

1.) Optimalizace spektrofluorimetrického stanovení obou forem glutathionu

- zavedení a optimalizace spektrofluorimetrické metody pro stanovení obou forem glutathionu
- určení analytických parametrů zavedené spektrofluorimetrické metody
- porovnání spektrofluorimetrické 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. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Seznam chemikálií použitých při stanoveních

- acetaminofen, AAP ($C_8H_9O_2N$; $M_r = 151,2$; Sigma Aldrich, SRN)
- blue, Coomassie G ($C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$; $M_r = 854,02$; Sigma Aldrich, SRN)
- deionizovaná voda ($G < 0,1 \mu S$)
- ethanol (95%) (C_2H_6O ; $M_r = 46,07$; Lachema, ČR)
- glutathion, GSH ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$; $M_r = 307,32$; Sigma Aldrich, SRN)
- glutathionreduktasa, GR (from Baker's Yeast; Sigma Aldrich, SRN)
- glutathion oxidovaný, GSSG ($C_{20}H_{30}N_6Na_2O_{12}S_2$; $M_r = 656,6$; Sigma Al., SRN)
- hydrogenfosforečnan draselný, PP (K_2HPO_4 ; $M_r = 174,18$; Sigma Al., SRN)
- hydrogenfosforečnan sodný, PB (Na_2HPO_4 ; $M_r = 141,96$; Sigma Aldrich, SRN)
- hydroxid sodný (NaOH; $M_r = 40$; Fluka, SRN)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (dihydrát), EDTA
($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$; $M_r = 372,2$; Fluka, SRN)
- kyselina fosforečná (85%) (H_3PO_4 ; $M_r = 98,0$; Lachema, ČR)
- kyselina chlorovodíková (HCl; $M_r = 36,46$; Fluka, SRN)
- kyselina metafosforečná, MPA (HPO_3 34,4%, $NaPO_3$ 60,4%; Sigma Al., SRN)
- kyselina octová (98%) ($C_2H_4O_2$; $M_r = 60,05$; Lachema, ČR)
- methanol (CH_4O ; $M_r = 32,04$; Sigma Aldrich, SRN)
- N-ethylmaleimid, NEM ($C_6H_7NO_2$, $M_r = 125,13$; Sigma Aldrich, SRN)
- nikotinamidadeninukleotid fosfát, NADPH
($C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3 \cdot xH_2O$; $M_r = 833,35$; Sigma Aldrich, SRN)
- o-ftaldialdehyd, OPA ($C_8H_6O_2$; $M_r = 134,13$; Fluka, SRN)
- trypanová modř (0,4%) ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$; $M_r = 960,81$; Sigma Aldrich, SRN)

4.2 Příprava roztoků

Perfúzní roztoky používané při izolaci potkaních hepatocytů

Roztok A: 8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,0977 g $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; 0,1206 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,06 g KH_2PO_4 ; 2,188 g NaHCO_3 ; 0,19 g EGTA, do 1000 ml doplněno destilovanou vodou, 7 min. syceno karbogenem (95 % O_2 + 5 % CO_2), aby výsledné pH bylo 7,3 – 7,4.

Roztok B: 4,8 g NaCl; 0,24 g KCl; 0,05862 g $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; 0,07236 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,036 g KH_2PO_4 ; 0,3528 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,314 g NaHCO_3 ; doplněno do 600 ml destilovanou vodou, 7 min. syceno karbogenem (95 % O_2 + 5 % CO_2), aby výsledné bylo pH 7,3 – 7,40; obvykle používáme 0,055 g surové kolagenasy do 200 ml recirkulačního roztoku.

Roztok C, Krebs-Henseleitův roztok (K-H roztok): pro přípravu 1 l roztoku jsme v deionizované vodě rozpustili 6,9 g NaCl, 0,36 g KCl, 0,1441 g $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, 0,13 g KH_2PO_4 , 0,374 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g NaHCO_3 , 0,9 g glukózy a 1,333 g albuminu.

Kultivační médium

Williamsovo kultivační médium – E bez fenolčerveně a L-glutaminu (Biotech) bylo před kultivací obohaceno o fetální bovinní sérum (10 %, Biotech), L-glutamin (2mM, Biotech), penicilin (200 IU/ml, Biotech), streptomycin (0,2 mg/ml, Biotech), inzulín (0,08 IU/ml, Actrapid HM inj., Novo Nordisk), prednizolon (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Solu-Decotin, Merck) a glukagon (0,008 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Glukagen 1 mg inj HYPOKIT, Novo Nordik). Těmito látkami obohacené Williamsovo E médium nazýváme již jako kompletní.

Roztoky využívané během použitých stanovení

Roztok metafosforečné kyseliny ($w_{\text{MPA}} = 5\%$) – navážku 0,25 g MPA jsme rozpustili v 50 ml deionizované vody.

Roztok metafosforečné kyseliny ($w_{\text{MPA}} = 10\%$) – navážku 0,5 g MPA jsme rozpustili v 50 ml deionizované vody.

Zásobní roztok GSH ($c_{\text{GSH}} = 500 \mu\text{mol/l}$) – zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním 0,0155 g GSH ve 100 ml HCl (1 mM).

Zásobní roztok GSSG ($c_{\text{GSSG}} = 500 \mu\text{mol/l}$) – zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním 0,0328 g GSSG ve 100 ml HCl (1 mmol/l).

Roztok GSSG ($c_{\text{GSSG}} = 40 \text{ mmol/l}$) – navážku 0,245 g GSSG jsme rozpustili v 10 ml pufru K_2HPO_4 (200 mM, pH 7,5).

Roztok N-ethylmaleimidu ($c_{\text{NEM}} = 0,5\%$) – 0,05 g NEM jsme rozpustili v 10 ml deionizované vody.

Roztok o-ftaldialdehydu ($c_{\text{OPA}} = 0,1\%$) – 0,05 g OPA jsme rozpustili v 50 ml methanolu a roztok byl uchováván v mrazáku při -80°C .

Roztok fosfátového pufru (Na^+) s přidavkem EDTA ($c_{\text{PB}} = 100 \text{ mmol/l}$; pH 8) – ve 100 ml deionizované vody jsme rozpustili 1,4 g Na_2HPO_4 a 0,2 g EDTA.

Roztok fosfátového pufru (Na^+) s přidavkem EDTA ($c_{\text{PB}} = 100 \text{ mmol/l}$; pH 6) – ve 100 ml deionizované vody jsme rozpustili 1,4 g Na_2HPO_4 a 0,2 g EDTA. pH bylo dle potřeby upraveno na hodnotu pH 6,0.

Roztok fosfátového pufru (K^+) s přidavkem EDTA ($c_{\text{PP}} = 200 \text{ mmol/l}$; pH 7,5) – ve 100 ml deionizované vody jsme rozpustili 3,484 g K_2HPO_4 a 0,0372 g EDTA. Hodnota pH byla upravena pomocí přidavku HCl (1 M) nebo NaOH (1M) na výslednou hodnotu 7,5.

Roztok hydroxidu sodného ($c_{\text{NaOH}} = 0,1 \text{ mol/l}$) – pro přípravu 100 ml roztoku jsme navážili 0,4 g NaOH a toto množství bylo rozpuštěno v deionizované vodě.

Roztok kyseliny chlorovodíkové ($c_{\text{HCl}} = 1 \text{ mol/l}$) – k 9,05 ml deionizované vody jsme připipetovali 950 μl cc HCl (32%).

Roztok kyseliny chlorovodíkové ($c_{\text{HCl}} = 1 \text{ mmol/l}$) – do 500 ml odměrné baňky jsme pipetovali 47,5 μl HCl (32%) a objem byl doplněn do 500 ml deionizovanou vodou.

Roztok NADPH ($c_{\text{NADPH}} = 4 \text{ mmol/l}$) – v 5 ml deionizované vody jsme rozpustili 0,0167 g NADPH.

PBS roztok (10x koncentrovaný) – 1 litr PBS roztoku jsme připravili navážením 26 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 115 g Na_2HPO_4 , 85 g NaCl a rozpuštěním v deionizované vodě. Hodnota pH byla upravena pomocí titrace HCl (1 M) nebo NaOH (1 M) na výslednou hodnotu 7,4.

Činidlo pro stanovení proteinů dle Bradforda – 500 ml roztoku jsme připravili navážením 0,05 g Coomassie blue G, rozpuštěním ve směsi 25 ml ethanolu (95%) a 50 ml H₃PO₄ (85%) a následným doplněním deionizovanou vodou na celkový objem 500 ml. Roztok byl dále přefiltrován přes papírový filtr.

Zásobní roztok acetaminofenu pro kultivaci hepatocytů

($c_{\text{AAP}} = 40 \text{ mmol/l}$) – zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním 0,1210 g AAP ve 20 ml kompletního Williamsova média E.

Roztok pro přípravu konjugátu acetaminofenu a glutathionu

($c_{\text{AAP}} = 1 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{GSH}} = 5 \text{ mmol/l}$) – rozpuštěním 0,0015 g AAP a 0,0154 g GSH v 10 ml fosfátového pufru (100 mmol/l, pH 7,4) jsme získaly reakční roztok pro elektrochemickou analýzu.

4.3 Přístroje a laboratorní pomůcky

spektrfluorimetr Aminco Bowman 2 series (Thermo, USA)
destičkový spektrofotometr a spektrfluorimetr Infinite M200 (Tecan, Rakousko)
UV/VIS spektrofotometr UV 1601 (Shimadzu, Japonsko)
potenciostat BAS100W (Bioanalytical Systems, USA)
oběhový termostat CTB 06C (Labio, ČR)
invertovaný mikroskop CK40 (Olympus, Japonsko)
membránové čerpadlo (KNF lab LIQUIPORT, SRN)
odstředivky Rotina 35 R a Rotina 50 R (Hettich, SRN)
odstředivka Mikro 20 R (Hettich, SRN)
CO₂ inkubátory (Sanyo, Japonsko)
lednice s mrazákem (-20 °C) (Elektrolux & Liebherr, SRN)
hlubokomrazicí box MDF-U3086S (-80 °C) (Sanyo, Japonsko)
pH-měrné elektrody Sen Fix 61 a 81 (Fischer Scientific, SRN)
pH metr pH 720 (Inolab, SRN)
sonikátor SonoPuls 2070 (Bandelin, SRN)
vodní lázeň s termostatem a ultrazvukem S10 (Elma, SRN)
magnetická míchadla (Heidolph & Big Squit Star, SRN)
aparatura pro izolaci hepatocytů - pumpa, termostatovaná lázeň
třepačky, vortexy (Reax top Heidolph, SRN; IKA Sweden)
váhy 440-35N a analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, SRN)
pipety Finnpiquette (Thermo, Finsko)
mikrozkumavky, objem 1,5 a 2,0 ml (Neptune, Mexiko)
fluorimetrická kyveta (1,5 ml)
nylonové filtry, 0,22 µm (Corning, USA)
Petriho misky, průměr 6 cm (Iwaki, Japonsko)
mikrotitrační destičky 24-j., 96-j. (Nunc, Dánsko)

software:

AB2 Luminiscence Spectrometer Version 5.50 © 2003 Thermo; Tecan i-control v 1.3; BAAS software; Microsoft Office (Word, Excel); Advanced Chemistry Development software; GraphPad Prism 4.

4.4 Příprava biologického materiálu

4.4.1 Pokusná zvířata

Pokusy byly prováděny na dospělých potkaních samcích kmene Wistar o hmotnosti 180 až 240 g. Potkani byli chováni za standardních podmínek při konstantní teplotě 23 ± 1 °C, relativní vlhkosti vzduchu 55 ± 10 %, výměně vzduchu 12 – 14x za hodinu a při 12ti hodinovém světelném režimu (6,00 – 18,00 hod.). Potkani byli ustájeni v klecích po 6 – 10 potkanech. Po celou dobu měli volný přístup k vodě a potravě. 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.

4.4.2 Izolace hepatocytů a její kvalitativní hodnocení

Izolace hepatocytů se provádí dvoustupňovou kolagenasovou perfúzí jater (Berry *et al.* 1991). Principem celého postupu je nejprve rozvolnění desmozomů mezi hepatocyty při absenci vápenatých kationtů, a v druhém kroku rozrušení extracelulární matrix díky účinku kolagenasy za přítomnosti vápenatých iontů.

Potkan je nejprve uveden do etherové narkózy a poté je přemístěn na operační stůl a fixován. Břišní stěna je dezinfikována jodovou tinkturou a dutinu břišní otevíráme stříhem ve tvaru „V“ skrz kůži a svalovinu. Orgány dutiny břišní jsou následně opatrně odsunuty k levé straně těla zvířete, čímž se odkryje přístup k *v. cava inferior*, do které aplikujeme heparin ve fyziologickém roztoku (200 m.j. na 100 g hmoty potkana). Tupou preparací uvolníme *v. portae*, do které zavedeme kovovou kanylu napojenou na perfúzní aparaturu. Ta je naplněna perfúzním roztokem temperovaným na 37 °C a nasyceným karbogenem.

Nejprve je provedena perfúze *in situ* roztokem A bez obsahu vápenatých iontů. O úspěšnosti perfúze svědčí rychlé, homogenní odbarvení jater a postupné zvětšování jejich objemu. Po chvíli je nutné zastavit přívod perfúzního roztoku a prostříhnout dolní dutou žílu, abychom předešli mechanickému poškození jater tlakem. Poté co nejrychleji vyjmeme játra

z dutiny břišní, opláchneme je v kádince s fyziologickým roztokem, upevníme do speciálního stojánku a dokončíme jejich proplach roztokem A.

Následně pokračujeme recirkulační perfúzí jater roztokem s obsahem kolagenasy (Collagenasa Cruda, Sevapharma) a vápenatých iontů v roztoku B. Optimální doba této perfúze byla stanovena na 14 minut. Stálý perfúzní tlak v obou stupních promývání je zajištěn výškou spádu perfúzního roztoku. Po ukončení recirkulační perfúze se játra ponoří do Krebs-Henseleitova média s bovinním sérovým albuminem (= roztok C) a jaterní tkáň se jemně mechanicky rozvolní. Přítomnost albuminu je nezbytná pro zachování koloidně-osmotických podmínek. Získaná suspenze buněk je přefiltrována přes sterilní 4x složenou gázu do centrifugační zkumavky a centrifugována po dobu 5 minut (28 g, 15 °C). Supernatant je odsán a buňky znovu resuspendovány v roztoku C. Následuje centrifugace za stejných podmínek a celý postup je pak ještě jednou opakován. Bezprostředně po izolaci je stanovena viabilita izolovaných buněk.

