

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Gabriela Hauptmanová

Studium oxidačního poškození na modelu hepatocytu potkana

Oxidative damage studied in rat hepatocyte model

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2018

Poděkování

Ráda bych poděkovala MUDr. Nikolině Kutinové-Canové, Ph.D za pomoc při přípravě hepatocytů a cenné rady ohledně kultivace buněk. Děkuji svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za konzultace a vedení této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Abstrakt

Míra oxidačního poškození vlivem reaktivních forem kyslíku a dusíku je měřena velmi často v buňkách *in vitro*. K tomuto účelu složí např. fluorescenční sondy. Jsou to látky, které reagují s určitými druhy reaktivních forem za emise fluorescenčního záření. V buňkách lze pozorovat také poškození DNA, lipidů či proteinů. K tomuto účelu bylo vyvinuto mnoho technik, z nichž ovšem většina neposkytuje jednoznačně objektivní výsledky. Měření bývají zatížena množstvím interferencí. Techniky jsou často selektivní pouze pro určité typy molekul a výsledky tedy neodpovídají celkové míře oxidačního poškození.

Tématem této bakalářské práce je optimalizace vybraných technik pro měření míry oxidačního poškození. Konkrétně stanovení malondialdehydu a měření množství reaktivních forem kyslíku a dusíku pomocí fluorescenčních sond DCFDA a DHR. Jako experimentální systém pro měření oxidačního stresu byly zvoleny primární potkaní hepatocyty. Zvolené techniky se podařilo optimalizovat a mohou být dále využity pro studium antioxidačních vlastností přírodních flavonoidních sloučenin v modelovém organismu potkana.

Klíčová slova

fluorescence, sonda, peroxidace lipidu, lipopolysacharid, ethanol

Abstract

Levels of oxidation damage caused by reactive oxygen and nitrogen species is very often measured in vitro in cells. For example, measurements are performed using fluorescence probes. These substances react with certain kinds of reactive species by emitting fluorescent radiation. It is also possible to observe cellular damage of DNA, lipids or proteins. Many techniques were developed for this purpose but most of them don't provide unambiguous objective results. Measures are usually contaminated by large number of interferences. These techniques are often selective just for certain types of molecules, therefore their results do not correspond to generalized level of oxidation damage.

Topic of my bachelor thesis is optimization of selected techniques used in oxidation damage levels measurements. Specifically, determination of malondialdehyde and measurement of reactive oxygen and nitrogen species levels using DCFDA and DHR fluorescence probes. Rats primary hepatocytes were used as an experimental system for measuring. These techniques were successfully optimized and can be used for further study of antioxidation characteristics of natural flavonoid compounds in rats as model organisms.

Key words

fluorescence, probe, lipid peroxidation, lipopolysaccharide, ethanol

Obsah

1	Seznam použitých zkratek.....	1
2	Teoretický úvod.....	2
2.1	Oxidační stres	2
2.2	Mechanismus tvorby ROS	2
2.3	Zdroje ROS v organismu	3
2.4	Exogenní látky způsobující oxidační stres.....	4
2.5	Význam ROS v organismu	5
2.6	Antioxidační systémy	7
2.7	Exogenní antioxidanty	7
2.8	Techniky určení míry oxidačního poškození.....	9
2.9	Elektronová spinová rezonance	10
2.10	Stanovení množství ROSN v buněčných kulturách	12
2.11	Techniky založené na měření lipidové peroxidace	14
2.12	Techniky měřící míru oxidačního poškození DNA	15
3	Cíle bakalářské práce	16
4	Materiál a metody.....	17
4.1	Použité přístroje	17
4.2	Použitý materiál a chemikálie.....	18
4.3	Metody	19
4.3.1	Izolace hepatocytů	19
4.3.2	Kultivace hepatocytů	19
4.3.3	Zpracování vzorků.....	20
4.3.4	Stanovení životnosti hepatocytů pomocí MTT	21
4.3.5	Stanovení koncentrace proteinu v buňkách podle Lowryho	21
4.3.6	Stanovení koncentrace proteinu v buňkách pomocí BCA.....	22
4.3.7	Stanovení malondialdehydu	23
4.3.8	Stanovení radikálů pomocí DCF DA.....	23
4.3.9	Stanovení radikálů pomocí DHR.....	24
5	Výsledky.....	25
5.1	Nanesení buněk a kultivace	25
5.2	Stanovení životnosti pomocí MTT testu.....	26
5.3	Stanovení koncentrace proteinu	27
5.4	Stanovení míry lipidové peroxidace	27
5.5	Stanovení množství ROSN pomocí DHR.....	28
5.6	Stanovení míry oxidačního stresu pomocí DCFDA	30
6	Diskuze.....	34
7	Závěr.....	38
8	Použitá literatura	39

1 Seznam použitých zkratk

6-WP	z angl. well plate; 6-jamková destička
8OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosin
24-WP	z angl. well plate; 24-jamková destička
96-WP	z angl. well plate; 96-jamková destička
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	z angl. bovine serum albumine; hovězí sérový albumin
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
DCFH	dichlorodihydrofluorescein
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid
DNA	z angl. deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
ESR	elektronová spinová rezonance
LPS	lipopolysacharid
MDA	malondialdehyd
MTT	methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
O ₂ ^{·-}	superoxidový anion radikál
obr	obrázek
OH [·]	hydroxylový radikál
PBN	N-tertbutyl-p-phenylnitron
PBS	z angl. phosphate buffer saline; fosfátový pufr
PUFA	z angl. polyunsaturated fatty acids; polynenasycené mastné kyseliny
RNS	z angl. reactive nitrogen species; reaktivní formy dusíku
ROS	z angl. reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
ROSN	z angl. reactive oxygen and nitrogen species; reaktivní formy kyslíku a dusíku
TBA	z angl. thiobarbituric acid; kyselina thiobarbiturová
TBHP	tert-butylhydroperoxid
z angl	z angličtiny

2 Teoretický úvod

2.1 Oxidační stres

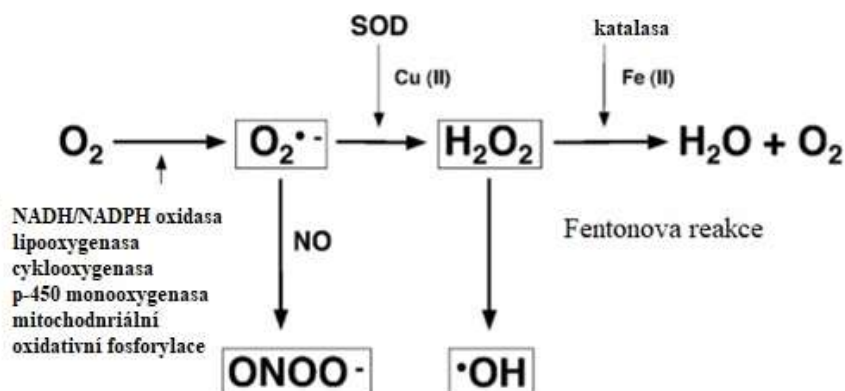
Oxidační a redukční reakce v biologických systémech mají zásadní význam pro různé biochemické pochody spojené s metabolickými změnami v našem těle [1]. Oxidační stres je výsledkem nerovnováhy mezi zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a dalších oxidovaných metabolitů a limitovanou kapacitou antioxidačních mechanismů buňky či celého organismu. Reaktivní formy kyslíku hrají důležitou roli ve vzniku mnoha chronických onemocnění člověka, jako jsou například kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní onemocnění, cukrovka či rakovina. Často se hovoří o oxidačním stresu v souvislosti se stárnutím. Vzhledem k výše zmíněným problémům, které mohou ROS a další oxidované metabolity v organismu způsobit, je důležité studovat vedle jejich vlivu na jednotlivé buňky také vliv na celý organismus [2]. Za reaktivní formy kyslíku lze považovat takové molekuly, jejichž atomární struktura obsahuje nepárové elektrony ve vnějších slupkách elektronového obalu. Nepárové elektrony způsobují jejich nestabilitu a reaktivitu [3]. Vzhledem k vysoké reaktivitě mají tyto molekuly krátkou dobu života. Reagují nespecificky s celou řadou biomolekul, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. ROS mohou být inaktivovány pomocí enzymů či pomocí dalších antioxidačních záchytných mechanismů [4]. Reaktivní formy kyslíku mohou mít jak radikálovou, tak neradikálovou povahu. Patří mezi ně například superoxidový anion radikál, hydroperoxylový radikál, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, alkoxylový radikál, peroxylový radikál, singletový kyslík a další. Mimo reaktivních forem na bázi kyslíku existují i reaktivní formy na bázi dusíku (RNS). Mezi tyto formy patří oxid dusnatý či oxid dusičitý [5]. Reaktivní formy kyslíku dusíku a dalších reaktivních forem molekul jsou obecně označovány jako ROSN.

2.2 Mechanismus tvorby ROS

Molekuly kyslíku a dusíku jsou v organismu jedním z hlavních zdrojů volných radikálů. Oxidační a redukční reakce bývají v organismu spřažené. Mechanismus vzniku reaktivních forem kyslíku je tedy doprovázen celou řadou reakcí, při kterých dochází k přenosu elektronů.

Nejprve dochází k jednoelektronové redukci molekuly kyslíku na vysoce reaktivní superoxidový anion radikál ($O_2^{\cdot-}$). Mezi dobře známé generátory superoxidových anion radikálů patří mitochondriální oxidačně-redukční systém a monooxygenasa, nicméně existuje mnoho dalších generátorů reaktivních forem kyslíku, např. xantin oxygenasa, lipooxygenasa, mitochondriální oxidasa či NADH/NADPH oxidasa. Superoxidové radikály dále podléhají

přeměně pomocí superoxid dismutasy na peroxid vodíku. Peroxid vodíku je stabilnější než ostatní radikály a je tak jednou z hlavních forem ROS uvnitř buňky. Peroxid vodíku podléhá rozkladu na vodu a kyslík pomocí enzymu katalasa nebo je z něj generován hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$) pomocí Fentonovy reakce. (Obrázek 1) [6].



Obrázek 1: Mechanismus tvorby ROS. Převzato a upraveno z [6].

Fentonova reakce

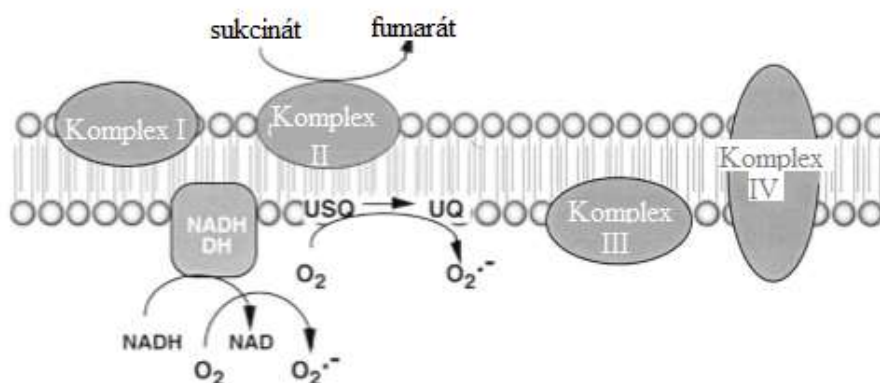
Fentonova reakce, přesněji Harber-Weissova reakce, popisuje vznik hydroxilových radiálů. Harber-Weissova reakce generuje toxičtější radikál $\text{OH}\cdot$ z méně reaktivního $\text{O}_2^{\cdot-}$ a peroxidu vodíku, který může být generován enzymově. Reakce je v biologických systémech termodynamicky nepříznivá. Hodnota rychlostní konstanty, která je druhého řádu, se ve vodných roztocích rovná nule. K tomu, aby reakce probíhala v biologickém systému je, nezbytná katalýza pomocí iontu přechodného kovu. Takto katalyzovaná reakce je poté označována jako Fentonova reakce. Ačkoli jsou katalýzy schopné i jiné ionty přechodných kovů, jako hlavní mechanismus Fentonovy reakce je považována reakce katalyzovaná železnatými kationty [7].



2.3 Zdroje ROS v organismu

ROS mohou být *in vivo* produkovány mnoha zdroji, jako např. autooxidace, fotochemické a enzymové reakce. Na generaci ROS se mohou podílet jak endogenní látky, tak různé druhy xenobiotik. Existuje veliké množství enzymů schopných generovat ROS. Mezi tyto enzymy lze zařadit cytochromy P450, různé druhy oxidas, peroxidas, lipoxygenas a dehydrogenas.

Nejdůležitějším zdrojem ROS *in vivo* jsou mitochondrie [8][9]. Hlavními druhy ROS generovanými v mitochondrii jsou především méně reaktivní formy, jako peroxid vodíku a superoxidový anion radikál. Množství produkovaných radikálů při normálních či patologických podmínkách není přesně známo. V literatuře je nejčastěji uváděno, že 2% z celkové spotřeby kyslíku v mitochondrii je za normálních podmínek převedeno na ROS. Tato hodnota nicméně není zcela směrodatná, protože byla určena v umělém *in vitro* systému. Proces izolace mitochondrií sám o sobě nevyhnutelně způsobuje určité poškození. Skutečná produkce radikálů v neporušených mitochondriích ve zdravé tkáni je pravděpodobně mnohem nižší. Podstatně vyšší produkce ROS může nastat v přítomnosti různých druhů xenobiotik nebo nastavením podmínek, které jsou pro buňky nefyziologické [7]. Zdrojem mitochondriálních ROS se zdá být určitý druh proteinu obsahující ion kovu o nehemové struktuře, který přenáší elektrony na molekuly kyslíku. K tomu dochází především na komplexu I (NADH-koenzym Q) a v menší míře po autooxidaci koenzymu Q z komplexu II (sukcinát-koenzym Q) nebo komplexu III (koenzym QH₂- cytochrom c reduktázy) (viz Obrázek 2).



Obrázek 2: Dýchací řetězec. Převzato a upraveno z [7].

Je nutné podotknout, že přesný příspěvek každého místa k celkové mitochondriální produkci ROS je ovlivněn místními podmínkami, které zahrnují chemické či fyzikální poškození mitochondrie, dostupnost kyslíku (hypoxie) a přítomnost xenobiotik.

