

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**STANOVENÍ BIOTRANSFORMAČNÍ KAPACITY BUNĚK**  
**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**AUTOR PRÁCE:** Bc. Martina Zeminová  
**VEDOUcí PRÁCE:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.  
**KONZULTANTI:** doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.  
Ing. Nikola Vaňková

**2017**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**ASSESSMENT OF**  
**CELLULAR BIOTRANSFORMATION CAPACITY**  
MASTERS THESIS

**AUTHOR:** Bc. Martina Zeminová  
**SUPERVISOR:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.  
**CONSULTANTS:** doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.  
Ing. Nikola Vaňková

**2017**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Zeminová**  
Osobní číslo: **C15642**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Název tématu: **Stanovení biotransformační kapacity buněk**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1.) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na metabolismus xenobiotik u člověka, jeho jednotlivé fáze, typy buněčných cytochromů, apod. Jmenovitě se zaměřte na uvedení a rozdělení typů CYP, obecný princip oxidačně/redukčních mikrosomálních reakcí, popř. také význam pro daná léčiva, jež jsou danými enzymy metabolizována. Dále detailně popište funkci, výskyt a možnosti stanovení izoenzymů CYP 2E1, 1A2 a 3A4. Ke zpracování tohoto přehledu využijte elektronické databáze (ScienceDirect, NCBI Pubmed, Web of Science).
- 2.) V rámci praktické části: 1) optimalizujte stanovení intracelulární aktivity minimálně jednoho z izoenzymů cytochromu P450 2E1, 1A2 nebo 3A4; 2) optimalizujte přípravu biologického materiálu pro stanovení aktivity daného CYP; 3) zavedenou metodu, popř. více metod (HPLC/UV/FL/MS nebo spektrofluorimetrické metody) využijte ke stanovení aktivity CYP v daných buňkách.
- 3.) Získaná experimentální data statisticky zpracujte a diskutujte. Své výsledky následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Ostatní konzultanti: **Ing. Nikola Vaňková**  
Katedra analytické chemie

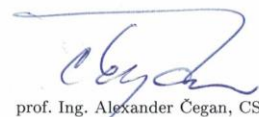
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Cegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 12. 5. 2017

Bc. Martina Zeminová

## **PODĚKOVÁNÍ:**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a mnoho trpělivosti při zpracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za cenné rady v oblasti analytické chemie a Mgr. Martině Vrbové a paní laborantce Bc. Ivaně Fousové za přípravu a kultivaci buněk.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu a skvělé zázemí během celého studia.

## **ANOTACE**

Užíváním mnoha druhů léku, a vystavováním našeho těla účinkům xenobiotik vůbec, zatěžujeme tělo pochody, kterými se snaží tyto látky odbourat. Dané xenobiotikum je v organismu metabolizováno pomocí I. a II. fáze biotransformace. Cytochromy P450 patří mezi nejdůležitější detoxikační enzymy I. fáze biotransformace xenobiotik v lidském organismu. Tyto hemoproteiny se tak uplatňují společně s II. fází biotransformace na eliminaci xenobiotik z buněk a jejich celkovém odstranění z organismu.

Hlavním cílem mé práce bylo optimalizovat metodický postup stanovení aktivity cytochromu 1A2 pomocí metody spektrofotometrické, spektrofluorimetrické a pomocí HPLC s UV/VIS detekcí u různých buněčných linií. Zjistili jsme, že spektrofotometrická metoda není z důvodu malé senzitivity vhodná. U metody HPLC-UV/VIS se nám také z hlediska nízké citlivosti detekce nedokázalo detekovat aktivitu CYP 1A2. Proto jsme jako nejvhodnější metodu určili metodu spektrofluorimetrickou s dobou měření aktivity v délce 1 hod.

Optimalizované postupy jsme použili při analýze vzorků biologického materiálu, tj. buněčnou linií pocházející z lidských buněk hepatocytárního karcinomu HepG2, linií lidských epiteliálních ledvinných buněk proximálního tubulu HK-2 a buněčnou linií lidského plicního adenokarcinomu A549. U všech tří linií jsme se zaměřili na stanovení aktivity CYP 1A2. Až na buněčnou linii HK-2 se nám podařilo spektrofluorimetricky detekovat aktivitu CYP 1A2. S ohledem na to lze závěrem říci, že jsme zavedli a optimalizovali spektrofluorimetrickou metodu ke stanovení aktivity CYP 1A2 v podmínkách *in vitro*.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

CYP450; biotransformace xenobiotik; CYP 1A2; fluorimetrie.

## **ANNOTATION**

Our organism has to metabolize a number of drugs and xenobiotics which might impair its function. The xenobiotics are metabolized through two phases of biotransformation – phase I and phase II. Cytochromes P450 are likely the most important detoxification enzymes participating in phase I of xenobiotic biotransformation in human organism. These hemoproteins play an important role together with phase II processes in the elimination of xenobiotics from cells and in their total removal from the body.

The main aim of my work was the optimization of a methodological approach for determination of cytochrome 1A2 activity using spectrophotometric, spectrofluorimetric methods and HPLC with UV/VIS detection in cell lines. We have found that spectrophotometric method is not suitable because of the low detection limit. In addition, we did not detect CYP 1A2 activity using HPLC-UV/VIS due to low sensitivity. Finally, we have determined the spectrofluorimetric assay as the most suitable method with 1 h duration of measurement.

We used the optimized procedures of sample preparation for analysis of CYP activity in a biological material - human hepatocellular cell line HepG2, proximal tubular epithelial renal cell line HK-2 and human lung adenocarcinoma cell line A549. We focused on determination of CYP 1A2 activity in all three cell lines. Except of HK-2 cells, we were able to detect CYP 1A2 activity in both other cell lines fluorimetrically. In conclusion, we introduced and optimized the spectrofluorimetric method to determine CYP 1A2 activity *in vitro*.

## **KEY WORDS**

CYP450; biotransformation of xenobiotics; CYP 1A2; fluorometry.



## OBSAH

ÚVOD.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1.1 METABOLISMUS A BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK.....	16
1.1.1 I. FÁZE BIOTRANSFORMACE.....	17
1.1.2 II. FÁZE BIOTRANSFORMACE.....	18
1.2 CYTOCHROM P450.....	24
1.2.1 NÁZVOSLOVÍ.....	25
1.2.2 REAKČNÍ CYKLUS CYTOCHROMU P450.....	26
1.2.3 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ IZOFORMY CYP.....	28
1.3 METODY STANOVENÍ AKTIVITY IZOFOREM CYTOCHROMU P450.....	32
1.3.1 METODY STANOVENÍ AKTIVITY CYP 2E1.....	32
1.3.2 METODY STANOVENÍ AKTIVITY CYP 1A2.....	33
1.3.3 METODY STANOVENÍ AKTIVITY CYP 3A4.....	35
2 CÍL PRÁCE.....	37
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	38
3.2 CHEMIKÁLIE.....	39
3.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ DLE BRADFODRA.....	40
3.3.1 PRINCIP.....	40
3.3.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	40
3.3.3 POSTUP.....	41
3.4 OPTIMALIZACE STANOVENÍ AKTIVITY CYP 1A2 POMOCÍ SUBSTRÁTU 7- METHOXYRESORUFINU.....	42
3.4.1 PRINCIP.....	42
3.4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	43
3.4.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ BUNĚČNÉ LINIE HK-2, HEPG2 A A549.....	43
3.4.4 STANOVENÍ AKTIVITY CYP 1A2 U BUNĚČNÝCH LINIÍ HK-2, HEPG2 A A549 V MÉDIU POMOCÍ SPEKTRÁLNÍCH METOD.....	43
3.5 OPTIMALIZACE METODY KE STANOVENÍ AKTIVITY CYP 1A2 POMOCÍ HPLC/UV-VIS A LC/MS.....	44
3.5.1 DEPROTEINACE VZORKŮ PŘED MĚŘENÍM.....	44
3.5.2 HPLC/UV-VIS A LC/MS.....	44
4 VÝSLEDKY.....	46
4.1 OPTIMALIZACE SPEKTROFOTOMETRICKÉ A SPEKTROFLUORIMETRICKÉ METODY KE STANOVENÍ AKTIVITY CYP 1A2.....	46
4.1.1 ABSORPČNÍ SPEKTRA RESORUFINU A 7-METHOXYRESORUFINU.....	46
4.1.2 OPTIMALIZACE STANOVENÍ AKTIVITY CYP 1A2 POMOCÍ SPEKTRÁLNÍCH METOD.....	47
4.2 OPTIMALIZACE METODY STANOVENÍ AKTIVITY CYP 1A2 POMOCÍ HPLC/UV-VIS A LC/MS.....	50
4.2.1 STANOVENÍ STANDARDŮ RESORUFINU A 7-METHOXYRESORUFINU.....	50
4.2.2 DETEKCE RESORUFINU A 7-METHOXYRESORUFINU POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	53
4.3 POROVNÁNÍ SPEKTROFLUORIMETRICKÉ METODY S METODOU HPLC/UV- VIS PRO STANOVENÍ AKTIVITY CYP 1A2 U BUNĚK.....	54

4.4	VYUŽITÍ SPEKTROFLUORIMETRICKÉ METODY PRO STANOVENÍ AKTIVITY CYP 1A2 U BUNĚČNÝCH LINIÍ .....	55
5	DISKUZE .....	59
6	ZÁVĚR.....	62
7	POUŽITÁ LITERATURA .....	63
8	PŘÍLOHY .....	68

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1 Obecné schéma biotransformace.....	18
Obr. 2 Acetyl-CoA .....	24
Obr. 3 Reakční cyklus cytochromu P450 .....	27
Obr. 4 Přeměna P450-Glo <sup>TM</sup> substrátu cytochromem P450.....	36

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Klasifikace hlavních typů konjugačních reakcí.....	19
Tabulka 2: Celkové množství CYP ve vybraných tkáních u člověka .....	25
Tabulka 3: Typické substráty lidských jaterních izoenzymů a jejich metabolické cesty .....	29
Tabulka 4: Příprava kalibračních standardů BSA .....	40
Tabulka 5: Podmínky spektrofotometrického stanovení aktivity CYP 1A2 .....	44
Tabulka 6: Podmínky spektrofluorimetrického stanovení aktivity CYP 1A2.....	44
Tabulka 7: Podmínky měření na LC/MS.....	45
Tabulka 8: Podmínky měření na HPLC .....	50
Tabulka 9: Porovnání změny intenzity fluorescence u jednotlivých buněčných linií.....	57

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Obsah jednotlivých izoenzymů CYP v játrech člověka.....	28
Graf 2: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda (0-1000 µg/ml BSA). .....	41
Graf 3: Lineární část kalibrační závislosti pro stanovení proteinů dle Bradforda (0-100 µg/ml BSA). .....	42
Graf 4: Absorpční spektra 7-methoxyresorufinu (MER) a resorufinu (RES). .....	46
Graf 5: Spektrofotometrické stanovení aktivity CYP 1A2.....	47
Graf 6: Optimalizace koncentrace standardu 7-methoxyresorufinu.....	48
Graf 7: Spektrofluorimetrické stanovení aktivity CYP 1A2. ....	49
Graf 8: Spektrofluorimetrické stanovení aktivity CYP 1A2. ....	49
Graf 9: Detekce 7-methoxyresorufinu pomocí HPLC.....	51
Graf 10: Detekce resorufinu pomocí HPLC. ....	51
Graf 11: Stanovení resorufinu (RES) pomocí HPLC. ....	52
Graf 12: Stanovení 7-methoxyresorufinu (MER) pomocí HPLC. ....	52
Graf 13: MS spektrum standardu resorufinu (RES). .....	53
Graf 14: MS spektrum standardu 7-methoxyresorufinu (MER). ....	54
Graf 15: Stanovení aktivity CYP 1A2 pomocí substrátu MER v buňkách linie HepG2.....	55

Graf 16: Stanovení aktivity CYP 1A2 pomocí substrátu MER v buňkách linie A549. ....	56
Graf 17: Stanovení aktivity CYP 1A2 pomocí substrátu MER v buňkách linie HK-2. ....	56
Graf 18: Průměrná změna intenzit fluorescence u jednotlivých buněčných linií. ....	58

## SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

A549	Buňky lidského plicního adenokarcinomu
AK	Aminokyselina
ATP	Adenosintrifosfát
BFC	7-benzyloxy-4-trifluoromethylkumarin
BSA	Bovinní sérový albumin
CEC	3-kyano-7-ethoxykumarin
CoA	Koenzym A
CYP	Cytochrom P450
CYP450	Cytochrom P450
DBF	Dibenzylfluorescein
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ER	Endoplazmatické retikulum
EROD	7-ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylace
GIT	Gastrointestinální trakt
GSH	Glutathion
HepG2	Buňky lidského hepatocytárního karcinomu
HK-2	Lidské epiteliální ledvinné buňky proximálního tubulu
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KK	Karboxylová kyselina
MER	7-methoxyresorufin
MPA	Kyselina metafosforečná
MROD	7-methoxyresorufin- <i>O</i> -demethylace
MS	Hmotnostní spektrometrie
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid fostát (redukovaná forma)
NAT	<i>N</i> -acetyltransferasa
PDA	detektor s diodovým polem
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PAU	Polyaromatické uhlovodíky
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SAM	<i>S</i> -adenosylmethionin
SULT	Sulfotrasferasa
UDP	Uridindifosfát

UDP-GA	UDP-glukuronová kyselina
UGT	UDP-glukonosyltransferasa

## ÚVOD

Cytochromy P450 jsou nepostradatelné enzymy, kterými naše tělo odbourává přijatá xenobiotika a podílí se z velké části na metabolismu mnoha endogenních látek. Bez správné funkce cytochromů by se naše tělo přehltilo nebezpečnými látkami, což by mohlo vést až k selhání funkce některých orgánů či organismu. Množství cytochromů a jejich celkový výskyt je z hlediska jednotlivých orgánů velmi odlišný. Nejvíce se jich vyskytuje v játrech, které jsou hlavním centrem metabolických a biotransformačních procesů. Mezi hlavní genetické rodiny cytochromů, které se vyskytují v játrech, jsou CYP 1, CYP 2 a CYP 3. Z hlediska množství i funkce jsou nejvýznamnějšími podrodinami izoenzymy CYP 1A, 2E a 3A.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Metabolismus a biotransformace xenobiotik

Většina látek vstupujících do organismu slouží jako zdroj energie nebo jako stavební materiál pro výrobu sloučenin tělu vlastních a lze mezi ně zařadit vodu, živiny přijaté z okolí, vzduch, minerály, vitaminy a všechny látky organismu vlastní. Naopak jiné látky vstupující do organismu, které neplní žádné fyziologické funkce, se nazývají xenobiotika neboli cizorodé látky (Skálová, Boušová a kol., 2011). Hlavním zdrojem xenobiotik je chemický průmysl a dále oblasti lidské činnosti, kde jsou tyto produkty chemického průmyslu používány. Příklady výskytu xenobiotik jsou léčiva, průmyslové chemikálie, hnojiva, pesticidy, odpadní látky znečišťující životní prostředí, alkaloidy, kosmetické produkty, návykové látky, ale i potravinová aditiva (Skálová, Boušová a kol., 2011; Parkinson, 2001; Matouš et al., 2010, Knejzlík a spol., 2000).

Do organismu vstupují tyto látky zejména plicemi, gastrointestinálním traktem (GIT) nebo se vstřebávají kůží. Dále se dané xenobiotikum dostává do krevního řečiště, kde může interagovat s plazmatickými proteiny, které mohou sloužit jako transportní molekuly a umožňují následnou distribuci toxické látky do orgánů, tkání a cílových buněk (Skálová, Boušová a kol., 2011; Knejzlík a spol., 2000).

Distribuce cizorodé látky v organismu závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. Mezi tyto vlastnosti patří např. lipofilita, která podporuje jejich snadné vstřebání do těla a naopak tvoří velkou překážku při jejich odstraňování. Nejčastěji probíhá eliminace cizorodé látky z organismu močí, stolicí, slinami, potem, dechem nebo mateřským mlékem (Hänninen, 2009; Skálová, Boušová a kol., 2011; Parkinson, 2001).