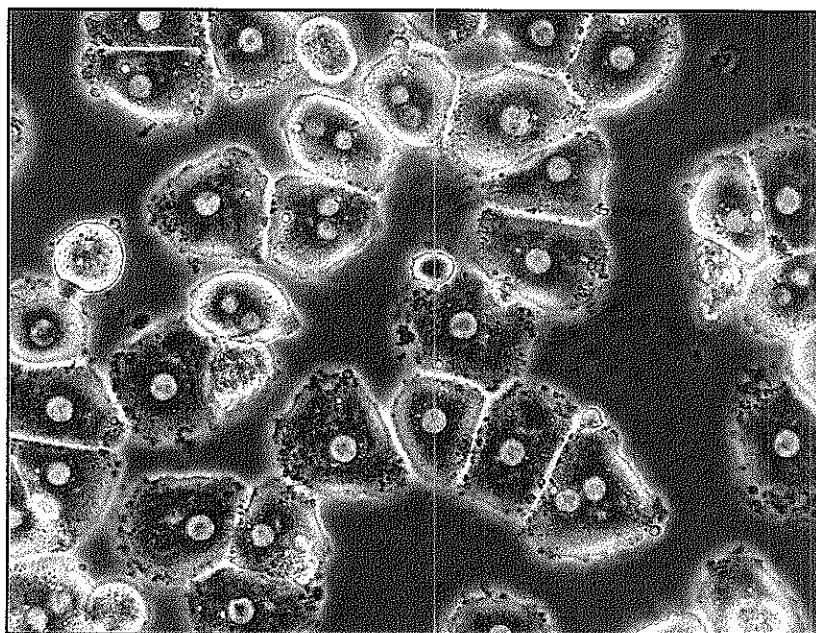
Hodnocení viability izolovaných hepatocytů se provádí pomocí barvení trypanovou modří (TB) (Seglen 1976). Principem použití TB je její schopnost vnikat porušenou cytoplasmatickou membránou do mrtvých buněk, díky čemuž dochází k jejich obarvení; navíc je u živých buněk popisována schopnost do cytoplasmy již proniklou TB aktivně vypuzovat (Belinsky *et al.* 1984). Následně je spočítán poměr mezi živými a všemi buňkami a tím je zjištěna viabilita. Vlastní hodnocení probíhá pod mikroskopem u preparátu naředěného na koncentraci cca 10^6 bb./ml, z něhož je odebráno 10 μ l suspenze a toto množství je smícháno se stejným objemem TB (0,4%). Po přiložení krycího sklíčka ihned pozorujeme (zvětšení 200x) a počítáme počty mrtvých a živých buněk. (Viabilita izolovaných buněk u všech v této práci zmiňovaných experimentů dosahovala nejméně 90%.)

4.4.3 Kultivace potkaních hepatocytů

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 suspenze K-H roztokem 100x). S ohledem na to je následně suspenze hepatocytů naředěna na výslednou koncentraci.

Kultivace primokultur hepatocytů se provádí na Petriho miskách (PM) a na 24- a 96-jamkových mikrotitračních destičkách (WP) kolagenovaných kolagenem typu I (from rat tail, Sigma-Aldrich). Kolagenace se provádí napipetováním v kyselině octové (20 mmol/l) rozpuštěného kolagenu do určené jamky WP či na Petriho misku a jeho ponechání zde po dobu 10 minut. Následuje jeho odlití a také nutná neutralizace pomocí K-H roztoku anebo Williamsova média E.

Potřebnou denzitu buněk pro kultivaci získáme naředěním původní suspenze hepatocytů pomocí kompletního Williamsova média E. Dávkované množství do PM či jamek na WP je následující: PM (2 ml, celkem $2 \cdot 10^6$ bb./PM), 1 jamka 24-WP (300 μ l, celkem $180 \cdot 10^3$ bb./jamku), 1 jamka 96-WP (100 μ l, celkem $30 \cdot 10^3$ bb./jamku). 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 (obr. 16). 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 a následné analýzy.



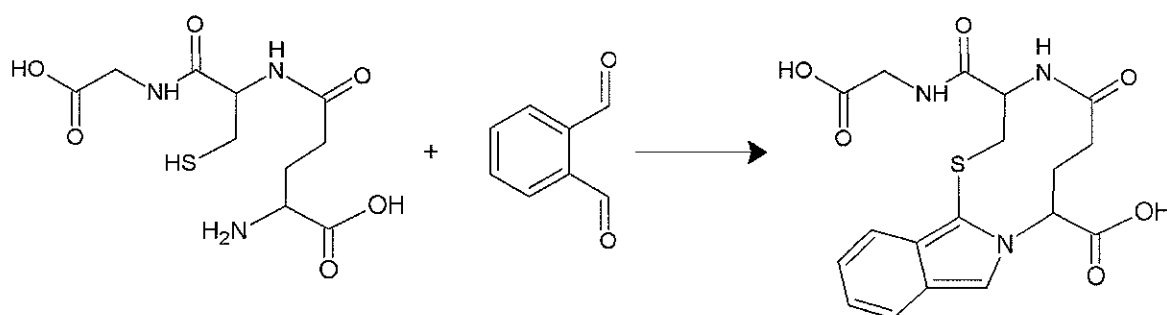
Obr. 16: Fotografie kultivovaných potkaních hepatocytů (2 hod. po izolaci; 400x)

4.5 Optimalizace fluorimetrického stanovení glutathionu

4.5.1 Princip stanovení GSH a GSSG

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 izoindolový kruh (GS-OPA) vykazující vysoký výtěžek fluorescence (obr. 17). 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 vystínit 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 $\lambda_{EX} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{EM} = 420 \text{ nm}$.



Obr. 17: Schéma reakce mezi GSH a OPA

4.5.2 Příprava standardů GSH a GSSG

Kalibrační řady GSH standardů byly připraveny postupným ředěním zásobního roztoku GSH (500 $\mu\text{mol/l}$) kyselinou chlorovodíkovou (1 mmol/l), přičemž výsledné koncentrace používaných standardů byly (0; 2,5; 10; 20; 50; 100 a 200 $\mu\text{mol/l}$ GSH). Standardy byly dále naředěny pomocí metafosforečné kyseliny (5%), a to v poměru 300 μl standardu : 600 μl MPA. Pro vlastní analýzu koncentrace GSH bylo odpipetováno 50 μl roztoku, který byl skladován při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

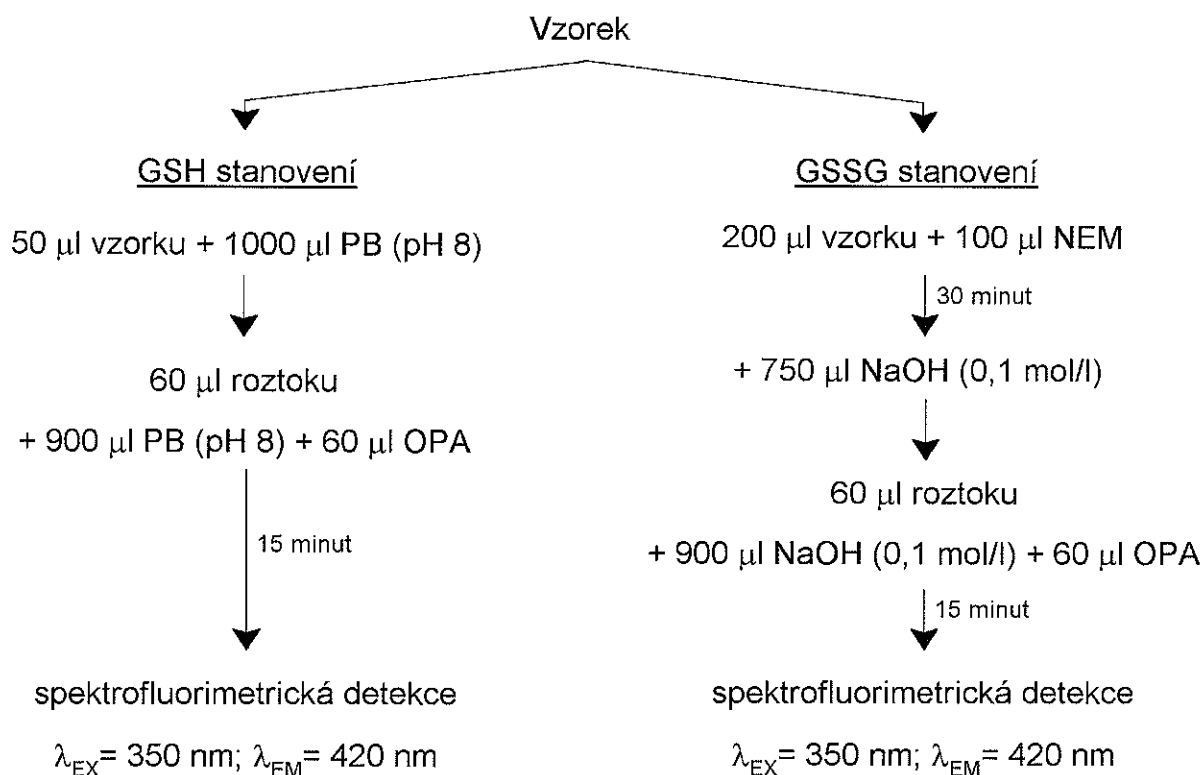
Postup pro přípravu standardů GSSG byl velmi podobný jako u GSH. Zásobní roztok GSSG (500 $\mu\text{mol/l}$) byl naředěn pomocí HCl (1 mmol/l) tak, aby byla připravena řada (0; 1; 5; 10; 20; 50; a 100 $\mu\text{mol/l}$ GSSG). Stejně jako u GSH byly vzorky dále v poměru 1:2 naředěny pomocí MPA (5%). Dále byly rozpipetovány po 200 μl do plastových mikrozkušavek, které byly uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby analýzy.

4.5.3 Příprava vzorků (lyzáty hepatocytů)

Z hepatocytárních primokultur na PM odebereme kultivační médium a ihned tyto PM vložíme do hlubokomrazicího boxu ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), kde je ponecháme po dobu 15 minut kvůli rozrušení buněčných membrán mrazem. Po vyjmutí okamžitě do každé PM napipetujeme 1 ml chlazené destilované vody ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), čímž dojde k dalšímu prohloubení lyze buněk. Škrabátkem pak oddělíme buňky od kolagenu a výslednou suspenzi napipetujeme do připravených mikrozkušavek a důkladně je protřepeme. Po 200 μl této suspenze pipetujeme do mikrozkušavek s 400 μl vychlazené MPA (10%), protřepeme a necháme působit 10 min. při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně opět protřepeme a centrifugujeme (13.500 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min.). Z každého vzorku napipetujeme 50 μl supernatantu pro stanovení GSH, resp. 200 μl pro stanovení GSSG do mikrozkušavek a skladujeme do doby analýzy ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.5.4 Spektrofluorimetrické stanovení - postup

Schéma původního stanovení GSH i GSSG (Hissin and Hilf 1976) je shrnuto na obr. 18. Cílem naší práce byla optimalizace celého postupu, a proto jsme se zaměřili na sledování analytických parametrů (sensitivita, specifita, přesnost) v závislosti na změnách podmínek reakce i detekce. Z tohoto důvodu byl testován vliv teploty, pH a vlnových délek detekce či doby inkubace. Po vyhodnocení všech výsledků bylo vypracováno upravené schéma postupu stanovení, které je uvedeno na obr. 19. S využitím tohoto optimalizovaného postupu byly stanoveny analytické parametry jak pro stanovení GSH, tak i GSSG.



Obr. 18: Schéma původního postupu stanovení GSH a GSSG (Hissin and Hilf 1976)

4.5.4.1 Instrumentace

Přístroj:	Spektrofluorimetr Aminco Bowman 2
Napětí na fotonásobičích:	760 V
Využívané programové moduly:	3D-scan, Time trace
Objem vzorku v kyvetě:	800 µl

4.5.4.2 Optimalizace metody - podmínky detekce (λ_{EX} a λ_{EM} , pH, T)

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 ověření potřebné doby reakce OPA a GSH 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 thiohy, 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 námi 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 různém pH: pro stanovení GSH to bylo pH 6 a 8, pro stanovení GSSG hodnoty pH 4, 5, 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 přídavků HCl (1 mol/l), přičemž výsledný objem roztoku byl shodný u všech testovaných hodnot pH.

Porovnáním výsledků byla zjištěna jako optimální hodnota pH 6, a to pro obě stanovení (GSH i GSSG).

Celkový postup optimalizovaného stanovení obou forem glutathionu je uveden na obrázku 19.

4.5.4.3 Stanovení analytických parametrů fluorimetrické metody

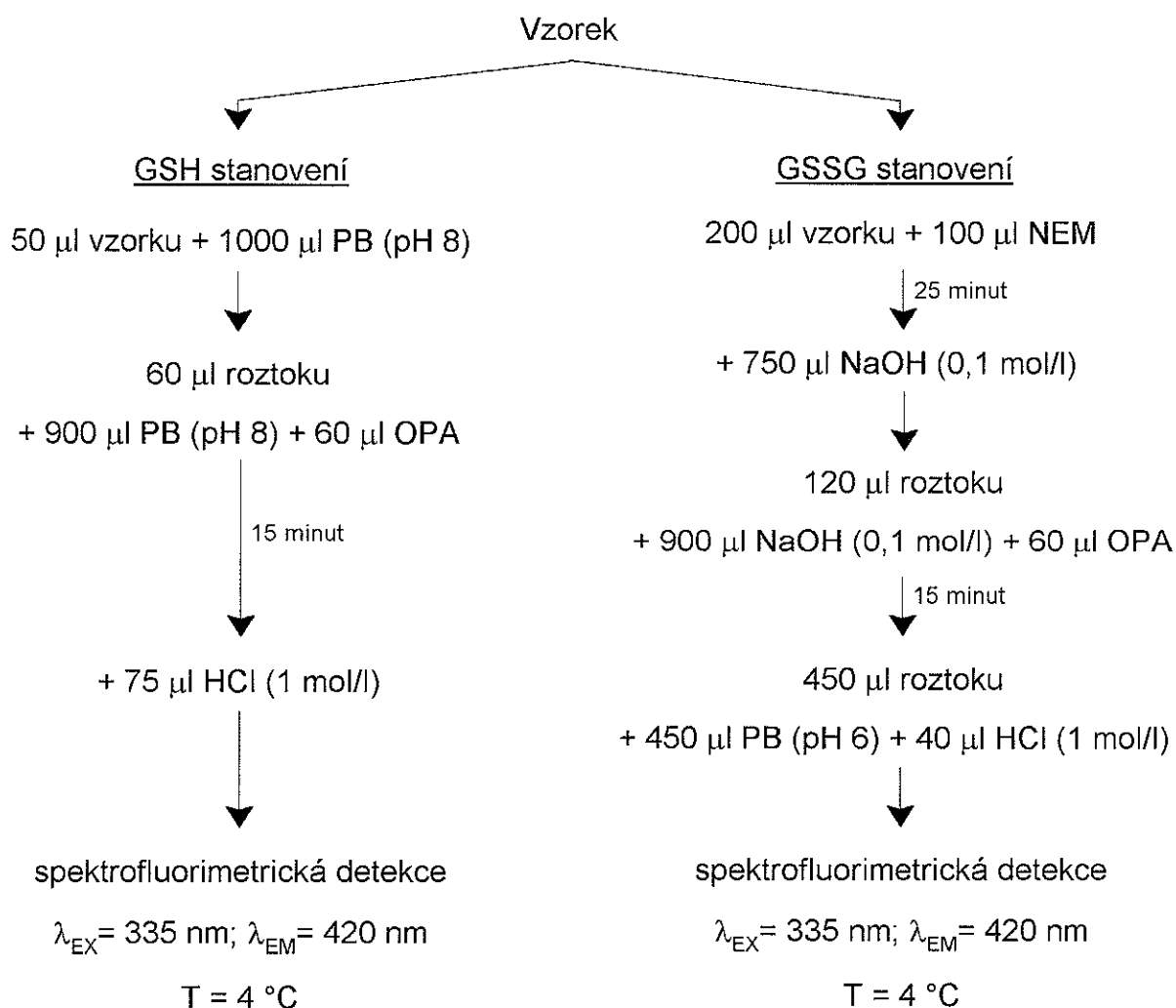
Během analýzy GSH i GSSG byly stanoveny analytické parametry. U vzorků a standardů byly zjištěny hodnoty intraassay ($n = 10$; CV%), pro charakterizaci kalibrace linearita a determinační koeficient (R^2).

4.5.4.4 Korelace s HPLC/FL metodou

Optimalizovanou metodou byly stanoveny koncentrace GSH a GSSG ve vzorcích; jako vzorky byly použity hepatocytární lyzáty z pokusů, kde byly používány různé hepatotoxické látky - *tert*-butylhydroperoxid, či acetaminofen. Totožné vzorky byly zároveň analyzovány pomocí HPLC/FL metody

(Kand'ár *et al.* 2007). Porovnáním koncentrací GSH a GSSG naměřených pomocí obou metod byl nakonec stanoven korelační koeficient.