2.4 Exogenní látky způsobující oxidační stres

Člověk se během každého dne setkává s velikým množstvím exogenních látek, které tělu způsobují oxidační stres. Obecně k němu přispívá znečištěná voda a ovzduší, alkohol či tabákový kouř. Mimo tyto globální faktory existuje celá řada chemických látek, které jsou v literatuře uváděny jako látky působící oxidační stres. Jsou to např. hnojiva a látky používané v zemědělství (např. pesticidy), různé drogy a léky (např. paracetamol, bleomycin, doxorubicin

nebo metrenidazol) [10]. Často využívanou látkou pro vědecké účely v souvislosti s oxidačním stresem je lipopolysacharid (LPS) z bakterie *E. coli*. LPS je endotoxin, který se nachází ve vnější membráně gramnegativních bakterií. Obecně dokáže u hostitele vyvolat celé spektrum biologických účinků, jak škodlivých, tak prospěšných. Biologicky aktivní částí této molekuly je lipid A [11]. LPS je spouštěč zánětlivých projevů organismu v případě sepse. V průběhu sepse dochází k disfunkci mitochondrií a snížení hladiny adenosintrifosfátu. Disfunkce mitochondrií způsobená LPS může vést k produkci laktátu. Zvýšená intracelulární koncentrace laktátu způsobuje v buňce acidosu. Vlivem disfunkce mitochondrií dále dochází k tvorbě toxických radikálů a uvolňování cytochromu c z poškozených mitochondrií. Kombinace výše zmíněných faktorů může vést až k multiorgánovému selhání. Za přímý projev toxicity LPS bývá označováno zvýšení hladiny mediátorů zánětu. Bylo dokázáno, že LPS ovlivňuje funkci kaspas, které zodpovídají v buňce za průběh apoptózy. Kaspasy se uplatňují také v případě nekrotických stavů způsobených zánětlivými procesy [12].

2.5 Význam ROS v organismu

Ačkoli jsou reakce závislé na kyslíku a aerobní respirace je neefektivnějším zdrojem pro získávání energie, tak ROS vzniklé v průběhu těchto dějů jsou potenciálně velmi toxické a mohou způsobit mnohá poškození. Zároveň jsou ROS nezbytnými faktory při normálním metabolismu [13]. ROS jsou nezbytné např. v průběhu reprodukce, pro správnou funkci imunitního systému či jako signalizační molekuly. Podrobněji se pozitivním a negativním účinkům ROS budou věnovat následující podkapitoly.

Pozitivní účinky

ROS mají pozitivní vliv na mnoho různých dějů v našem organismu. ROS jsou důležité v průběhu reprodukce a vývoje plodu. Ovlivňují motilitu spermií, proces kapacitace a akrozomovou reakci. Během oplození tedy hladina ROS ovlivňuje interakci vajíčka se spermií [14]. ROS jsou významné v imunitním systému. ROS aktivují NADPH oxidasu. NADPH oxidasa patří do skupiny enzymů, které uvolňují superoxidové radikály pomocí přenosu elektronů z nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) na molekulu kyslíku. Tyto enzymy jsou lokalizovány např. na buněčné membráně makrofágů, neutrofilních granulocytů či endoteliálních buněk [15]. Přestože jsou ROS spojené převážně s buněčným poškozením, jsou z fyziologického hlediska v organismu důležité v procesu vnitrobuněčné signalizace a regulace. Přenášejí informace z vnějšího prostředí buňky do cytoplazmy a do jádra. Přenos je ovlivněn růstovými faktory, cytokiny či neurotransmitery. Signály jsou zodpovědné za genovou

expresi, svalové kontrakce, nervové přenosy nebo buněčný růst. ROS jsou tedy nezbytné pro správné fungování signálních drah. V rámci svého působení v signálních kaskádách se mohou ROS vyskytovat na různých místech signální dráhy [1]. ROS mohou působit také jako obrana hostitele před útokem mikrobu [14].

Negativní účinky

Toxicita ROS vychází z jejich schopnosti reagovat s různými složkami molekuly deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Dokáží poškodit jak pyrimidinové, tak purinové báze, a zároveň i fosfodeoxyribózovou kostru. Poškození DNA je prvním krokem vedoucím k mutagenезi, karcinogenезi a stárnutí buněk. Útoky ROS na DNA mohou vést k indukci transkripce, signálních drah, replikaci chyb v genetickém kódu a celkové nestabilitě genomu. Všechny tyto problémy jsou pravděpodobně spojeny se vznikem maligních nádorů. Přesný mechanismus ovšem není doposud znám [16]. Mimo DNA jsou útoky ROS zasaženy i další buněčné komponenty, jako jsou například polynasycené mastné kyseliny nebo zbytky fosfolipidů. Dochází tedy k peroxidaci lipidů. V průběhu tohoto jevu dochází ke vzniku peroxylového radikálu. Peroxylový radikál je pomocí cyklické reakce přetvořen na endoperoxidy. Endoperoxidy jsou prekurzory pro vznik malondialdehydu (MDA). Produktem peroxidace lipidů je 4-hydroxy-2-nonal. MDA je karcinogenní látkou pro potkaní buňky a mutagenní pro bakteriální i buňky savců, zatímco 4-hydroxy-2-nonal je pouze slabě mutagenní, ale zdá se být hlavním toxickým produktem lipidové peroxidace. Stanovení míry lipidové peroxidace je velmi užitečným ukazatelem míry oxidačního stresu, ale vzhledem k nízké specifitě a selektivitě není zcela věrohodné, především při použití *in vivo* [17]. Oxidační stres postihuje nejen lipidy a DNA, ale také proteiny. Když proteiny reagují s hydroxylovými radikály dojde k tvorbě uhlíkového radikálu. Tento radikál za aerobních podmínek snadno reaguje s molekulou kyslíku za vzniku peroxylového radikálu. Vznik těchto radikálů a jejich další reakce přispívají ke změně tvaru a fluidity membrány. V přítomnosti atomu přechodného kovu může dojít k oxidačnímu štěpení spolu se ztrátou histidinových zbytků a tvorbě alkylových a alkyl peroxylových radikálů. Koncentrace karbonylových skupin je dobrým ukazatelem oxidace proteinů způsobenou ROS, protože ROS modifikují postranní řetězce proteinogenních aminokyselin, což vede ke vzniku dalších karbonylových skupin [18].

Postranní řetězce všech proteinogenních aminokyselin jsou citlivé na oxidační útoky způsobené ROS. Obzvláště citlivé jsou cysteinové a methioninové zbytky. Železnatý kation se dokáže navázat na specifické místo proteinu a komplex železnatého kationtu a proteinu reaguje

s peroxidem vodíku prostřednictvím Fentonovy reakce za vzniku reaktivních forem kyslíku [19].

2.6 Antioxidační systémy

Během procesu evoluce si organismy vytvořily rozličné druhy mechanismů, kterými se brání proti toxicitě ROS. Jedním z nejdůležitějších mechanismů je antioxidační obrana [14]. Mezi ROS a antioxidanty panuje rovnováha. Při zvýšení hladiny ROS je tato rovnováha porušena, což vede ke změně podmínek v intracelulárním prostředí, které budou posunuty více ve směru oxidačních reakcí. [3].

Účinek ROS a RNS je balancován pomocí antioxidantů, které mohou být jak enzymové, tak neenzymové povahy. Antioxidanty představují ochranu, díky které může dojít k přímému odstranění volných radikálů. Díky těmto vlastnostem jsou pro tělo nezbytně důležité. Antioxidanty by měly specificky zhaset volné radikály, chelatovat ionty přechodných kovů, a regenerovat další antioxidanty v antioxidační kaskádě. Některé antioxidanty mají pozitivní efekt na genovou expresi tím, že ostraňují ROS, které by mohly DNA poškozovat. Všechny antioxidanty by měly být pro organismus snadno odbouratelné [20].

Nejúčinnějšími enzymatickými antioxidanty jsou superoxid dismutasa, katalasa a glutathion peroxidasa. Mezi neenzymové antioxidanty patří vitamín C, vitamín E, karotenoidy, thiolové antioxidanty (glutathion, thioredoxin, kyselina lipoová) a přírodní flavonoidy. Některé antioxidanty potřebují hydrofilní prostředí, jiné zase hydrofobní. Existují také antioxidanty schopné uvnitř buňky fungovat v obou prostředích. Příkladem antioxidantu, který účinkuje ve vodné fázi, je vitamín C. Reaguje ve vodném prostředí se superoxidem. Vitamín E také reaguje se superoxidem, ale v lipofilní fázi. Kyselina α -lipolová podléhá reakcím jak v prostředí buněčných membrán, tak v cytosolu. Schopnost regenerovat jeden antioxidant jiným antioxidantem je dána redoxními potenciály (poměr oxidované a redukované formy) daného páru látek [1].

2.7 Exogenní antioxidanty

V dnešní době jsou exogenní přírodní látky s antioxidačními schopnostmi velmi popularizované. Mezi přírodní antioxidanty lze zařadit především výše zmíněnou skupinu flavonoidů, dále pak skupinu ubichinonů a polyfenolů. Antioxidanty přijímané ve stravě fungují jako „lapače“ volných radikálů, reakční mechanismy se ovšem mohou lišit. Obecně antioxidanty neutralizují (zhasají) volné radikály, pomáhají obnovovat oxidované buněčné membrány a napomáhají ke snížení produkce ROS [21]. Většina antioxidantů, mezi nimi i

flavonoidy a polyfenolové pigmenty, se v rámci rostlinné říše vyskytují v rostlinnách, ovoci nebo semenech. Flavonoidy se dělí na flavonoly (např. quercetin), flavony (např. luteolin), flavanony (např. naringenin), anthokyanidiny (např. cyanidin) a isoflavony (např. genistein). V následujících kapitolách budou krátce zmíněny jako příklady dvě flavonoidní látky a dvě neflavonoidní [22].

Resveratrol

Resveratrol (Obrázek 3D), systematickým názvem 3,5,4'-trihydroxystilben, se řadí mezi polyfenolické látky. Vyskytuje se v různých druzích semen a slupkách mnoha plodů např. v hroznovém víně, borůvkách a brusinkách. Červené víno lze označit jako nejběžnější přírodní zdroj resveratrolu. Resveratrol není toxický a je pro člověka snadno vstřebatelný. Metabolismu resveratrolu vede k tvorbě konjugovaných sulfátů a glukuronidů, které si zachovávají určitou míru biologické aktivity. Na základě pokusů *in vitro* bylo dokázáno, že resveratrol vychytává OH· a tím chrání DNA před oxidačním poškozením [22].

Quercetin

Quercetin (Obrázek 3C), systematickým názvem 3,3',4',5,7-pentyhydroxyflavone, je přírodní bioaktivní flavonoid, který lze nalézt v celé řadě běžně hospodářsky pěstovaných rostlin. Vyskytuje se v různých druzích ořechů, hroznovém víně, cibuli, jablkách, brokolici a také v černém čaji [23].

Antioxidační vlastnosti quercetinu se odvíjí od jeho chemické struktury. Za ochranu proti volným radikálům je zodpovědná hydroxylová skupina, která ve své konfiguraci může vázat radikály [22].

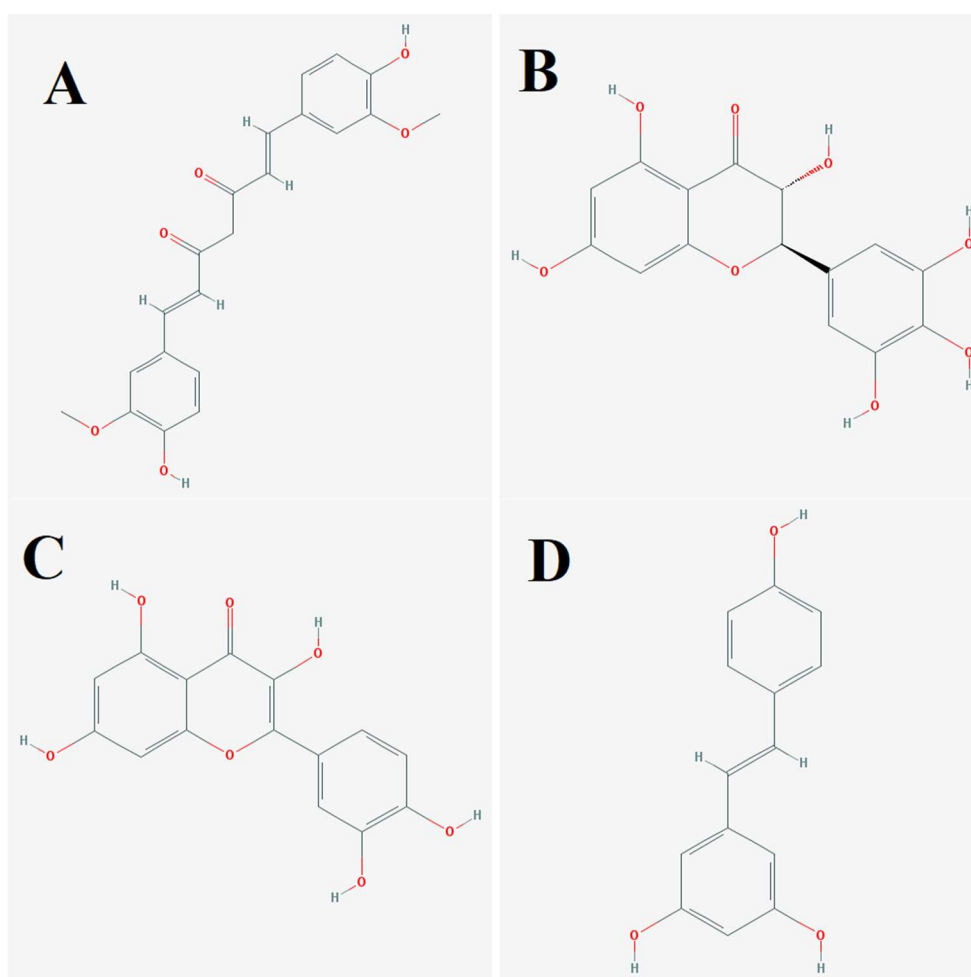
Kurkumin

Kurkumin (Obrázek 3A), systematickým názvem diferuloylmethan, je svítivě žlutá látka řadící se mezi polyfenoly. Vyskytuje se v kořeni rostliny *Curcuma longa*, která je typická pro země Středního východu a Asie, kde se přidává jako jedna ze složek do směsi koření zvaného curry, jemuž propůjčuje typickou žlutou barvu. Díky své struktuře reaguje s ROS i RNS a snižuje tak jejich hladinu v organismu. Vzhledem ke své lipofilní povaze reaguje také s peroxylovými radikály. Kurkumin může modulovat aktivitu katalas, superoxididismutasy a dalších enzymů podílejících se na neutralizaci ROS. Zároveň inhibuje aktivitu ROS generujících enzymů jako je např. xanthin hydrogenasa [22].

Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (Obrázek 3B) je hlavní bioaktivní složkou čínské rostliny *Amopelopsis grossedentata*, která bývá využívána v tradiční čínské medicíně. Bylo dokázáno, že tato látka má mimo jiné také antioxidační vlastnosti. Dihydromyricetin se řadí mezi flavonoly a bývá někdy nazýván ampelopsin [24].

Vzhledem k antioxidačním vlastnostem (snižování hladiny ROS a indukci tvorby oxidačního stresu) lze usuzovat, že dihydromyricetin má silné protinádorové účinky u některých typů maligních nádorů [25].



Obrázek 3: Chemické struktury vybraných antioxidantů. A – kurkumin, B – dihydromyricetin, C – quercetin, D – resveratrol. Převzato a upraveno z [26].

2.8 Techniky určení míry oxidačního poškození

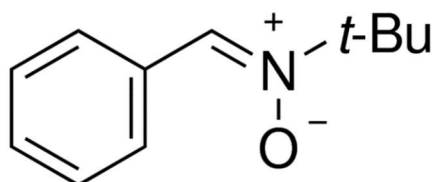
Technik, kterými je ROS a RNS možno stanovit je mnoho. Těmto technikám se budou věnovat následující kapitoly.

2.9 Elektronová spinová rezonance

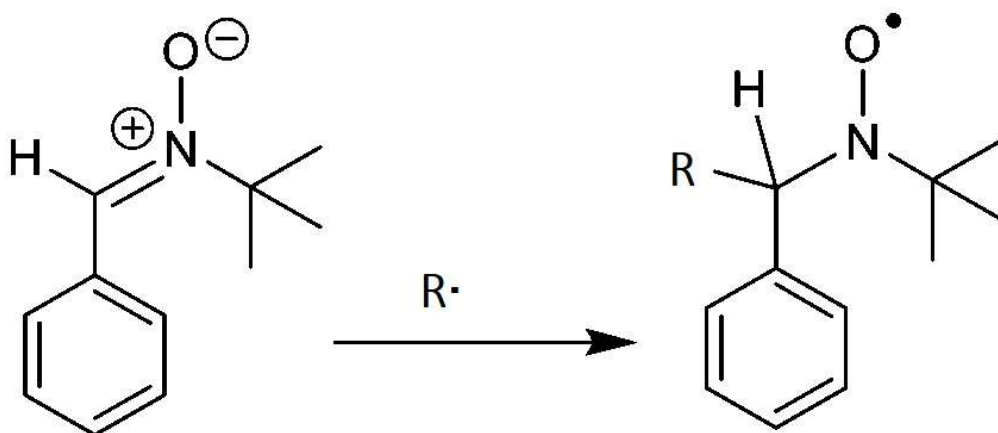
Elektronová spinová rezonance (ESR) je jedinou technikou, díky které jsme schopni sledovat radikály a jejich množství přímo. Je tedy jedinou technikou, kterou lze považovat v jisté míře za absolutní. Umožňuje detekci nespárovaných elektronů [27]. Nevýhodou této techniky je schopnost bezpečně detekovat pouze méně reaktivní radikály. Více aktivní radikály se nehromadí v organismu v dostatečně vysokých množstvích, aby bylo možné je pomocí ESR stanovit. Jedním z řešení tohoto problému je použití tzv. „pastí“. Jedná se o látky schopné zachytit vysoce reaktivní radikály a reagovat s nimi za vzniku stabilního radikálu, který lze již pomocí ESR detekovat. Nevýhodou je, že v okamžiku použití pasti již přestává být technika absolutní. Množství radikálů poté závisí na množství, které se podaří navázat na danou radikálovou past [28].

Pasti používané *ex vivo*

Existuje celá řada pastí, které jsou využívány pro testy na buněčných kulturách i na zvířatech. Mezi běžně používané látky patří především N-tertbutyl-p-phenylnitron (PBN) a 5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO). Obecně jsou PBN, DMPO a jim podobné látky používány pro pokusy *ex vivo* [29]. PBN je látka se sumárním vzorcem $C_{11}H_{15}NO$. Její molekulová hmotnost je 177,3 g/mol. Chemická struktura látky je uvedena na Obrázek 4.

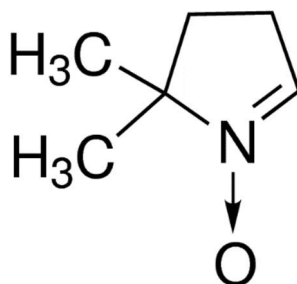


Obrázek 4: Chemická struktura PBN. Přejato a upraveno z [30].



Obrázek 5: Reakce PBN s $R\cdot$, produktem je stabilnější radikál, který lze pomocí ESR stanovit. Převzato a upraveno z [31].

DMPO má sumární vzorec $C_6H_{11}NO$ a molekulovou hmotnost 113.16 g/mol. Chemická struktura je popsána na Obrázek 6.



Obrázek 6: Chemická struktura DMPO. Přejato a upraveno z [32].

Jeden z obecně podceňovaných problémů spočívá v tom, že reakční produkty, které poskytují ESR signál mohou být rychle odstraněny (zhašeny), a to aktivitou některých enzymů. Ke zhašení může docházet také vlivem různých látek, které se v organismu běžně vyskytují, např. askorbátu. Tento problém silně zasahuje i DMPO, který je využíván k zachycení hydroxylových radikálů. V literatuře je popisována schopnost askorbátu snížit množství radikálů při měření využívajících DMPO. Spekuluje se tedy o jeho antioxidačních schopnostech v daném systému [33].

Radikálové pasti používané *in vivo*

Potenciálně vhodnější pro pokusy *in vivo* u lidí jsou aromatické pasti volných radikálů. U látek používaných pro testy na lidech je nezbytná především jejich fyziologická vstřebatelnost organismem. Příkladem těchto látek salicylát či fenylalanin. Salicylát je v přítomnosti $OH\cdot$ hydroxylován na 2,3-dihydroxybenzoát. Oba optické izomery 2,3-dihydroxybenzoátu jsou hydroxylovány $OH\cdot$ na orto- a metyl- tyrosin. Jak 2,3-dihydroxybenzoát, tak orto- a metyl- tyrosiny zřejmě nevznikají vlivem enzymové aktivity *in vivo*. Efektivita aromatických pastí při detekci $OH\cdot$ závisí na koncentraci v místě, kde jsou volné radikály generovány. Dochází ke kompetici mezi danou pastí a dalšími látkami, schopnými pohlcovat volné radikály, a proto je nepravděpodobné, že by nějaká past byla schopná polapit více než malé procento z celkově produkovaného množství $OH\cdot$. Z tohoto tvrzení tedy vyplývá, že aromatické lapače radikálů nejsou vhodnými látkami pro kvantifikaci hydroxylových radikálů. Obzvláště pro plazmu jsou tyto techniky nevhodné, protože není možné určit původ $OH\cdot$, které jsou v plazmě detekovány. Z výše uvedených skutečností vyplývá, že tyto techniky neposkytují zcela objektivní výsledky [34]. Dalším příkladem radikálových pastí jsou urátové pasti. Urát je oxidován pomocí ROSN [35].

Jedním z hlavních oxidačních produktů urátu je allantoin. Zvýšené hodnoty allantoinu v plazmě naznačují, že byl daný organismus vystaven oxidačnímu stresu. Allantoin lze také stanovit v moči. Měření allantoinu se zdá být jednou z nejslibnějších metod pro kvantifikaci celkového oxidačního stresu při měření *in vivo*. Hladina urátu v lidském těle je fyziologicky vysoká a zároveň urát reaguje se širokou škálou ROSN [36].

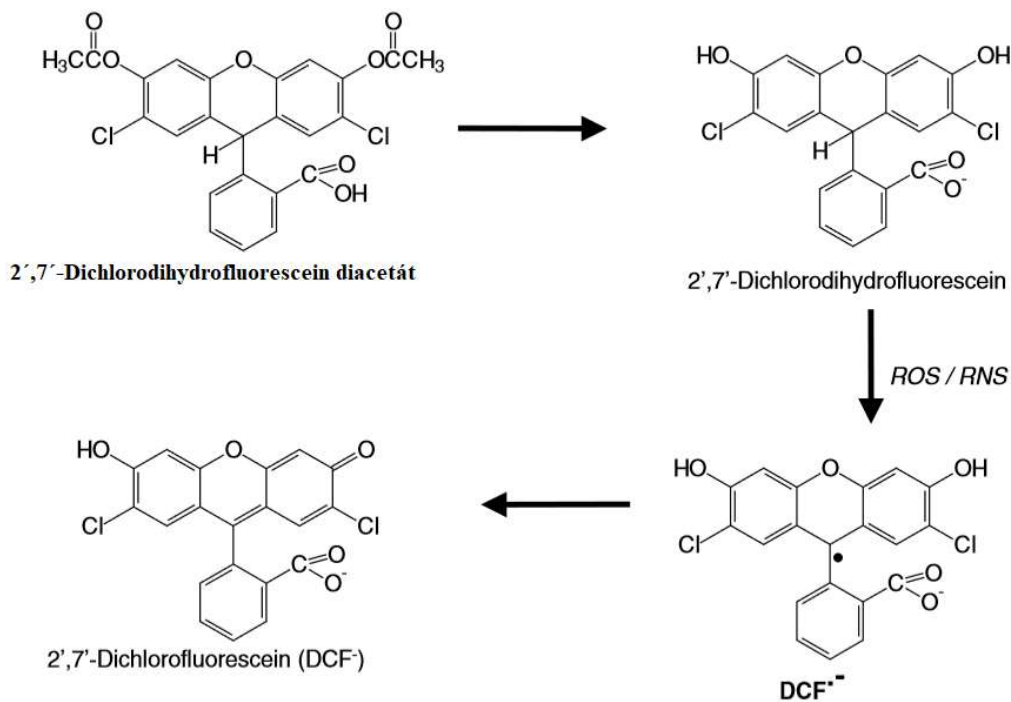
2.10 Stanovení množství ROSN v buněčných kulturách

Na úvod je podstatné zmínit, že v průběh samotné kultivace buněčných kultur způsobuje oxidační poškození [37]. Existuje řada technik, pomocí nichž můžeme na buněčných kulturách sledovat, jak vzniká v buňkách oxidační poškození. Mezi obecné zákonitosti patří např. fakt, že peroxid vodíku velmi snadno prochází skrz buněčné membrány, kdy k průchodu do buňky pravděpodobně využívá aquaporinů [38]. Na základě snadného průniku peroxidu vodíku do buňky skrz aquaporiny může katalasa ovlivňovat jeho intralulární a extracelulární koncentraci. Snížením extracelulární koncentrace peroxidu vodíku dojde ke změně koncentračního gradientu a peroxid vodíku proudí z buňky ven. Na rozdíl od peroxidu vodíku $O_2^{\cdot-}$ neprochází skrz buněčnou membránu [39]. Obecně je třeba si před experimentem uvědomit, jaký efekt mají různé látky či enzymy na ROSN v krátkém čase a jaký po delší době.

Ke studiu oxidačního stresu u buněčných kultur lze využít spinových pastí a detekci pomocí ESR, jak bylo již zmíněno v kapitole (2.9). Druhou možností je využití sond na bázi fluorescence. Dvěma nejvyužívanějšími sondami se budou zabývat následující kapitoly.

Dichlorodihydrofluorescein diacetate

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetát (DCFDA) je nejčastěji používanou fluorescenční sondou pro určení míry oxidačního stresu v buněčných kulturách [40]. DCFDA je deacetylován na dichlorodihydrofluorescein (DCFH) pomocí buněčných esterás. DCFH nevykazuje fluorescenci. Vlivem ROSN je DCFH přeměněn na dichlorofluorescein (DCF). DCF vykazuje silnou fluorescenci při 525 nm při excitaci okolo 488 nm. Celý průběh přeměny je popsán na Obrázek 7.

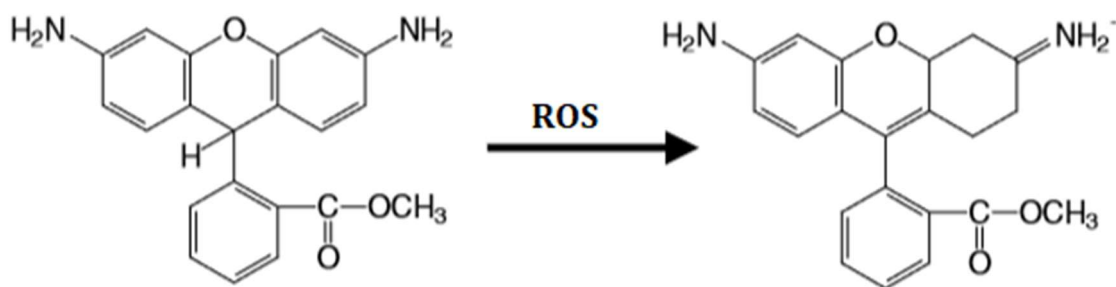


Obrázek 7: Mechanismus vzniku DCF. DCF vykazuje silnou fluorescenci při 525 nm při excitaci kolem 488 nm. Převzato a upraveno z [41].

DCFDA vstupuje do buněk a akumuluje se v cytosolu. Ve vyšších dávkách může DCFDA působit cytotoxicky. Sonda musí být nanášena na buňky ve velmi nízkých koncentracích. V literatuře je uváděna koncentrace 1-10mM jako optimální. Při kultivaci je nutné používat médium neobsahující sérum, protože by sérum mohlo obsahovat endogenní zdroj esteras., což může ovlivnit výsledná data. Deesterifikovaný dichlorofluorescein má totiž nižší prostupnost skrz buněčnou membránu. Vystavením sondy světlu o vysoké intenzitě záření může mít také na měření vliv. Nevýhodou DCFDA je velmi pomalá reakce s peroxidem vodíku a peroxidovanými lipidy [42] [43]. Peroxid vodíku ani $O_2^{\cdot-}$ DCFH na DCF oxidovat nedokáže. Peroxylové, alkoxylové a OH^{\cdot} radikály tuto schopnost mají. Z toho vyplývá, že výsledky při použití DCFDA znázorňují celkové množství ROSN. [40][44].