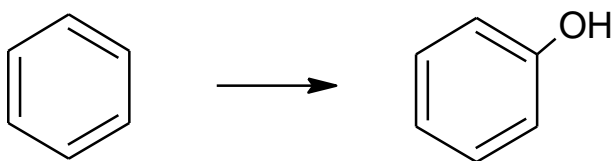
Hlavním cílem metabolismu xenobiotik je rychlé zbavení se látek, které jsou pro organismus škodlivé. To probíhá pomocí chemických přeměn (biotransformací), které jsou katalyzovány biotransformačními enzymy. Centrem výskytu biotransformačních enzymů jsou játra, plíce, kůže, nosní sliznice a ledviny. Úkolem biotransformačních enzymů je přeměna původního xenobiotika na novou sloučeninu s odlišnou chemickou strukturou, tzv. metabolit. Vzhledem ke změně struktury metabolitu dochází i ke změně fyzikálně-chemických vlastností a celkově ke změně biologické aktivity a chování v organismu. Tento proces umožňuje zvýšení hydrofility (rozpuštěnosti ve vodě) a následně zrychlené vylučování látky, bioaktivaci původní metabolicky neaktivní látky na účinnou, nebo vyloučení xenobiotika beze změny (Martínková a spol., 2001; Skálová, Boušová a kol., 2011).



### 1.1.1 I. fáze biotransformace

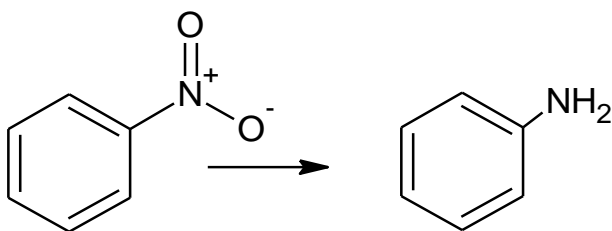
Biotransformační reakce se obecně dělí do dvou fází. Cílem první fáze biotransformace je zvýšení polariry látky čili její lepší rozpustnost ve vodě, než tomu je u původního xenobiotika. Díky tomu nedochází k akumulaci látek v tělních buňkách a jsou dále vyloučeny z těla ven. Mezi chemické pochody, které tento děj umožňují, patří oxidace postranního řetězce, deaminace, tvorba epoxidů, sulfooxidace, redukce, *N*-hydroxylace, redukce a hydrolytické reakce.

Chemické reakce I. fáze biotransformace jsou oxidační, méně potom redukční a hydrolytické. Velké množství xenobiotik se přeměňuje právě oxidačními reakcemi, které díky tomu patří mezi nejrozšířenější reakce biotransformace xenobiotik. Lze mezi ně zařadit hydroxylace, dealkylace, oxidační deaminace, oxidační dehalogenace, *N*- a *S*-oxidace a oxidace alkoholů a aldehydů. U hydroxylačních reakcí je hlavní funkcí zavedení hydroxylové skupiny do bočního řetězce nebo do aromatických jader. Zavedení hydroxylové skupiny do aromatického jádra je znázorněno pomocí reakce 1.



[1]

Redukční reakce nejsou tolik významné jako oxidační, ale pro určité strukturní typy xenobiotik jsou hlavní metabolickou cestou. Nejvýznamnější reakce jsou redukce nitrosloučenin, azosloučenin, karbonylových sloučenin a *N*-oxidů a *S*-oxidů. Redukce nitrobenzenu na anilin je znázorněna reakcí 2. Další skupinou méně častých reakcí jsou hydrolyzy. Biotransformační hydrolyze podléhají epoxidy, estery, amidy, hydraziny a karbamáty. Reakce probíhají buď neenzymaticky, nebo za katalýzy hydrolasami.

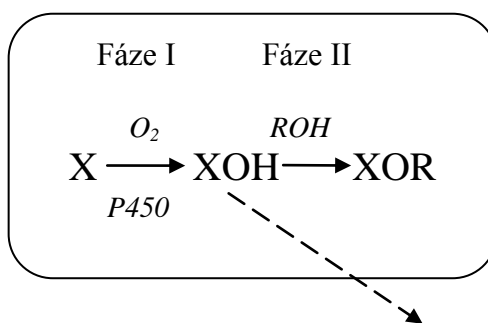


[2]

Nejdůležitější detoxikační enzymy první fáze biotransformace xenobiotik v lidském organismu patří cytochromy P450 a oxygenasy (Parkinson, 2001; Knejzlík a spol., 2000; Skálová, Boušová a kol., 2011).

### 1.1.2 II. fáze biotransformace

Ve druhé fázi biotransformace probíhají tzv. konjugační reakce, při kterých samotné xenobiotikum nebo metabolit vzniklý v první fázi biotransformace reaguje s endogenní sloučeninou, nejčastěji s molekulou kyseliny glukuronové, sulfátové nebo s molekulou glutathionu. Obecné schéma biotransformace xenobiotik je znázorněno na obr. 3.



**Obr. 1** Obecné schéma biotransformace (upraveno podle Knejzlík a spol., 2000)

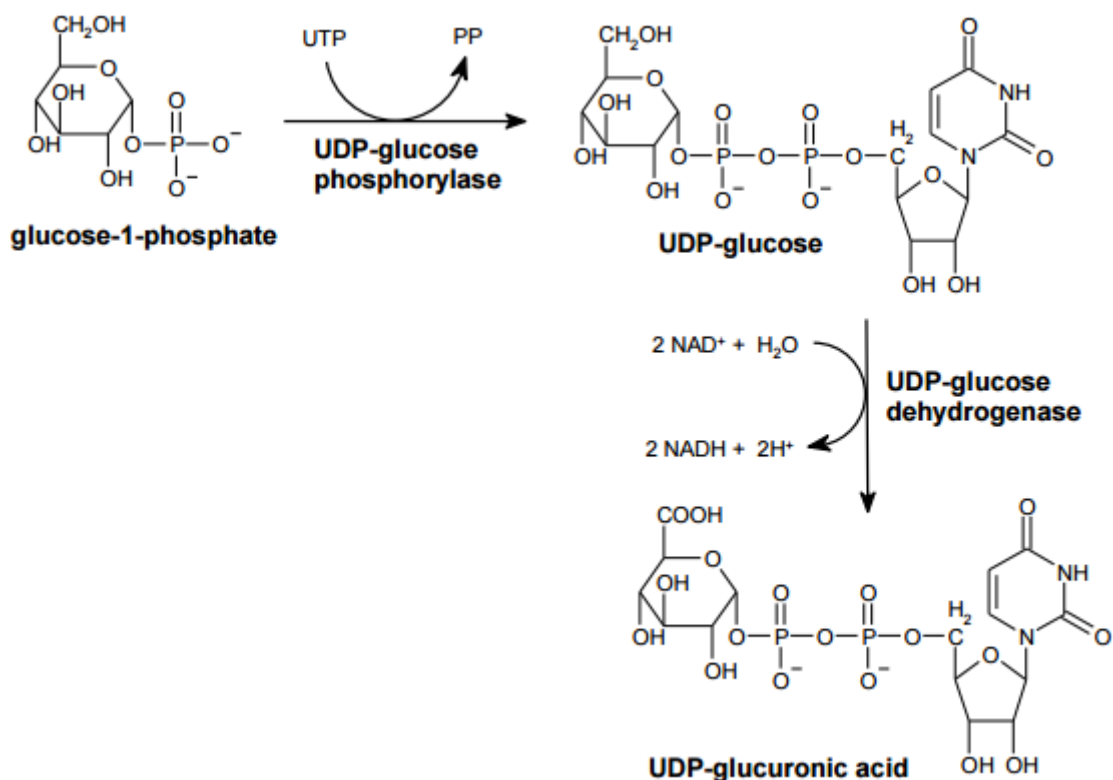
Veškeré konjugační reakce vyžadují dodání energie. Výsledné konjugáty, které vznikly po navázání xenobiotika (metabolitu) s konjugačním činidlem, jsou polárnější látky. Hlavní typy konjugačních reakcí spolu se zástupci konjugačních činidel jsou uvedeny v tabulce 1. Vznik polárních látek lze obecně považovat za společnou vlastnost obou biotransformačních reakcí (Skálová, Boušová a kol., 2011; Murray, 2001).

**Tabulka 1:** Klasifikace hlavních typů konjugačních reakcí (Skálová, Boušová a kol., 2011; Knejzlík a spol., 2000)

<b>Typ reakce</b>	<b>Konjugační činidlo</b>
<i>Reakce s aktivovaným konjugačním činidlem</i>	
Glukuronidace	UDP-glukuronová kyselina
Konjugace se sacharidy	UDP-glukosa UDP-xylosa UDP-ribosa
Sulfatace	Fosfoadenosilfosfosulfát
Methylace	S-adenosylmethionin
Acetylace	Acetyl
Detoxikace kyanidů	Sulfátová síra
<i>Reakce s aktivovaným xenobiotikem</i>	
Konjugace s glutathionem	Glutathion
Konjugace s AK	Glycin Taurin Glutamová kyselina

#### 1.1.2.1. Glukuronidace

Nejčastější konjugační reakce je konjugace s kyselinou glukuronovou (glukuronidace). Samotná kyselina glukuronová vzniká v organismu oxidací glukosy, která musí být aktivována vazbou na uridindifosfát (UDP) za katalýzy enzymem UDP-glukosadehydrogenasou. Kofaktorem glukuronidace je kyselina UDP-glukuronová (UDP-GA) a katalyzuje ji UDP-glukonosyltransferasa (UGT). Vznik UDP-GA je znázorněno reakcí 3.



[3] (Testa, Krämer, 2008)

Glukuronidaci podléhají sloučeniny obsahující nukleofilní heteroatom (O, N nebo S). Typickými substráty jsou alkoholy a fenoly, karboxylové kyseliny (KK) tvořící *O*-glukuronidy, primární, sekundární a terciární aminy tvořící *N*-glukuronidy a thioly pro tvorbu *S*-glukuronidů (Murray et al., 2001; Parkinson, 2001).

Produkty vzniklé po glukuronidaci, tzv.  $\beta$ -glukuronidy, se vyznačují vysokou polaritou a rozpustností ve vodě, což vede ke zvýšené míře vylučování produktu, který je méně toxický než původní látka. Vylučování probíhá močí, žlučí nebo obojím. Problémem může být nestabilita některých glukuronidů, kdy dochází ve střevě ke zpětné resorpci, která prodlužuje účinek léků (Fisher et al., 2000). Některé *N*-glukuronidy jsou nestabilní při kyselém pH a dochází k jejich neenzymové hydrolyze v močových cestách, což zapříčiní vznik reaktivních aminů, které jsou poté karcinogenní (Skálová, Boušová a kol., 2011).

UGT se vyskytuje v hladkém endoplazmatickém retikulu (ER). Nejvyšší aktivity UDP-glukonosyltransferasy byly zjištěny v játrech, a poté v menším množství v plicích, kůži a tenkém střevě. Nadrodina UGT je členěna do rodin a podrodin podle jejich aminokyselinové sekvence. Ze čtyř rodin, které jsou přítomné u savců, jsou pro člověka nejdůležitější dvě rodiny a to UGT1 a UGT2. Třetí rodina UGT8 se využívá UDP-galaktosu při galaktosylaci ceramidů, která je důležitá při syntéze glykosfingolipidů a cerebrosidů. Funkce čtvrté rodiny UGT3 není dosud známa.

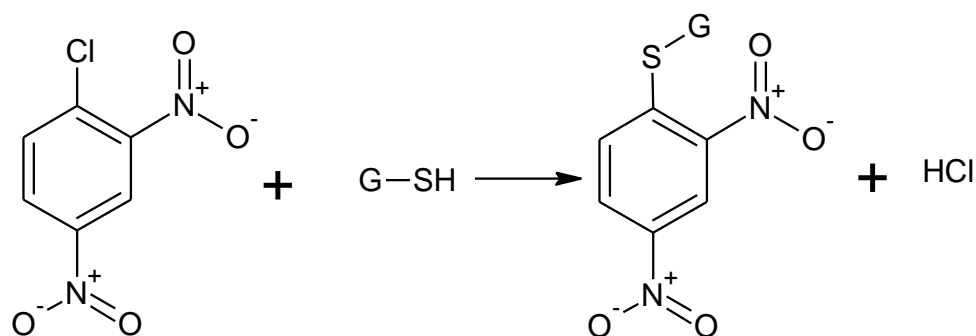
Enzymy rodin UGT1 a UGT2 využívají jako substráty bilirubin, steroidy, žlučové kyseliny, léky a mnoho dalších xenobiotik. Rodina UGT1 je kódována jedním genem. Rodina UGT2 je členěna do dvou podrodin (UGT2A a UGT2B), které jsou kódovány různými geny (Mackenzie et al., 2008).

Kyselina UDP-glukuronová se podílí i na metabolismu bilirubinu. Bilirubin se uvnitř hepatocytu u dospělého člověka naváže na UDP-glukuronovou kyselinu a vzniká z něj konjugovaný bilirubin, který je rozpustný ve vodě a méně toxický. U novorozenců se projevuje nezralost glukuronidačního systému relativním nedostatkem UDP-glukuronové kyseliny a podílí se na patogenezi novorozenecké žloutenky (Vítek, 2009).

Obecně může být aktivita UGT ovlivněna mnoha faktory. Bylo zjištěno několik genetických mutací spojených s tímto enzymem. Relativně častá bývá mutace v promotorové oblasti pro gen UGT1, která vede ke snížení jeho exprese a tudíž ke sníženému množství konjugovaného bilirubinu v krvi. Projevem této poruchy je Gilbertův syndrom. Mutace přímo v genu pro UGT1 může vést k Crieglerovu-Najjarovu syndromu, který se vyznačuje nepochopností konjugovat bilirubin. Nekonjugovaný bilirubin proniká u dětí do mozku a způsobuje těžké neurologické poruchy (Vítek, 2009; Skálová, Boušová a kol., 2011).

#### **1.1.2.2. Konjugace s glutathionem**

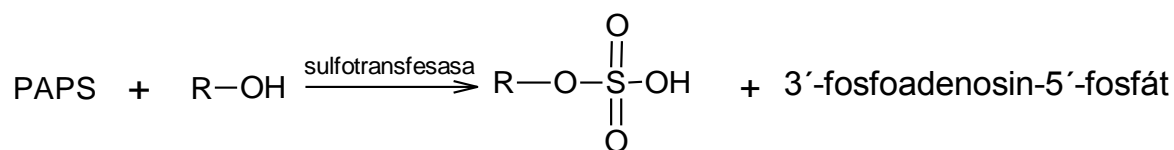
Nejvýznamnější konjugační reakce je konjugace s glutathionem (GSH). Mechanismus konjugace GSH s xenobiotikem je znázorněn reakcí 4. Kofaktorem je tripeptid glutathion, který vzniká z aminokyselin glutamátu, cysteinu a glycinu. Thiolová skupina cysteinu zajišťuje glutathionu nukleofilní vlastnosti, takže jako substráty pro glutathionovou konjugaci zde vystupují elektrofilní xenobiotika, např. ketony, chinony,  $\alpha,\beta$ -nenasycené ketony, arylhalogenidy, aromatické nitro- a aminokyseliny (Parkinson, 2001). K tvorbě GSH konjugátů dochází buďto neenzymaticky, nebo enzymaticky za přítomnosti enzymů glutathion-S-transferas (GST). GST jsou přítomny ve většině tkání v játrech, střevech, ledvinách, varlatech, nadledvinách, plicích, kde jsou lokalizovány v cytoplazmě a v ER. Většina vzniklých GSH-konjugátů je z těla vyloučena žlučí, nebo jsou přeměněny na deriváty merkapturové kyseliny a vyloučeny močí.



[4]

### 1.1.2.3. Sulfatace

Zdrojem anorganického síranu je nejčastěji cystein. Před vstupem do reakce se anorganický síran aktivuje na 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS), který dále slouží jako donor síranu. Přenos sulfoskupiny z PAPS na xenobiotikum probíhá podle rovnice 5. Koncentrace PAPS je v organismu mnohem nižší, než koncentrace UDP-glukuronové kyseliny, což rozhoduje o rychlosti sulfatace (Parkinson, 2001). Jako substráty pro sulfatační konjugace slouží jak endogenní sloučeniny (catecholaminy, steroidní hormony, retinol, vitamín D), tak i xenobiotika (hlavně alkoholy, fenoly, aminy) (Jančová, Šiller, 2012; Parkinson, 2001).