Princip HPLC/FL metody je totožný s metodou spektrofotometrickou; při analýze GSH dochází nejprve k reakci GSH s OPA a po krátké inkubaci je vzniklý komplex GS-OPA chromatograficky analyzován. U analýzy GSSG je do postupu zahrnuto vystínění přítomného GSH pomocí NEM a následné rozštěpení oxidovaného glutathionu zpět na GSH. Dále je postup již shodný s postupem pro stanovení GSH. Vlastní chromatografická analýza probíhá na C₁₈ koloně (Discovery, Supelco, USA) s využitím fluorescenčního detektoru a HPLC sestavy (Shimadzu, Japonsko) (Kand'ár *et al.* 2007).



Obr. 19: Schéma optimalizovaného postupu stanovení GSH a GSSG

4.6 Studium hepatotoxického účinku acetaminofenu v podmínkách *in vitro*

4.6.1 Inkubace kultivovaných hepatocytů s acetaminofenem

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 o různých koncentracích AAP byly následně připipetovány k buňkám, a to v objemech: 2 ml/1 PM; 300 μ l/1 jamka v 24-WP; 100 μ l/1 jamka v 96-WP. Zároveň byly vždy připraveny také kontrolní buňky, ke kterým bylo připipetováno pouze kompletní Williamsovo médium E. Počet opakování u testování každé z koncentrací byl roven minimálně $n = 3$, u některých experimentů až $n = 8$. Buňky byly inkubovány s acetaminofenem po různě 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. Celkově byly u hepatocytů sledovány tyto biochemické parametry: aktivita laktátdehydrogenasy, LDH-leakage, aktivita buněčných dehydrogenas, syntéza albuminu, koncentrace GSH a GSSG, intracelulární produkce ROS a aktivita glutathionreduktasy.

4.6.2 Stanovení aktivity laktátdehydrogenasy

Stanovení enzymové aktivity laktátdehydrogenasy (LDH) je jedním z velmi používaných markerů buněčného poškození. Po poškození buňky, resp. po poškození buněčné membrány, dochází k průniku LDH do okolí, a proto můžeme její aktivitu měřit v médiu. Od aktivity LDH v médiu se navíc odvíjí druhý test, a to tzv. LDH-leakage (LDH-L), který také podává informaci o viabilitě buněk. LDH-L se získá z poměru LDH aktivity nalezené v médiu vůči celkové aktivitě LDH (v médiu a v buňce). LDH-L tedy vypovídá o procentu LDH, které uniklo z buňky do okolí.

4.6.2.1 Princip stanovení LDH

Laktátdehydrogenasa v buňce katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát, a i opačně, za současné přeměny NAD^+ na $\text{NADH}+\text{H}^+$. Této reakce se také využívá při její analýze, kdy je do reakčního roztoku přidán NAD^+ a laktát a je sledován nárůst absorbance při $\lambda = 340 \text{ nm}$ spektrofotometricky.

4.6.2.2 Provedení stanovení LDH

Ke stanovení aktivity LDH jsme využili diagnostický kit LDH (Sigma Aldrich, SRN). Pro měření extracelulární aktivity LDH jsme od buněk kultivovaných na PM odebrali médium, pro měření zbytkové intracelulární aktivity LDH jsme po odebrání média buňky ještě vložili do $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ na 15 minut, aby došlo k rozbití buněk mrazem. Po vyjmutí buněk z mrazicího boxu jsme připipetovali 1 ml vychlazené deionizované vody a po oddělení buněk od kolagenu a centrifugaci (13.500 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min) jsme již testovali LDH aktivitu.

Reakční činidlo obsahující laktát, NAD^+ , pufr (pH 8,9), azid sodný (5%) bylo dle návodu doplněno 10 ml deionizované vody, přelito do zkumavek a ty následně inkubovány 10 minut při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Do křemenné kyvety jsme napipetovali 1 ml připraveného činidla a 50 μl vzorku. Po promíchání byla absorbance měřena po 30 s do uplynutí 90 s. Rozdíl absorbancí byl porovnán s kalibrační závislostí a byla určena aktivita LDH, popř. z poměru extracelulární a celkové aktivity byla určena LDH-L. K analýze jsme používali UV/VIS spektrofotometr Shimadzu UV – 1601. LDH aktivita byla analyzována po inkubaci 4, 12 a 24 hod. s AAP.

4.6.3 WST-1 test

WST-1 test (Roche, SRN) je dalším testem, který se používá k hodnocení viability buněk, a to pomocí detekce intracelulární dehydrogenasové aktivity. Patří do skupiny viabilitních testů společně s XTT a MTT testy.

4.6.3.1 Princip WST-1 testu

K detekci aktivity buněčných, a to zejména mitochondriálních dehydrogenas se využívá redukce tetrazoliových solí (4-(3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2-H-5-tetrazolio)-1,3-benzen-disulfonát), které jsou aktivními dehydrogenasami přeměněny na barevné formazany. Tato přeměna je detekována spektrofotometricky.

4.6.3.2 Postup při WST-1 testu

Po uplynutí inkubace buněk s AAP bylo z 96-jamkových mikrotitračních destiček odstraněno médium. K buňkám bylo následně připipetováno činidlo WST-1 (po 100 μ l), které bylo předtím naředěno 10:1 v PBS. Následně byla ve všech jamkách proměřena absorbance ($\lambda = 440$ nm) a WP s buňkami byla na 1 hodinu umístěna do CO₂ inkubátoru (5% CO₂, 37 °C). Po uplynutí této doby byla opět proměřena absorbance ($\lambda = 440$ nm). Následně byl zjištěn rozdíl absorbancí pro každou z jamek a výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako procenta signálu kontrolních vzorků. Analýza byla prováděna na destičkovém spektrofotometru TECAN Infinite M200. Viabilita kultivovaných hepatocytů byla pomocí testu WST-1 sledována po 1, 3, 6, 12 a 24 hod. inkubace s AAP.

4.6.4 Syntéza albuminu

Jedním ze stanovení funkčních parametrů hepatocytů, které se v současné době používá, je analýza syntézy albuminu v hepatocytech.

4.6.4.1 Princip stanovení syntézy albuminu

Albumin je protein, který je syntetizovaný výhradně v hepatocytech. U hepatocytů *in vitro* je syntetizovaný albumin uvolňován do média, a proto je třeba využít velmi citlivou a specifickou metodu pro jeho stanovení. My využíváme imunochemickou enzymatickou nekompetitivní sendvičovou metodu, ELISA, která využívá specifických protilátek proti potkanímu albuminu.

4.6.4.2 Postup stanovení albuminu metodou ELISA

Ke kvantifikaci v kultivačním médiu obsaženého albuminu slouží Rat Albumin ELISA Quantitation Kit (Bethyl, USA). Do jamek 96-j. mikrotitrační destičky jsme napipetovali 100 μ l naředěných ovčích protilátek proti potkanímu albuminu (ředěno 1:100 v pufru). K přichycení těchto protilátek ke stěně destičky jsme jako optimální dobu zvolili 60 minut, a poté jsme jamky 3x promývali promývacím roztokem. Ke znemožnění navázání protilátek na stěnu destiček v dalších krocích stanovení jsme aplikovali blokovací roztok (200 μ l, 30 minut) a poté všechny jamky opět promyli 3x promývacím roztokem. Následně jsme přidali 100 μ l naředěných vzorků resp. standardů. Po 60 minutách inkubace jsme jamky promyli 5x promývacím roztokem. Pro kalibrační křivku jsme použili ředění standardu (500; 250; 125; 62,5; 31,25 a 15,625 ng albuminu/ml). Ředění vzorků jsme provedli s ohledem na jejich umístění v lineárním úseku kalibrační křivky.

Po promytí jsme do jamek připipetovali 100 μ l protilátky značené křenovou peroxidasou (ředění 1 : 30000) a opět probíhala inkubace 60 minut. Následovalo 5x vypláchnutí promývacím roztokem a do každé jamky jsme aplikovali 100 μ l substrátového roztoku. Po 25 minutách byla reakce zastavena 100 μ l H_2SO_4 (2 mol/l) a barevný produkt byl stanovován spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Experimenty byly prováděny na přístroji TECAN Infinite M200. Syntéza u potkaních hepatocytů byla stanovována pouze po uplynutí 24 hodinové inkubace s AAP.

4.6.5 Stanovení koncentrace glutathionu

Intracelulární hladiny GSH a GSSG byly stanoveny jak pomocí HPLC/FL (Kand'ár *et al.* 2007), tak i pomocí nově zavedené spektrofluorimetrické metody.

Podrobný postup obou metod včetně přípravy vzorků z kultivovaných hepatocytů je uveden v kapitole 4.5 .

4.6.6 Stanovení intracelulární produkce ROS

V poslední době se objevily metody, které umožňují stanovit produkci intracelulární produkci ROS pomocí tzv. ROS sond. Tyto sloučeniny jsou po reakci s reaktivní formou kyslíku či dusíku oxidovány a tím je umožněna

jejich fluorimetrická detekce. Většina ROS sond jsou strukturální analoga fluoresceinu, jednou z nejčastěji užívaných je DCFDA (dichlórodihydrofluorescein diacetát).

4.6.6.1 Princip stanovení ROS pomocí DCFDA

DCFDA a jeho analoga se po reakci s ROS oxidují a vykazují fluorescenci typickou pro fluorescein. DCFDA není sondou specificky reagující pouze s daným typem ROS. DCFDA spíše informuje o celkové produkci řady ROS, neboli o přítomnosti oxidačního stresu (Halliwell and Whiteman 2004).

4.6.6.2 Postup stanovení produkce ROS

K detekci produkce ROS byla využita ROS sonda CM-DCFDA, 5-, 6-chlóromethyl-2',7'-dichlórodihydrofluorescein diacetát (Molecular Probes, USA). Produkce ROS byla stanovována ve 24-WP, ze kterých bylo po uplynutí doby inkubace odstraněno médium s AAP. Následně byly jamky s buňkami propláchnuty roztokem PBS a bylo připipetován pracovní roztok CM-DCFDA (1 $\mu\text{mol/l}$, v PBS). Destička s buňkami byla umístěna do CO₂ inkubátoru (5% CO₂, 37 °C) a zde byla ponechána 45 minut. Po uplynutí této doby byl z jamek odstraněn roztok CM-DCFDA a do jamek byl napipetován roztok PBS. Ihned potom byla fluorimetricky proměřena počáteční intenzita fluorescence ($\lambda_{\text{EX}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 535 \text{ nm}$), a po 60 minutách byla fluorescence proměřena znovu. Mezitím byla 24-WP inkubována v CO₂ inkubátoru (5% CO₂, 37 °C).

Výsledná míra produkce ROS byla vypočtena jako podíl mezi nárůstem fluorescence během 60 minut (rozdíl mezi intenzitou fluorescence v 60 minutě a v 0 minutě) a intenzitou fluorescence v 0 minutě. Měření fluorescence bylo prováděno na přístroji TECAN Infinite M200. Hepatocytární produkce ROS byla sledována po 3, 12 a 24 hod. inkubace s AAP.

4.6.7 Stanovení aktivity glutathionreduktasy

4.6.7.1 Princip stanovení aktivity GR

Glutathionreduktasa je intracelulární enzym schopný přeměny GSSG na GSH za součinnosti s NADPH+H⁺. Této reakce se využívá i při stanovení aktivity GR, kdy je do vzorku s GR přidáno v nadbytku GSSG a NADPH+H⁺. Následně je spektrofotometricky detekován úbytek absorbance při $\lambda = 340$ nm (Carlberg and Mannervik 1975).

4.6.7.2 Postup stanovení aktivity GR

Po uplynutí doby inkubace s AAP bylo z jamek ve 24-WP odstraněno médium obsahující AAP a k buňkám bylo napipetováno 600 μ l deionizované vody. Každá jamka byla následně sonikována pětisekundovými pulzy pomocí sonikátoru Bandelin Sonopuls. Vzniklá suspenze byla odpipetována a 10 minut centrifugována (8.000 g, 4 °C). Ze supernatantu byl odebrán objem 400 μ l roztoku, který byl společně s GSSG a NADPH napipetován do 24-WP (výsledné koncentrace GSSG, 3,1 mmol/l a NADPH, 0,23 mmol/l). Aktivita GR byla určena z poklesu absorbance při $\lambda = 340$ nm spektrofotometricky na destičkovém spektrofotometru TECAN Infinite M200. Enzymová aktivita GR byla stanovována po uplynutí 3, 12 a 24 hod. inkubaci a byla vyjádřena jako U/mg proteinů. (1 U byla definována jako nmol GSSG redukované během jedné minuty; pro výpočet byl využit molární extinkční koeficient pro NADPH $6,22 \cdot 10^3$ l.mol⁻¹.cm⁻¹.)

4.6.8 Stanovení proteinů

4.6.8.1 Princip stanovení proteinů

Ke stanovení proteinů jsme zavedli metodu dle Bradforda, ve které je využívána Coomassie Brilliant Blue (Bradford 1976). Tato látka má vysokou afinitu k bílkovinám, resp. k některým aminokyselinám, a po jejím navázání na jejich strukturu dochází ke změně spektrálních vlastností, jež jsou detekovány.

4.6.8.2 Postup stanovení proteinů

Stanovení dle Bradforda (Bradford 1976) je svým rozsahem použitelných koncentrací proteinů velmi podobné další velmi používané metodě dle Lowryho (Lowry *et al.* 1951). Z těchto důvodů je vzorky vždy nutné naředit do rozmezí 1 - 100 µg/ml deionizovanou vodou. Vlastní stanovení probíhá v 96-WP, kam je napipetováno 10 µl vzorku a 300 µl Bradfordova činidla obsahujícího Coomassie Blue. Stejný poměr objemů je také využíván u přípravy kalibrační řady v rozmezí (1 - 150 µg/ml). Následně je mikrotitrační destička se vzorky inkubována 10 minut ve tmě za laboratorní teploty a poté je při $\lambda = 595$ nm detekována absorbance. Porovnáním absorbancí s kalibrační řadou a započtením ředění jsou spočteny výsledné koncentrace proteinů ve vzorcích.

4.7 Studium příčin inhibice glutathionreduktasy nalezené u AAP toxicity

4.7.1 Příprava glutathionreduktasy pro studium inhibice

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 (10^6 bb./ml v K-H roztoku). Buňky byly nejprve centrifugovány (10 minut, 28 g, 15 °C) a po odlití supernatantu bylo k buňkám připipetováno 600 μ l deionizované vody. Následně byly hepatocyty lyzovány pětisekundovou sonikací (Bandelin Sonopuls), po které byla opět provedena centrifugace (10 minut, 8.000 g, 4 °C). Získaný supernatant byl odpipetován a uskladněn při -20 °C v mikrozkuvkách až do doby analýzy. Pro stanovení inhibice byly použity vzorky s aktivitou glutathionreduktasy 0,04 U/ml, a to jak u hepatocytární, tak i u kvasinkové GR.

4.7.2 Produkce AAP-GSH konjugátu

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 (při +600 mV), který ihned reaguje s GSH přítomným v roztoku. Touto reakcí vzniká 3-(glutathion-S-yl)acetaminofen, jenž je již stabilní.

Postup byl realizován přesně v souladu s publikovaným stanovením a to tak, že byl připraven roztok fosfátového pufru (100 mmol/l, pH 7,4) obsahující AAP (0,5 mmol/l) a GSH (5 mmol/l). Elektrochemická oxidace AAP v tomto roztoku byla prováděna při určeném potenciálu (+600 mV) celkem 1 hodinu, po které byl roztok skladován při 4 °C do doby jeho dalšího použití. Příprava AAP-GSH konjugátu byla realizována na elektrochemickém potenciostatu BAS100W (Bioanalytical Systems).