Dihydrorhodamine 123

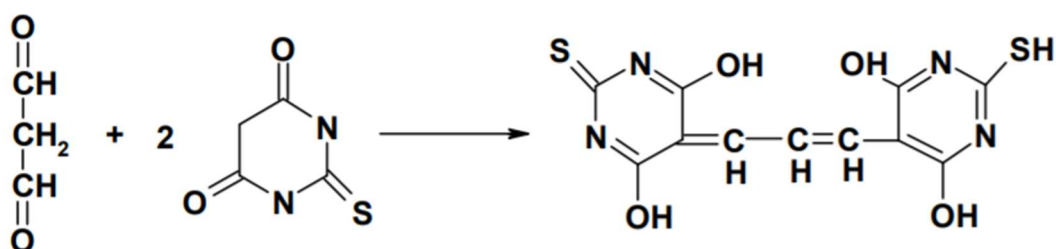
Dihydrorhodamine 123 (DHR) je sonda, která je využívána pro detekci určitých druhů ROSN (OH^{\cdot} , $ONOO^{\cdot}$, $NO_2^{\cdot-}$ a některých druhů peroxidových derivátů). Reakce s peroxidem vodíku a $O_2^{\cdot-}$ probíhají špatně. DHR je pomocí ROSN oxidován na rhodamine 123, který vykazuje vysokou fluorescenci kolem 536 nm při excitaci kolem 500 nm. Rhodamine 123 je lipofilní, pozitivně nabitá látka, která se vzhledem ke svému náboji akumuluje v mitochondriích [45]. Reakce DHR s ROS je popsána na Obrázek 8.



Obrázek 8: Reakce DHR s ROS za vzniku rhodaminu 123, který vykazuje silnou fluorescenci při 536 nm při excitaci kolem 500 nm. Převzato a upraveno z [41].

2.11 Techniky založené na měření lipidové peroxidace

Lipidy mohou vlivem ROSN podléhat oxidaci, chloraci či nitraci. S lipidy nereagují peroxidem vodíku ani s $O_2^{\cdot-}$. Byly vyvinuty techniky pro zkoumání míry nitrace či chlorace. Čatěji je ovšem zkoumána míra oxidace lipidů. Polynenasycené mastné kyselina (PUFA) obsahující 2 nebo více dvojných vazeb jsou obecně velmi citlivé na oxidaci způsobenou různými druhy ROSN. Proces peroxidace je poměrně složitý a probíhá přes řadu meziproduktů. Reakcí PUFA s OH^{\cdot} dochází ke vzniku peroxylovaných lipidových zbytků. Tyto zbytky poté mohou reagovat s dalšími PUFA za tvorby hydroperoxidu daného lipidů a peroxylovaného lipidového zbytku „napadené“ PUFA. Druhou cestou je atak intramolekulární dvojných vazeb PUFA peroxylovaným zbytkem za vzniku cyklického endoperoxidu. Endoperoxid se pak dále rozkládá na MDA. MDA je jedním z mnoha nízkomolekulárních produktů vznikajících rozpadem lipidového hydroperoxidu. Množství MDA lze detekovat pomocí kyseliny thiobarbiturové (TBA), se kterou MDA tvoří barevný konjugát, jenž lze spektrofotometricky detekovat při 532 nm. Reakce MDA s TBA je znázorněna na Obrázek 9.



Obrázek 9: Reakce MDA s TBA. Vznikne barevný konjugát stanovitelný při 532 nm. Přejato a upraveno z [46].

Tuto techniku lze označit za jednu z obecně nejvyužívanějších technik pro zjištění míry lipidové peroxidace. Technika poskytuje spekulativní výsledky, protože velká část konjugátů s TBA vyskytujících se v tělních tekutinách může vznikat jiným způsobem než během lipidové

peroxidace. Koncentrace MDA může vzrůst např. vlivem reakce ROSN s kyselinou sialovou a deoxyribózou. Metoda popsaná výše je tedy v této formě pro současný moderní výzkum neakceptovatelná. Pro vědecké účely se využívá modifikace, kdy je konjugát MDA-TBA izolován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie [47]. Ani v případě použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie nelze tvrdit, že jsou výsledky validní, neboť není možné odlišit hydroperoxydy lipidů a aldehydů vytvořené v důsledku lipidové peroxidace od hydroperoxidů lipidů a aldehydů přijímaných v potravě [48]. Pravděpodobně nejlepším dostupným biomarkerem lipidové peroxidace uvedeným v literatuře jsou isoprostanony. Vznikají jako konečné produkty peroxidace PUFA. Většina publikovaných prací se věnuje skupině F2-isoprostanonů vznikajících z kyseliny arachidonové. Nicméně se ukazuje, že ani isoprostanony se nezdají být ideálními biomarkery, protože jejich detekci mohou ovlivnit parametry jako je např. koncentrace kyslíku. Přestože isoprostanony nejsou ideálními biomarkery bývají často využívány ve studiích týkajících se obezity a hypercholesterolemie [49] [50].

2.12 Techniky měřící míru oxidačního poškození DNA

Oxidační poškození DNA pravděpodobně zvyšuje riziko vzniku rakoviny. Prozatím neexistuje technika, která by se dala označit jako „zlatý standard“ pro určování míry poškození DNA vlivem ROSN. Poškozením DNA vzniká široká škála modifikovaných bází a cukrů. Přestože nelze jeden určitý produkt označit jako ukazatel celkového poškození DNA, bývá k tomu účelu využíván 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8OHdG). Pro stanovení množství 8OHdG se využívá analytický technik jako např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí či plynová chromatografie s hmotnostní detekcí [51]. Jako veliký problém se ukázalo, že 8OHdG vzniká již v průběhu izolace DNA a v průběhu přípravy pro analýzu. Doposud nebyla stanovena žádná fyziologická bazální hodnota množství 8OHdG v buněčné DNA. 8OHdG bývá využíván ve studiích zabývajících se vlivem antioxidantů a na poškození DNA vlivem ROSN [52] [53].

3 Cíle bakalářské práce

Hlavním cílem této bakalářské práce byla optimalizace vybraných technik pro měření míry oxidačního poškození a jejich vzájemné porovnání na experimentálním modelu jaterních buněk potkana. K dosažení tohoto cíle bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

- shrnutí dosavadních poznatků o technikách využívaných pro určení míry oxidačního stresu,
- izolace hepatocytů z potkaních jater a jejich následná kultivace,
- vyvolání oxidačního poškození u kultivovaných buněk a následná detekce poškození pomocí vybraných technik: stanovení malondialdehydu a měření množství reaktivních forem pomocí fluorescenčních sond DCFDA a DHR.

4 Materiál a metody

4.1 Použité přístroje

Analytické váhy

Discovery, Ohaus Corp. (USA)

Automatické pipety

Eppendorf (Německo); Nichiryo (Japonsko)

Centrifugy

Centrifuge 5418, Eppendorf (Německo); Spectrafuge Mini Centrifuge C1301B, Labnet International, Inc. (USA); ROTOFIX 32, Hettich (Německo); Sigma 2K15, Sigma (Německo)

Čtečka mikrotitračních destiček

Infinite® 200 PRO, Tecan Trading AG (Švýcarsko); Sunrise™ , Tecan Trading AG (Švýcarsko)

Inkubátory

Thermomixer kompakt, Eppendorf (Německo); SANJOY CO2 incubator, SANYO (Japonsko)

Laboratorní třepačka

Vortex Genius 3, IKA-Werke GmbH & Co. KG (Německo)

Magnetická míchačka

Monotherm, Variomag (Německo)

Mikrostríkačka

MICROLITER Syringe 802RN, Hamilton (Švýcarsko); MICROLITER Syringe 802RN, Hamilton (Švýcarsko)

Mikroskop

Leica DM IL LED, Leica Microsystems (Německo); Mikroskop LABOVAL 3, Carl Zeiss Jena (Německo)

Stavebnicové čerpadlo

Stavebnicové čerpadlo SC4, Vývojové dílny ČSAV (Česká republika)

Předvážky

KERN EW 600-2M, Kern & Sohn GmbH, (Německo)

Vodní lázeň

EL 20R, KAVALIER (Česká republika)

4.2 Použitý materiál a chemikálie

BioVision Inc. (USA)

Lipid peroxidation (MDA) colorimetric/fluorimetric Assay Kit

Cayman Chemical (USA)

dihydrorhodamine 123

Gibco® by life technologies™ (USA)

L-glutamin, fetální hovězí sérum,

Lachema Brno (Česká republika)

hydrogenfosforečnan sodný (čistý), dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, heptahydrát síranu hořečnatého

PENTA s.r.o (Česká republika)

hydroxid sodný, dihydrogenfosforečnan draselný, chlorid draselný, síran hořečnatý, chlorid sodný, ethanol (96%)

ROCHE s.r.o., Diagnostic Division (Švýcarsko)

kolagen (z potkaních ocasů)

Sigma-Aldrich (USA)

2',7'-Dichlorofluorescein diacetát, ethylen glycol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetra octová kyselina (EGTA), chlorid vápenatý, lipopolysacharid z *E.coli*, trypanová modř, chlorid sodný (0,9%), dimethyl sulfoxid, tetrazolium bromid, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), penicilin-streptomycin, William's E medium, tert-butyhydroperoxid

Thermo Fisher Scientific (USA)

Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit

Zentiva Group, a.s. (Nizozemsko)

heparin, kolagenasa

Cytosol izolovaný z potkanů byl připraven na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v roce 2015.

Primární hepatocyty izolované z potkaních samců kmene Wistar o hmotnosti 200 – 300 g.

4.3 Metody

4.3.1 Izolace hepatocytů

Pro izolaci byli použiti potkaní samci kmene Wistar o hmotnosti 200 – 300 g. Potkanům byla 18 hodin před izolací odebrána potrava. Hepatocyty byly izolovány z nepoškozených jater pomocí standardní dvoufázové kolagenázové perfuze [54] s menšími modifikacemi podle [55]. Životnost buněk byla stanovena pomocí trypanové modři [56]. Na podložní sklíčko byla kápnuta kapka trypanové modři a kapka suspenze hepatocytů. Buňky byly mikroskopovány při desetinásobném zvětšení. Byly počítány živé a mrtvé buňky (mrtvé buňky se obarví namodro) ve 20 náhodně vybraných zorných polích. Počet mrtvých a živých buněk byl sečten, celkem dohromady tvoří 100 %. Životnost hepatocytů byla vypočtena jako poměr živých buněk ku celkovému počtu počtu buněk (živých i mrtvých).

Buňky byly počítány také v Bürkově komůrce. Byl vypočten počet buněk v 5 a 5 čtvercích po 16 okénkách. Výsledný počet buněk určuje počet buněk v milionech na ml. Obě tyto hodnoty byly dále použity pro výpočet ředění suspenze hepatocytů vhodného pro jejich kultivaci.

4.3.2 Kultivace hepatocytů

Pro kultivaci byly připraveny následující roztoky:

Kyselina octová: 20mM

Pracovní roztok kolagenu: (kolagen 10 mg, kyselina octová (20mM) 33,3 ml)

Kompletní médium + 5% fetální hovězí sérum

Tabulka 1: Příprava kompletního média s 5% fetálním hovězím sérem.

Látka	V [ml]
William's E medium	464,7
Penicilin/Streptomycin (10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu na 1 ml)	5,000
Glutamin (200mM)	5,000
Insulin (1 μ M)	0,3000
Fetální hovězí sérum	25,00
Celkem	500,0

Do jamek dvacetičtyřjamkové destičky (24-WP) bylo napipetováno 200 μ l a do jamek šestijamkové destičky (6-WP) 3 ml pracovního roztoku kolagenu. Všechny destičky byly ponechány minimálně 15 minut s pracovním roztokem kolagenu. Po uplynutí pátáctiminutové inkubace byl kolagen odsán a všechny jamky byly propláchnuty fyziologickým roztokem, aby došlo k neutralizaci pH. Do jamek 24-WP bylo pipetováno 0,5 ml a do 6-WP 2 ml fyziologického roztoku. Fyziologický roztok byl odsán až těsně před nanesením hepatocytů, aby nedošlo k vyschnutí jamek. Hepatocyty byly před nasazením na kultivační plotny vhodně naředěny.

Tabulka 2: Množství buněk a objem nanášený na jednotlivé velikosti kultivačních ploten.

Typ plotny	Množství nasazených buněk	V _{KM} [ml]
24 -WP	200 000 hc/PM (15 mm)	0,30 ml KM
6 - WP	1000 000 /PM (35 mm)	1,5 ml KM
PM (10 cm)	8000 000/ PM (100 mm)	12 ml KM

Legenda: 24-WP (dvacetičtyřjamková destička), 6-WP (šestijamková destička), PM (petriho miska)

Naředěné hepatocyty byly nasazeny na kultivační plotny potažené kolagenem v konečném objemu 0,3 ml na 24-WP, 1,5 ml na 6-WP. Hepatocyty byly kultivovány 3 hodiny při teplotě 37°C a 5% medicínálním CO₂. Po třech hodinách byly odsány neuchycené hepatocyty. Bylo přidáno 0,3 ml kompletního média s 5% fetálním hovězím sérem do všech 24-WP a 1,5 ml do všech 6-WP. Destičky byly následně umístěny opět do inkubátoru a kultivovány přes noc. Ráno bylo odsáno médium a k hepatocytům byly přidány příslušné pracovní roztoky. K polovině buněk byl přidán roztok LPS o koncentraci 15 μ g/ml ve William's E mediu, k druhé polovině buněk bylo přidáno kompletní médium již bez fetálního hovězího séra. Buňky byly kultivovány s pracovními roztoky po dobu 24 hodin při teplotě 37°C a 5% medicínálním CO₂.

4.3.3 Zpracování vzorků

Buňky z 6-WP byly zpracovány dle následujícího postupu. Bylo odebráno médium a všechny jamky byly promyty 2 ml ledového fosfátového pufru (PBS). Všechny destičky byly nadále udržovány při 4°C na ledu. Vždy ze 3 jamek byl odsán promývací roztok. Následně bylo do všech tří jamek napipetováno 200 μ l PBS. Hepatocyty byly uvolněny ze dna jamky pomocí stěrky a následně přemístěny pipetou do mikrozkušavek. Množství buněk v 1 zkumavce

odpovídalo 3×10^6 buněk. Mikrozkuřavky se vzorky byly následně centrifugovány 5 minut při 500x g při 4°C na centrifuze Sigma 2K15 (Sigma; Německo). Byl odsán supernatant a část hepatocytů byla ihned zmražena a následně skladována v kapalném dusíku. Druhá část hepatocytů byla dále zpracovávána pomocí technik viz následující kapitoly. 24-WP byly používány pro stanovení životnosti.