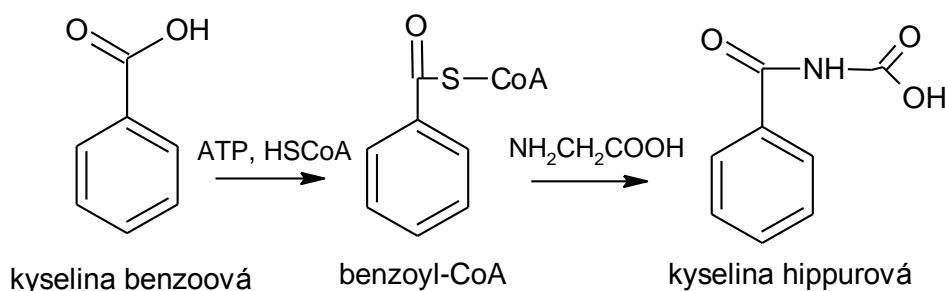


[5]

Produkty sulfatace jsou organické sulfáty, které jsou snadno vyloučené močí nebo žlučí. Sulfatace je katalyzována cytosolickými sulfotransferasami (SULT), které se vyskytují především v játrech, střevech, plicích a ledvinách (Parkinson, 2001). Hlavní význam u lidí mají izoformy ze tří rodin a to SULT1, SULT2, SULT4 a SULT6. Tyto rodiny se výrazně liší svoji substrátovou specifitou (Jančová, Šiller, 2012). Sulfátová konjugace je charakteristická pro metabolismus malých, chemicky jednoduchých molekul, které jsou slabě rozpustné v tucích a vyskytují se v cytoplazmě (Dostálek a kol., 2006)

#### 1.1.2.4. Konjugace s aminokyselinami

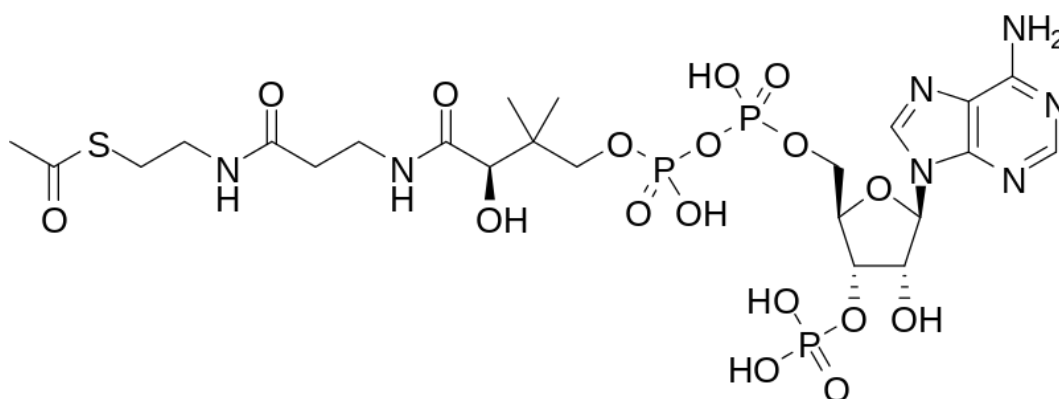
Xenobiotika a endogenní sloučeniny (hlavně žlučové kyseliny), které obsahují karboxylovou kyselinou, mohou podstoupit konjugaci s aminokyselinami (Skálová, Boušová a kol., 2011). Nejběžnější konjugační AK jsou glycin, taurin a glutamin. Existují dva hlavní kroky ke konjugaci xenobiotik obsahujících aminokyselinu. V prvním kroku je xenobiotikum konjugováno vazbou s koenzymem A (CoA) a v druhém kroku reaguje aktivované xenobiotikum s aminoskupinou. Katalyzátorem při navázání CoA jsou acyl-CoA-synthetasy a tato reakce vyžaduje dodání energie ve formě ATP (Parkinson, 2011). Nejčastější konjugační AK je glycin a jeho typickým substrátem je kyselina benzoová (reakce 6) (Jančová, Šiller, 2012). Druhý krok při konjugaci s AK je katalyzován *N*-acyltransferasami. Produkty konjugace s AK jsou považovány za metabolicky stabilní a netoxické a bývají snadno vyloučeny z těla ven (Parkinson, 2011).



[6]

#### 1.1.2.5. Acetylace

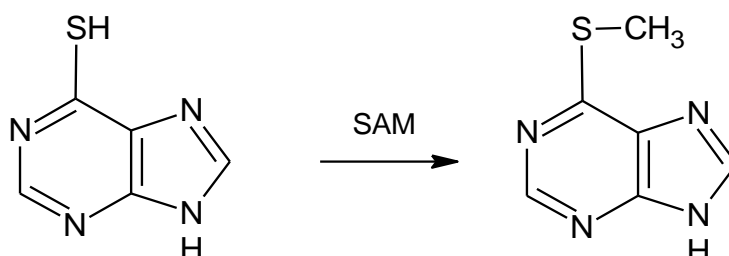
*N*-acetylace je hlavní cesta biotransformace pro xenobiotika obsahující aromatické aminy a hydraziny, které jsou poté přeměněny na aromatické amidy a hydrazidy. Donorem acetylové skupiny je acetylkoenzym A (obr. 2), který se vyskytuje v organismu ve vysoké koncentraci. *N*-acetylaci katalyzují cytosolické *N*-acetyltransferasy (NAT). U lidí se běžně vyskytují pouze dvě izoformy, a to NAT1 a NAT2 (Parkinson, 2001).



Obr. 2 Acetyl-CoA

### 1.1.2.6. Methylace

Methylace je biotransformační reakce probíhající hlavně u endogenních sloučenin, jako jsou např. nukleové kyseliny, proteiny, katecholaminy a estrogény, a jen zřídka u xenobiotik. Oproti ostatním reakcím je methylace jediná konjugační reakce, při které dochází ke snížení rozpustnosti sloučenin. Výjimkou je *N*-methylace xenobiotik obsahujících pyridin (např. nikotin), který produkuje kvartérní amonné ionty, které jsou hydrofilnější. Substráty pro methylaci mohou podstoupit *N*-, *O*- nebo *S*-methylaci. Příklad *S*-methylace 6-merkaptopurinu je znázorněn reakcí 7. Kofaktorem reakce je *S*-adenosylmethionin (SAM), který je primárně tvořen kondenzací ATP a *L*-methioninu. Methylaci katalyzují enzymy methyltransferasy (Parkinson, 2001; Jančová, Šiller, 2012).



[7]

## 1.2 Cytochrom P450

Cytochromy P450 (CYP450) (EC 1.14.14.1.) se zařazují mezi hemové proteiny, které se vyskytují zejména jako membránové proteiny v endoplazmatickém retikulu a v mitochondriích. Písmeno „P“ v názvu znamená „pigment“ a číslo „450“ označuje absorpční maximum při 450 nm, které vykazuje cytochrom po redukci a vazbě s oxidem uhelnatým (Zeldin, Seubert, 2008). Tento hemoprotein je přítomen téměř ve všech živých organismech. Díky sekvenování lidského genomu byla prokázána přítomnost 57 genů P450 a 58 pseudogenů, které jsou rozděleny do 18 rodin a 44 podrodin (Isin, Guengerich, 2008).



Kromě savců byl CYP450 identifikován u rostlin, bakterií i plísní. U savců byl nalezen ve všech typech tkání kromě erytrocytů a svalových buněk. Nejvyšší výskyt u člověka je v jaterní tkáni, kde probíhá největší část detoxikačních pochodů. Expresce CYP v lidských tkáních je uvedeno v tabulce 2 (Skálová, Boušová a kol., 2011; Knejzlík a spol., 2000).

**Tabulka 2:** Celkové množství CYP ve vybraných tkáních u člověka (Pelkonen et al., 2008)

Tkáň	Množství CYP (nmol/mg mikrozomálního proteinu)
Játra	0,3-0,6
Nadledviny	0,23-0,54
Tenké střevo	0,03-0,21
Mozek	0,1
Ledviny	0,03
Plíce	0,01
Varlata	0,01

Cytochromy P450 jsou klíčovým enzymem metabolismu xenobiotik, kam patří hlavně léčiva a chemické karcinogeny, ale podílí se i na metabolismu endogenních látek, jako jsou např. steroidní hormony, mastné kyseliny, vitamíny rozpustné v tucích a biogenní aminy. Jejich exprese a aktivita je pod kontrolou hormonů, růstových faktorů a transkripčních faktorů. Tyto enzymy katalyzují především reakce oxidační, peroxidační a redukční (Zeldin, Seubert, 2008).

V organismu jsou CYP450 zodpovědné především za reakce I. fáze biotransformace xenobiotik, které vedou k jejich detoxikaci a po reakcích II. fáze biotransformace k jejich eliminaci z buněk a celkové odstranění z organismu (Knejzlík a spol., 2000).

### 1.2.1 Názvosloví

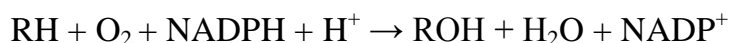
CYP se vyskytují v nejrůznějších formách (izoenzymech, izoformách), které jsou zařazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury neboli pořadí aminokyselin (Stiborová a kol., 1999). V současnosti bylo popsáno několik tisíc forem CYP. Vzhledem k neustálému nárůstu jejich počtu bylo nutné založit systematické zařazení. Systematické názvosloví genů a forem CYP450 tvoří nadrodinu označovanou formou zkratky CYP, za kterým následuje arabská číslice, která označuje číslo rodiny. CYPs, u kterých byla nalezena homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů větší než 40 %, jsou zařazeny do stejné rodiny. Za číslicí následuje velké písmeno, kterým se označuje podrodina. Do stejné podrodiny se řadí CYPs, u kterých homologie přesáhne 60 %. Jednotlivé izoenzymy jsou

označeny arabským číslem za písmenem podrodiny (Guengerich, 2001). Například CYP 1A2 je druhým členem podrodiny A patřící do rodiny 1.

### 1.2.2 Reakční cyklus cytochromu P450

Hemové proteiny CYP450 mají ve své molekule navázaný hem b (protoporfyrin IX). Rozdíl oproti ostatním hemoproteinům jsou, že železo v hemové skupině je oxidované na  $\text{Fe}^{3+}$ . Protoporfyrinový skelet je částečně vázán hydrofobními silami a prostřednictvím thiolátové síry cysteinového zbytku v aktivním centru enzymu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX). Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování hemoproteinů a odlišuje je od ostatních hemoproteinů. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody (Anzenbacher, Anzenbacherová, 2001; Stiborová a kol., 1999).  $\text{Fe}^{3+}$  se v CYP450 vyskytuje ve dvou spinových formách. Za běžných podmínek existuje CYP450 v nízkospinové formě, ve kterém je hemové železo popsáno jako  $\text{Fe}^{3+}$  s pěti 3d valenčními elektrony. Při vazbě hydrofobních substrátů dojde k posunutí molekul vody a k destabilizaci vazby mezi vodou a železem, což zapříčiní vznik vysokospinové formy (Luthra, Denisov, Sligar, 2011).

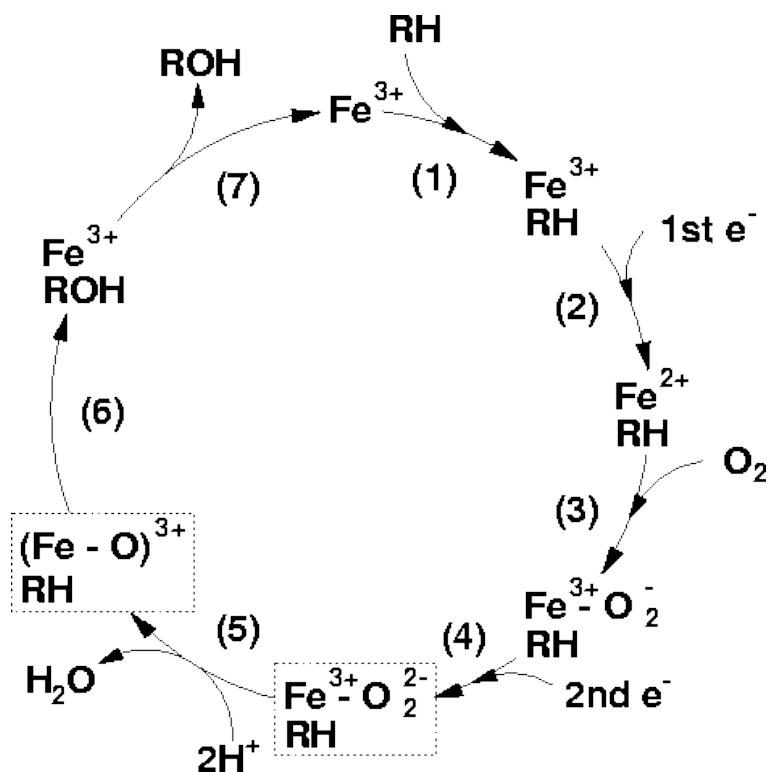
CYP450 tvoří hlavní skupinu enzymů, které se podílejí na oxidaci léčiv a jiných xenobiotik a to pomocí oxidas se smíšenou funkcí (Guengerich, 2001). Tyto reakce umožňuje enzymový systém monooxygenas cytochromu P450, který se nachází v eukaryotických buňkách navázan v membráně hladkého ER nebo v mitochondriích. Jako terminální oxidasu obsahuje tento systém hemoprotein CYP450, který spolupůsobí s dalšími enzymy lokalizovanými v ER např. s NADPH:CYP reduktasou a NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou. NADPH:CYP reduktasa je enzym, který přenáší elektrony z NADPH na mikrosomální CYP. Jedná se o flavoprotein složený z jednoho flavinmononukleotidu (FMN) a jednoho flavinadenindinukleotidu (FAD). Jejich vzájemná přítomnost umožňuje molekule enzymu fungovat jako dělič elektronového páru a redukovat tak CYP450 v první a druhé redukci reakčního cyklu CYP450. V druhé redukci reakčního cyklu může být funkce NADPH:CYP reduktasy zastoupena NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou. Jedná se také o flavinový protein s výjimkou, že využívá jako koenzymu NADH. Obecný mechanismus monooxygenasové reakce katalyzované CYP450 lze vyjádřit reakcí (reakce 8),



[8]

kde RH je substrát a ROH je hydroxylovaný produkt (Stiborová a kol, 2004).

Reakční cyklus CYP450 probíhá určitým mechanismem, který se skládá alespoň z osmi kroků. Schematicky je znázorněn na obr. 3 (Stiborová a kol., 2004). Nejprve dojde k vazbě substrátu na enzym v kroku 1. Po vazbě se mění konformace molekuly enzymu (Fe v hemu z formy hexakoordinované na pentakoordinovanou formu) a spinový stav (z nízkospinového na vysokospinový). V kroku 2 dochází k redukcí z  $\text{Fe}^{3+}$  cytochromu P450 na  $\text{Fe}^{2+}$  pomocí přenosu elektronu z NADPH-CYP reductasy. V kroku 3 dochází k vazbě molekulárního kyslíku na volné šesté koordinační místo hemového železa za tvorby  $(\text{RH})\text{Fe}^{2+}(\text{O}_2)$ . Druhá redukce probíhá v kroku 4, kde komplex přijímá druhý elektron od NADPH-CYP reductasy a nebo v některých případech od zmíněného NADH:cytochromu *b5* reductasy a vzniká ferro-superoxidovaný komplex. V kroku 5 komplex reaguje se dvěma protony za vzniku molekuly vody a komplexu  $(\text{Fe}-\text{O})^{3+}\text{RH}$ . Dochází tím k rozpadu vazby O-O. V kroku 6 vzniká produkt ROH. Atom O vázaný na Fe je navázán na molekulu RH, což vede ke vzniku hydroxylované formy substrátu (ROH), která je produktem celé reakce. K uvolnění produktu dochází v kroku 7 a enzym se vrací do svého původního stavu (Guengerich, 2001; Groves, 2005).