4.7.3 Studium inhibice glutathionreduktasy v přítomnosti AAP-GSH

Princip stanovení aktivity glutathionreduktasy byl shodný s již uvedeným (kapitola 3.6.7.2), kdy byl sledován pokles absorbance NADPH při $\lambda = 340$ nm. Aktivita GR byla měřena v prostředí fosfátového pufru (200 mmol/l, pH 7,5), kde výsledné koncentrace ostatních látek během všech experimentů byly: GR (0,016 U/ml), GSSG (4 mmol/l), NADPH (0,7 mmol/l).

Inhibice glutathionreduktasy byla studována po přidavku roztoku obsahujícího AAP-GSH konjugát do jamky mikrotitrační destičky s přítomnou GR; výsledná koncentrace AAP-GSH v jedné jamce byla nakonec 1 μ mol/l, popř. 1,5 μ mol/l. (Testovaný roztok tedy obsahoval GR, GSSG, NADPH, AAP-GSH, a dále také nezreagovaný 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. Experimenty byly vypracovány na přístroji TECAN Infinite M200.

4.8 Statistická analýza

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 po 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

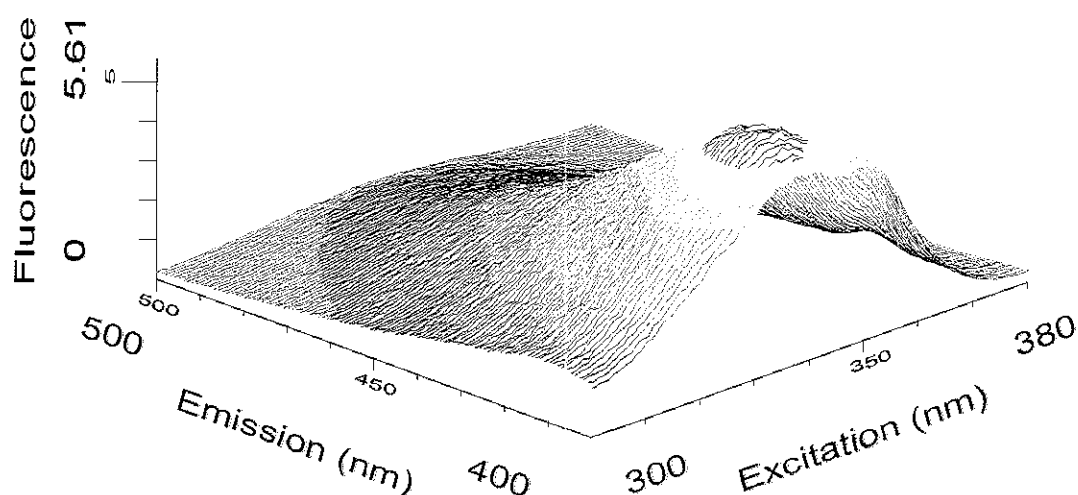
5.1 Optimalizace fluorimetrického stanovení glutathionu

5.1.1 Optimalizace detekčních podmínek

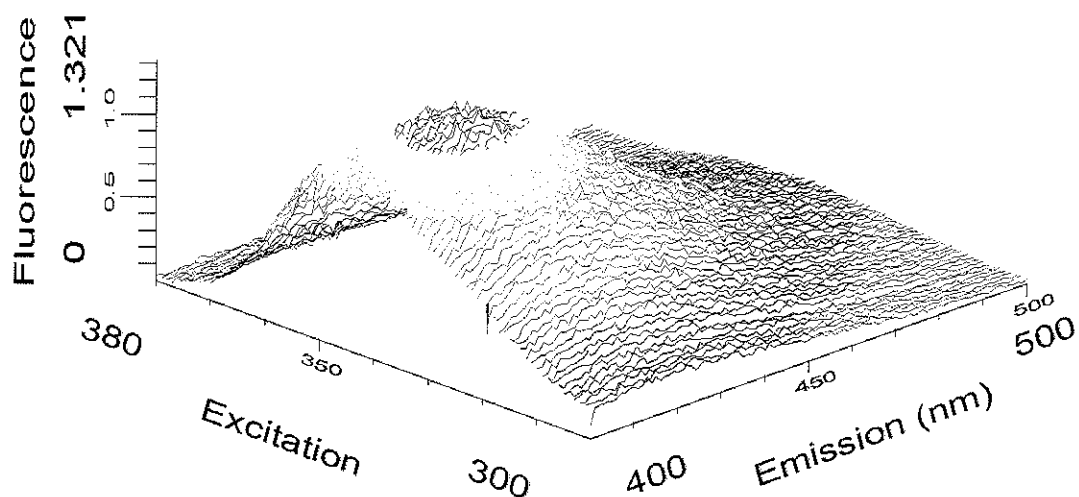
Při spektrofluorimetrickém stanovení GSH a GSSG jsme testovali vliv teploty a pH na intenzitu fluorescence, přesnost a opakovatelnost. Stejně tak jsme optimalizovali vlnové délky excitace a emise či dobu reakce mezi GSH a OPA. Takto byly zjištěny optimální podmínky analýzy, které jsou shrnuty v tabulce V; pro srovnání jsou také uvedeny původní hodnoty z práce Hissina a Hilfa (Hissin and Hilf 1976). Na dalších obrázcích jsou zobrazeny vybrané grafy či závislosti. Grafy 1 a 2 zobrazují 3D fluorescenční spektra produktu reakce GSH a OPA u obou stanovení.

Tab. V: Přehled optimalizovaných detekčních podmínek a jejich porovnání s původními hodnotami

Parametr	Původní hodnota	Optimalizovaná hodnota
$\lambda_{EX} / \lambda_{EM}$	350 nm / 420 nm	335 nm / 420 nm
doba reakce GSH a OPA	t = 15 minut	t = 15 minut
teplota	20 °C	4 °C
pH roztoku	pH 8 (GSH) pH 12 (GSSG)	pH 6 (GSH i GSSG)

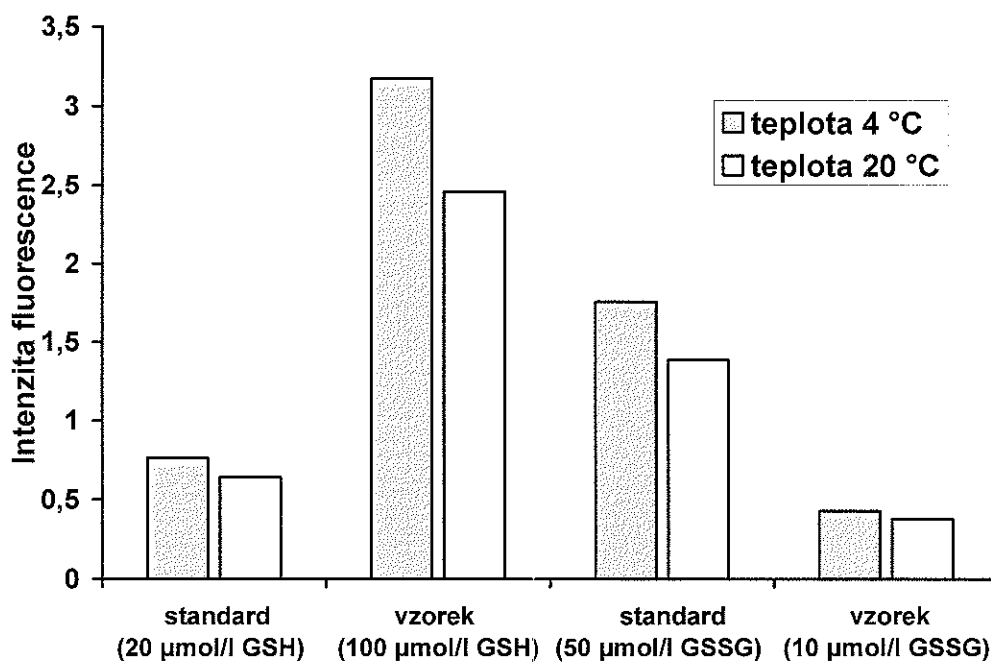


Graf 1: 3D fluorescenční spektrum GS-OPA (standard, 200 µmol/l GSH)



Graf 2: 3D fluorescenční spektrum GS-OPA (standard, 20 $\mu\text{mol/l}$ GSSG)

V grafu 3 je zobrazen vliv teploty na stanovení GSH a GSSG. Z těchto grafů je patrné, že snížení teploty z původních 20 $^{\circ}\text{C}$ na 4 $^{\circ}\text{C}$ vede ke zvýšení intenzity fluorescence až o 25%.

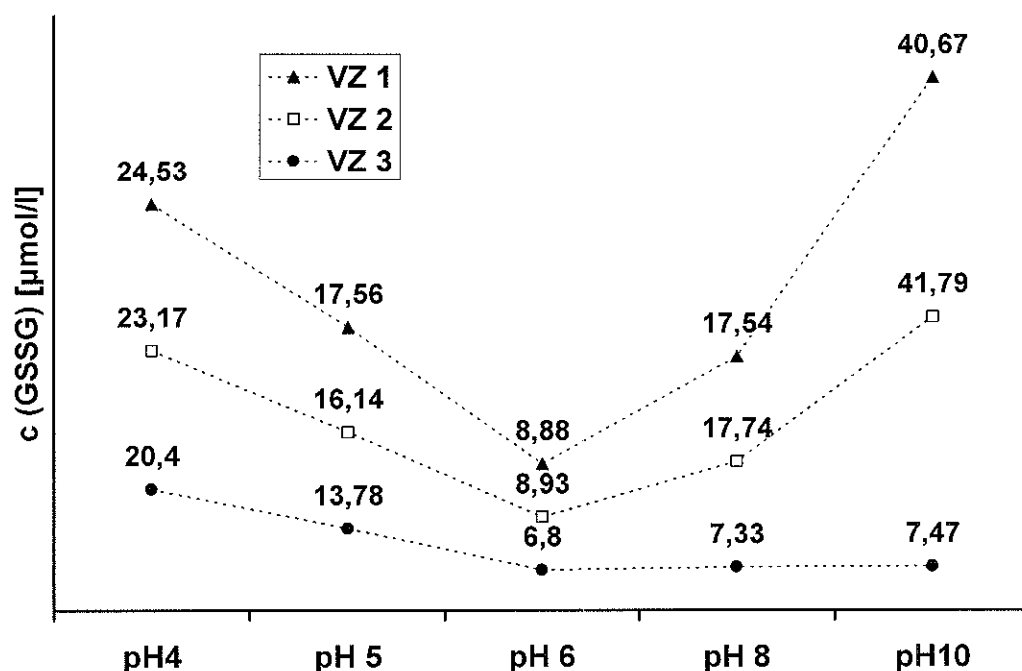


Graf 3: Vliv teploty na intenzitu fluorescence při stanovení GSH a GSSG (Standard, popř. vzorek = lyzát hepatocytů, o koncentraci uvedené v závorce byl analyzován při obou teplotách 4 $^{\circ}\text{C}$ a 20 $^{\circ}\text{C}$ a zjištěné IF byly porovnány.)

Dalším testovaným parametrem byla hodnota pH roztoku při detekci. U 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 (tab. VI). U stanovení GSSG byl podobný trend nalezen i u snižujících se hodnot pH (graf 4). S ohledem na mnohem nižší zjištěné hodnoty variačního koeficientu CV% a také na absolutní hodnoty koncentrací bylo jako optimální pH určeno pH 6.

Tab. VI: Vliv pH na přesnost stanovení GSH
(ST – standard; VZ – vzorek)

Vzorek / standard	CV% (pH 6)	CV% (pH 8)
ST ($c_{\text{GSH}} = 20 \mu\text{mol/l}$)	3,67	10,64
ST ($c_{\text{GSH}} = 100 \mu\text{mol/l}$)	0,92	4,14
VZ ($c_{\text{GSH}} = 6 \mu\text{mol/l}$)	2,68	15,99
VZ ($c_{\text{GSH}} = 35 \mu\text{mol/l}$)	1,58	4,83



Graf 3: Vliv pH na koncentraci GSSG zjištěnou ve vzorku

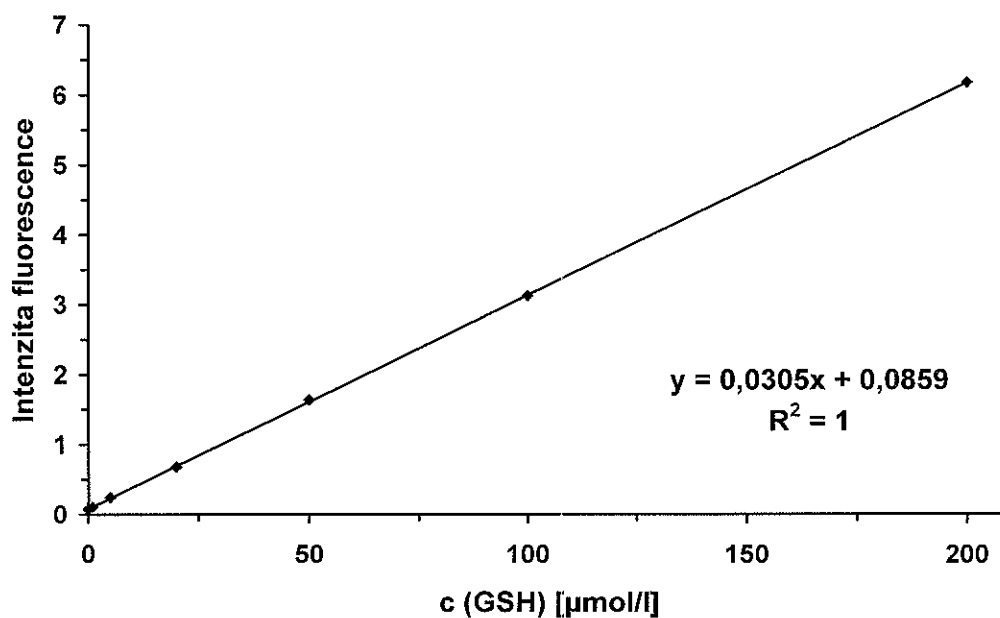
5.1.2 Stanovení analytických parametrů fluorimetrické metody

Po optimalizaci podmínek reakce a detekce jsme pro stanovení obou forem glutathionu zjistili analytické parametry metody. Pro GSH i GSSG byly stanoveny: linearita a determinační koeficient kalibrace, a u vzorků, popř. standardů intra-assay ($n = 10$). Dále byla také sledována stabilita vzorků při skladování v 4 °C.

Výsledné analytické parametry obou stanovení jsou shrnuty v tabulce VII., graf 4 zobrazuje kalibrační závislost GSH. 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, $R^2 = 0,9999$).

Tab. VII: Analytické parametry stanovení GSH a GSSG

Parametr	Stanovení GSH	Stanovení GSSG
přesnost kalibrace	$R^2 = 1$	$R^2 = 0,999$
linearita (pro 760 V)	$c = 0 - 500 \mu\text{mol/l}$	$C = 0 - 200 \mu\text{mol/l}$
intra-assay (vzorek)	$\ll 5\%$	$< 5\%$
intra-assay (standard)	$\ll 5\%$	$< 5\%$
stabilita při 4 °C	~ 24 hod.	~ 24 hod.



Graf 4: Kalibrace GSH

5.1.3 Korelace s HPLC/FL metodou

Po stanovení 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 (tab. VIII).