4.3.4 Stanovení životnosti hepatocytů pomocí MTT

Byl připraven pracovní roztok (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnetrazolium bromidu (MTT) o koncentraci 1 mg/ml ředěním zásobního roztoku MTT s kompletním médiem bez fetálního hovězího séra. Pracovní roztok byl umístěn na 10 minut do inkubátoru, aby se vytemperoval. Ze všech jamek 24-WP bylo odsáno médium. Následně bylo do všech jamek napipetováno 300 μ l pracovního roztoku MTT. Buňky byly inkubovány po dobu 3 hodin s roztokem MTT. Po třech hodinách byl odsán roztok MTT. Na dně jamky bylo možné pozorovat fialově zabarvené hepatocyty.

Do každé jamky bylo přidáno 500 μ l dimethylsulfoxidu. Obsah destičky byl promíchán pomocí kývavých pohybů. Z každého vzorku bylo v „paralelkách“ odebráno 100 μ l a přeneseno na čistou 96-ti jamkovou destičku. Byla měřena absorbance při 540 nm.

4.3.5 Stanovení koncentrace proteinu v buňkách podle Lowryho

Ke stanovení obsahu proteinu byla použita modifikovaná Lowryho metoda. Lowryho metoda je modifikací biuretové metody, která nemá vysokou citlivost. Principem metody je chelatace měďnatého iontu pomocí imidových struktur polypeptidového řetězce v bazickém prostředí. Lowryho metoda používá mimo biuretového činidla ještě činidlo Folin-Ciocalteuovo. Toto činidlo obsahuje kyseliny fosfomolybdenovou a fosfowolframovou, které jsou redukovány tyrosinovými zbytky proteinů. Výsledný produkt má modrou barvu. Koncentrace se stanovuje spektrofotometricky při 650 nm [57].

Vzorky byly zpracovány podle postupu popsáního v kapitole (4.3.3). Pro stanovení obsahu proteinu v jednotlivých suspenzích hepatocytů byly použity následující roztoky:

Roztok A: (500,0 g tartarát sodný, 22,50 g bezvodý uhličitan sodný, 122,5 ml hydroxidu sodného (4 g /100 ml), 250,0 ml deionizované vody)

Roztok B: (2,000 g tartarátu sodného, 10,00 ml hydroxidu sodného (4 g /100 ml), 1,000 g pentahydrátu síranu měďnatého, 100,0 ml deionizované vody)

Roztok C: (1,000 ml Folin-Ciocalteu činidlo, 10,00 ml deionizovaná voda)

Vzorky byly připraveny v „paralelkách“. Pro získání homogenní suspenze hepatocytů byla použita sonikace. K 10 µl homogenátu bylo přidáno 190 µl deioizované vody. Poté byly připraveny kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací 0,025 mg/ml – 0,1 mg/ml ředěním zásobního roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 0,1 mg/ml.

Ke všem analyzovaným vzorkům i vzorkům pro kalibraci bylo přidáno 200 µl roztoku A. Všechny zkumavky byly promíchány na Vortexu a následně umístěny do vodní lázně o teplotě 50°C, kde probíhala inkubace po 10 minut. Po deseti minutách byly zkumavky vyjmuty z vodní lázně a do všech bylo přidáno 20 µl roztoku B. Vzorky byly opět promíchány na Vortexu. Následně probíhala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Nakonec bylo do všech zkumavek napipetováno 600 µl roztoku C a zkumavky byly inkubovány 10 minut při 50°C. Po ochlazení vzorků na laboratorní teplotu byla měřena absorbance při 650 nm.

4.3.6 Stanovení koncentrace proteinu v buňkách pomocí BCA

Stanovení množství proteinů ve vzorcích hepatocytů bylo prováděno také pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA). Metoda je založena na principu redukce měďnatého kationtu na kation měďný v alkalickém prostředí. Barevný produkt reakce s BCA je detekován spektrofotometricky [58].

Ke stanovení byl použit „Pierce[®] Microplate BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Fisher scientific, USA)

BCA Reagent A: 250ml; obsahuje uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, BCA a tartarát sodný v 0,1M hydroxidu sodném

BCA Reagent B: 25 ml; 4% síran měňatý

Albumin Standard: 2 mg/ml, BSA v 0,9% NaCl a 0,05% azidu sodném

Vzorky byly zpracovány podle postupu popsaného v kapitole (4.3.3). Suspenze hepatocytů byla homogenizována pomocí sonikace. K 10 µl homogenátu bylo přidáno 190 µl deioizované vody. Byly připraveny roztoky kalibrační řady o koncentraci 0,125-2,00 mg/ml ředěním zásobního roztoku BSA o koncentraci 2,00 mg/ml.

Dále byl připraven blak, kdy byl místo roztoku BSA použit PBS. Následně byl ekvivalent 9 µl každého vzorku a vzorků standardů pipetován do 96-ti jamkovou. Destička byla kývavými pohyby promíchána. Následně byla destička inkubována při 37°C po dobu 15 minut. Po uplynutí 15 minut bylo do všech jamek přidáno 260 µl pracovního roztoku BCA. Destička byla inkubována při 37°C po dobu 30 minut. Po ochlazení destičky na laboratorní teplotu byla měřena absorbance všech vzorků při 562 nm.

4.3.7 Stanovení malondialdehydu

Ke stanovení byl použit „Lipid peroxidation (MDA) Colorimetric/Fluorimetric Assay Kit“ (Biovision, USA).

Byl připraven pracovní roztok TBA. Do vialky obsahující 250 mg TBA bylo přidáno 7,5 ml neředěné ledové kyseliny octové. Suspenze byla kvantitativně převedena do odměrné baňky a baňka byla doplněna destilovanou vodou na konečný objem 25 ml. Roztok byl následně míchán, aby došlo k rozpuštění suspenze.

Vzorky byly zpracovány podle postupu popsaného v kapitole (4.3.3). Vzorky byly resuspendovány na hustotu 1×10^6 hepatocytů/ml. Homogenizace probíhala následujícím způsobem: ke vzorku odpovídajícímu hustotě 1×10^6 buněk bylo přidáno 300 μ l „MDA Lysis Buffer“ a 3 μ l „BHT (100X)“. Všechny vzorky byly následně centrifugovány při 13 000 x g po 10 minut. Z každého vzorku byl odebrán alikvot 200 μ l a přenesen do nové mikrozkušavky.

Byla připravena řada kalibračních roztoků o koncentraci 0-0,5 nmol MDA/jamka ředěním standardního roztoku MDA o koncentraci 4,17M. Ke všem vzorkům i roztokům kalibrační řady bylo přidáno 600 μ l TBA. Všechny zkumavky byly inkubovány při 95°C po 60 min. Po uplynutí 60 minut byly zkumavky zchlazeny na laboratorní teplotu pomocí ledu. Vzorky byly v tripletech přeneseny na 96-ti jamkovou destičku. Byla měřena fluorescence při Ex/Em= 532/560 nm.

4.3.8 Stanovení radikálů pomocí DCF DA

Byl připraven zásobní roztok DCF-DA v ethanolu o koncentraci 5 mg/ml. Tento roztok byl následně naředěn PBS na koncentraci 20 μ mol/l, čímž byl připraven pracovní roztok. Dále byl připraven pracovní roztok připraveny tert-butylhydroperoxidu (TBHP) o koncentraci 55 μ mol/l ředěním zásobního roztoku o koncentraci 5,5 mol/l. Ředěním pracovního roztoku byly připraveny roztoky TBHP o koncentraci 50-250 μ mol/l.

Vzorky byly zpracovány podle postupu popsaného v kapitole (4.3.3). Vzorky byly resuspendovány na hustotu 1×10^6 hepatocytů/ml v pracovním roztoku DCF-DA a byly inkubovány po 30 minut při 37°C ve tmě. Buňky byly následně promyty PBS pomocí centrifugace. Buňky byly opět resuspendovány na koncentraci 1×10^6 hepatocytů/ml. Na 96-ti jamkovou destičku bylo nanášeno 25 μ l suspenze hepatocytů pomocí mikrostříkačky Hamilton. Do každé jamky bylo nanášeno 125 μ l přílušného roztoku TBHP nebo PBS. Destička byla inkubována po 60 min při 37°C. Fluorescence byla měřena při Ex/Em = 485/535 nm. Míra fluorescence byla sledována v čase (60 min nebo 175 min)

4.3.9 Stanovení radikálů pomocí DHR

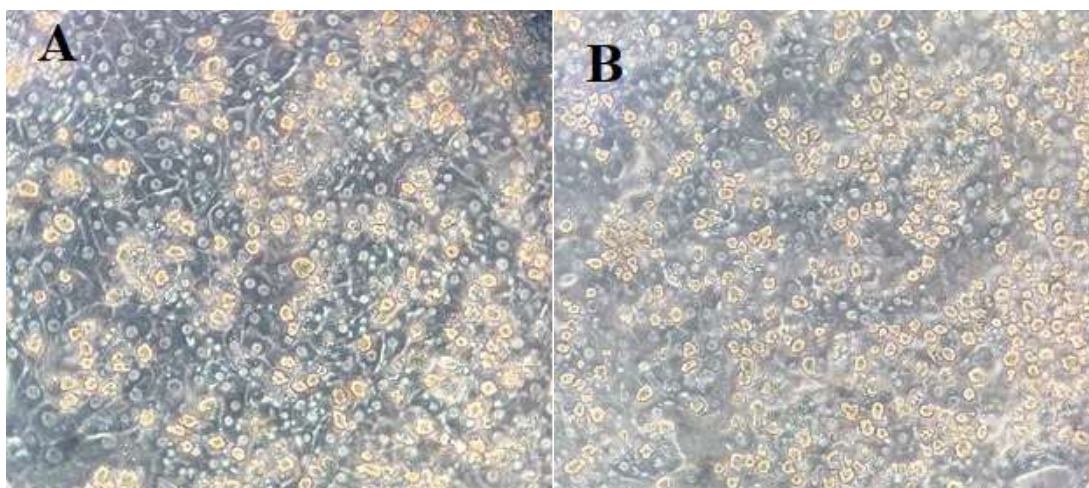
Byl připraven pracovní roztok DHR o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ ředěním zásobního roztoku o koncentraci 2 mg/ml. Byly připraveny pracovní roztoky TBHP (stejným způsobem jako v kapitole (4.3.8)). Vzorky byly zpracovány podle postupu popsaného v kapitole (4.3.3). Vzorky byly následně promyty PBS pomocí centrifugace při 4°C, byl odsán supernatant a vzorky byly resuspendovány na hustotu 1×10^6 hepatocytů/ml v pracovním roztoku DHR. Vzorky byly inkubovány po 45 minut při 37°C ve tmě. Buňky byly následně promyty PBS a opět resuspendovány na koncentraci 1×10^6 hepatocytů/ml. Na 96-ti jamkovou destičku bylo nanášeno 16 μl suspenze hepatocytů pomocí mikrostříkačky Hamilton. Do každé jamky bylo nanášeno 134 μl přílušného roztoku TBHP nebo PBS. Destička byla inkubována po 30 min při 37°C. Fluorescence byla měřena při Ex/Em 500/536 nm. Míra fluorescence byla sledována v čase (60 min nebo 175 min).

5 Výsledky

V předkládané práci jsme se nejprve zaměřili na proces izolace primárních hepatocytů a následnou kultivaci. Nejprve bylo cílem izolovat a kultivovat vzorky primárních hepatocytů. V rámci této fáze jsme sledovali, jak velikost kultivační plotny ovlivňuje životnost kultivovaných buněk. V další fázi bylo třeba najít vhodnou techniku pro stanovení koncentrace proteinu ve vzorcích hepatocytů. Poté, co byla nalezena řešení výše uvedených úkolů, jsme se zaměřili na optimalizaci jednotlivých technik pro měření míry oxidačního poškození a jejich vzájemné porovnání. Je obecně známo, že mražení buněk způsobuje samo o sobě oxidační stres, testovali jsme proto všechny techniky jak na živých buňkách, tak na buňkách zmražených v kapalném dusíku, abychom zjistili, zda je míra oxidačního poškození u zmražených vzorků vyšší. Tato informace je důležitá pro práci se vzorky v budoucím výzkumu týkajícího se oxidačního poškození.

5.1 Nanesení buněk a kultivace

Hepatocyty byly naneseny na příslušné kultivační plotny. Po třech hodinách byly odsáty neuchycené buňky a bylo vyměněno kultivační médium. Buňky byly ponechány v tomto médiu 12 hodin. Po 12 hodinách bylo médium nahrazeno roztokem LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ v PBS. Kultivace v roztoku LPS probíhala 24 hodin.



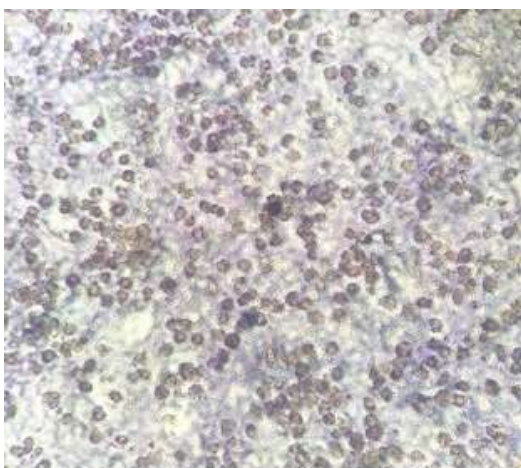
Obrázek 10: Struktura kultivovaných primárních hepatocytů po 24 h kultivace v kompletním médiu. (A) kultura kontrolní skupiny primárních hepatocytů při čtyřnásobném zvětšení na mikroskopu Leica DMIL B) kultura primární hepatocytů vystavených po 24 hodin působení LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ při čtyřnásobné zvětšení na mikroskopu Leica DMIL.

Obrázek 10: Struktura kultivovaných primárních hepatocytů po 24 h kultivace v kompletním médiu. (A) kultura kontrolní skupiny primárních hepatocytů při čtyřnásobném

zvětšení na mikroskopu Leica DMIL B) kultura primární hepatocytů vystavených po 24 hodin působení LPS o koncentraci 15 µg/ml při čtyřnásobné zvětšení na mikroskopu Leica DMIL.

5.2 Stanovení životnosti pomocí MTT testu

Byla stanovena životnost kultivovaných buněk pomocí MTT testu na 24-WP 96-WP, pro zjištění závislosti životnosti buněk na velikosti kultivačních ploten.