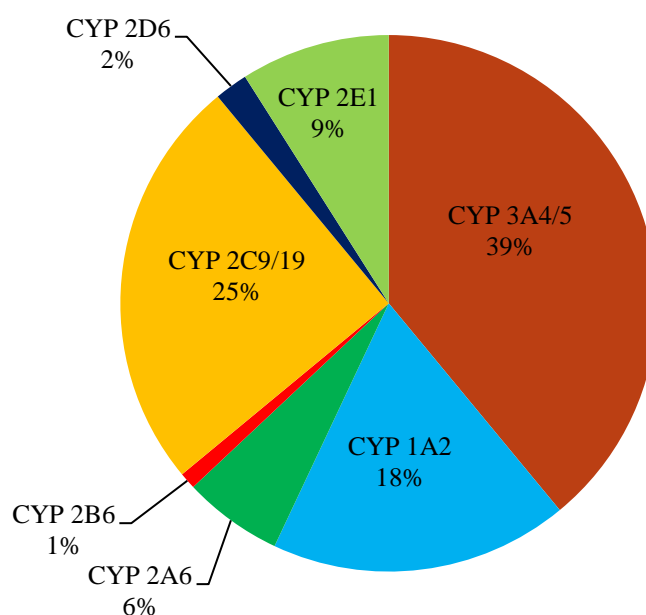


Obr. 3 Reakční cyklus cytochromu P450

(<http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node49.html>)

### 1.2.3 Nejvýznamnější izoformy CYP

Významnost CYP450 přítomných v lidských tkáních se bere z hlediska množství metabolismu cizorodých látek. Tyto cizorodé látky mohou být ve většině případů toxické. Z jaterních CYP450 jsou v procesu metabolismu xenobiotik nejvýznamnější izoenzymy CYP 1A2, 2A6, 2D6, 2C (2C8, 2C9, 2C18 a 2C19), 2E1 a 3A4 (obr. 12). Z CYP450 přítomných ve vysoké koncentraci v jiných tkáních (ledviny, plíce, kůže, tkáň GITu) jsou nejvýznamnější v přeměně xenobiotik CYP 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4. Nejvyšší zastoupení mají izoformy CYP450 3A4 a dále izoenzymy podrodiny 2C, 1A2 a 2E1. Množství jednotlivých CYP450 nelze jednoznačně považovat za stálou. Jejich množství a aktivita je závislá na mnoha faktorech, jako je např. genetický polymorfismus, chemické a fyzikální polutanty životního prostředí, výživa, věk, kouření, konzumace alkoholu a léčiva. Genetický polymorfismus se velmi liší u různých lidských ras a populací (Stiborová a kol., 1999). Jednotlivé izoenzymy přeměňují různé substráty. Jejich specifita je velmi široká a často dochází i k překryvu (Zeldin, Seubert, 2008).



**Graf 1:** Obsah jednotlivých izoenzymů CYP v játrech člověka (upraveno dle Gundert-Remy a kol., 2014).

**Tabulka 3:** Typické substráty lidských jaterních izoenzymů a jejich metabolické cesty (Lewis, 2003; Zanger, Schwab, 2013; Guengerich, 2001)

<b>CYP</b>	<b>Substráty</b>	<b>Metabolická cesta</b>
1A2	Kofein 7-Methoxyresorufin Takrin 7-Ethoxyresorufin Aflatoxin B1 Estradiol Melatonin 2-Amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin Theofylin	<i>N</i> -3 demethylace <i>O</i> -demethylace 7-hydroxylace <i>O</i> -deethylace 8,9-epoxidace 2-hydroxylace 6-hydroxylace <i>N</i> -hydroxylace <i>N</i> -3 demethylace
2E1	4-Nitrofenol Chlorzoxazone Anilin Paracetamol Butadien Ethanol	2-hydroxylace 6-hydroxylace 4-hydroxylace <i>N</i> -oxidace 1,2-epoxidace 2-hydroxylace
3A4	Midazolam Testosteron Nifedipin Progesteron Paracetamol Erythromycin Cholesterol Kortisol Fenacetin Triazolam Chinin	1-hydroxylace 6 $\beta$ -hydroxylace Oxidace 6 $\beta$ -hydroxylace Oxidace <i>N</i> -demethylace 4 $\beta$ -hydroxylace 6 $\beta$ -hydroxylace <i>O</i> -deethylace 4-hydroxylace 3-hydroxylace

### 1.2.3.1 CYP 1A1

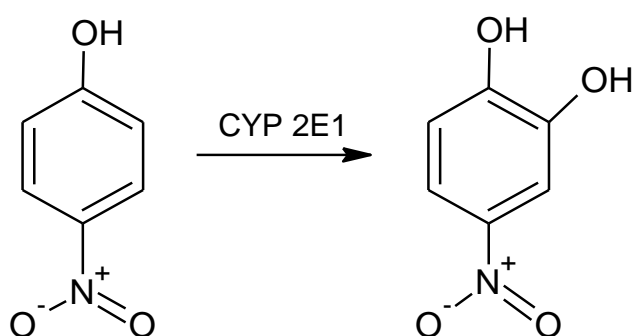
Podrodina CYP 1A se u člověka vyskytuje ve dvou formách a to ve formě CYP 1A1 a CYP 1A2 (Wei, Caccavale et al., 2002). CYP 1A1 se nachází ve velmi malé koncentraci v játrech, ale naopak ve vysoké koncentraci v jiných tkáních např. v plicích, placentě, mozku a srdci. Patří mezi enzymy, které hrají klíčovou roli v bioaktivaci polyaromatických uhlovodíků (PAU). PAU se hojně vyskytují v tabákovém kouři. CYP 1A1 byl detekován ve vysoké koncentraci v plicích kuřáků, kde souvisí s vysokým rizikem rakoviny plic (Wei, Caccavale et al., 2001). Jeho zvýšené koncentrace byly nalezeny i v dalších nádorových tkáních, např. buňky nádoru prsu a plicního karcinomu (Stiborová a kol., 1999).

### 1.2.3.2 CYP 1A2

CYP 1A2 je typický jaterní enzym. Tvoří téměř 15 % z CYP450 v lidských játrech. Má velmi širokou substrátovou specifitu (Stiborová a kol., 1999). Mezi významné substráty se zařazují aromatické aminy a heterocyklické sloučeniny. Nejčastějšími xenobiotickými substráty jsou kofein, chlorzoxazon, 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin a polycyklické aromatické uhlovodíky, které se vyskytují v cigaretovém kouři. Mezi endogenní substráty se zařazuje kyselina arachidonová, prostaglandiny, estrogeny, melatonin a kyselina retinová (Zanger, Schwab, 2013; Anzenbacher, Anzenbacherová, 2001). Mezi induktory patří brukvovitá zelenina. K výraznému zvýšení aktivity CYP 1A2 dochází při konzumaci hamburgerů grilovaných na dřevěném uhlí (Anzenbacher, Anzenbacherová, 2001). Vyšší aktivita tohoto izoenzymu byla spojena se zvýšeným rizikem rakoviny tlustého střeva (Guengerich, 2001).

### 1.2.3.3 CYP 2E1

CYP 2E1 se uplatňuje v metabolismu toxikologicky důležitých látek s malou molekulovou hmotností (Lewis, 2003). Jeho typickými substráty jsou xylen, benzen, chloroform, trichloretylen, metylchlorid, vinylchlorid, styren a acetaldehyd. Dále také některé léky např. halotan, paracetamol, fenacetin nebo chlorzoxazon, který se používá pro zjištění jeho aktivity (Loizou, Cocker, 2001). Ke zjištění aktivity CYP 2E1 se také často používá p-nitrofenol (reakce 9) (Chang, Crespi, Waxman, 2006). Příklady typických substrátů jsou znázorněny v tabulce 3. Nejvíce se CYP 2E1 vyskytuje v játrech a méně v mozku, nosní sliznici, kůře nadledvin, varlatech, vaječnicích, trávicím traktu a srdeční tkáni (Zanger, Schwab, 2013).



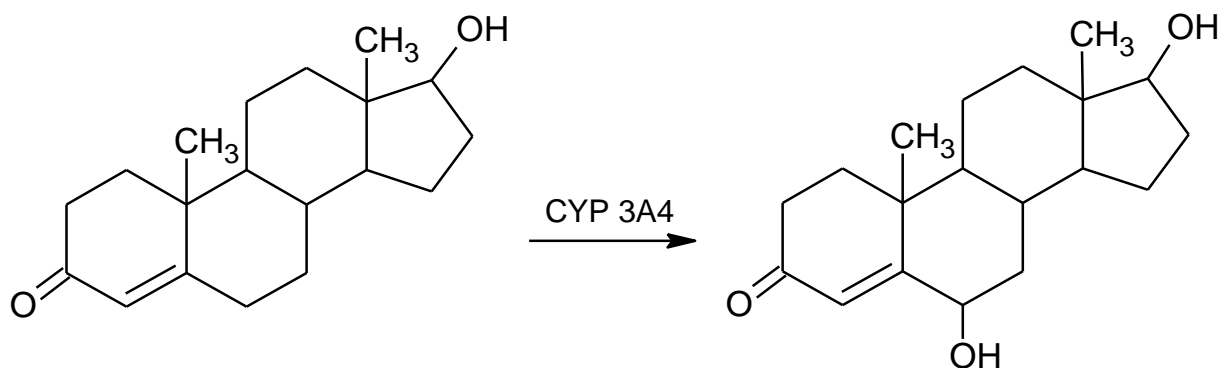
[9]

CYP 2E1 je znám i pod názvem „ethanolem-indukovaná forma“. Je indukován také za různých patofyziologických podmínek, např. cukrovka, obezita, konzumace alkoholu a hladovění. Chronické užívání alkoholu vede k rychlejší biotransformaci xenobiotik. Při oxidaci ethanolu pomocí CYP 2E1 dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které

přispívají k poškození jaterních buněk. Tato chronická konzumace alkoholu byla uznána jako hlavní faktor pro vznik rakoviny jícnu (Zanger, Schwab, 2013). Naopak aktivitu tohoto izoenzymu snižují některé složky potravy, jako např. diallylsulfid přítomný v česneku a cibuli, nebo ke snížení aktivity dochází po konzumaci brukvovité zeleniny (Anzenbacher, Anzenbacherová, 2001; Louzou, Cocker, 2001).

#### 1.2.3.4 CYP 3A4

CYP 3A4 je nejvýznamnějším a nejdůležitějším CYP450. Není to jen pro jeho množství vyskytující se v játrech, ale proto, že je zapojen do většiny známých cest v metabolismu léčiv, jako jsou např. acetaminofen (paracetamol), nifedipin, erytromycin, kodein, cyklosporin A a diazepam (Anzenbacher, Anzenbacherová, 2001). Vyskytuje se tedy zejména v játrech a v menší míře potom v tenkém střevě, plicích, žaludku, tlustém střevě a v nadledvinách. CYP 3A4 substráty bývají buď neutrální, nebo slabě bazické s relativně vysokou molekulovou hmotností a velkou strukturální rozmanitostí (Lewis, 2003). Typickými substráty jsou aflatoxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a steroidní sloučeniny (testosteron, progesteron, kortisol). 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu je uvedena v reakci 10.



[10]

CYP 3A4 je indukován barbituráty, rifampicinem a dexamethazonem (Stiborová a kol., 1999). Inhibiční účinky byly prokázány u azolových antimykotik a u grapefruitového džusu (Anzenbacher, Anzenbacherová, 2001). Další klinicky významné inhibitory jsou antibiotika (klarithromycin), antidepresiva (fluvoxamin), blokátory vápníkových kanálů (verapamil), steroidy a jejich modulátory (gestoden) a některé druhy bylinek (Zhou, 2008).

### **1.3 Metody stanovení aktivity izoforem cytochromu P450**

Nejčastější metodou, kterou lze stanovit aktivitu jednotlivých izoforem CYP450, je v dnešní době používána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s UV, elektrochemickou a fluorescenční detekcí, nebo i ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). Dalšími velmi významnými metodami jsou spektrofotometrické a spektrofluorimetrické metody (Konečný, Glatz, 2006).

#### **1.3.1 Metody stanovení aktivity CYP 2E1**

##### **1.3.1.1. Spektrofotometrické stanovení aktivity CYP 2E1**

*P*-nitrofenol (PNF) spolu s chlorzoxazonem byly určeny jako selektivní substráty pro stanovení aktivity izoformy CYP 2E1 v jaterních mikrozomech. V případě PNF lze spektrofotometrickou metodou stanovit množství vzniklého metabolitu *p*-nitrokatecholu, který se nachází přímo v reakční směsi. PNF je v kyselém prostředí bezbarvý, ale v zásaditém prostředí je jasně žlutý s absorpčním maximem v oblasti 405 nm. Vzniklý metabolit *p*-nitrokatechol má ve formě soli růžovofialovou barvu s absorpčním maximem v oblasti 510 nm. Díky těmto vlastnostem se může snadno sledovat metabolismus PNF pomocí spektrofotometru. (Blevins, 2008).

Chlorzoxazon je lék, který se používá k úlevě od bolestivých onemocnění svalové soustavy, jako jsou např. svalové křeče. V těle je tento lék hydroxylován na metabolit 6-hydroxychlorzoxazon, který podléhá glukuronidaci a je vyloučen ledvinami, což svědčí o minimálním vlivu na další eliminační cesty. Proto se chlorzoxazon používá jako vysoce selektivní sonda vhodná pro stanovení aktivity CYP 2E1 u lidí (Ernstgård et al., 2004).

##### **1.3.1.2. Stanovení aktivity CYP 2E1 vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií**

Kromě HPLC/UV lze použít i HPLC s elektrochemickou detekcí. Substrátem ke zjištění aktivity CYP 2E1 v jaterních mikrozomech je opět PNF. Jedná se o velmi citlivou, rychlou a jednoduchou metodu. Postup se skládá z enzymatické reakce zastavené kyselinou trichloroctovou, vysrážení proteinu, odstředěním a konečnou analýzou metabolitů na koloně s reverzní fází. Elektrochemická detekce umožňuje detekci velmi nízké koncentrace až 0,5 pmol *p*-nitrokatecholu, což je o dva až tři řády citlivější než HPLC/UV. Další výhodou je, že všechny složky reakce jsou komerčně dostupné (Mishin et al., 1996; Watt et al., 1997).



### 1.3.1.3. Spetrofluorimetrické stanovení aktivity CYP 2E1

Fluorescenční metoda je založena na měření záření emitovaného molekulami, které přešly do excitovaného stavu díky absorpci záření o vhodné vlnové délce. Po návratu zpět do svého základního vibračního stavu vyzáří molekula přebytek své energie ve formě fotonu. Pro každou látku jsou charakteristické dvě vlnové délky, a to excitační a emisní. Proto je tato metoda v určování koncentrace určité látky efektivnější a citlivější než spektrofotometrické metody (Káš a spol., 2006).

U měření aktivity CYP450 2E1 je velmi důležité vybrat selektivní substrát. Pouze některé molekuly mohou být použity jako selektivní substráty (sondy) pro jednotlivé izoenzymy. Většinu těchto substrátů doprovází po reakci ještě HPLC separace pro detekci metabolitů. Spetrofluorimetrické metody tuto separaci metabolitů nevyžadují. Využívají substrátů, které nevykazují žádnou nebo velmi malou fluorescenci, ale produkují velmi vysoce fluorescenční metabolity ve vodných roztocích. Výběr fluorescenčních sond je náročný. Sonda nesmí mít omezenou rozpustnost ve vodě, nízkou tvorbu metabolitů, vysoké pozadí fluorescence, nízký poměr signálu k šumu, nebo i excitační vlnovou délku v UV oblasti. Jako vhodné sondy pro stanovení aktivity 2E1 byly vybrány různé *O*-alkyl deriváty resorufinu, fluorescein, 7-hydroxykumarin, hydroxyquinolin a 4-methylsulfonylfuran.

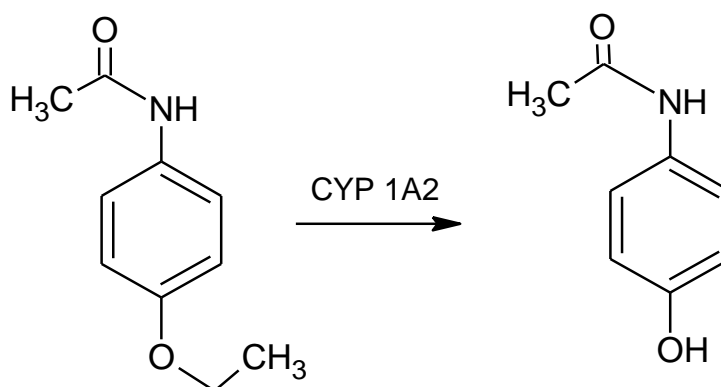
## 1.3.2 Metody stanovení aktivity CYP 1A2

### 1.3.2.1. Spektrofotometrické stanovení aktivity CYP 1A2

4-hydroxylace acetanilidu poskytuje nejspolehlivější detekci enzymatické aktivity CYP 1A2. Současné metody používají ke stanovení aktivity CYP 1A2 HPLC s UV detekcí nebo radioaktivně značené substráty. Nevýhody metody HPLC jsou drahé vybavení a pomalá analýza. Použití radioizotopů je spojeno se zdravotními riziky a s vedením záznamu o práci s radioizotopy. 4-hydroxylace acetanilidu je reakce, kde se využívá odštěpení *N*-acetyl skupiny z reakčního produktu 4-hydroxylacetanilidu následovaného derivatizací 4-aminofenolu, který vzniká jako produkt hydrolýzy s fenolem. Po této reakci dojde ke vzniku modrého komplexu, který je lehce stanovitelný spektrofotometricky. Detekční limit je až 0,1 nmol 4-hydroxyacetanilidu (Shertzer et al., 2008).