Tab. VIII: Porovnání koncentrací GSH a GSSG ve vzorcích - korelace
(tBHP – *tert*-butylhydroperoxid; AAP, acetaminofen)

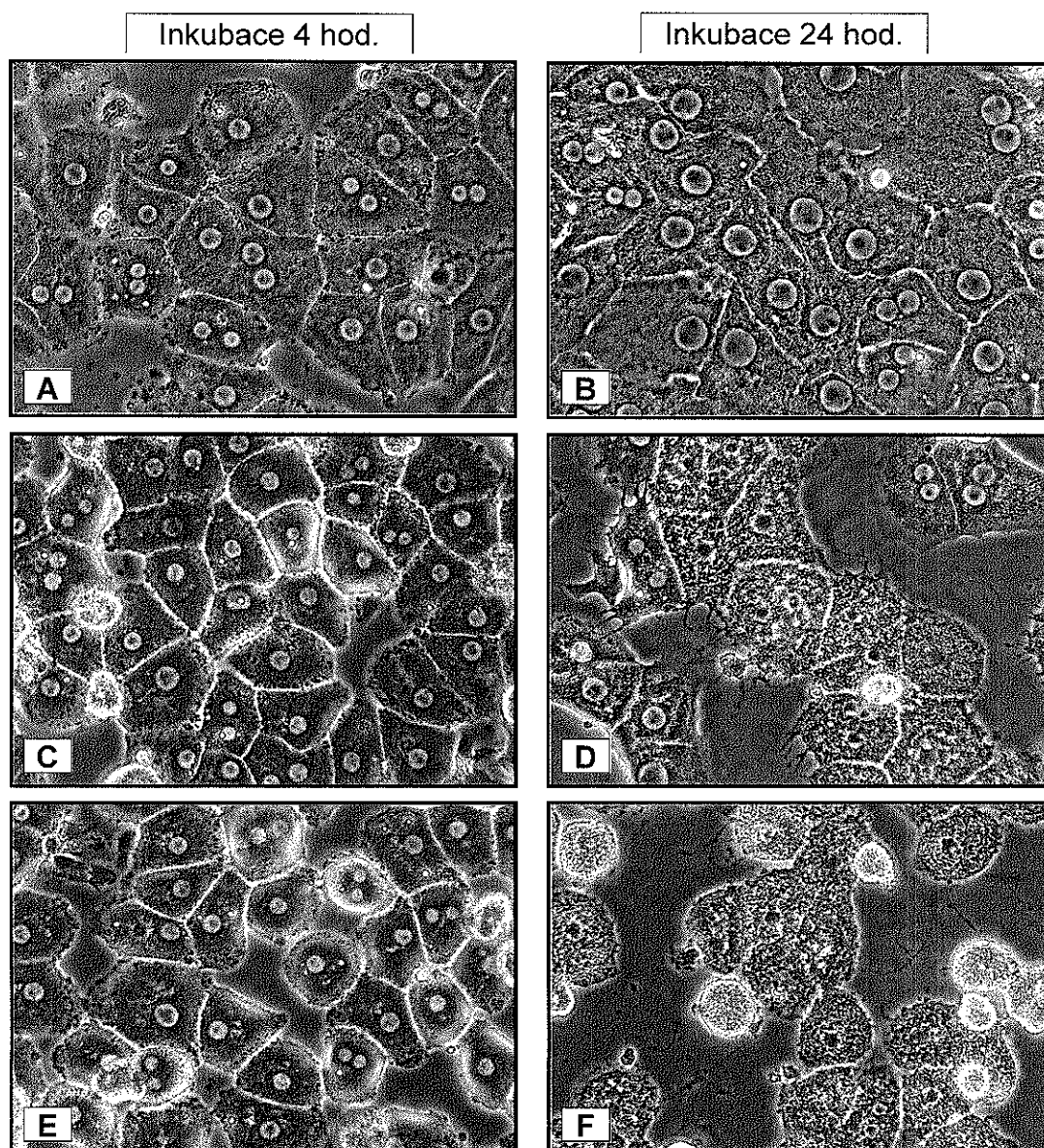
Parametr	c (GSH) [$\mu\text{mol/l}$]	c (GSSG) [$\mu\text{mol/l}$]
	Flu. metoda / HPLC/FL	Flu. metoda / HPLC/FL
vzorek 1 (kontrola)	51,71 / 52,44	6,78 / 5,93
vzorek 2 (kontrola)	53,22 / 54,22	11,08 / 12,07
vzorek 3 (tBHP)	47,91 / 44,34	6,19 / 5,40
vzorek 4 (tBHP)	25,87 / 24,39	6,93 / 5,11
vzorek 5 (AAP)	2,36 / 0,00	0,78 / 1,33

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*

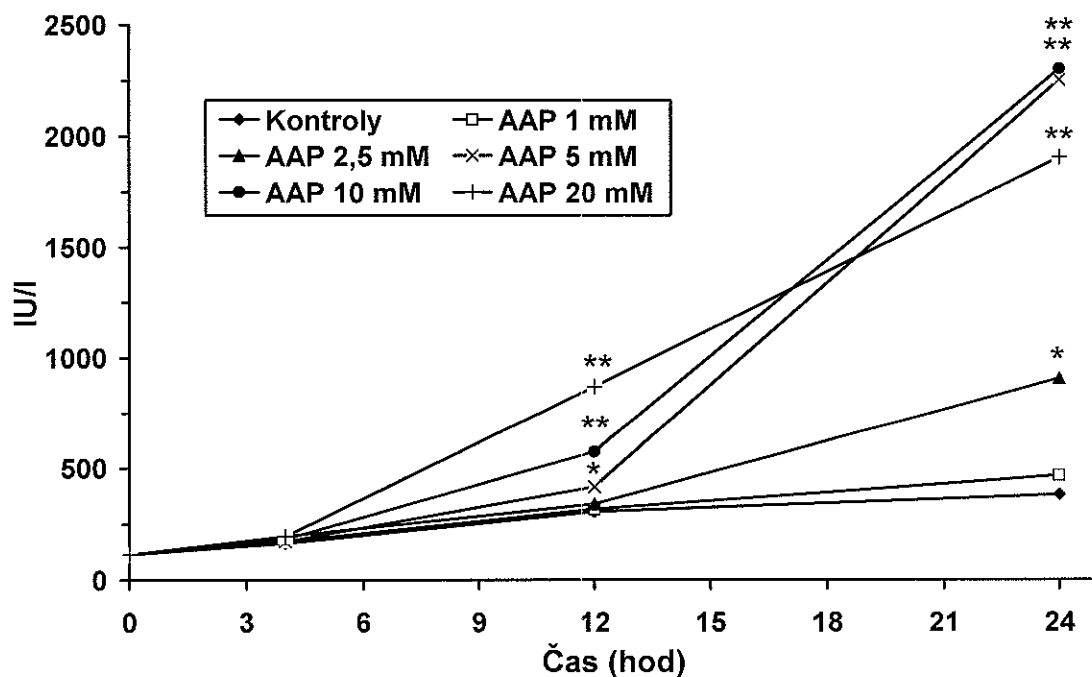
5.2.1 Testování vlivu acetaminofenu na viabilitu buněk

Po dovršení požadované doby inkubace kultivovaných hepatocytů s acetaminofenem (koncentrace 1; 2,5; 5; 10 a 20 mmol/l AAP) byly testovány změny viability, a to s pomocí stanovení laktátdehydrogenasy (aktivita v médiu, LDH-leakage) a testu WST-1. Dále také byly po 4 h a 24 h inkubace pořízeny fotografie hepatocytárních primokultur, na kterých je jasně zřetelný toxický vliv AAP (obr. 17).



Obr. 17: Toxické poškození hepatocytů acetaminofenem (400X)
(A,B – kontroly; C,D – 2,5 mmol/l AAP; E,F – 10 mmol/l AAP)

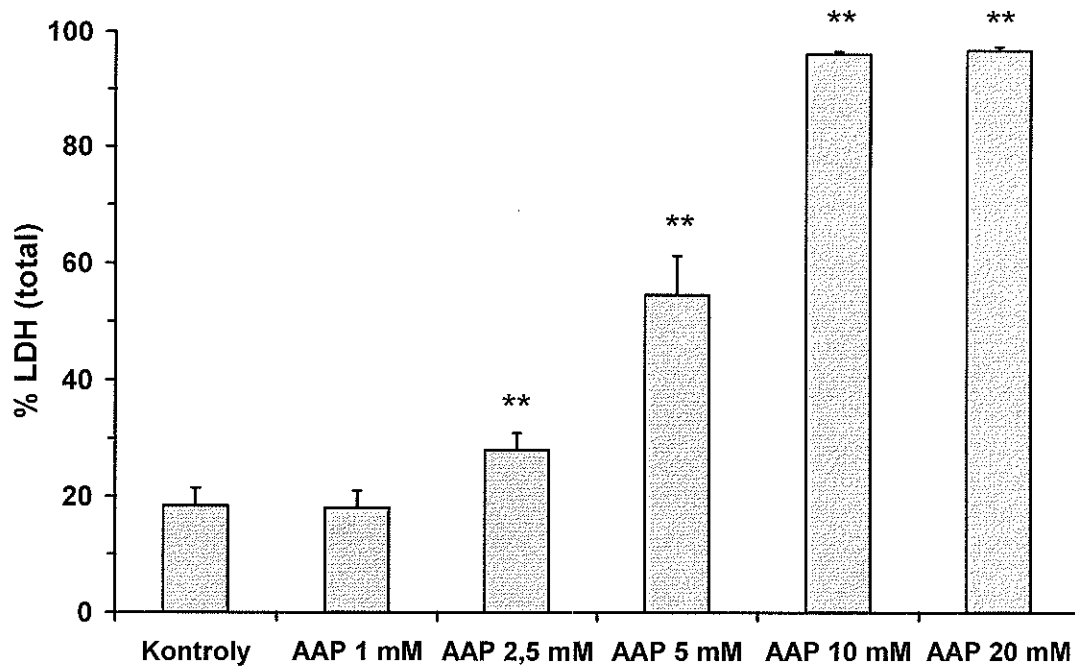
Extracelulární LDH aktivita v médiu byla analyzována po 4, 12 a 24 hodinách (graf 5). Po prvních čtyřech hodinách inkubace s AAP nebylo nalezeno signifikantní zvýšení aktivity LDH u žádné z koncentrací. To nastalo u tří nejvyšších koncentrací AAP až po 12 h inkubace, přičemž po 24 h byly statisticky 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. Zajímavostí je pokles aktivity LDH u 20 mmol/l AAP zjištěný po 24 h. Tento pokles lze s ohledem na hodnoty LDH-leakage (graf 6) vysvětlit pouze pravděpodobným poklesem aktivity LDH, resp. poškozením enzymu, u této koncentrace AAP. LDH-leakage byla stanovována pouze po 24 hodinách od začátku inkubace a z výsledků je patrný jasný nárůst LDH uvolněné z buňky v závislosti na dávce AAP.



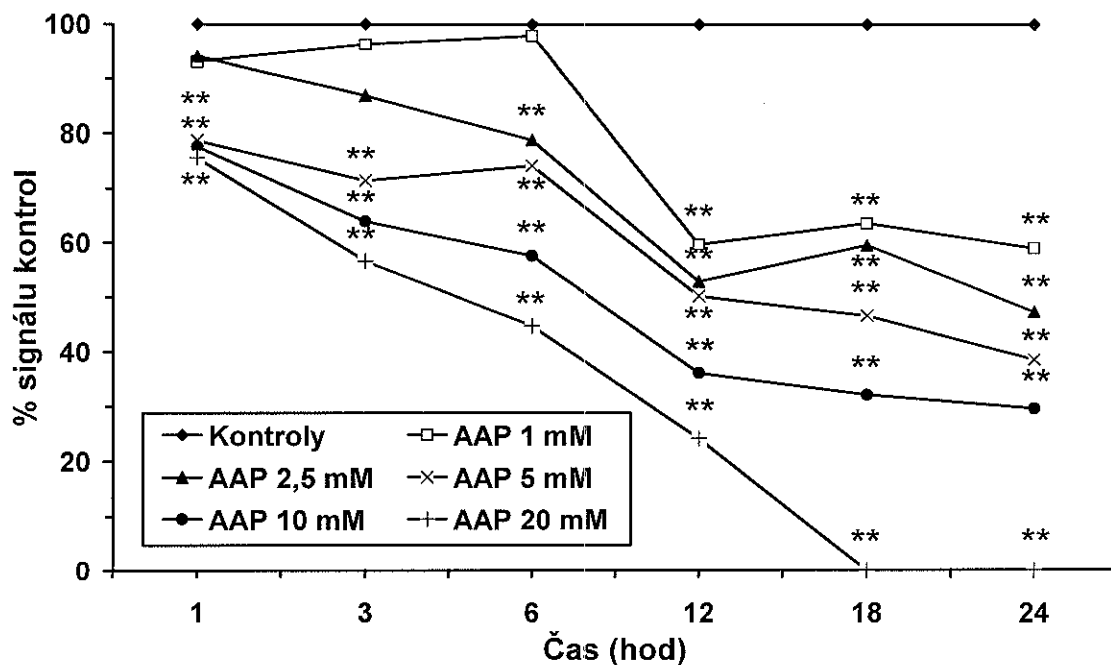
Graf 5: Aktivita LDH v médiu (průměr; n = 3)
(*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; vs. kontroly)

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 (graf 7), ukázal na signifikantní rozdíly v enzymové aktivitě mezi buňkami už po jedné hodině AAP inkubace. V tomto intervalu 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 detekovaná aktivita, u ostatních koncentrací AAP byl znatelný další pokles.



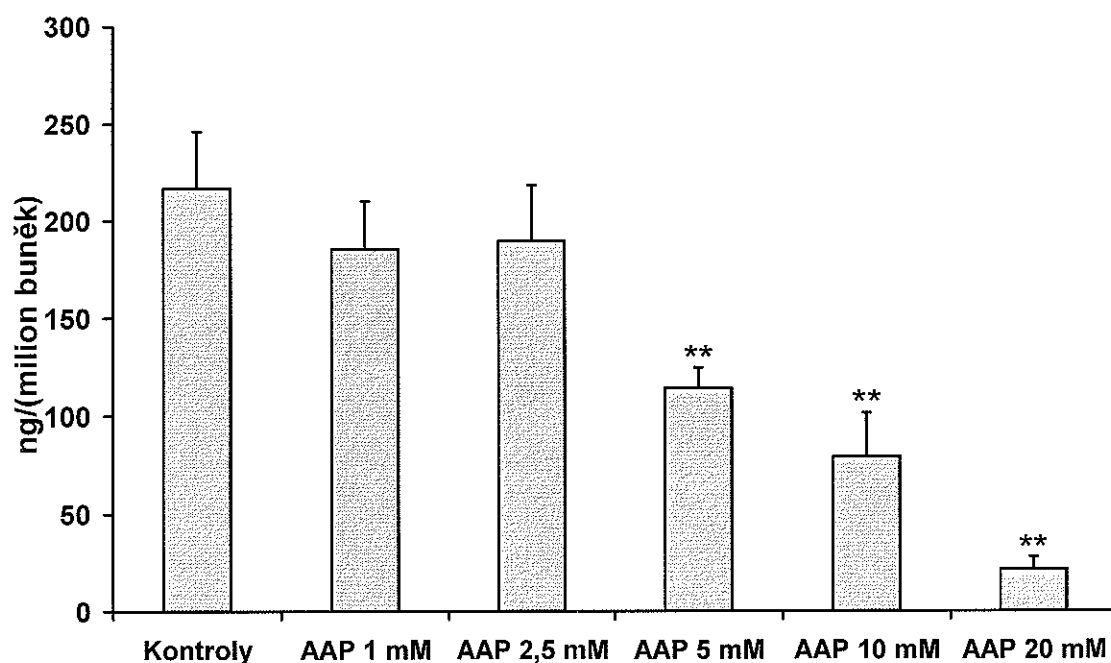
Graf 6: LDH-leakage po 24 hod (průměr ± SD; n = 4)
(**, p < 0,01; vs. kontroly)



Graf 7: WST-1 test (průměr; n = 8)
(**, p < 0,01; vs. kontroly)

5.2.2 Vliv acetaminofenu na funkční kapacitu hepatocytů

Ke zjištění vlivu AAP na funkci hepatocytů byla studována syntéza a produkce albuminu. Stanovení bylo prováděno pouze po 24 h inkubace s AAP a po uplynutí této doby byla zjištěna signifikantní redukce produkce albuminu u koncentrace 5 mmol/l AAP a vyšších (graf 8). 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%.