Obrázek 11: Reprezentační snímek hepatocytů po přidání MTT. Živé buňky jsou zbarveny fialově. Zbarvení je způsobeno fialovými krystaly zredukovaného MTT pomocí mitochondriální dehydrogenasy [59]. Snímek byl sledován při čtyřnásobném zvětšení na mikroskopu Leica DMIL.

Tabulka 3: Porovnání životnosti buněk kultivovaných na 24-WP a na 96-WP. Životnost byla stanovena u třech skupin - kontrolní skupiny, skupiny kultivované v roztoku LPS o koncentraci LPS 15 µg/ml a skupiny kultivované v 200mM roztoku alkoholu.

	životnost 24-WP %	životnost 96-WP %
Kontrola	100%	100%
LPS 15 µg/ml	71,0%	58,0%
EtOH 200mM	102%	85,0%

Legenda: 24-WP (dvacetičtyřjamková destička), 6-WP (šestijamková destička), LPS (lipopolysacharid z *E. coli*); EtOH (ethanol)

Pro účely výzkumu byly na základě výsledků MTT testu použity pro kultivaci hepatocytů 6-WP.

Tabulka 4: Životnost buněk u vzorků použitých pro následující analýzy.

	Životnost %
Kontrola	100 %
LPS 15 µg/ml	70 %
20% EtOH	100 %

Legenda: LPS (lipopolysacharid z *E. coli*); EtOH (ethanol); životnost byla stanovena pro 3 skupiny vzorků, kontrolní skupinu buněk kultivovaných v kompletním médiu, skupinu buněk kultivovanou v roztoku LPS o koncentraci LPS 15 µg/ml a skupinu buněk z potkana, kterému byl po 6 dní podáván gaváží do žaludku 20% roztok ethanolu (buňky byly následně kultivovány pouze v kompletním médiu).

5.3 Stanovení koncentrace proteinu

Tabulka 5: Koncentrace proteinu ve vzorcích použitých pro následující analýzy stanovené Lowryho metodou a metodou využívající BCA.

	BCA [mg/ml]	Lowry [mg/ml]
Kontrola	6,02	5,43
LPS 15 µg/ml	5,17	5,19
20% EtOH	8,33	6,52

Legenda: LPS (lipopolysacharid z *E. coli*); EtOH (ethanol); byla měřena kontrolní skupina kultivovaná v čistém médiu, skupina kultivovaná s roztokem LPS o koncentraci 15 µg/ml a skupina buněk z potkana, kterému byl po 6 dní podáván gaváží do žaludku 20% roztok ethanolu (buňky byly následně kultivovány pouze v kompletním médiu). Uvedené koncentrace proteinu v mg/ml odpovídají množství buněk $1 \cdot 10^6$.

5.4 Stanovení míry lipidové peroxidace

Tabulka 6: Výsledky z měření míry lipidové peroxidace u zmražených a živých buněk.

	c [nmol/mg proteinu BCA]	c [nmol/mg proteinu LOWRY]
Kontrola zmražené buňky	0,161 ± 0,004	0,179 ± 0,004
LPS 15 µg/ml zmražené buňky	0,194 ± 0,003	0,193 ± 0,004
Kontrola živé buňky	0,724 ± 0,067	0,803 ± 0,074
LPS 15 µg/ml živé buňky	0,956 ± 0,019	0,953 ± 0,019
20% EtOH živé buňky	0,899 ± 0,037	1,149 ± 0,047

Legenda: LPS (lipopolysacharid z *E. coli*); BCA (kyselina bicinchoninová); EtOH (ethanol).
 Výsledky uvedeny ve tvaru koncentrace \pm SEM, $n = 6$, $p < 0,05$ (platí pro všechny výsledky v Tabulka 6). Byla měřena kontrolní skupina kultivovaná v kompletním médiu, skupina kultivovaná s roztokem LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ a skupinu buněk z potkana, kterému byl po 6 dní podáván gaváží do žaludku 20% roztok ethanolu, (buňky byly následně kultivovány pouze v kompletním médiu). Výsledky byly vztaženy na koncentraci proteinu určenou oběma zvolenými metodami.

5.5 Stanovení množství ROSN pomocí DHR

Před samotným měřením množství ROSN touto sondou bylo nezbytné nalézt vhodnou vlnovou délku pro emisi a pro excitaci na námi používaném přístroji (Infinite pro 200, Tecan; USA). Na základě těchto proměřených spekter byla vybrána vlnová délka 503 nm pro excitaci a vlnová délka 536 nm pro emisi. Dále bylo třeba ověřit zda jsme schopni pomocí DHR detekovat ROSN. K tomuto účelu bylo provedeno měření dvou vzorků, kdy jeden obsahoval systém generující Fentonovu reakci a druhý ne.

Tabulka 7: Porovnání míry fluorescence detekované DHR u systému generujícího Fentonovu reakci se systémem negenerujícího Fentonovu reakci.

	Negenerující systém	Generující systém
Míra fluorescence při Ex/Em=503/536nm	435 \pm 44	1280,0 \pm 43,5

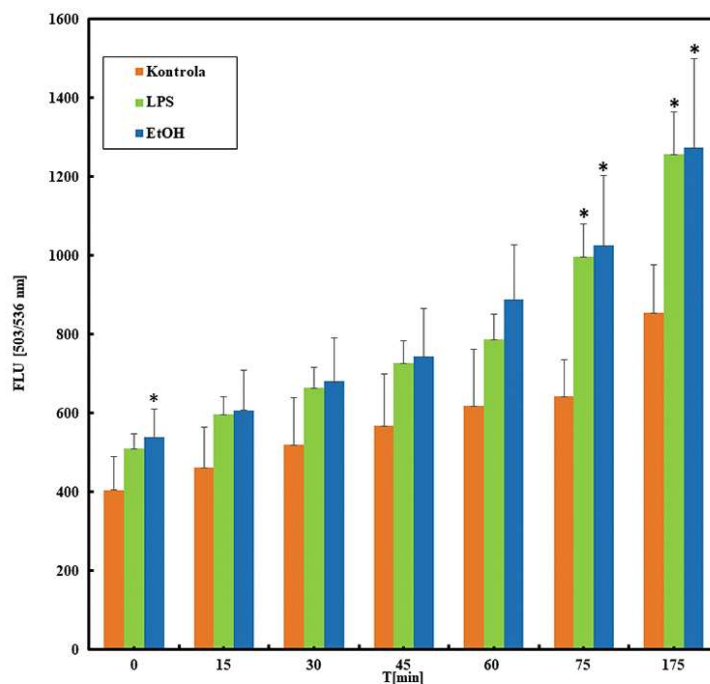
Legenda: Systém generující Fentonovu reakci obsahoval:

110 μl PBS + 5 μl FeSO_4 + 5 μl FeCl_3 + 10 μl DHR + 10 μl 1% H_2O_2 (poměry jednotlivých složek ve směsi byly stanoveny experimentálně).

Směs bez systému generujícího Fentonovu reakci obsahovala:

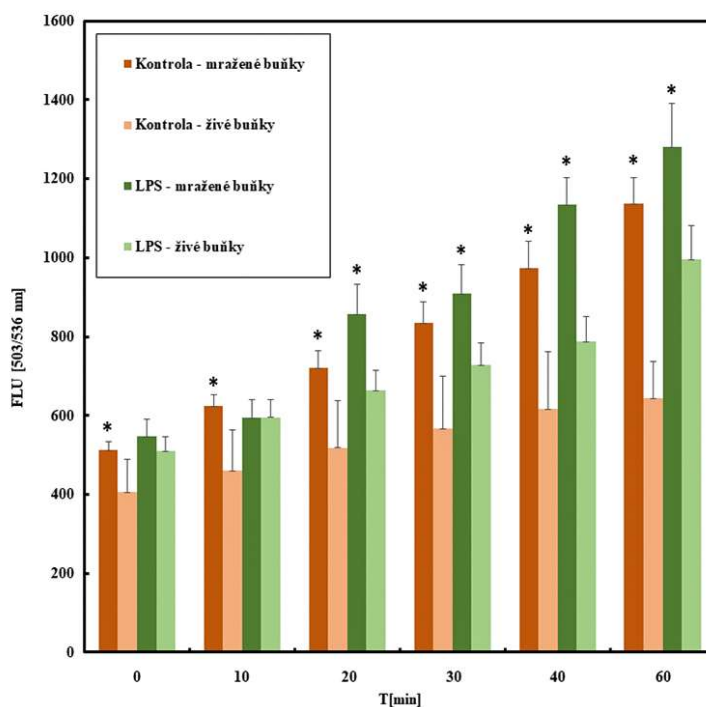
120 μl PBS + 5 μl FeSO_4 + 5 μl FeCl_3 + 10 μl DHR. Výsledky uvedeny ve tvaru míra fluorescence \pm SEM.

Během měření množství ROSN jednotlivých vzorků jsme měřili intenzitu fluorescence u kontrolní skupiny, skupiny kultivované s roztokem LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ a skupiny vzorků z potkana, kterému byl po 6 dní podáván gaváží do žaludku 20% roztok ethanolu. Dále jsme pozorovali rozdíl v intenzitě fluorescence u buněk živých a buněk, které byly po izolaci zmrazeny a uskladněny v kapalném dusíku. Posledním bodem, kterým jsme se zabývali, bylo pozorování množství ROSN vytvořených pomocí TBHP.



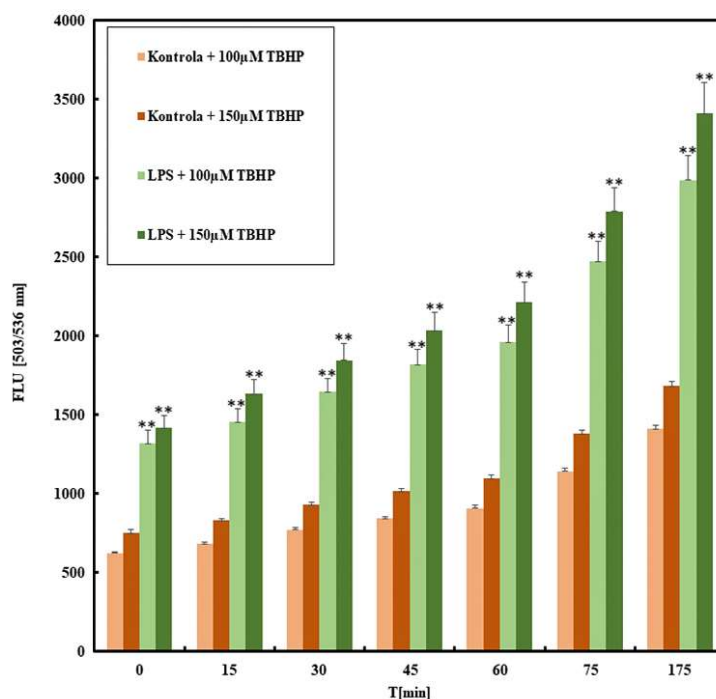
Obrázek 12: Měření množství ROSN pomocí DHR.

Obrázek 12: Porovnání hodnot intenzity fluoresce jednotlivých měřených vzorků v závislosti na čase. Byly měřeny vzorky kontrolní skupiny, vzorky skupiny kultivované s roztokem LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ a vzorky buněk z potkana kultivované v kompletním médiu, kterému byl po 6 dní podáván 20% roztok ethanolu. Výsledky uvedeny ve tvaru koncentrace \pm SEM, $n = 6$, * $p < 0,05$ proti hodnotě kontroly odpovídajícího časového intervalu.



Obrázek 13: Měření množství ROSN pomocí DHR.

Obrázek 13: Porovnání hodnot intenzity fluorescence zmražených vzorků a nezmražených vzorků v závislosti na čase. Byly měřeny vzorky kontrolní skupiny a vzorky skupiny kultivované s LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky uvedeny ve tvaru koncentrace \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$ (kontrola mražených buněk proti kontrole nemražených buněk v odpovídajícím časovém intervalu; vzorky s LPS mražené proti nemraženým vzorkům s LPS v odpovídajícím časovém intervalu).



Obrázek 14: Měření množství ROSN vyvolaných pomocí TBHP.

Obrázek 14: Porovnání hodnot intenzity fluoresce jednotlivých měřených vzorků v závislosti na čase. Pro vytvoření ROSN byly použity koncentrace 100 μM a 150 μM TBHP. Byly měřeny vzorky kontrolní skupiny, vzorky skupiny kultivované s roztokem LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ a vzorky buněk z potkana, kterému byl po 6 dní podáván gaváží do žaludku 20% roztok ethanolu. Výsledky uvedeny ve tvaru koncentrace \pm SEM, $n = 6$, $*p < 0,05$, $**p < 0,001$, $***p < 0,001$, proti hodnotě kontroly o příslušné koncentraci TBHP a odpovídajícího časového intervalu.

5.6 Stanovení míry oxidačního stresu pomocí DCFDA

Před samotným měřením množství ROSN sondou bylo opět nezbytné nalézt vhodnou vlnovou délku pro emisi a pro excitaci na námi používaném přístroji (Infinite pro 200, Tecan; USA). Na základě proměřených spekter byla vybrána vlnová délka 485 nm pro excitaci a vlnová délka 530 nm pro emisi. Dále bylo třeba ověřit zda jsme schopni pomocí DCFDA

detekovat ROSN. K tomuto účelu bylo provedeno obdobné měření měření dvou vzorků jako u DHR, kdy jeden vzorek obsahoval systém generující Fentonovu reakci a druhý ne. Složení směsi však bylo jiné. Jak již bylo zmíněno v kapitole (2.10). DCFDA reaguje s buněčnými esterasami za vzniku DCFH, který dále reaguje s ROSN přičemž emituje fluorescenční záření. Do směsi byl přidán buněčný cytosol pro zajištění přítomnosti buněčných esteras ve směsi.

Tabulka 8: Porovnání míry fluorescence detekované DCFDA u systému generujícího Fentonovu reakci se systémem negenerujícím Fentonovu reakci.