### 1.3.2.2. Stanovení aktivity CYP 1A2 vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Aktivita CYP 1A2 lidských jaterních mikrozomů a hepatocytů vyžaduje selektivní substrát pro odlišení od ostatních izoform P450. Fenacetin představuje vhodnou látku pro posouzení aktivity CYP 1A2. Jedná se o poměrně vysoce selektivní substrát, který tvoří jeden hlavní primární metabolit, acetaminofen (= paracetamol) a to pomocí *O*-deethylace (reakce 11). Aktivita CYP 1A2 za tvorby acetaminofenu se může měřit pomocí HPLC. V celém systému měření se například využívá gradientu mobilní fáze u HPLC systému s UV detektorem. Měření probíhá se při 254 nm (Polasek et al., 2006).



[11]

### 1.3.2.3. Spektrofluorimetrické stanovení aktivity CYP 1A2

Aktivitu izoformy CYP 1A2 v jaterních buňkách lze stanovit pomocí tvorby resorufinu, což je látka, která vykazuje vysokou fluorescenci, a proto ji můžeme měřit touto metodou. Resorufin vzniká při 7-methoxyresorufin-*O*-demethylaci (MROD), který je hlavním substrátem CYP 1A2, případně při 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylaci (EROD), který je hlavním substrátem CYP 1A1. Detekce MROD probíhá při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 580 nm. U MROD je detekce založená na spektrofluorimetrických metodách, ale může být také měřena pomocí HPLC s fluorescenční detekcí (Chang, Waxman, 2006).

Další substrát, který může být použit ke zjištění aktivity izoformy CYP 1A2 pomocí fluorescence, je 3-kyano-7-ethoxykumarin (CEC). Jeho metabolitem je kyano-hydroxykumarin. CEC se považuje za lepší substrát z hlediska vyšší míry metabolismu a nižšímu pozadí fluorescence než 7-methoxyresorufin (MER). Aktivita CYP 1A2 se u obou substrátů stanovuje přímo v buňkách (Donato et al., 2004).

### **1.3.3 Metody stanovení aktivity CYP 3A4**

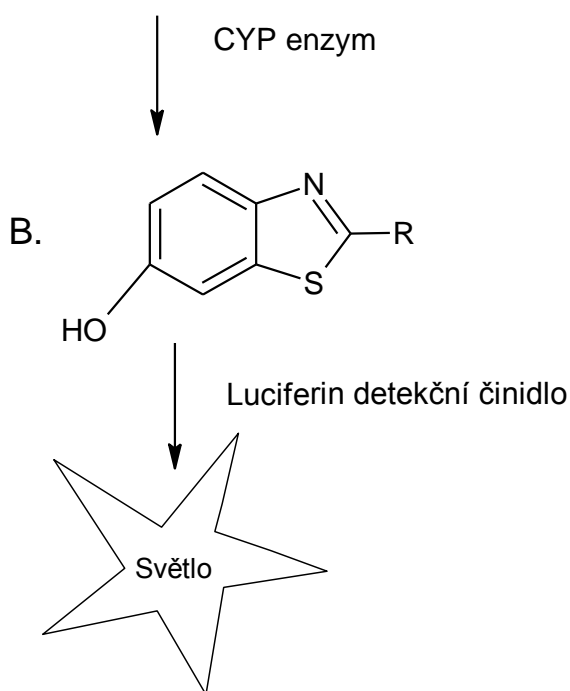
#### **1.3.3.1. Stanovení aktivity CYP 3A4 vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií**

Jednoduchá, rychlá a selektivní metoda pro přímé stanovení aktivity izoformy CYP 3A4 v jaterních mikrozomech je metoda HPLC s UV/VIS detekcí, která využívá substrátu testosteronu. Testosteron je vysoce selektivní substrát, který se přeměňuje díky CYP3A4 v přítomnosti NADPH na 6- $\beta$ -OH-testosteron. Tato metoda byla použita ke stanovení aktivity CYP3A4 6 $\beta$ -hydroxylací prostřednictvím kvantifikace 6- $\beta$ -OH-testosteronu. Separace produktu může například probíhat po extrakci pomocí chromatografie s obrácenou fází, kdy mobilní fázi může být směs methanolu a kyseliny trichloroctové. Detekce probíhá při 240 nm (Baati et al., 2012).

#### **1.3.3.2. Luminescenční stanovení aktivity CYP 3A4**

Luminescenční metoda využívá P450-Glo<sup>TM</sup> pro měření aktivity CYP450. Substráty P450-Glo<sup>TM</sup> (proluciferiny) jsou pomocí CYP450 enzymů převedeny na luciferinové produkty (obr. 4, reakce A). D-luciferin se vytváří a je detekován během druhé reakce po reakci s luciferinovým detekčním činidlem. Množství vzniklého světla v reakci B je přímo úměrné aktivitě CYP450. Tyto testy jsou ideální pro měření inhibice jednotlivých CYP, kvantifikaci aktivity rekombinantních CYP či charakterizaci aktivity nativních CYP nebo po jejich indukci.

A. P450-Glo™ substrát (proluciferin)



**Obr. 4** Přeměna P450-Glo™ substrátu cytochromem P450 (upraveno dle Mary Sobol, 2007)

Pro izoformu CYP 3A4 jsou k dispozici 4 různé substráty ke stanovení aktivity. Luciferin izopropylacetal neboli Luciferin-IPA je vysoce selektivní a citlivý substrát pouze pro izoformu CYP 3A4. Luciferin-PPXE je selektivní pro izoformy CYP 3A4, CYP 3A5 a CYP 3A7. Luciferin 6'benzylether neboli Luciferin-BE je selektivní pro izoformy CYP 3A4, CYP 3A7 a CYP 4F12. Luciferin-PFBE je selektivní pro izoformy CYP 3A4, CYP 3A5 a CYP 3A7. Výhody těchto metod jsou rychlost, zjednodušení metody, větší citlivost, žádná fluorescenční interference, stabilita signálu a buněčná propustnost.

Metoda je prováděna, jak už bylo dříve zmíněno ve dvou krocích. V prvním kroku jsou CYP450 enzym a substrát P450-Glo™ promíchány ve fosforečnato-draselném pufru a reakce se zahájí přidávkem NADPH. V druhém kroku je luciferinový produkt, který vznikl v prvním kroku detekován jako luminiscenční signál. Nejprve se přidá luciferinové detekční činidlo, které zastaví CYP reakci a iniciuje luminiscenční signál, který je přímo úměrný CYP aktivitě. Poté probíhá detekce luminometrem.

Substráty P450-Glo™ a produkty reakce jsou buněčně propustné a proto se mohou použít k detekci aktivity CYP 3A4 v buňkách (Mary Sobol et al., 2007).

## **2 CÍL PRÁCE**

- 1.) Zavést a optimalizovat stanovení intracelulární aktivity 1A2 izoenzymu cytochromu P450.
- 2.) Optimalizovat přípravu biologického materiálu pro stanovení aktivity daného CYP.
- 3.) Následně bylo naším cílem zavedenou metodu, popř. více metod (HPLC/UV/FL/MS nebo spektrofluorimetrické metody) využít ke stanovení aktivity CYP v buněčných liniích.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, SRN)

Elektronická multipipeta (Eppendorf, Xstream, Germany)

Hamilton dávkovací jehla 25  $\mu$ l (Hamilton, Rumunsko)

HPLC: LC systém s dvěma LC-20ADXR pumpami, analytická kolona Kinetex EVO C18 100A s porézními částicemi (150 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m; Phenomenex, USA).

HPLC/MS: LC/UV systém s SPD-20A UV detektorem, s dvěma LC-20ADXR pumpami, autosamplerem SIL-20ADXR (Shimadzu, Japan), kolonový termostat LCO 102 (ECOM, ČR), QTRAP 4500 MS (AB SCEIX, USA), analytická kolona Kinetex EVO C18 100A s porézními částicemi (150 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m; Phenomenex, USA).

Inkubátor (Major Science, USA)

Laboratorní sklo (baňky, kádinky) (Simax, Fisherbrand; ČR, UK)

Lednice s mrazákem (-20 °C) Electrolux 3046 (SRN)

Mikrozkumavky o objemu 200  $\mu$ l, 1,5 a 2 ml (Neptune, Mexiko)

Mikrozkumavky s 0,22  $\mu$ m s nylonovým filtrem o objemu 2 ml (Costar, USA)

Pipety Finnipipette (Thermo corporation, Finsko)

Rotační třepačka Heidolph (Reax top, SRN)

Spektrofoto-/spektrofluorimetr Infinite M200 (Tecan, Rakousko)

Spektrofluorimetr Aminco.Bowman 2 (Thermo, USA)

Třepačna na mikrotitrační destičky (IKA, Německo)

Vyhřívaná třepačka na mikrotitrační destičky (Biosan, Lotyšsko)

96-jamkové mikrotitrační destičky (Nunc, Dánsko)

384-jamkové mikrotitrační destičky (Nunc, Dánsko)

Software: ACD/ChemSketch, i-control 1.6, Microsoft Office Word 2010, Microsoft Office Excel 2007, Clarity

## 3.2 CHEMIKÁLIE

Acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ , Mr = 41,05, Sigma-Aldrich, SRN)

Bovinní sérový albumin (>95 %, Sigma.Aldrich, SRN)

Brilliant Blue G-250 ( $\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$ , Mr = 854,02, Sigma-Aldrich, SRN)

Dimethylsulfoxid ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ , Mr = 78,13, Sigma-Aldrich, USA)

Deionizovaná voda ( $G < 0,1 \mu\text{S}$ )

Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Mr = 46,07, Merck, SRN)

Kyselina trihydrogenfosforečná ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85%, Mr = 98, Sigma-Aldrich, SRN)

Kyselina metafosforečná ( $\text{HPO}_3$ , Mr = 79,98, Sigma-Aldrich, SRN)

Lyzační pufr (Fisher Scientific, USA)

LDH reagensie R1 (DiaSys, Germany)

LDH reagensie R2 (DiaSys, Germany)

Methanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ , Mr = 32,04, Sigma-Aldrich, SRN)

Methoxyresorufin ( $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_3$ , Mr = 227,22, Sigma-Aldrich, USA)

Resorufin sodný ( $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{NNaO}_3$ , Mr = 235,17, Sigma-Aldrich, USA)

### 3.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ DLE BRADFORDA

#### 3.3.1 Princip

Princip metody stanovení proteinů dle Bradforda spočívá v navázání Comassie Brilliant Blue G-250 k proteinu, která způsobí posun absorpčního maxima barviva. Vazba barviva na bílkovinu je velmi rychlý proces, při kterém dochází ke změně absorpčního maxima ze 465 nm na 595 nm, což se projevuje změnou barviva z červené na modrou (Bradford M. M.; 1976).

#### 3.3.2 Příprava roztoků

##### Roztok dle Bradforda

K 50 mg Brilliant Blue G-250 přidáme 25 ml ethanolu (95%) s 50 ml kyseliny fosforečné (85%) a po rozpuštění doplnili do 500 ml deionizovanou vodou a přefiltrovali. Připravený roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

##### Kalibrační řada standardů bovinního sérového albuminu (BSA) pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda

V 1 ml deionizované vody jsme rozpustili 10 mg BSA (95%) a tím připravili zásobní roztok, který jsme dále ředili na roztok o koncentraci 1 mg/ml BSA. Takto připravený zásobní roztok jsme dále využili k přípravě roztoků do kalibrační řady o koncentraci 0, 10, 50, 70, 100, 250, 500 µg/ml BSA dle tabulky 4.

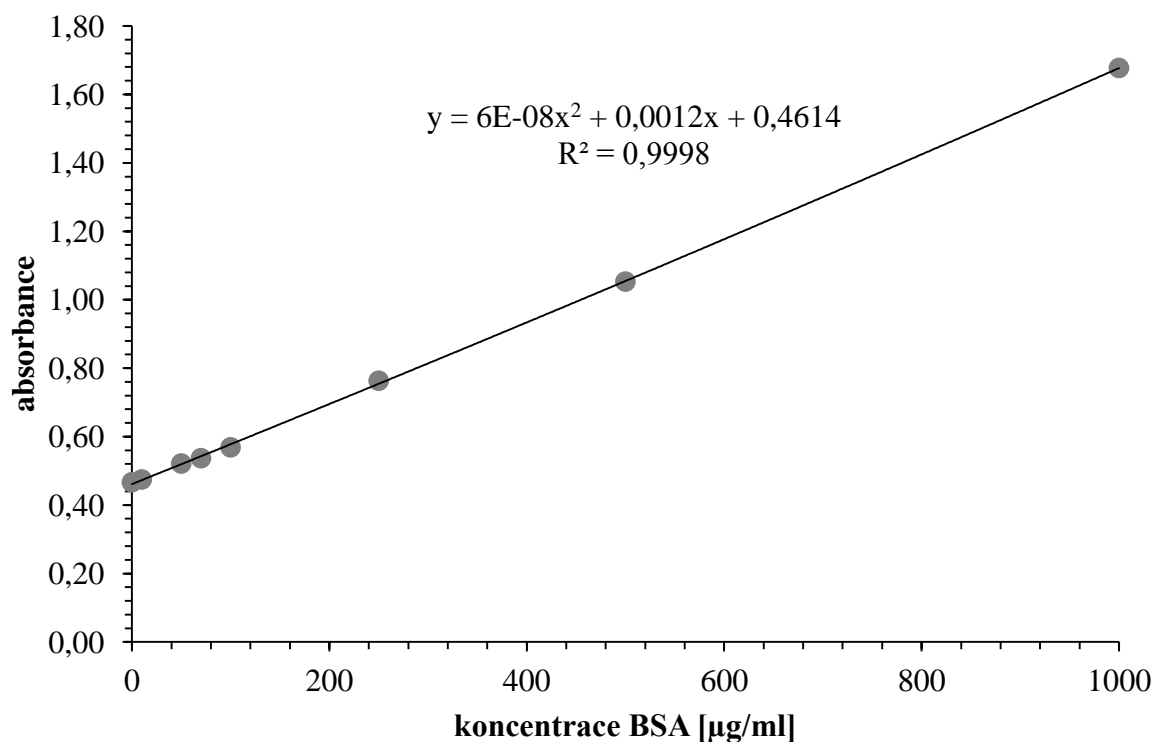
**Tabulka 4:** Příprava kalibračních standardů BSA

Koncentrace standardního roztoku BSA [µg/ml]	Objem roztoku BSA [µl]	Objem deionizované vody [µl]
1000	100 (10 mg/ml BSA)	900
500	500 (1 mg/ml BSA)	500
250	250 (1 mg/m BSA)	750
100	200 (1 mg/ml BSA)	1800
70	700 (100 µg/ml BSA)	300
50	500 (100 µg/ml BSA)	500
10	100 (100 µg/ml BSA)	900
0	0	1000

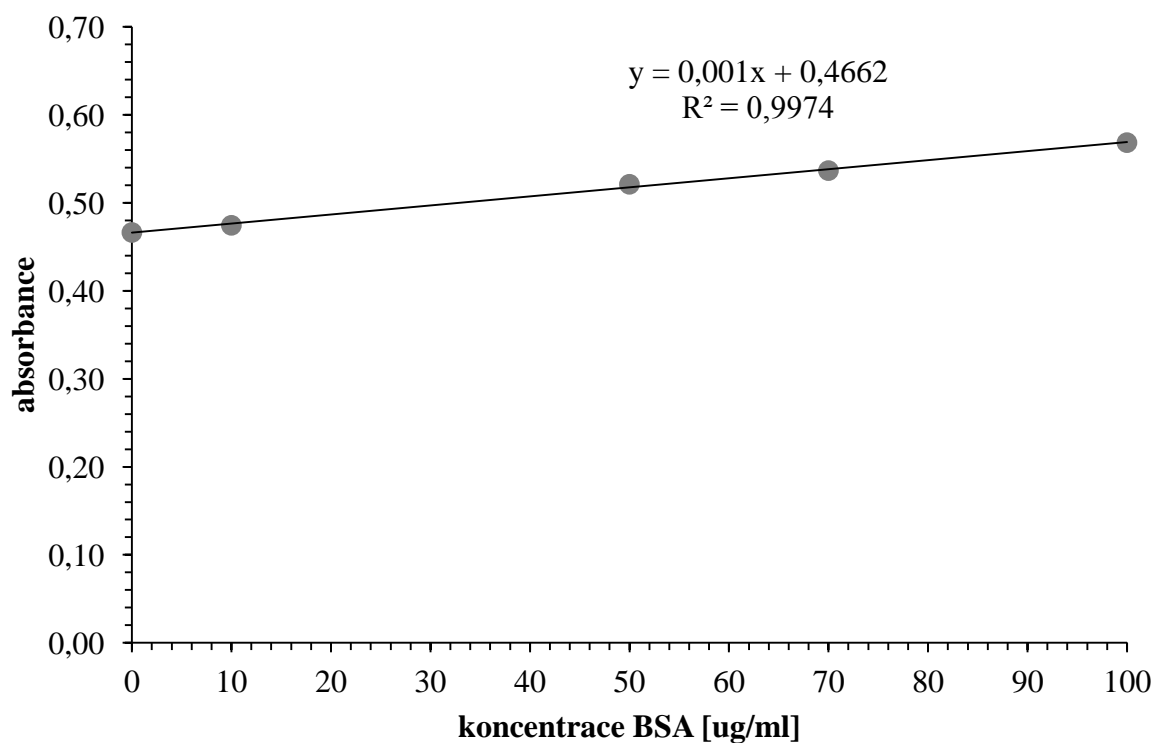


### 3.3.3 Postup

Do mikrotitrační destičky jsme pipetovali 10  $\mu\text{l}$  z každého standardního roztoku připravené kalibrační řady a 10  $\mu\text{l}$  blanku (deionizovaná voda). K roztokům jsme přidali 300  $\mu\text{l}$  roztoku dle Bradforda a poté vložili destičku do spektrofoto-/spektrofluorimetru Infinite M200. Nastavili jsme teplotu měření na 21  $^{\circ}\text{C}$ . Takto připravené roztoky jsme nechali inkubovat 10 minut a poté jsme proměřili absorbanci při 595 nm.