Graf 8: Produkce albuminu po 24 hod (průměr ± SD; n = 4)
(**, p < 0,01; vs. kontroly)

5.2.3 Vliv acetaminofenu na redox stav hepatocytů

Kromě výše uvedených stanovení jsme se dále zaměřili na charakterizaci změn redox stavu v intracelulárním prostředí. S ohledem na to jsme u buněk inkubovaných s acetaminofenem stanovili koncentrace glutathionu a míru intracelulární produkce ROS.

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 (tab. IX). 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 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.

Tab. IX Produkce ROS v hepatocytech po inkubaci s AAP (průměr \pm SD; n = 4)

(* , p < 0,05; ** , p < 0,01; vs. kontroly)

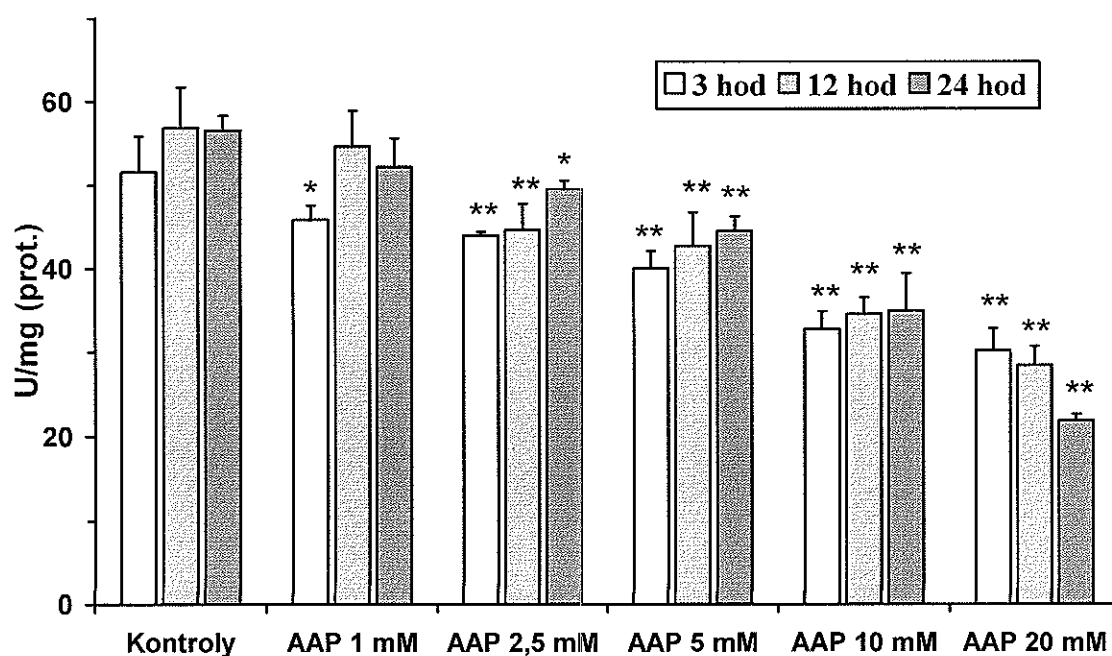
(Po odstranění média s AAP byly buňky 45 minut inkubovány s CM-DCFDA. Následně byl roztok s CM-DCFDA odstraněn také a k buňkám byl připipetován roztok PBS. Vlastní produkce ROS byla fluorimetricky stanovována v čase 0 a po 60 minutách. Tvorba ROS je v tabulce vyjádřena jako procentuální poměr rozdílu hodnot fluorescence po 60 minutách vůči hodnotě fluorescence v čase 0. Čísla uvedená v závorkách udávají poměr vůči signálu kontrol v daném časovém intervalu.)

	3 hod.	12 hod.	24 hod.
Kontroly	90 \pm 6 %	25 \pm 10 %	36 \pm 9 %
AAP 1 mM	137 \pm 55 %	45 \pm 6 %	22 \pm 4 %
(koeficient, vs. kontroly)	(1,51)	(1,82)	(0,63)
AAP 2,5 mM	179 \pm 40 % **	74 \pm 21 %	35 \pm 16 %
(koeficient, vs. kontroly)	(1,98)	(3,00)	(1,00)
AAP 5 mM	147 \pm 33 %	126 \pm 47 % **	67 \pm 13 % *
(koeficient, vs. kontroly)	(1,63)	(5,11)	(1,88)
AAP 10 mM	189 \pm 35 % **	146 \pm 30 % **	211 \pm 9 % **
(koeficient, vs. kontroly)	(2,10)	(5,91)	(5,96)
AAP 20 mM	177 \pm 16 % **	217 \pm 19 % **	178 \pm 20 % **
(koeficient, vs. kontroly)	(1,97)	(8,76)	(5,03)

Glutathion, a to jak redukovaný tak oxidovaný, jsme stanovovali po 24 h inkubace s AAP, a detekovatelné hladiny GSH jsme našli kromě kontrol ($62,9 \pm 6,8 \mu\text{mol/l}$) pouze u hepatocytů inkubovaných s 1 mmol/l AAP ($41,29 \pm 2,8 \mu\text{mol/l}$ **). Naproti tomu GSSG byl detekovatelný u všech koncentrací AAP. Jeho koncentrace byly: ($5,9 \pm 1,7 \mu\text{mol/l}$) kontroly, ($5,54 \pm 1,1 \mu\text{mol/l}$) 1 mmol/l AAP, ($1,5 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ **) 2,5 mmol/l AAP a ($0,48 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$ **) pro 5 mmol/l AAP. Vyšší koncentrace AAP způsobily u hladin GSSG pokles srovnatelný s koncentrací 5 mmol/l AAP. (**, $p < 0,01$ – srovnání s kontrolními hodnotami)

5.2.4 Vliv AAP toxicity na aktivitu glutathionreduktasy

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 (graf 9). 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 – $56,5 \pm 1,8$; $52,2 \pm 3,4$; $49,5 \pm 1,0$; $44,5 \pm 1,7$; $34,9 \pm 4,5$ and $21,8 \pm 0,7$ U/mg proteinu.



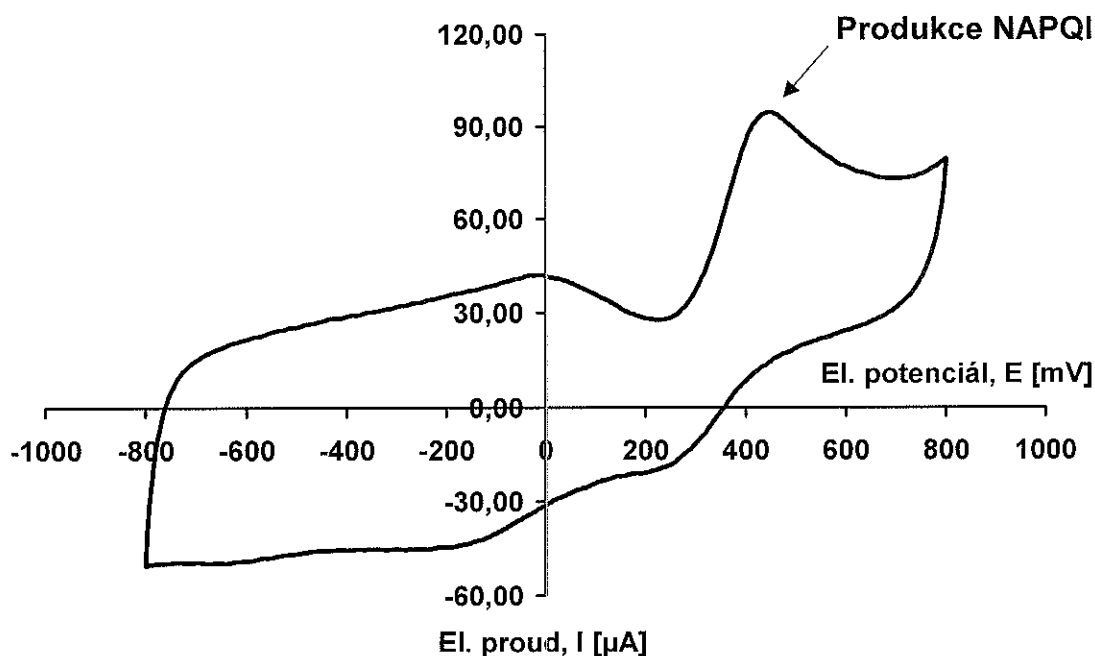
Graf 9: Aktivita glutathionreduktasy (průměr \pm SD; $n = 4$)
(*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; vs. kontroly)

5.3 Studium příčin inhibice glutathionreduktasy nalezené během charakterizace AAP toxicity

5.3.1 Příprava AAP-GSH konjugátu

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.

Nejprve jsme pomocí cyklické voltametrie ověřili podmínky oxidace AAP na NAPQI. 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 (graf 10). 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). S ohledem na zjištěná fakta jsme pro oxidaci AAP, a tím i pro vznik AAP-GSH konjugátu, zvolili jako vhodnou hodnotu +600 mV. Vlastní příprava byla prováděna vždy po dobu 60 minut. Výsledná koncentrace AAP-GSH v roztoku byla vypočtena z Faradayova zákona na cca 2,5 $\mu\text{mol/l}$ (pro detekovaný proud $I \sim 100 \mu\text{A}$).



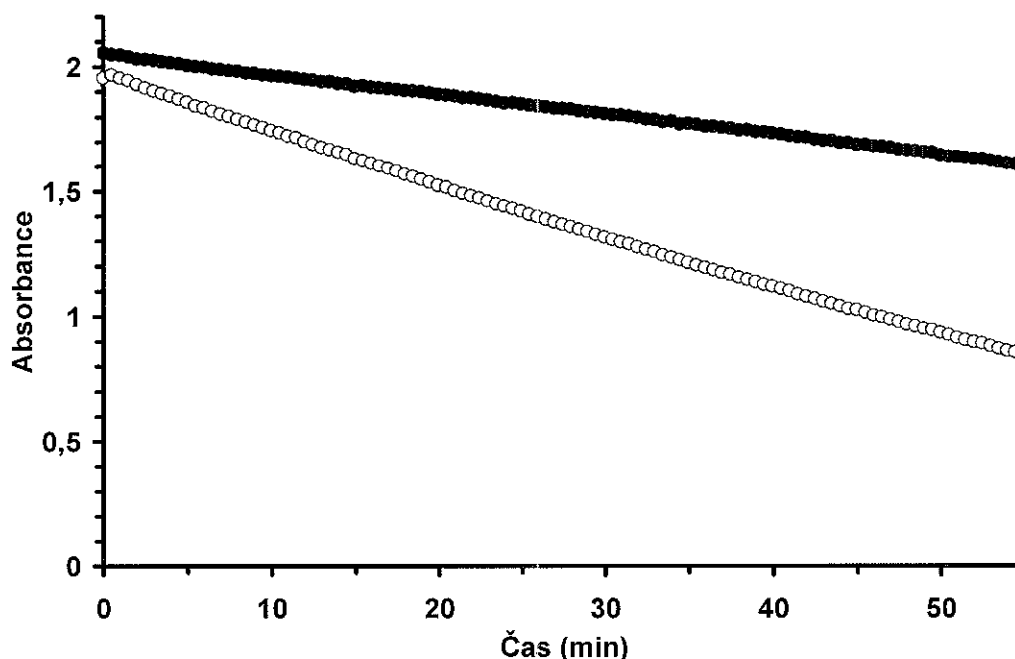
Graf 10: Oxidace AAP na NAPQI
(Cyklický voltamogram, roztok 0,5 mmol/l AAP)

5.3.2 Vliv přítomnosti AAP-GSH na aktivitu glutathionreduktasy

Aktivita glutathionreduktasy byla sledována pomocí poklesu absorbance NADPH ($\lambda = 340 \text{ nm}$). Jako množství GR vhodné pro testování vlivu AAP-GSH jsme zvolili $0,016 \text{ U/ml}$, které je sice velmi malé, ale na druhou stranu mohlo lépe vypovídat o případném vlivu nízké koncentrace AAP-GSH.

Doba testování aktivity glutathionreduktasy, a to u obou sledovaných typů, byla 30 a 60 minut. Analýza byla započata přidáním roztoku s AAP-GSH do jamky 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.

V grafu 11 je vyobrazena výsledná aktivita kvasinkové GR jako závislost absorbance v čase u kontrolních vzorků a u vzorků v přítomnosti AAP-GSH. Porovnáním zjištěných aktivit vůči kontrolnímu signálu bylo určeno, že po 30 minutách inkubace s AAP-GSH dochází k poklesu enzymové aktivity o 50% (pro konečnou koncentraci $1,5 \mu\text{mol/l}$ AAP-GSH v měřeném roztoku), resp. o 40% (pro $1 \mu\text{mol/l}$ AAP-GSH) (graf 12).

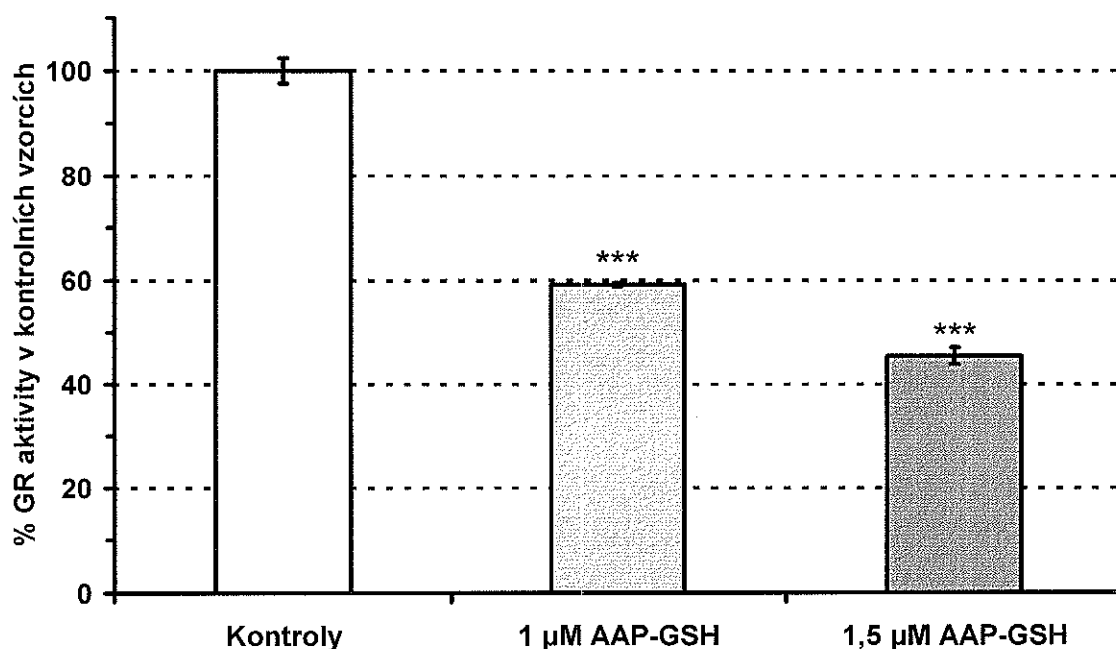


Graf 11: Inhibice glutathionreduktasy (kvasinková) v přítomnosti AAP-GSH (GR aktivita byla sledována po dobu 60 min. v přítomnosti $1,5 \mu\text{mol/l}$ AAP-GSH (●), a po této době byla porovnána s aktivitou v kontrolním vzorku (○), který byl složením zcela totožný, ale neobsahoval AAP-GSH.)

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 nařaděna tak, aby její výsledná aktivita v roztoku byla také 0,016 U/ml.