	Negenerující systém	Generující systém
Míra fluorescence při Ex/Em = 503/536nm	107,5 ± 6,5	1654,5 ± 149,5

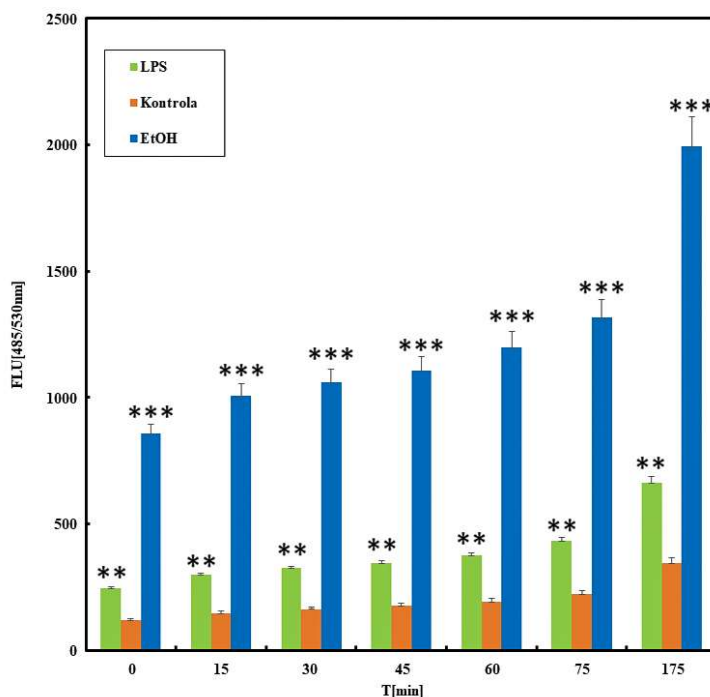
Legenda: Systém generující Fentonovu reakci obsahoval:

100 µl PBS + 5 µl FeSO₄ + 5 µl FeCl₃ + 10 µl DHR + 10 µl 1% H₂O₂ + 10 µl cytosol.

Směs bez systému generujícího Fentonovu reakci obsahovala:

110 µl PBS + 5 µl FeSO₄ + 5 µl FeCl₃ + 10 µl DHR + 10 µl cytosol. Výsledky uvedeny ve tvaru koncentrace ± SEM.

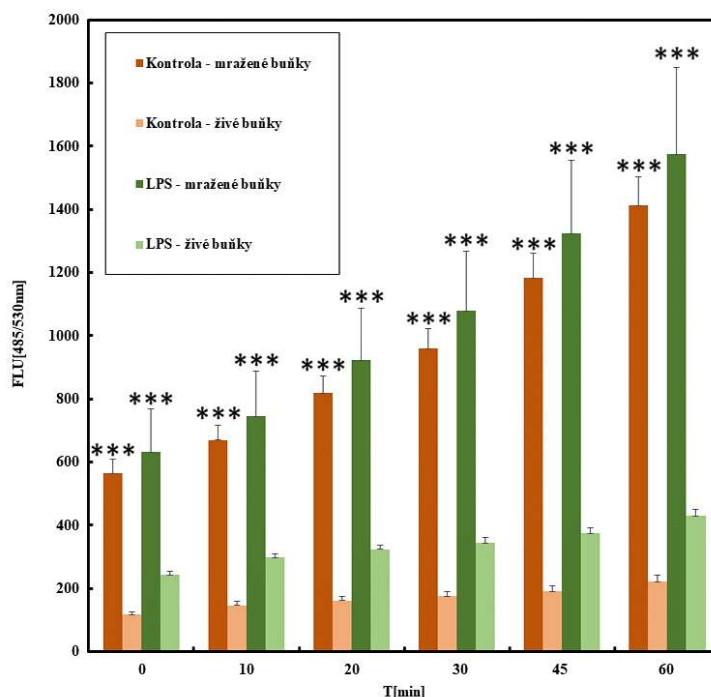
Během měření oxidačního stresu jsme se zaměřili na stejné problémy jako při měření pomocí DHR viz kapitola 5.5.



Obrázek 15: Měření množství ROSN pomocí DCFDA.

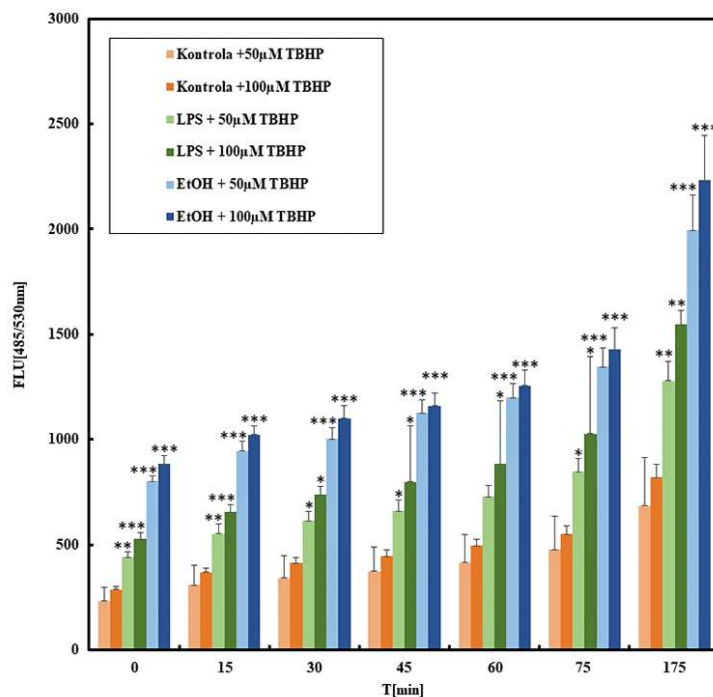
Obrázek 15: Porovnání hodnot intenzity fluorescence jednotlivých měřených vzorků v závislosti na čase. Byly měřeny vzorky kontrolní skupiny, vzorky skupiny kultivované s

roztokem LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ a vzorky buněk z potkana, kterému byl po 6 dní podáván gaváží do žaludku 20% roztok ethanolu. Výsledky uvedeny ve tvaru koncentrace \pm SEM, $n = 6$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$ proti hodnotě kontroly odpovídajícího časového intervalu.



Obrázek 16: Měření množství ROSN pomocí DCFDA.

Obrázek 16: Porovnání hodnot intenzity fluorescence zmražených vzorků a nezmražených vzorků v závislosti na čase. Byly měřeny vzorky kontrolní skupiny a vzorky skupiny kultivované s roztokem LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky uvedeny ve tvaru koncentrace \pm SEM, $n = 6$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$ (kontrola mražených buněk proti kontrole nemražených buněk v odpovídajícím časovém intervalu; vzorky s LPS mražené proti nemraženým vzorkům s LPS v odpovídajícím časovém intervalu).



Obrázek 17: Měření množství ROSN vytvořených pomocí TBHP.

Obrázek 17: Porovnání hodnot intenzity fluorescence jednotlivých měřených vzorků v závislosti na čase. Pro vyvolání oxidačního stresu byly použity koncentrace 100µM a 150µM TBHP. Byly měřeny vzorky kontrolní skupiny, vzorky skupiny kultivované s roztokem LPS o koncentraci 15 µg/ml a vzorky buněk z potkana, kterému byl po 6 dní podáván gaváží do žaludku 20% roztok ethanolu. Výsledky uvedeny ve tvaru koncentrace ± SEM, n = 6, *p < 0,05, ** p < 0,001, *** p < 0,001, proti hodnotě kontroly o příslušné koncentraci TBHP a odpovídajícího časového intervalu.

6 Diskuze

Cílem bakalářské práce byla optimalizace a vzájemné porovnání metod využívaných pro stanovení míry oxidačního poškození, což má zásadní význam pro výzkum antioxidačních vlastností přírodních flavonoidních látek s antioxidačními účinky. Míra oxidačního poškození byla měřena na primárních potkaních hepatocytech. Hepatocyty jsou vhodným modelem, protože v nich probíhá biotransformace většiny xenobiotik. Pro studii byly použity hepatocyty z potkana, kterému byl dlouhodobě podáván ethanol, a hepatocyty z potkana, které sloužily jako kontrola. Byly porovnávány tři typy vzorků, kontrolní vzorky hepatocytů vůči vzorkům z potkana vystaveného ethanolu a hepatocytům, které byly během kultivace vystaveny lipopolysacharidu z *E. coli* (LPS). Izolované buňky byly následně použity pro stanovení množství malondialdehydu (MDA), který je ukazatelem míry lipidové peroxidace. V izolovaných hepatocytech bylo dále stanovováno množství reaktivních forem (ROSN) pomocí fluorescenčních sond DHR a DCFDA.

Dále bylo zkoumáno, zda mražení a uchovávání buněk v kapalném dusíku bude mít vliv na měření oxidačního poškození či na množství detekovaných ROSN. Byl také ověřován předpoklad, zda peroxid (TBHP) dokáže v izolovaných buňkách navýšit míru oxidačního stresu a zda bude tato hodnota u buněk vystavených dávkám ethanolu nebo LPS vyšší ve srovnání s buňkami kontrolní skupiny.

Pro další postup ve výzkumu bylo třeba nejprve zjistit, zda velikost plotny pro kultivaci buněk ovlivňuje životnost kultivovaných buněk. Metodicky by bylo vhodné kultivaci provádět na 96-jamkových destičkách. Výsledky MTT testu ovšem poukazují na to, že životnost buněk je menší v případě buněk kultivovaných na menších plotnách. Proto byly buňky pro další experimenty kultivovány na šestijamkových plotnách.

Z výsledků MTT testu je patrná nižší životnost u buněk vystavených LPS. Ovšem v případě hepatocytů potkana, který byl exponován ethanolu bylo zjištěno, že životnost těchto buněk je shodná s životností buněk kontrolní skupiny. Tuto skutečnost lze vysvětlit regeneračními schopnostmi hepatocytů již exponovaných ethanolu [60].

Na Obrázek 10, který zachycuje kontrolní skupinu buněk, je velmi dobře viditelná charakteristická „dlaždicovitá struktura“, kterou hepatocyty tvoří, když přilnou ke dnu plotny. U buněk, které byly během kultivace vystaveny LPS je tato schopnost mnohem méně viditelná. Množství mrtvých neuchycených buněk je na snímku po ošetření LPS oproti kontrole vyšší. Tyto skutečnosti potvrzují to, že LPS má na hepatocyty negativní efekt [59].

Pro účely měření oxidačního poškození bylo nezbytné najít vhodnou techniku pro stanovení koncentrace proteinu. Byla testována technika stanovení s využitím BCA a technika stanovení podle Lowryho [57] [58]. V testovaných systémech se koncentrace proteinu v jednotlivých vzorcích stanovených oběma technikami se téměř neliší. Stanovené obsahy proteinu jsou ve shodě s množstvím buněk v jednotlivých vzorcích primárních hepatocytů dle publikovaných výsledků [61]. Pro účely dalšího výzkumu bude proto možno používat jednu z testovaných technik.

Při pozorování oxidačního poškození hepatocytů bylo stanovováno nejprve množství malondialdehydu (MDA) ve vzorcích. MDA je jedním z produktů lipidové peroxidace. Vzhledem k tomu, že produktů lipidové peroxidace je více, nelze stanovené množství MDA v buňce označovat jako celkovou míru lipidové peroxidace. Z tohoto důvodu je tato technika považována pouze za orientační [41]. Lipidy reagují pouze s některými druhy ROSN. Pro celkové hodnocení oxidačního poškození hepatocytů je tedy třeba využít i dalších metod, které jsou selektivní i pro jiné druhy ROSN.

Výsledky měření ukazují, že LPS je schopen v buňkách navodit oxidační stres, který se projeví zvýšenou peroxidací lipidů. Ve vzorcích vystavených působení LPS bylo stanoveno vyšší množství MDA jak vůči kontrole, tak vůči buňkám vystaveným pravidelným dávkám ethanolu. Z naměřených dat dále vyplývá, že hepatocyty z potkana vystaveného ethanolu mají také výrazně vyšší hodnotu MDA než kontrolní skupina. Tyto výsledky se shodují s již publikovanými výsledky [61].

Dále bylo zjištěno, že množství MDA ve zmrazených buňkách je nižší než u buněk, které procesem mražení neprošly. Nebyla nalezena žádná publikovaná data, která by tento výsledek potvrzovala.

Výsledek také nepotvrdil předpoklad, že se oxidační poškození vlivem mražení zvyšuje. Tento předpoklad je založen na studii, která se zabývala vlivem mražení na množství volných radikálů a poškození buněčných membrán. V této studii je uvedeno, že mražení primárních hepatocytů může vyvolat zvýšenou produkci superoxidů. Pokles teploty totiž zvyšuje rozpustnost kyslíku v extracelulární tekutině; kyslík začne procházet skrz buněčnou membránu a akumuluje se v buňce. Zvýšené množství kyslíku dále způsobí vznik superoxidů, které mohou dále ovlivnit lipidovou peroxidaci [62].

Mimo stanovení MDA, které je ukazatelem lipidové peroxidace v buňkách, byly použity dvě fluorescenční sondy (DHR a DCFDA), které kvantifikují určité druhy ROSN. Každá z těchto sond je selektivní pro jiný typ radikálů. DHR je látkou široce využívanou především pro detekci hydroxylových radikálů či peroxynitritového aniontu. Reakce se superoxidovým anion

radikálem a s peroxidem vodíku téměř neprobíhá [41]. DHR tedy na rozdíl od DCFDA nelze považovat za sondu schopnou detekovat celkovou míru oxidačního poškození. DCFDA je považována za nejčastěji využívanou látku pro stanovení ROSN v buňkách. Tato sonda reaguje s celou řadou ROSN a není příliš specifická pro jeden určitý druh. Z tohoto důvodu bývá používána pro stanovení celkového množství ROSN v buňce [41].

Bylo optimalizováno konkrétní nastavení měřicího přístroje, tak aby bylo možno sondy využít. Bylo nutné zjistit správný interval mezi vlnovou délkou excitace a emise, tak aby se excitační záření nepřekrývalo s emisním zářením. Zároveň byla ověřena správná funkce sondy pokusem, kdy byl Fentonovou reakcí generován hydroxylový radikál. Na základě dat prezentovaných v Tabulka 7 Tabulka 8 je zřejmé, že DHR i DCFDA jsou vysoce selektivní pro hydroxylový radikál, jak je uváděno také v literatuře [63].

Další pokusy s buňkami potvrzují, že oxidační poškození může být způsobeno vystavením buněk LPS či ethanolu, což bylo zjištěno při stanovení MDA. Buňky vystavené LPS obsahovaly oproti kontrole výrazně vyšší množství ROSN. Hepatocyty z potkana vystaveného ethanolu vykazují oproti kontrole výrazně vyšší množství ROSN a zároveň i vyšší míru lipidové peroxidace. Tento výsledek je velmi zajímavý v souvislosti se stanovením životnosti buněk. Životnost buněk byla srovnatelná s životností kontrolní skupiny. Z toho vyplývá, že hepatocyty se pravděpodobně adaptovaly na pravidelné dávky ethanolu a jejich život, tak nebyla snížena i za podmínek oxidačního poškození.