**Graf 2:** Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda (0-1000  $\mu\text{g/ml}$  BSA).

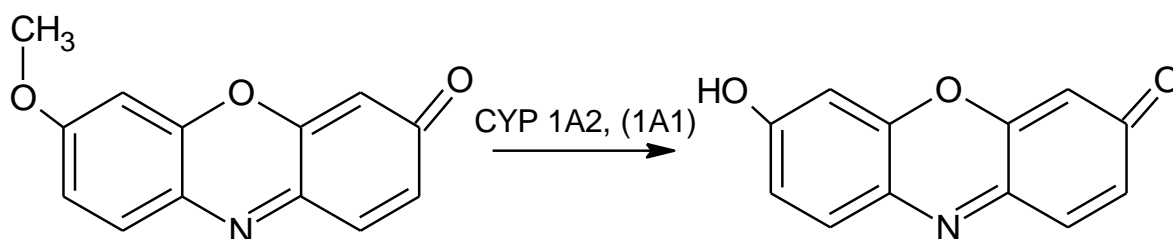


**Graf 3:** Lineární část kalibrační závislosti pro stanovení proteinů dle Bradforda (0-100  $\mu\text{g/ml}$  BSA).

### 3.4 Optimalizace stanovení aktivity CYP 1A2 pomocí substrátu 7-methoxyresorufinu

#### 3.4.1 Princip

Aktivita izofomy CYP 1A2 v jaterních buňkách se stanovuje na základě *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu na jeho fluorescenční produkt resorufin (reakce 16). Reakce je detekována při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 580 nm (Chang, Waxman, 2006).



[16]

### **3.4.2 Příprava roztoků**

#### **7-methoxyresorufin (10 mM)**

Ve 440  $\mu\text{l}$  DMSO jsme rozpustili 1 mg 7-methoxyresorufinu. Připravený roztok jsme rozpipetovali do 200  $\mu\text{l}$  mikrozkuvek a skladovali v mrazáku při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **5% kyselina metafosforečná (MPA)**

Ve 100 ml deionizované vody jsme rozpustili 5 g MPA. Připravený roztok jsme skladovali v lednici při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **Příprava mobilní fáze**

Pro všechna měření byla použita mobilní fáze, která byla složena z deionizované vody (40 %) a acetonitrilu (60 %).

### **3.4.3 Příprava vzorků buněčné linie HK-2, HepG2 a A549**

Každá buněčná linie byla kultivována v kultivačním médiu s fenolovou červení po dobu 24 hod. Poté bylo kultivační médium vyměněno za kultivační médium bez fenolové červeně. Dále jsme postupovali podle kapitoly 3.4.4.

### **3.4.4 Stanovení aktivity CYP 1A2 u buněčných linií HK-2, HepG2 a A549 v médiu pomocí spektrálních metod**

Po zředění zásobního roztoku 7-methoxyresorufinu pomocí deionizované vody jsme si připravili koncentrace tak, aby konečná koncentrace v jamce byla 4, 8, 20 a 40  $\mu\text{M}$  7-methoxyresorufinu. Ke vzorkům i ke slepým vzorkům vybrané buněčné linie jsme pipetovali 10  $\mu\text{l}$  7-methoxyresorufinu o dané koncentraci a detekovali fluorescenci při excitační vlnové délce 535 nm a emisní vlnové délce 582 nm po dobu 3 hodin pomocí spektrofotometru/spektrofluorimetru Infinite M200.

Dále jsme si ředěním zásobního roztoku 7-methoxyresorufinu pomocí deionizované vody připravili koncentraci tak, aby konečná koncentrace v jamce byla 40  $\mu\text{M}$  MER. Ke vzorkům buněk HK-2 (HepG2, A549) se 100  $\mu\text{l}$  média jsme přidali 10  $\mu\text{l}$  7-methoxyresorufinu. 10  $\mu\text{l}$  každé koncentrace 7-methoxyresorufinu jsme přidali také ke slepým vzorkům. Nejprve jsme proměřovali vzorky spektrofotometricky, kdy  $\lambda_{\text{max}}$  je u resorufinu 575 nm. Podmínky měření jsou uvedeny v tabulce 5. Následně jsme celý postup zopakovali po přidání 40  $\mu\text{M}$  substrátu 7-methoxyresorufinu a vzorky buněk i slepé vzorky proměřili fluorimetricky na spektrofotometru/spektrofluorimetru Infinite M200 při excitační vlnové délce 535 nm a emisní vlnové délce 582 nm. Podmínky měření jsou uvedeny v tabulce 6. Po proměření jsme odebrali 40  $\mu\text{l}$  média

od buněk a 40 µl média od slepého vzorku do mikrozkušavek na pozdější měření na HPLC, kdy do doby analýzy byly zamrazeny při -20 °C.

**Tabulka 5:** Podmínky spektrofotometrického stanovení aktivity CYP 1A2

Interval měření	1 min
Počet cyklů	61
Teplota měření	37 °C
Vlnová délka absorpance	575 nm

**Tabulka 6:** Podmínky spektrofluorimetrického stanovení aktivity CYP 1A2

Interval měření	1 min
Počet cyklů	61
Teplota měření	37 °C
Vlnová délka excitace	535 nm
Vlnová délka emise	582 nm

### **3.5 Optimalizace metody ke stanovení aktivity CYP 1A2 pomocí HPLC/UV-VIS a LC/MS**

#### **3.5.1 Deproteinace vzorků před měřením**

Ke vzorkům, které byly zamrazeny, po rozmrazení přidáme 5% MPA v poměru ke vzorku 1:2. Poté jsme vzorek s MPA nechali inkubovat po dobu 10 minut. Roztok jsme dále filtrovali a centrifugovali v mikrozkušavkách s nylonovým filtrem (10000g, 5 minut, 4 °C). Získaný vzorek jsme uchovávali v lednici při 4 °C do analýzy na HPLC.

#### **3.5.2 HPLC/UV-VIS a LC/MS**

Pro stanovení aktivity CYP 1A2 jsme použili vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV/VIS detektorem. Konkrétně se jedná o LC systém, který obsahuje dvě pumpy, degasser, kolonu se stacionární fází (silikagel s C18 s porézními částicemi) a kolonový termostat. Jako mobilní fáze byla použita vždy čerstvá deionizovaná voda a acetonitril (40:60; v/v). Zvolili jsme nástřik 2,5 µl. Odezva detektoru byla sledována při vlnové délce 535 nm.

Jako další metodu jsme zvolili vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii propojenou s hmotnostním spektrometrem (LC/MS). Konkrétně se jednalo o Shimadzu LC systém, který obsahuje dvě pumpy, autosampler, kolonu se stacionární fází (silikagel s C18 a porézními částicemi), kolonový termostat a UV detektor. Kapalinový chromatograf je spojen s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 s elektrosprejem AB SCIEX.

Jako mobilní fáze byla použita čerstvá deionizovaná voda s acetonitrilem (40:60; v/v).  
Podmínky měření LC/MS detekce jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tabulka 7:** Podmínky měření na LC/MS

Mobilní fáze	60 % ACN (B), 40 % DV (A)
Kolona	Kinetex EVO, C18, 150 x 3 mm, 5 µm
Množství dávkovaného vzorku	1 µl
Teplota	30 ° C
Průtok mobilní fáze	0,2 ml/min
Polarita	Pozitivní
Rozsah m/z	50 – 300
Rychlost skenování	10 000 Da/s
Deklasterační potenciál, DP	70 V
Kolizní energie, CE	10 V
Vstupní potenciál, EP	10 V
Napětí iontového spreje	4500 V
Teplota na zdroji	200 ° C

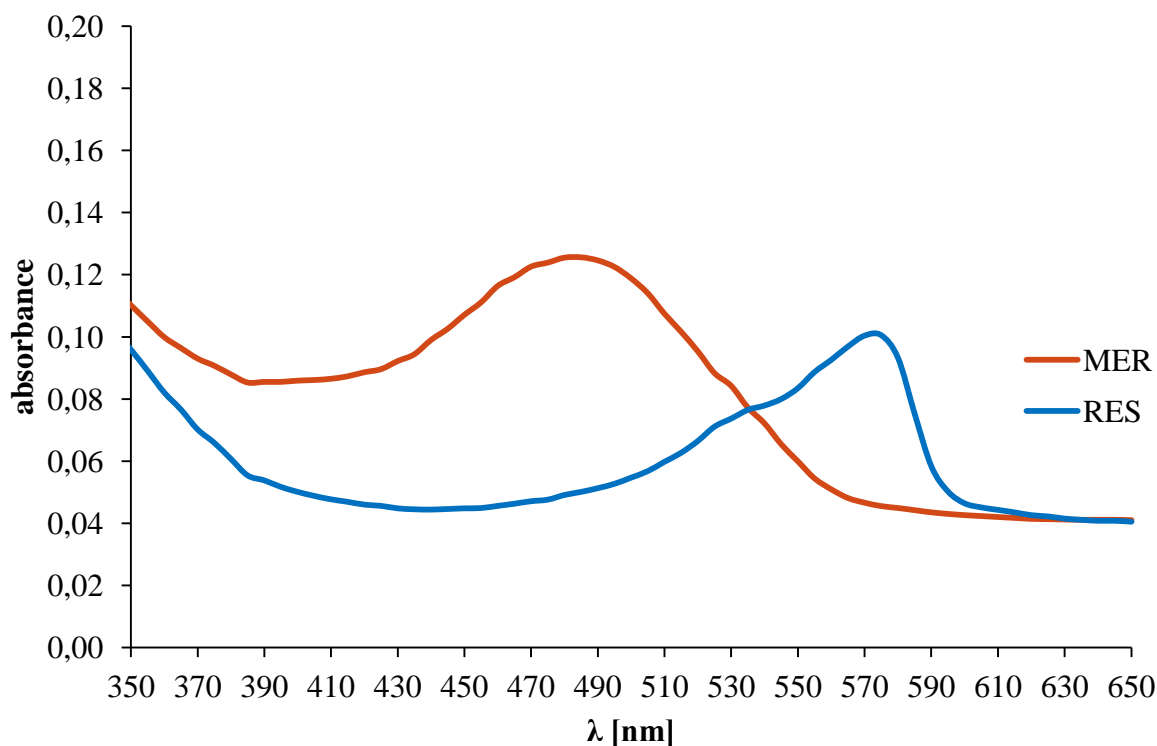
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Optimalizace spektrofotometrické a spektrofluorimetrické metody ke stanovení aktivity CYP 1A2

#### 4.1.1 Absorpční spektra resorufinu a 7-methoxyresorufinu

Aktivita CYP 1A2 v jaterních buňkách se stanovuje na základě *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu, který se přeměňuje na fluorescenční produkt resorufin. Tento produkt můžeme detekovat pomocí spektrofotometrické metody, spektrofluorimetrické metody nebo pomocí HPLC.

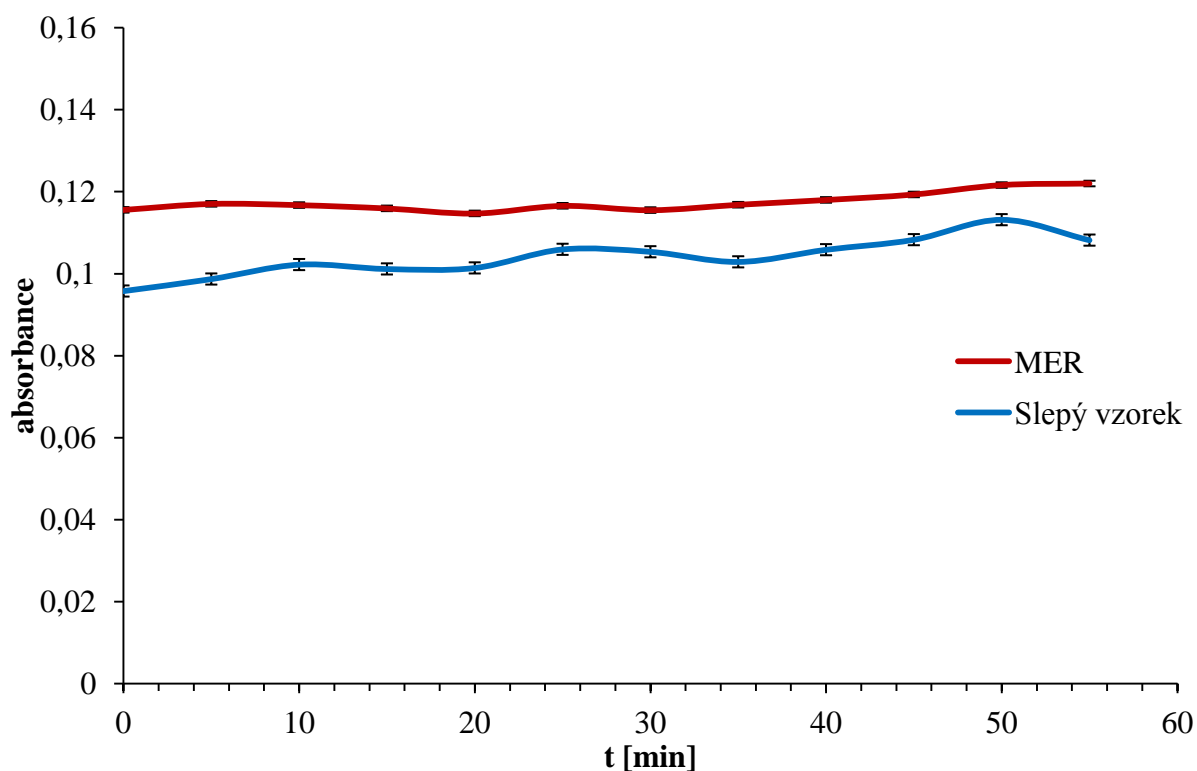
Nejprve jsme proměřili absorpční spektra standardů resorufinu a 7-methoxyresorufinu, abychom zjistili jejich absorpční maxima. Roztoky byly připravovány v deionizované vodě. Z grafu 4 vyplývá, že absorpční maximum 7-methoxyresorufinu je  $\lambda_{\max} = 478$  nm a u resorufinu je  $\lambda_{\max} = 575$  nm. Tyto vlnové délky jsme následně využili při dalších spektrofotometrických analýzách.



**Graf 4:** Absorpční spektra 7-methoxyresorufinu (MER) a resorufinu (RES).  
(MER (2  $\mu$ M); RES (2  $\mu$ M))

#### 4.1.2 Optimalizace stanovení aktivity CYP 1A2 pomocí spektrálních metod

Podle předchozího zjištění absorpčních maxim jsme nastavili hodnoty vlnové délky u spektrofotometrické metody a zjišťovali předpokládaný nárůst absorbance odpovídající aktivitě CYP 1A2 po inkubaci MER s buňkami. K tomuto pokusu jsme využili buněčnou linii HepG2, kde jsme předpokládali vysokou aktivitu tohoto cytochromu. Jak je z grafu 5 patrné, nárůst absorbance nebyl viditelný ani po hodinové inkubaci. Kromě téměř nulového nárůstu absorbance jsme také našli u slepého vzorku nárůst absorbance odpovídající 83 % signálu vzorku. Z toho vyplývá, že slepý vzorek nelze téměř odlišit od signálu vzorku u buněčné linie HepG2, u níž je předpokládána vysoká aktivita CYP 1A2. Vzhledem k těmto skutečnostem jsme od dalšího použití spektrofotometrické metody detekující aktivity CYP 1A2 upustili.