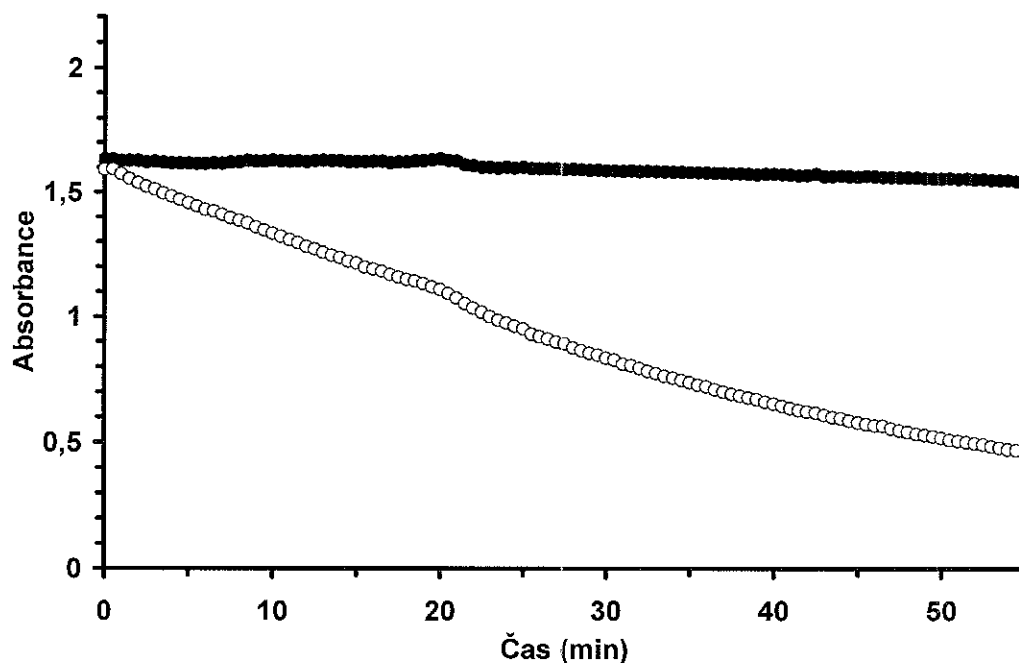
Stejně jako u kvasinkové GR byla také u hepatocytární glutathionreduktasy prokázána inhibice v přítomnosti AAP-GSH. Při vzájemném porovnání aktivit mezi oběma testovanými typy GR bylo ale zřejmé, že míra inhibice u hepatocytární GR je mnohem větší (graf 13). Srovnáním výsledné aktivity po 30 minutové 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% (graf 14).

Z popsaných nálezů je zjevné, že jsme prokázali inhibiční vliv AAP-GSH konjugátu na aktivitu glutathionreduktasy, a to překvapivě u obou testovaných druhů GR. Dalším neméně zajímavým zjištěním je rozdílná míra inhibice u použitých druhů glutathionreduktasy

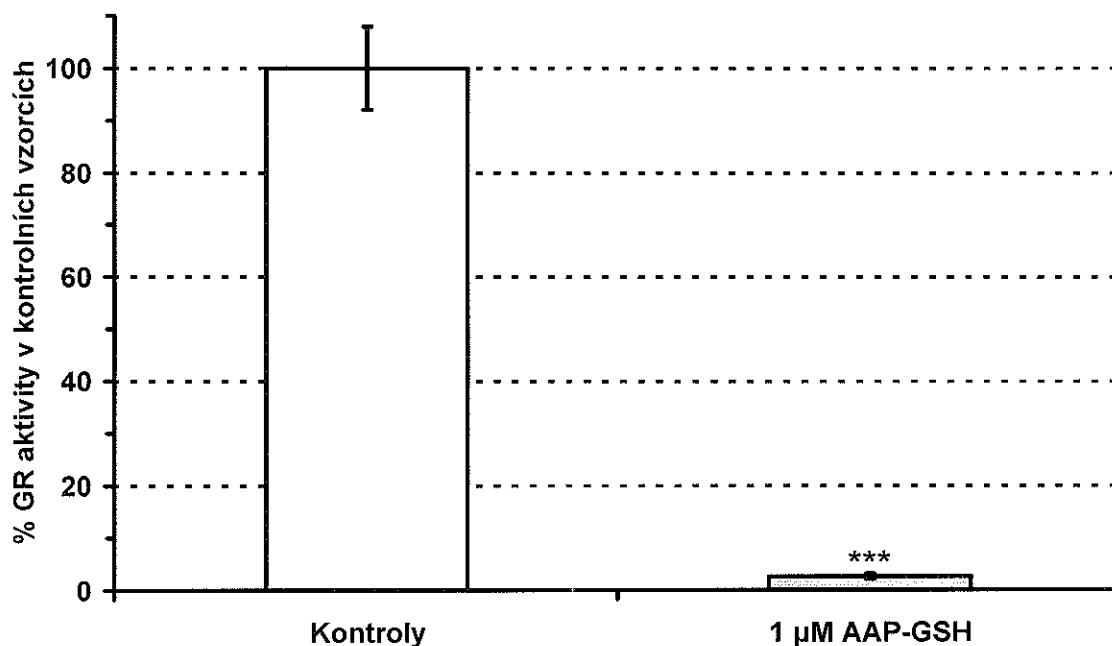


Graf 12: Inhibice glutathionreduktasy (kvasinková) v přítomnosti AAP-GSH (průměr \pm SD; n = 2; ***, p < 0,001; vs. kontroly)

(GR aktivita byla sledována po dobu 30 min. v přítomnosti 1 či 1,5 $\mu\text{mol/l}$ AAP-GSH. Tyto aktivity byly porovnány s aktivitou v kontrolním vzorku a byly vyjádřeny jako % kontrolního signálu.)



Graf 13: Inhibice glutathionreduktasy (hepatocytární) v přítomnosti AAP-GSH (GR aktivita byla sledována po dobu 60 min. v přítomnosti 1 $\mu\text{mol/l}$ AAP-GSH (●), a po této době byla porovnána s aktivitou v kontrolním vzorku (○), který byl složením zcela totožný, ale neobsahoval AAP-GSH.)



Graf 14: Inhibice glutathionreduktasy (hepatocytární) v přítomnosti AAP-GSH (průměr \pm SD; $n = 4$; ***, $p < 0,001$; vs. kontroly)

(GR aktivita byla sledována po dobu 30 min. v přítomnosti 1 $\mu\text{mol/l}$ AAP-GSH. Tato aktivita byla porovnána s aktivitou v kontrolním vzorku a byla vyjádřena jako % kontrolního signálu.)

6. DISKUZE

I. Optimalizace fluorimetrického stanovení glutathionu

Glutathion je sloučenina, která má v organismu celou řadu funkcí, a proto je pro buňky zcela nezastupitelná. Účastní se udržování redox rovnováhy, detoxikačních pochodů, regulace buněčného dělení, metabolismu aminokyselin a prostanooidů či regulace apoptózy. Kromě toho glutathion hraje velmi důležitou roli i v antioxidačním systému buněk. Jeho struktura, od které se odvíjí i jeho funkce, je složena ze třech aminokyselin – glycinu, L-cysteinu a L-glutamátu. Koncentrace glutathionu se v buňkách pohybuje v řádech mmol/l, a proto je tento tripeptid nejdůležitějším nebílkovinným intracelulárním thiolem.

Glutathion se vyskytuje ve dvou formách, redukované, GSH a oxidované, GSSG. S ohledem na jeho důležitost ve zmíněných procesech 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 Hissina a Hilfa je reakce mezi GSH a o-ftaldialdehydem, po které vzniká izoindolová sloučenina vykazující velmi vysoký výtěžek fluorescence při detekci $\lambda_{EX} = 350$ nm a $\lambda_{EM} = 420$ 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 nespécifikovanou interferencí (Beutler and West 1977). Další doklad interference byl popsán v práci Scaduta (Scaduto 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 pravděpodobné 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 GS-OPA byl následně detekován na C₁₈ chromatografické koloně (mobilní fáze – methanol, PB; 15:85 w/v; pH 6), ale při stejných λ_{EX} a λ_{EM} jako v originální práci. Zajímavé bylo zjištění, že na chromatografických záznamech kromě píku, který odpovídal GSH-OPA, nebyla žádná další detekovaná sloučenina. Tento nálezn 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). Takovou změnou vlnových délek jsme dosáhli vzrůstu intenzity fluorescence o cca 20%.

Dalším testovaným parametrem byla teplota detekce. Porovnávali jsme intenzitu fluorescence, IF, 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 vystíněn 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 je v roztoku 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 potvrzeno, že při pH 11, stejně jako za velmi kyselého pH, dochází k nárůstu absolutní míry IF, resp. koncentrace, a to až na pětinasobek hodnoty nalézané 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 nalézány

nové fluorescenční signály, zatímco jiné se naopak vytrácely. Námi 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 totožný s původním (detekce při pH 11), a proto jimi naměřené hodnoty GSSG byly zvýšeny z důvodu růstu interference. Naopak v článku s HPLC/FL stanovením (Kand'ár *et al.* 2007) byla při detekci použita mobilní fáze s pH 6, při němž žádná interference prokázána nebyla.

S ohledem na výše uvedené údaje byly určeny optimální podmínky ($\lambda_{EX} = 335$ nm, $\lambda_{EM} = 420$ nm; T = 4 °C; pH 6), za nichž byly stanoveny analytické parametry pro stanovení GSH: kalibrace – linearita (0 - 500 $\mu\text{mol/l}$), $R^2 = 1,00$; intra-assay, CV% $\ll 5\%$; stanovení GSSG: kalibrace, linearita (0 - 200 $\mu\text{mol/l}$), $R^2 = 0,999$; intra-assay, CV% $< 5\%$. Námi získané analytické parametry stanovení dosahují v porovnání s daty uvedenými Floreanim (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, sensitivní a hlavně specifickou. V porovnání s metodami HPLC či s enzymatickou metodou poskytuje námi zavedená metoda mnohem vyšší rychlost analýzy (HPLC ~ 10 min/vzorek; enzymatická ~ 3 min/vzorek; spektrofluorimetrická ~ 10 s/vzorek) a stejně tak i nižší cenové náklady.

V současné době 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 –SH skupiny proteinů, což by následně mělo vést k poškození jejich funkce. Protože ale u absolutní většiny proteinů, u kterých byly AAP-adukty detekovány, žádný významný pokles aktivity nebyl prokázán, byla metabolická teorie jako hlavní příčina AAP toxicity odmítnuta (James *et al.* 2003a).

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 antioxidační 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 potkaní 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 jejích 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 vztaženy 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 nálezn 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 nálezn 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 se 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 glutathionreduktasy 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.* 2003a), 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 (Ochi 1990; 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; James *et al.* 2003a), 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. V původní práci (Madsen *et al.* 2007) byla tato reakce využita pro testování chování NAPQI v roztocích o různém pH, kde bylo nutné zvýšit stabilitu NAPQI, jenž je za normálního stavu velmi nestabilní (Dahlin and Nelson 1982). Proto tedy vzniklý NAPQI byl nechán reagovat s GSH, a tím byl převeden na mnohem stabilnější konjugát AAP-GSH, který byl následně detekován pomocí HPLC/MS. Protože naše podmínky přípravy byly zcela totožné jako v originální práci (Madsen *et al.* 2007), 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; $\lambda = 340$ nm) při porovnání s kontrolním vzorkem. Lze jistě namítnout, že přidávaný roztok obsahoval kromě AAP-GSH ještě také nezreagovaný AAP a GSH, a to ve velkém nadbytku; vypočtená koncentrace vytvořeného AAP-GSH byla cca jen 2 $\mu\text{mol/l}$. Na druhou stranu ale AAP a ani GSH nejsou schopny glutathionreduktasu inhibovat, a proto mohla být případná změna GR aktivity po přidavku roztoku pouze přisouzena vlivu přítomnosti AAP-GSH. Navíc byly kontrolní vzorky připravovány zcela stejným postupem (až na elektrochemickou oxidaci), a proto obsahovaly stejné koncentrace a objemy všech látek vyjma AAP-GSH.

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 $\mu\text{mol/l}$ 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 $\mu\text{mol/l}$ AAP-GSH, prokázána inhibice aktivity o 97% !!! Tento náš náález 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 myší, a stejně tak i u člověka.

Vlastní mechanismus, kterým jsme se snažili inhibiční jev vysvětlit, by mohl být podobný popisované inhibici glutathionreduktasy S-nitrosoglutathionem (GSNO). Tento produkt reakce GSH a NO tvořený v buňce je totiž schopen GR inhibovat jak reversibilně, tak i ireversibilně (Becker *et al.* 1995). Příčinou je pravděpodobně rozštěpení chemické vazby mezi GSH a NO a následné navázání NO na aktivní místo enzymu. Z tohoto vyplývá, že GR je schopna reagovat i s molekulou, která je pouze z jedné poloviny strukturálně shodná s GSSG, což je kromě GSNO i konjugát AAP-GSH.

Popisovaný náález 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 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 svými spolupracovníky 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 dospěli 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 autoři připsali 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).

Další práce byla zaměřena na testování AAP toxicity u transport-deficientních potkanů (Silva *et al.* 2005). U tohoto kmene potkanů mají buňky defektní MRP-2 protein. Toto sice vede k hromadění metabolitů v buňce, zároveň ale není do žluči exkretován glutathion, a proto tyto buňky mají zvýšenou antioxidační ochranu. Vystavení MRP-2 deficientních potkanů účinku AAP vedlo k nálezu zvýšené rezistence potkanů oproti wild-type. Příčina tohoto nálezu byla rozpoznána ve zvýšené intracelulární hladině GSH. Proto byl zvířatům podán inhibitor syntézy glutathionu, aby byla hladina GSH snížena na úroveň nalézanou u kontrolních potkanů. Výsledkem bylo snížení rezistence k AAP toxicitě na úroveň mnohem nižší než u wild-type zvířat. Presentované vysvětlení bylo takové, že u MRP-2 deficientních potkanů byla prokázána zvýšená exprese v určitých izoenzýmech cytochromu P-450, čímž i vzrostla produkce NAPQI, který dále způsobil větší poškození.

Obě výše zmíněné práce přinesly velmi překvapivé výstupy. Předpoklady autorů u prvního článku byly takové, že v nepřítomnosti GST π by mělo dojít ke zvýšení míry acetaminofenem způsobené hepatotoxicity (Henderson *et al.* 2000); zjištění snížené rezistence u MRP-2 deficientních potkanů po porovnání s kontrolními zvířaty ve druhém článku bylo víceméně překvapivé také (Silva *et*

al. 2005). 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.

U prvního článku (Henderson *et al.* 2000) lze předpokládat, že myši hepatocyty díky deficitu enzymu GST π produkují mnohem menší množství AAP-GSH (Coles *et al.* 1988). 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 přetrvávaly 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 u 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.

Nález zvýšené AAP toxicity u MRP-2 deficientních potkanů ve druhém článku (Silva *et al.* 2005) vede velmi pravděpodobně k akumulaci AAP-GSH, a dále pak ke zvětšení míry inhibice glutathionreduktasy, což má za následek zvýšení míry toxického působení. Vysvětlení autorů, že snížená rezistence je způsobena zvýšenou produkcí NAPQI, samozřejmě vyloučit nelze. Na druhou stranu ale i zvýšená produkce NAPQI může vést opět k další a rychlejší tvorbě AAP-GSH.

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 uvedených případech prokázali, že zvýšená hladina AAP-GSH následkem přítomnosti GST π nebo z důvodu blokování MRP-2 transportu konjugátu do žluči vede k prohloubení hepatocytárního poškození *in vivo*. 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 popsanych 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 (James *et al.* 2003a; Kon *et al.* 2004), přesto tímto principem nelze vysvětlit ani jeden z případů podrobně rozebraných výše (Henderson *et al.* 2000; Rzucidlo *et al.* 2000).