V případě mražených buněk bylo stanovené množství ROSN vyšší, což potvrzuje náš předpoklad, že mražení buněk zvyšuje jejich oxidační poškození. Předpoklad byl založen na výše zmíněné studii, ve které je uvedeno, že mražení primárních hepatocytů může vyvolat zvýšenou produkci superoxidů [62].

Pro dosažení validních výsledků při dalším výzkumu ROSN pomocí DHR a DCFDA by tedy bylo vhodné využívat vždy čerstvě izolované buňky. Při porovnání výsledků získaných pomocí DCFDA a DHR, lze pozorovat, že rozdíl mezi kontrolními vzorky a vzorky vystavenými LPS a ethanolu je u DCFDA vyšší než u DHR. Rozdíl je dán selektivitou DHR. Výsledky DHR ukazují, že množství hydroxylových radikálů a peroxylových aniontů (a dalších ROSN, pro které je DHR selektivní) je u vzorků vystavených LPS a ethanolu vyšší oproti kontrole. V případě DCFDA hovoříme spíše o celkovém množství ROSN, proto je rozdíl mezi kontrolou a vzorky vystavenými LPS či ethanolu výraznější. Celkově je v buňkách větší množství ROSN než je možné pomocí DHR detekovat. Stejně je tomu i při porovnání výsledků porovnávání zmražených a nezmařených vzorků v závislosti na čase. Pro všechny pokusy platí, že množství ROSN v závislosti na čase vzrůstá.

Poslední otázkou která nás zajímala bylo, zda lze dosáhnout pomocí přídavku TBHP u buněk vystavených LPS či ethanolu většího oxidačního poškození (většího množství ROSN) oproti kontrolním vzorkům. Na základě výsledků lze předpokládat, že tomu tak je. Námi naměřená data se shodují s již publikovanými výsledky [64]. TBHP bývá používán při měření pomocí fluorescenčních sond jako pozitivní kontrola.

Závěrem je možno konstatovat, že ani jednou z testovaných technik nelze přesně určit celkové množství ROSN ve sledovaných vzorcích. Zároveň není možné sledovat pouze určitý druh radikálu, neboť radikály podléhají vzájemné konverzi. Navíc všechny uvedené techniky jsou skupinově selektivní, tedy selektivní pro více druhů ROSN. Dalším směrem ve výzkumu by proto mělo být měření ROSN pomocí ESR. Tato metoda nabízí v současné době nejpřesnější způsob pro sledování ROSN. Pomocí ESR jsme schopni pozorovat jednotlivé druhy radikálů selektivně.

V předkládané práci se podařilo optimalizovat 3 vybrané techniky měření míry oxidačního poškození, a prokázat, že jsou vhodné pro měření ROSN v buněčných kulturách. Tyto techniky mohou být v budoucnu využity ve výzkumu antioxidačních vlastností přírodních flavonoidních sloučenin. V rámci dalších prací budou tyto techniky porovnávány s ESR v souvislosti s antioxidačním působením vybraných flavonoidních sloučenin.

7 Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá optimalizací a vzájemným porovnáním vybraných technik pro sledování míry oxidačního poškození primárních potkaních hepatocytů. Konkrétně stanovením malondialdehydu a stanovením různých druhů reaktivních forem kyslíku a dusíku pomocí fluorescenčních sond DCFDA a DHR. Stanovené cíle této bakalářské práce byly naplněny. Konkrétně bylo dosaženo následujících výsledků:

V druhé kapitole (2) je provedena rešerše dosavadních výsledků, týkajících se tématu.

1. Byly úspěšně izolovány hepatocyty z potkaních jater kontrolního potkana a potkana vystaveného pravidelným dávkám ethanolu, kdy část hepatocytů byla během kultivace vystavena působení lipopolysacharidu.

2. Byly optimalizovány všechny tři vybrané techniky: stanovení malondialdehydu a měření množství reaktivních forem kyslíku a dusíku pomocí fluorescenčních sond DCFDA a DHR.

3. Pomocí těchto technik bylo zjištěno, že lipopolysacharid je látkou, která je schopna vyvolat jak lipidovou peroxidaci, tak zvýšit množství ROSN v buňkách.

4. Obdobné poškození jako působením lipopolysacharidu bylo pozorováno i u hepatocytů z potkana vystaveného pravidelným dávkám ethanolu. U těchto buněk bylo navíc zjištěno, že hepatocyty jsou schopné se na pravidelné dávky ethanolu adaptovat a jejich životnost tak přes detekované oxidační poškození není ovlivněna.

5. Bylo zjištěno, že pro výzkum oxidačního poškození nelze buněčné vzorky uchovávat ve zmrazeném stavu, protože tím míra poškození samovolně zvyšuje.

6. Příklad TBHP indukuje v již poškozených buňkách větší množství ROSN oproti buňkám kontrolní skupiny.

Získané výsledky budou použity pro studium antioxidačních vlastností vybraných flavonoidů v modelu potkana exponovaného ethanolu.

8 Použitá literatura

- 1 Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.
- 2 Possik, E., Pause, A. (2015) Measuring Oxidative Stress Resistance of *Caenorhabditis elegans* in 96-well Microtiter Plates. *J. Vis. Exp.* 9, e52746.
- 3 Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- 4 Sinha, N., Dabla, P. K. (2015) Oxidative stress and antioxidants in hypertension: A current Review. *Curr. Hypertens. Rev.* 11, 132–142.
- 5 Magder, S. (2006) Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit. Care.* 10, 208.
- 6 Kyaw, M., Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Izawa, Y., Kanematsu, Y. and Tamaki, T. (2004) Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacol. Sin.* 25, 977–85.
- 7 Kehrer, J. P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 149, 43-50.
- 8 Boveris, A., Enrique, C. (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* 54, 311-314.
- 9 Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., Flohé, L. (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 42, 68–72.
- 10 Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30, 11-26.
- 11 Freudenberg, M. A., Galanos, C. (1990) Bacterial lipopolysaccharides: Structure, metabolism and mechanisms of action. *Int. Rev. Immunol.* 6, 207–221.
- 12 Jeger, V., Brandt, S., Porta, F., Jakob, S., Takala, J., Djafarzadeh, S. (2006) Dose Response of Endotoxin on Hepatocyte and Muscle Mitochondrial Respiration In Vitro. *J. Endotoxin Res.* 12, 358–66.
- 13 Thannickal, V. J. (2009) Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 507-510.

- 14 Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. L. (2010) Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 15, 186–190.
- 15 Babior, B. M. (2018) NADPH Oxidase: An Update. *Blood.* 93, 1464–1476.
- 16 Marnett, L. J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 21, 361–370.
- 17 Marnett, L. J. (1999) Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424, 83–95.
- 18 Marzocchi, B., Perrone, S., Paffetti, P., Magi, B., Bini, L., Tani, C., Longini, M., Buonocore, G. (2005) Nonprotein-bound iron and plasma protein oxidative stress at birth. *Pediatr. Res.* 58, 1295–1299.
- 19 Halliwell, B. (2006) Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.* 31, 509–515.
- 20 Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595–603.
- 21 Berger, M. M. (2005) Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin. Nutr.* 24, 172-183.
- 22 Simioni, C., Zauli, G., Martelli, A. M., Vitale, M., Sacchetti, G., Gonelli, A., Neri, L. M. (2018) Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget.* 9, 17181–17198.
- 23 Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M., Bast, A. (2008) Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 325-337.
- 24 Ye, L., Wang, H., Duncan, S. E., Eigel, W. N., O’Keefe, S. F. (2015) Antioxidant activities of Vine Tea (*Ampelopsis grossedentata*) extract and its major component dihydromyricetin in soybean oil and cooked ground beef. *Food Chem.* 172, 416–422.
- 25 Park, G. Bin, Jeong, J. Y., Kim, D. (2017) Ampelopsin-induced reactive oxygen species enhance the apoptosis of colon cancer cells by activating endoplasmic reticulum stress-mediated AMPK/MAPK/XAF1 signaling. *Oncol. Lett.* 14, 7947–7956.
- 26 Pubchem. Dostupné z URL: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. > [cit. 20.4. 2018].
- 27 Simpson, D. A., Ryan, R. G., Hall, L. T., Panchenko, E., Drew, S. C., Petrou, S., Donnelly, P. S., Mulvaney, P., Hollenberg, L. C. L. (2017) Electron paramagnetic resonance microscopy using spins in diamond under ambient conditions. *Nat. Commun.* 8, 458.
- 28 Berliner, L. J., Khramtsov, V., Fujii, H., Clanton, T. L. (2001) Unique in vivo applications of spin traps. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 489–499.

- 29 Khan, N., Wilmot, C. M., Rosen, G. M., Demidenko, E., Sun, J., Joseph, J., O'Hara, J., Kalyanaraman, B., Swartz, H. M. (2003) Spin traps: In vitro toxicity and stability of radical adducts. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1473–1481.
- 30 *Sigma - Aldrich*. Dostupné z URL:
< <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b7263?lang=en®ion=CZ>> [cit. 10.4. 2018].
- 31 Khrizanforova, V. V., Kholin, K. V., Khrizanforov, M. N., Kadirov, M. K., Budnikova, Y. H. (2018) Electrooxidative CH/PH functionalization as a novel way to synthesize benzo[b]phosphole oxides mediated by catalytic amounts of silver acetate. *New J. Chem.* 42, 930–935.
- 32 *Sigma - Aldrich*. Dostupné z URL:
< <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d5766?lang=en®ion=CZ>> [cit. 10.4. 2018].
- 33 Halliwell, B. (2009) Establishing the Significance and Optimal Intake of Dietary Antioxidants: The Biomarker Concept. *Nutr. Rev.* 57, 104–113.
- 34 Halliwell, B., Kaur, H. (1997) Hydroxylation of salicylate and phenylalanine as assays for hydroxyl radicals: a cautionary note visited for the third time. *Free Radic. Res.* 27, 239–244.
- 35 Whiteman, M., Ketsawatsakul, U., Halliwell, B. (2002) A Reassessment of the Peroxynitrite Scavenging Activity of Uric Acid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962, 242–259.
- 36 Grootveld, M., Halliwell, B. (1986) Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl-radical formation in vivo. Identification of hydroxylated derivatives of salicylate in human body fluids. *Biochem J.* 237, 499–504.
- 37 Halliwell, B. (2003) Oxidative stress in cell culture: An under-appreciated problem? *FEBS Lett.* 540, 3–6.
- 38 Henzler, T., Steudle, E. (2000) Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J. Exp. Bot.* 51, 2053–2066.
- 39 Lynch, R. E., Fridovich, I. (1978) Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J. Biol. Chem.* 253, 4697–9.
- 40 LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227–231.

- 41 Halliwell, B., Whiteman, M. (2004) 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.
- 42 Tampo, Y., Kotamraju, S., Chitambar, C. R., Kalivendi, S. V., Keszler, A., Kalyanaraman, J. J. B. (2003) Oxidative stress-induced iron signaling is responsible for peroxide-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein in endothelial cells role of transferrin receptor-dependent iron uptake in apoptosis. *Circ. Res.* 92, 56–63.
- 43 Marchesi, E., Rota, C., Fann, Y. C., Chignell, C. F., Mason, R. P. (1999) Photoreduction of the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein: A spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 148–161.
- 44 Ischiropoulos, H., Gow, A., Thom, S., Kooy, N., Royall, J., Crow, J. (1999) Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Methods Enzymol.* 301, 367–373.
- 45 Buxser, S. E., Sawada, G., Raub, T. J. (1999) Analytical and numerical techniques for evaluation of free radical damage in cultured cells using imaging cytometry and fluorescent indicators. *Methods Enzymol.* 300, 256–75.
- 46 *Northwest Life Science Specialties*. Dostupné z URL: https://www.nwlifescience.com/product_insert/nwk-mda01_derivative_spectroscopy_product_insert.pdf [cit. 15.4. 2018].
- 47 Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81–128.
- 48 Nelson, G. J., Morris, V. C., Schmidt, P. C., Levander, O. (1993) The urinary excretion of thiobarbituric acid reactive substances and malondialdehyde by normal adult males after consuming a diet containing salmon. *Lipids.* 28, 757–61.
- 49 Roberts II, L. J., Morrow, J. D. (2002) Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 808–820.
- 50 Morrow, J. D. (2003) Is Oxidant Stress a Connection Between Obesity and Atherosclerosis? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 368–370.
- 51 Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1102–15.
- 52 Collins, A. R., Horvathova, E. (2001) Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification. *Biochem. Soc.* 29, 337–341.

- 53 Collins, A. R., Cadet, J., Möller, L., Poulsen, H. E., Viña, J. (2004) Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 57–65.
- 54 Moldéus, P., Högberg, J., Orrenius, S. (1978) Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol.* 52, 60–71.
- 55 Farghali, H., Buchar, E., Machková, Z., Kameníková, L., Masek, K. (1986) Muramyl dipeptide and carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats: involvement of plasma membrane and calcium homeostasis in protective effect. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 8, 469–77.
- 56 Strober, W. (2015) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology.* 111, A3.B.1-A3.B.3.
- 57 Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–75.
- 58 Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- 59 Canová, N. K., Martínek, J., Kmoníčková, E., Zídek, Z., Kameníková, L., Farghali, H. (2008) Modulation of spontaneous and lipopolysaccharide-induced nitric oxide production and apoptosis by D-galactosamine in rat hepatocyte culture: The significance of combinations of different methods. *Toxicol. Mech. Methods.* 18, 63–74.
- 60 Michalopoulos, G. K. (2007) Liver regeneration. *J. Cell. Physiol.* 213, 286–300.
- 61 Mohammad, K. K., Ghazi-Khansari, M., Hayati, F., Staji, H., Keywanloo, M., Shahroozian, E. (2017) The Role of TNF- α in Aflatoxin B -1 Induced Hepatic Toxicity in Isolated Perfused Rat Liver Model. *Acta Med. Iran.* 55, 417–421.
- 62 Kendall, E. J., McKersie, B. D. (1989) Free radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat. *Physiol. Plant.* 76, 86–94.
- 63 Cho, S., Hwang, E. S. (2011) Fluorescence-Based Detection and Quantification of Features of Cellular Senescence. In: *Recent Advances in Cytometry*, (Darzynkiewicz, Z., Holden, E., Orfao, A., Telford, W., Wlodkowic, D. B. T.-M. in C. B., Eds.). New York: Academic Press, p. 149–188.
- 64 Daba, M. H., Abdel-Rahman, M. S. (1998) Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 95, 23–29.