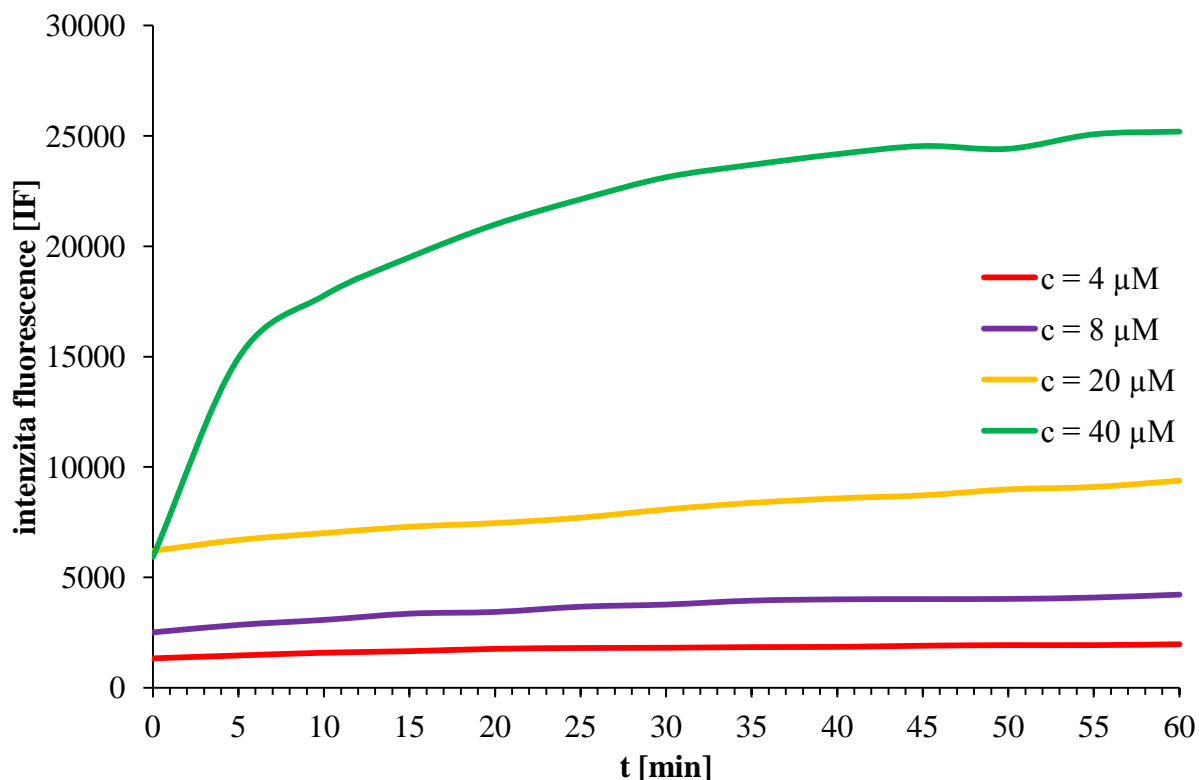


**Graf 5:** Spektrofotometrické stanovení aktivity CYP 1A2.

(HepG2 buňky; 7-methoxyresorufin (MER; 40  $\mu$ M). Čas měření 0-60 min při  $\lambda = 575$  nm., průměr  $\pm$  SD, n = 2; původní data příloha 1.)

Další metodou, kterou jsme použili ke zjištění aktivity CYP 1A2, je metoda spektrofluorimetrická. S optimalizací spektrálních metod se pojí i zvolení vhodné koncentrace substrátu 7-methoxyresorufinu, kterou budeme dále používat u všech metod. Nejprve jsme zvolili koncentraci substrátu 8  $\mu$ M a poté i další koncentrace - a to 4  $\mu$ M, 20  $\mu$ M a 40  $\mu$ M. Srovnání fluorescence RES vzniklého z MER o těchto koncentracích po inkubaci s buněčnou

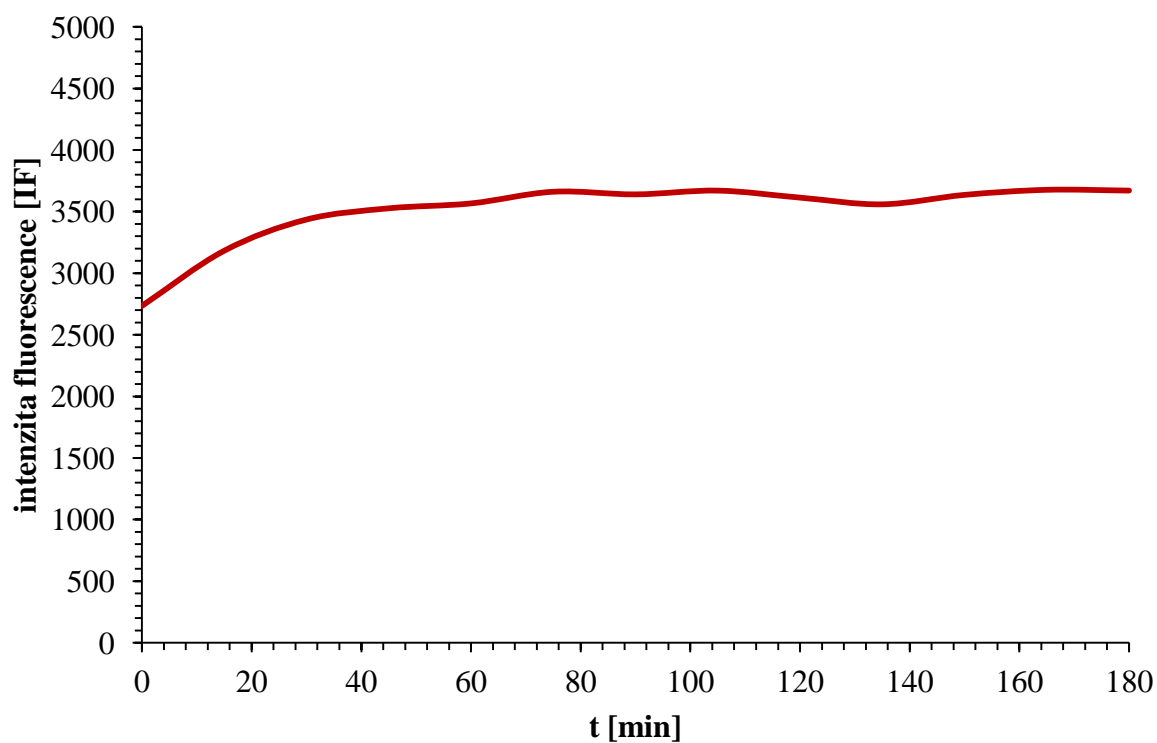
linií HepG2 je znázorněno na grafu 6. Můžeme vidět, že k nejvyššímu nárůstu intenzity fluorescence dochází u koncentrace 40  $\mu\text{M}$  7-methoxyresorufinu.



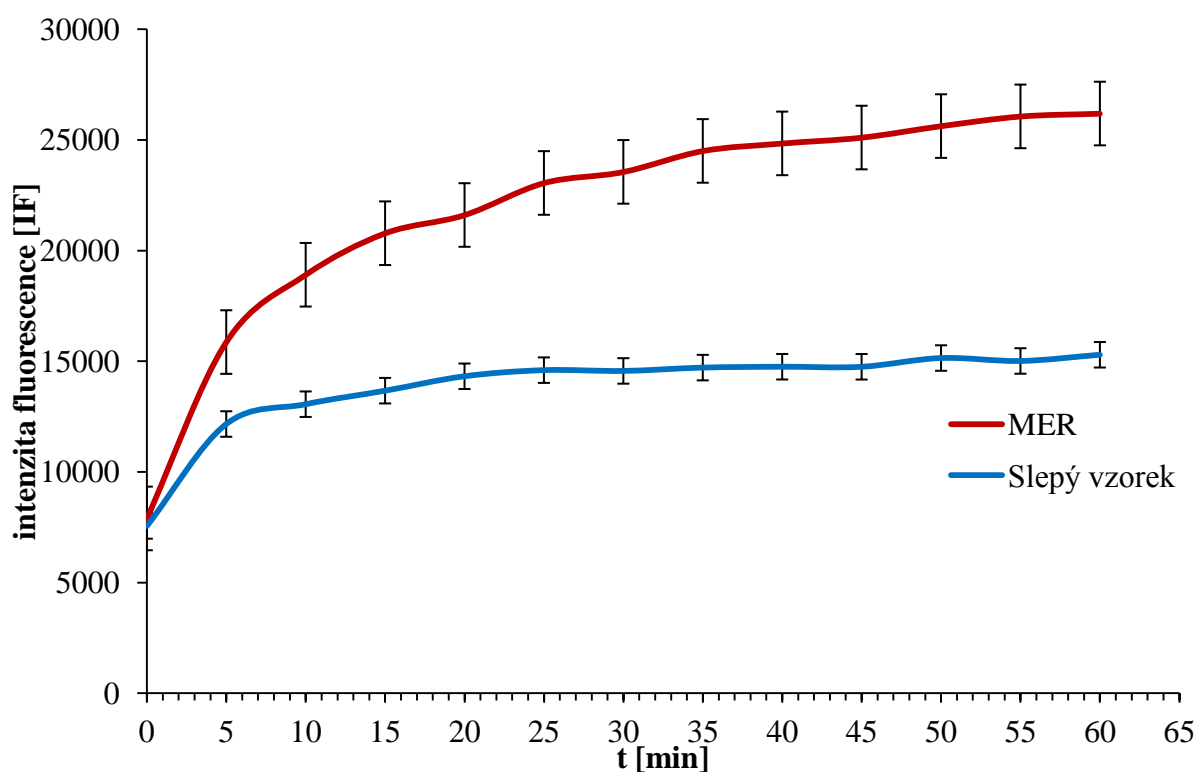
**Graf 6:** Optimalizace koncentrace standardu 7-methoxyresorufinu (HepG2 buňky; 7-methoxyresorufin (4, 8, 20 a 40  $\mu\text{M}$ ). Čas měření 0-60 min. při  $\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{EM}} = 535/582 \text{ nm.}$ )

Fluorescenční signál jsme detekovali po dobu 60 minut. Po tomto časovém intervalu již nedocházelo k výrazné změně signálu u buněk HepG2 (graf 7). Při srovnání s předchozí metodou jsme zde našli (graf 8) výrazné odlišení fluorescenčního signálu odpovídajícího aktivitě CYP 1A2 u buněk od slepého vzorku bez buněk. Signál vzorku bez buněk tvoří po 60 minutách měření 31 % signálu vzorku s buňkami. Dále je z grafu 8 patrné, že nejvýraznější vzestup signálu u buněk můžeme zaznamenat během počátečních intervalů měření, kdy u vzorku s buňkami došlo k nárůstu fluorescence po prvních 10 minutách měření o 11000 IF, po dalších 10 minutách o 2700 IF a mezi 20. a 30. minutou měření o 1500 IF.





**Graf 7:** Spektrofluorimetrické stanovení aktivity CYP 1A2.  
(HepG2 buňky; 7-methoxyresorufin (MER; 20  $\mu$ M). Čas měření 0-180 min. při  $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 535/582$  nm.)



**Graf 8:** Spektrofluorimetrické stanovení aktivity CYP 1A2.  
(HepG2 buňky; 7-methoxyresorufin (MER; 40  $\mu$ M). Čas měření 0-60 min. při  $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 535/582$  nm.)

## 4.2 Optimalizace metody stanovení aktivity CYP 1A2 pomocí HPLC/UV-VIS a LC/MS

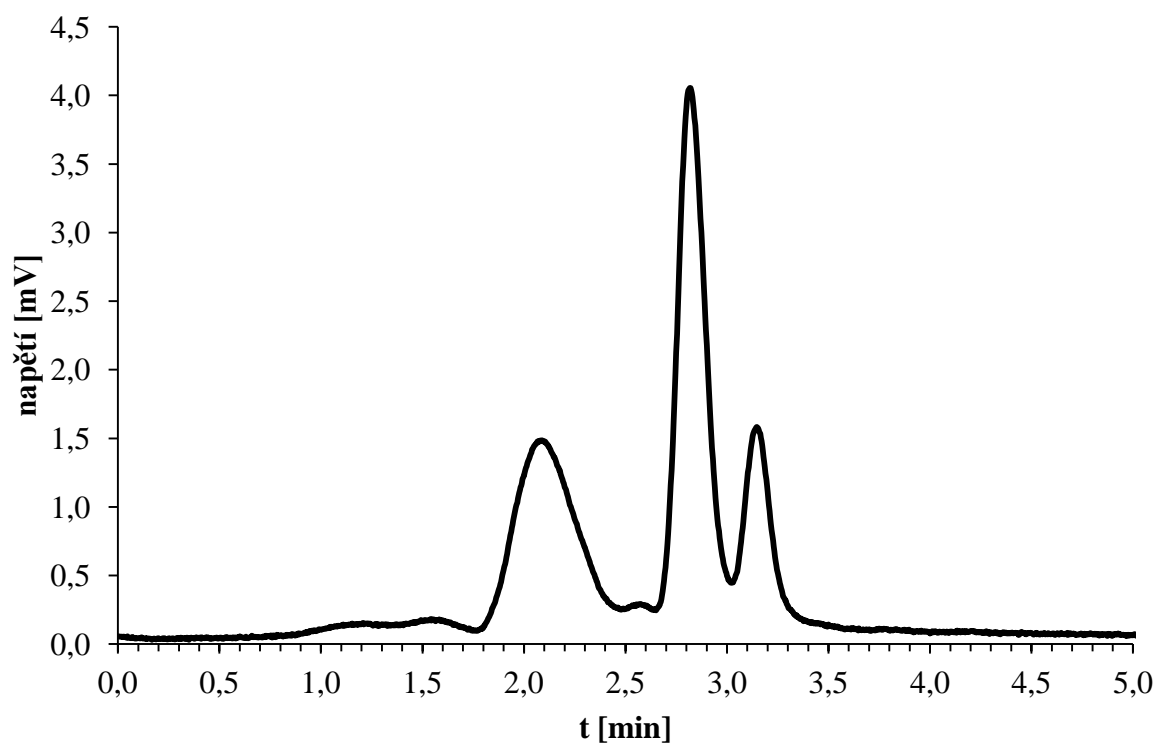
### 4.2.1 Stanovení standardů resorufinu a 7-methoxyresorufinu

Před stanovením aktivity CYP 1A2 u buněk jsme jednotlivé standardy proměřovali pomocí HPLC s UV/VIS detekcí a zjišťovali jejich chování v naší zvolené mobilní fázi. Nejprve jsme používali jako mobilní fázi směs fosfátového pufru s acetonitrilem, ale zjistili jsme, že zde dochází k nežádoucím účinkům v chování standardů (graf 9, 10). Proto jsme místo směsi s fosfátovým pufrem použili jako mobilní fázi směs deionizované vody s acetonitrilem, která se ukázala být optimální pro separaci standardů RES a MER při jedné analýze, což bylo i cílem optimalizace metody. Veškeré podmínky měření a retenční časy obou standardů jsou uvedeny v tabulce 8.