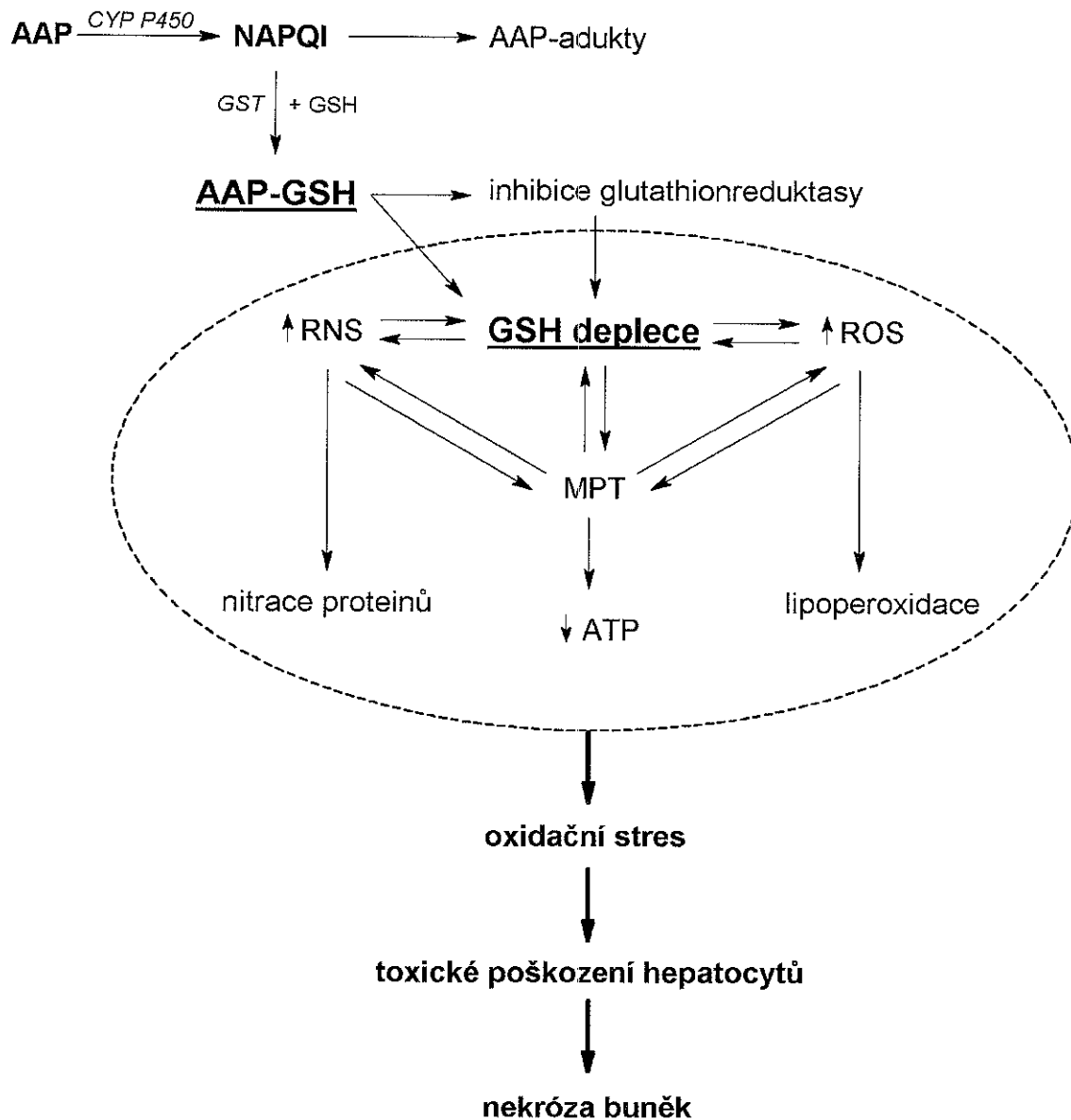
Mitochondrial Permeability Transition (MPT) může být stimulována mnoha podněty, které většinou vznikají, pokud se v buňce odehrává patologický proces. Proto k MPT dochází při zvýšeném oxidačním stresu či při růstu intracelulárních hladin Ca^{2+} (He and Lemasters 2002). Mezi tyto stimuly

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 (James *et al.* 2003a). 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), kde za nepřítomnosti GST π jistě dochází k menší vazbě GSH s NAPQI, a proto se i NAPQI může ve větší míře vázat na –SH skupiny proteinů. Pokud by tedy 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 (Henderson *et al.* 2000).

Námi navrhovaný model pro popsání mechanismu toxického působení acetaminofenu v hepatocytech je znázorněn na obrázku (obr. 18). 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 díky inhibici 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.* 2003a).



Obr. 18: Navrhovaný mechanismus toxického působení acetaminofenu

Důkazem pro toto tvrzení jsou i závěry již zmiňovaných 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 antioxidantním 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 (viz možnost zvýšené produkce NO, či lipoperoxidace při blokaci NOS). 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 spektrofluorimetrická 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 spektrofluorimetrickou 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 specifitou, sensitivitou, 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. Naší 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 (0,016 U/ml) o 97%!!! Náš nález zcela mění vzhled do mechanismu AAP toxicity a ozřejmuje nálezy popsané v odborné literatuře, které dosud známými poznatky vysvětlitelné nebyly.

8. SEZNAM LITERATURE

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. ANDERSON ME, MEISTER A: Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 707-711, 1983.
3. 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.
4. BAKER MA, CERNIGLIA GJ, ZAMAN A: Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* **190**: 360-365, 1990.
5. BASS R, RUDDOCK LW, KLAPPA P, FREEDMAN RB: A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem* **279**: 5257-5262, 2004.
6. BAST A, HAENEN GMM, DOELMAN CJA: Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am. J. Med.* **91**: 2S-13S, 1991.
7. BECKER K, GUI M, SCHIRMER RH: Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. *Eur J Biochem* **234**: 472-478, 1995.
8. BELINSKY SA, POPP JA, KAUFFMAN FC, THURMAN RG: Trypan blue uptake as a new method to investigate hepatotoxicity in periportal and pericentral regions of the liver lobule: studies with allyl alcohol in the perfused liver. *J Pharmacol Exp Ther* **230**: 755-760, 1984.
9. BELLOMO G, VAIRETTI M, STIVALA L, MIRABELLI F, RICHELMI P, ORRENIUS S: Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4412-4416, 1992.
10. 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
11. BEUTLER E, WEST C: Comment concerning a fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem* **81**: 458-460, 1977.
12. BLAZKA ME, WILMER JL, HOLLADAY SD, WILSON RE, LUSTER MI: Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **133**: 43-52, 1995.
13. BRADFORD MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254, 1976.
14. BROWN AJ, LEONG SL, DEAN RT, JESSUP W: 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lip Res* **38**: 1730-1745, 1997.
15. CAMERA E, PICARDO M: Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **781**: 181-206, 2002.

16. CARLBERG I, MANNERVIK B: Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* **250**: 5475-5480, 1975.
17. 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.
18. COHN VH, LYLE J: A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem* **14**: 434-440, 1966.
19. 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.
20. CORD JM: The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **108**: 652-659, 2000.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. GUPTA S, ROGERS LK, TAYLOR SK, SMITH CV: Inhibition of carbamyl phosphate synthetase-I and glutamine synthetase by hepatotoxic doses of acetaminophen in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **146**: 317-327, 1997.
25. GUTTERIDGE JMC: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* **41**: 1819-1828, 1995.
26. HALLIVELL B, HU ML, LOUIE S: Interaction of nitrogen dioxide with human plasma. *FEBS* **313**: 62-66, 1992.
27. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC: Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press New York, 2007
28. 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.
29. 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.
30. HENDERSON CJ, WOLF CR: Disruption of the glutathione transferase pi class genes. *Methods Enzymol* **401**: 116-135, 2005.
31. 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.

32. 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.
33. HISSIN PJ, HILF R: A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* **74**: 214-226, 1976.
34. HOLEČEK V, RACEK J: Ochrana před volnými radikály pomocí antioxidantů, stopových prvků a léků. *Klin Biochem Metab* **23**: 137-141, 1994.
35. 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.
36. CHEN W, KOENIGS LL, THOMPSON SJ, PETER RM, RETTIE AE, TRAGER WF, NELSON SD: Oxidation of acetaminophen to its toxic quinone imine and nontoxic catechol metabolites by baculovirus-expressed and purified human cytochromes P450 2E1 and 2A6. *Chem Res Toxicol* **11**: 295-301, 1998.
37. JAESCHKE H, BAJT ML: Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* **89**: 31-41, 2006.
38. JAMES LP, MAYEUX PR, HINSON JA: Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* **31**: 1499-1506, 2003a.
39. JAMES LP, MCCULLOUGH SS, KNIGHT TR, JAESCHKE H, HINSON JA: Acetaminophen toxicity in mice lacking NADPH oxidase activity: role of peroxynitrite formation and mitochondrial oxidant stress. *Free Radic Res* **37**: 1289-1297, 2003b.
40. JENSEN SJK: Oxidative stress and free radicals. *J Mol Structure* **667**: 387-392, 2003.
41. 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.
42. 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.
43. KAPLOWITZ N: Acetaminophen hepatotoxicity: what do we know, what don't we know, and what do we do next? *Hepatology* **40**: 23-26, 2004.
44. KERR ME, BENDER CM, MONTI EJ: An introduction to free radicals. *Heart and Lung* **25**: 200-211, 1996.
45. 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.
46. KNIGHT TR, KURTZ A, BAJT ML, HINSON JA, JAESCHKE H: Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci* **62**: 212-220, 2001.

47. KOELSCH H, LUDWIG M, LUETJOHANN D, PRANGE W, RAO ML: 7 α -Hydroperoxycholesterol causes CNS neuronal cell death. *Neurochemistry International* **36**: 507-512, 2000.
48. 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.
49. KUNTZ E, KUNTZ H-D: *Hepatology : Principles and Practice*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2006
50. LASH LH, PUTT DA: Renal cellular transport of exogenous glutathione: heterogeneity at physiological and pharmacological concentrations. *Biochem Pharmacol* **58**: 897-907, 1999.
51. LEE WM: Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* **40**: 6-9, 2004.
52. LOFT S, POULSEN HE: Cancer risk and oxidative DNA damage in men. *J Mol Med* **74** 1996.
53. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951.
54. LU SC: Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* **13**: 1169-1183, 1999.
55. MADSEN KG, OLSEN J, SKONBERG 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.
56. MANAUTOU JE, DE WAART DR, KUNNE C, ZELCER N, GOEDKEN M, BORST P, ELFERINK RO: Altered disposition of acetaminophen in mice with a disruption of the Mrp3 gene. *Hepatology* **42**: 1091-1098, 2005.
57. MANNERVIK B, BOARD PG, HAYES JD, LISTOWSKY I, PEARSON WR: Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol* **401**: 1-8, 2005.
58. MÅRTENSSON J, LAI JC, MEISTER A: High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7185-7189, 1990.
59. MASUBUCHI Y, SUDA C, HORIE T: Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Hepatol* **42**: 110-116, 2005.
60. MCCAY PB, : Vitamin E : Interactions with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* **5**: 323-340, 1985.
61. MEISTER A: Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* **269**: 9397-9400, 1994.
62. MEISTER A: Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim Biophys Acta* **1271**: 35-42, 1995.
63. MEISTER A, ANDERSON ME: Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**: 711-760, 1983.
64. MEREDITH MJ, REED DJ: Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem* **257**: 3747-3753, 1982.

65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. NELSON SD: Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Semin Liver Dis* **10**: 267-278, 1990.
69. OCHI T: Effects of an organic hydroperoxide on the activity of antioxidant enzymes in cultured mammalian cells. *Toxicology* **61**: 229-239, 1990.
70. 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.
71. PASTORE A, FEDERICI G, BERTINI E, PIEMONTE F: Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* **333**: 19-39, 2003.
72. PATTEN CJ, THOMAS PE, GUY RL, LEE M, GONZALEZ FJ, GUENGERICH FP, YANG CS: Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chem Res Toxicol* **6**: 511-518, 1993.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. RACEK J, HOLEČEK V: Vznik volných radikálů a enzymy. *Klin. Biochem. Metab.* **7**: 158-163, 1999.
77. RACEK J, HOLEČEK V, TREFIL L: Antioxidační vlastnosti kyseliny askorbové. *Čas Lék čes* **139**: 583-587, 2000.
78. REID AB, KURTEN RC, MCCULLOUGH SS, BROCK RW, HINSON JA: Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **312**: 509-516, 2005.
79. ROMERO FJ, MUELLER-KLIESER W: Semiquantitative bioluminescent assay of glutathione. *J Biolumin Chemilumin* **13**: 263-266, 1998.

80. ROUSAR T, KUCERA O, KRIVÁKOVÁ P, LOTKOVÁ H, KANDÁR R, MUZÁKOVÁ V, CERVINKOVÁ Z: Evaluation of oxidative status in acetaminophen treated rat hepatocytes in culture. *Physiol Res* **58**:2009.
81. 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.
82. SCADUTO RC, JR.: Dithiothreitol and amino acids interfere with the fluorometric determination of glutathione with orthophthalaldehyde. *Anal Biochem* **174**: 265-270, 1988.
83. SEGLEN PO: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **13**: 29-83, 1976.
84. SENFT AP, DALTON TP, SHERTZER HG: Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* **280**: 80-86, 2000.
85. SHARMA R, YANG Y, SHARMA A, AWASTHI S, AWASTHI YC: Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid Redox Signal* **6**: 289-300, 2004.
86. SIES H: Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* **27**: 916-921, 1999.
87. SILVA VM, THIBODEAU MS, CHEN C, MANAUTOU JE: Transport deficient (TR-) hyperbilirubinemic rats are resistant to acetaminophen hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* **70**: 1832-1839, 2005.
88. SMITH LL, JOHNSON BH: Biological activities of oxysterols. *Free Radical Biology and Medicine* **7**: 285-332, 1989.
89. SOŠKA V: Volné kyslíkové radikály a jejich scavengery. *Klin. Biochem. Metab.* **1**: 57-61, 1993.
90. STAHL W, SIES H: A biologically important carotenoid for humans? . *Archives of Biochemistry and Biophysics* **336**: 1-9, 1996.
91. ŠTÍPEK S, KOL. A: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Grada Publishing, Praha, 2000
92. 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.
93. 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.
94. THUMMEL KE, LEE CA, KUNZE KL, NELSON SD, SLATTERY JT: Oxidation of acetaminophen to N-acetyl-p-aminobenzoquinone imine by human CYP3A4. *Biochem Pharmacol* **45**: 1563-1569, 1993.
95. 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.
96. 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.

97. 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.
98. WIKIPEDIA: http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_reductase. (30.3.2008)
99. WILLIAMS CH, ARSCOTT LD, MÄLLER S, LENNON BW, LUDWIG ML, WANG PF, VEINE DM, BECKER K, SCHIRMER RH: Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem* **267**: 6110-6117, 2000.
100. WILLIAMS K, FRAYNE J, HALL L: Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. *Mol Hum Reprod* **4**: 841-848, 1998.
101. WU G, FANG YZ, YANG S, LUPTON JR, TURNER ND: Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* **134**: 489-492, 2004.
102. YAN CC, HUXTABLE RJ: Fluorimetric determination of monobromobimane and o-phthalaldehyde adducts of gamma-glutamylcysteine and glutathione: application to assay of gamma-glutamylcysteinyl synthetase activity and glutathione concentration in liver. *J Chromatogr B Biomed Appl* **672**: 217-224, 1995.
103. YANG Y, CHENG JZ, SINGHAL SS, SAINI M, PANDYA U, AWASTHI S, AWASTHI YC: Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J Biol Chem* **276**: 19220-19230, 2001.
104. YASUI H, HAYASHI S, SAKURAI H: Possible involvement of singlet oxygen species as multiple oxidants in p450 catalytic reactions. *Drug Metab Pharmacokinet* **20**: 1-13, 2005.
105. 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.
106. ZIMA T, ŠTÍPEK S, TESAŘ V, PLÁTENÍK J, CRKOVSKÁ J: Volné radikály – reaktivní formy kyslíku, antioxidační látky a antioxidační terapie. *Remedia* **6**: 35-37, 1996.

Poděkování:

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