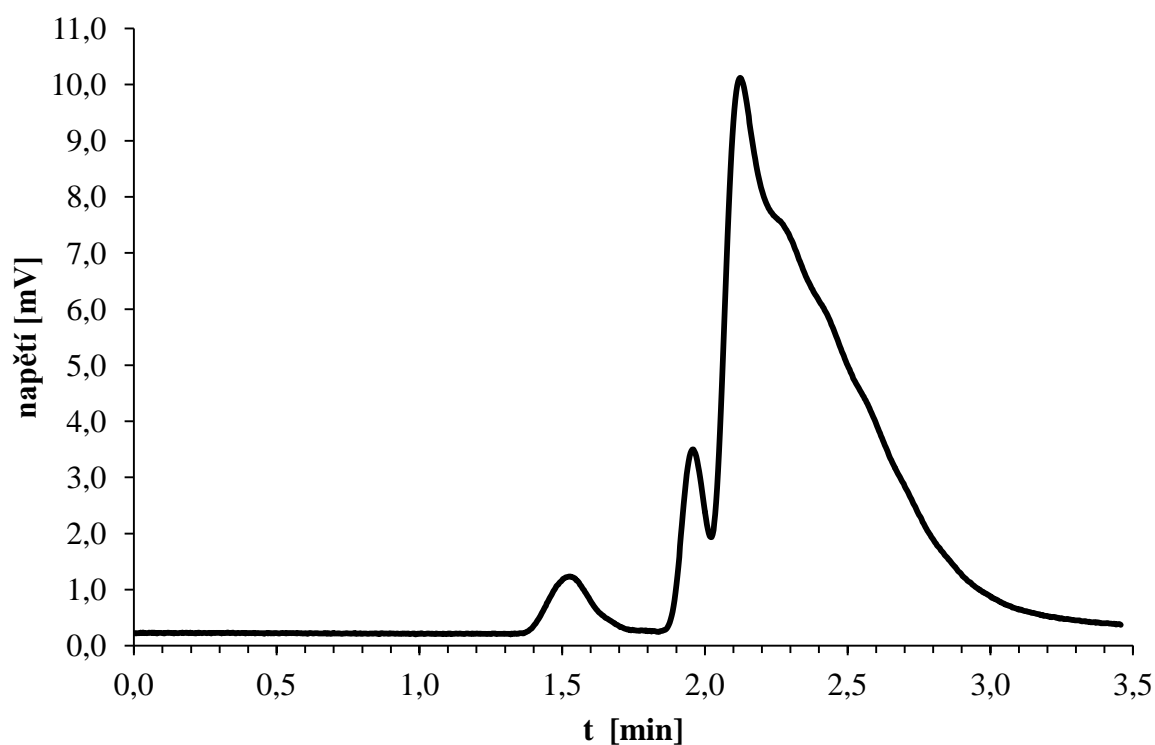
Retenční čas standardu resorufinu je 1,97 min (graf 11) a retenční čas standardu 7-methoxyresorufinu je 2,25 min (graf 12).

**Tabulka 8:** Podmínky měření na HPLC

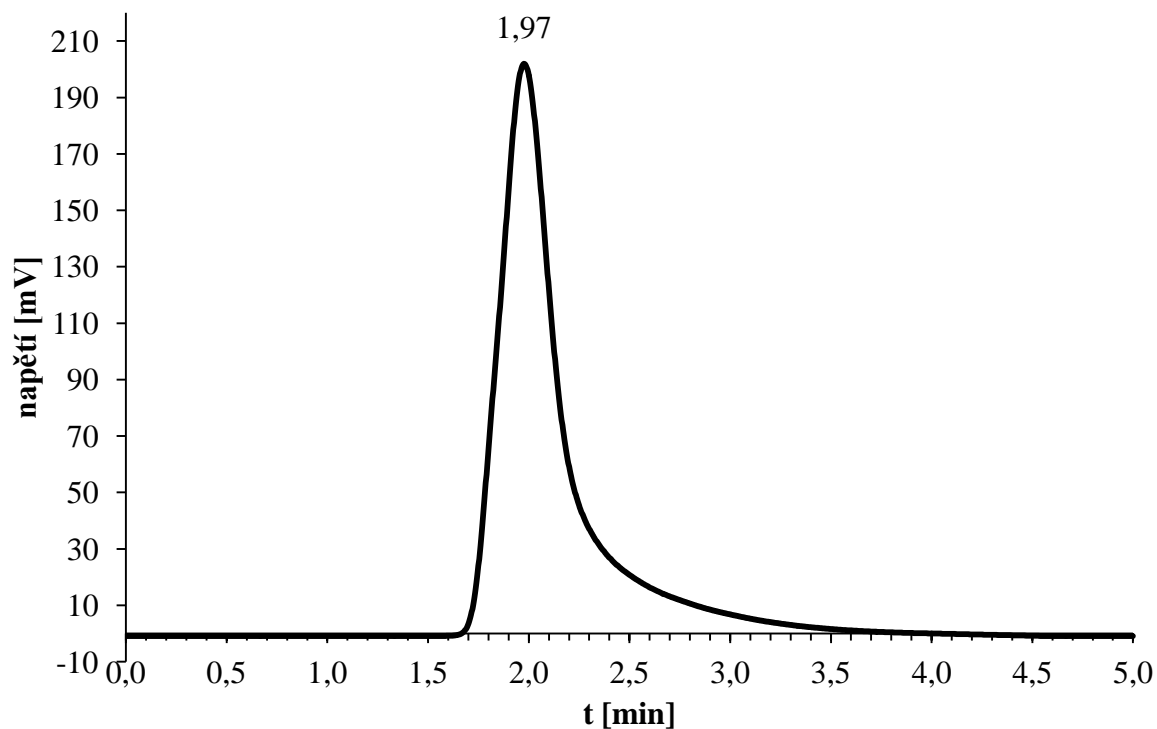
Mobilní fáze	60 % ACN (B), 40 % DV (A)
Kolona	Kinetex, EVO, C18, 150 x 3 mm, 5 µm
Množství dávkovaného vzorku	2,5 µl
Teplota	30 °C
Průtok mobilní fáze	0,2 ml/min
Retenční čas RES	1,97 min
Retenční čas MER	2,25 min
Vlnová délka	535 nm



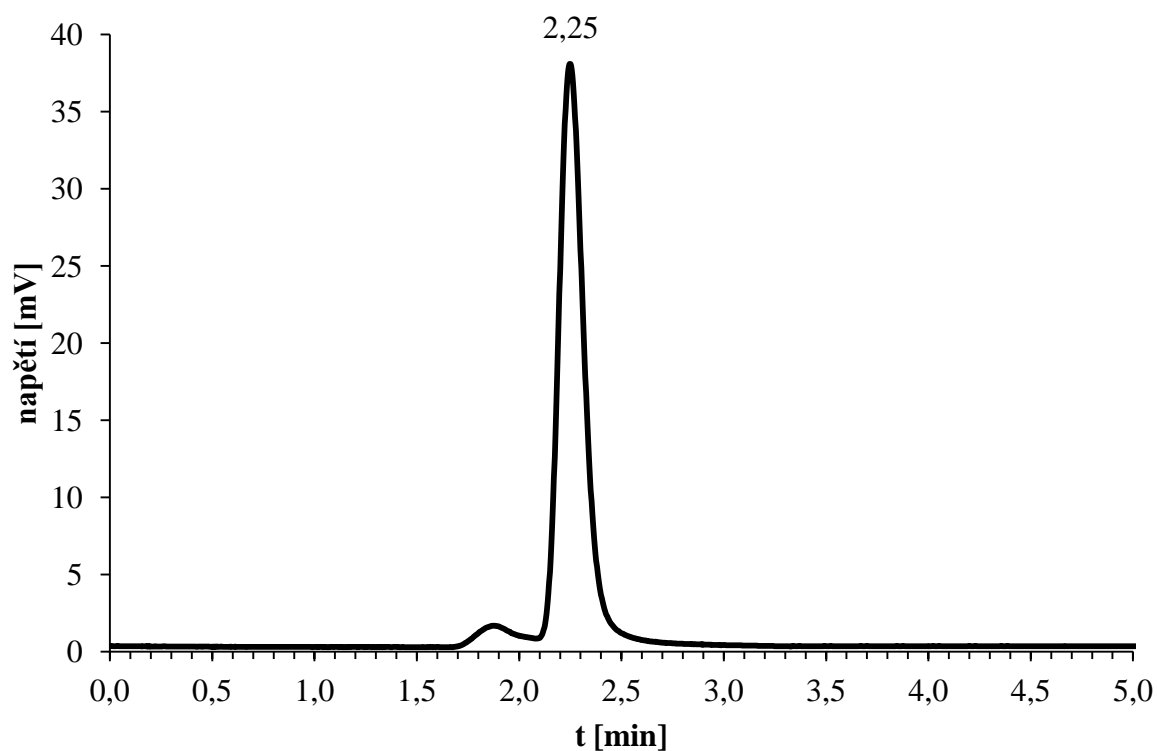
**Graf 9:** Detekce 7-methoxyresorufinu pomocí HPLC.  
 (7-methoxyresorufin (8  $\mu$ M). Čas měření 0-5 min. při  $\lambda = 254$  nm. MF: 70% ACN + 30 %  
 fosfátový pufr (30 mM); SF: silikagel s C18 a porézními částicemi.)



**Graf 10:** Detekce resorufinu pomocí HPLC.  
 (Resorufin (50  $\mu$ M). Čas měření 0-3,5 min. při  $\lambda = 254$  nm. MF: 50% ACN + 50 %  
 fosfátový pufr (30 mM); SF: silikagel s C18 a porézními částicemi.)



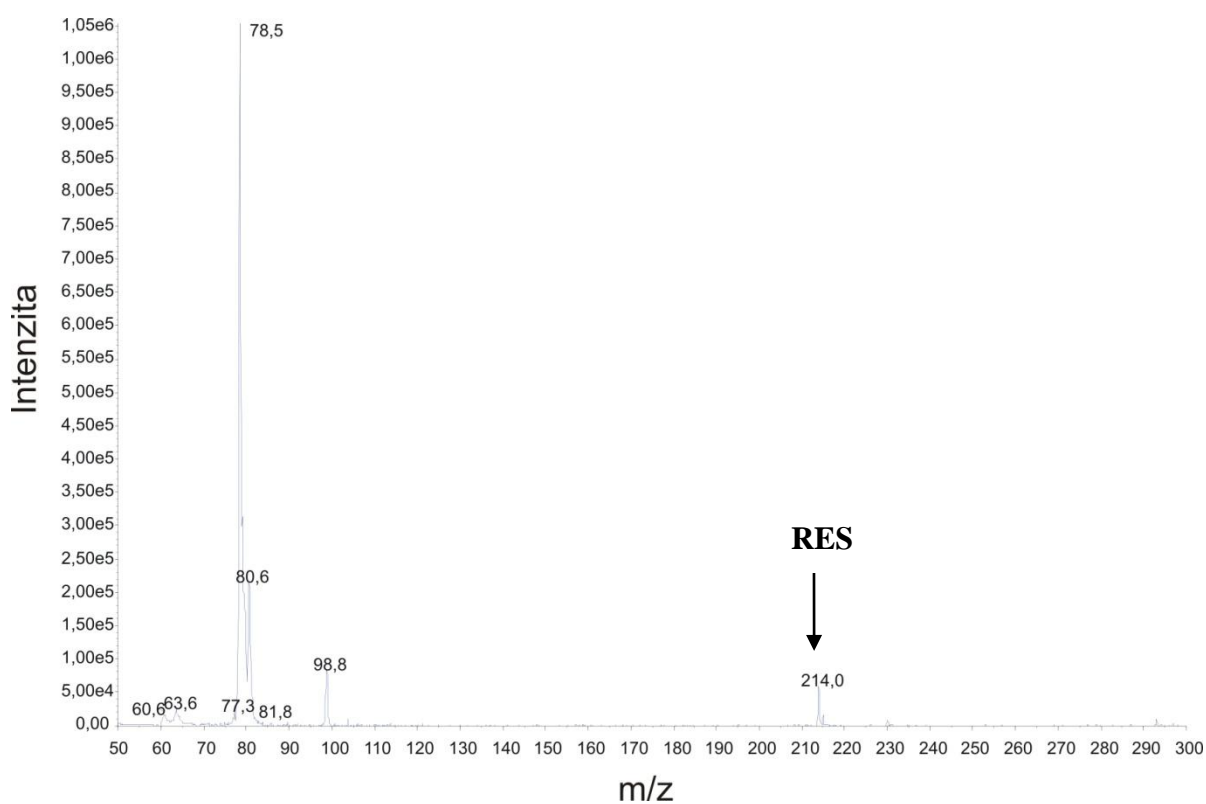
**Graf 11:** Stanovení resorufinu (RES) pomocí HPLC.  
 (Resorufin (RES; 40  $\mu$ M). Čas měření 0-5 min. při  $\lambda = 535$  nm. MF: 60% ACN + 40 %  
 DV; SF: silikagel s C18 a porézními částicemi.)



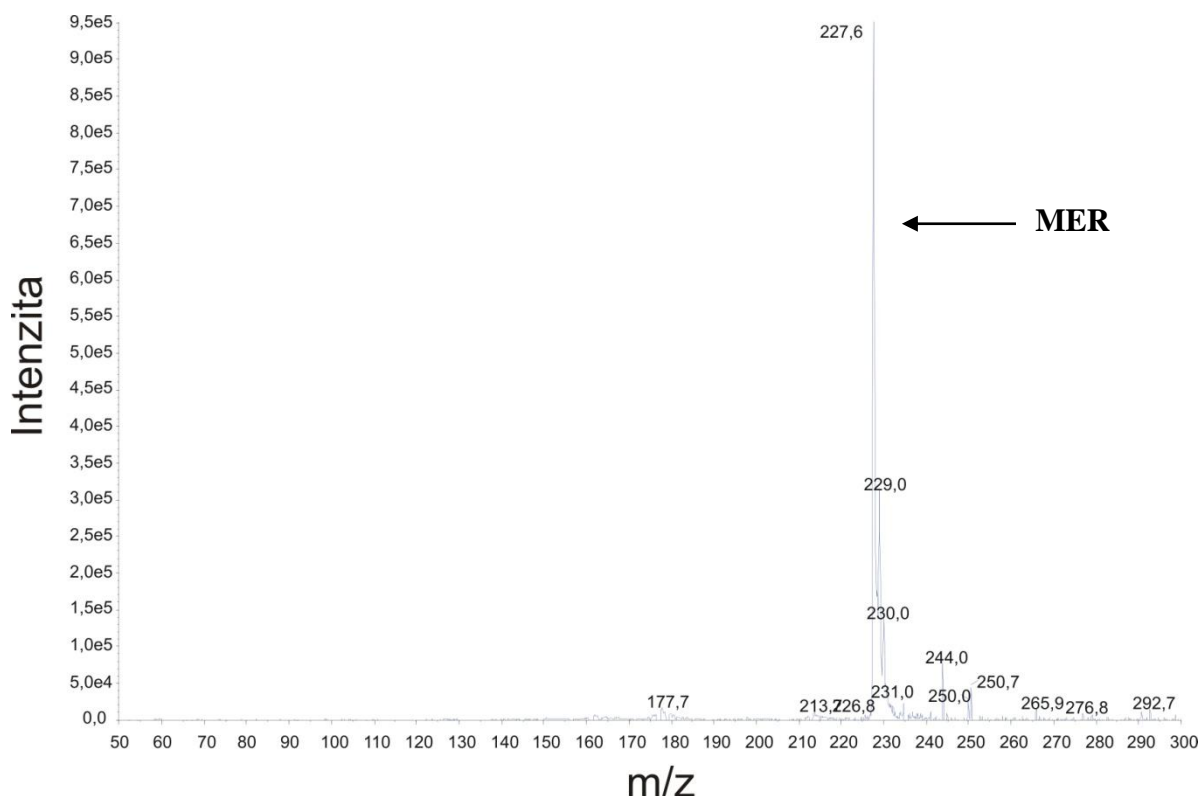
**Graf 12:** Stanovení 7-methoxyresorufinu (MER) pomocí HPLC.  
 (7-methoxyresorufin (MER; 40  $\mu$ M). Čas měření 0-5 min. při  $\lambda = 480$  nm. MF: 60% ACN  
 + 40 % DV; SF: silikagel s C18 a porézními částicemi.)

#### 4.2.2 Detekce resorufinu a 7-methoxyresorufinu pomocí hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrii jsme využili k potvrzení struktur námi měřených standardů. Udávaná molekulová hmotnost resorufinu sodného je 235,15 a molekulová hmotnost 7-methoxyresorufinu je 227,22. Tato molekulová hmotnost byla nalezena v MS spektru MER (graf 14), ale u RES (graf 13) jsme nebyli schopni ji detekovat. Toto může ukazovat na velkou nestabilitu molekuly resorufinu sodného, kdy dojde k odštěpení sodného kationu a vznikne samotná molekula resorufinu. Molekulová hmotnost resorufinu je 214, kterou vidíme na MS spektru. Intenzivní pík na grafu 13 s  $m/z$  78,5 odpovídá fragmentované molekule resorufinu, kdy dojde k odštěpení obou postranních aromatických jader.



**Graf 13:** MS spektrum standardu resorufinu (RES).  
(RES (8  $\mu$ M); Mr = 235,17; MF: 60% ACN + 40 % DV; SF: silikagel s C18 a porézními částicemi.)



**Graf 14:** MS spektrum standardu 7-methoxyresorufinu (MER).

(MER (8 $\mu$ M); Mr = 227,22; MF: 60% ACN + 40 % DV; SF: silikagel s C18 a porézniimi částicemi.)

### 4.3 Porovnání spektrofluorimetrické metody s metodou HPLC/UV-VIS pro stanovení aktivity CYP 1A2 u buněk

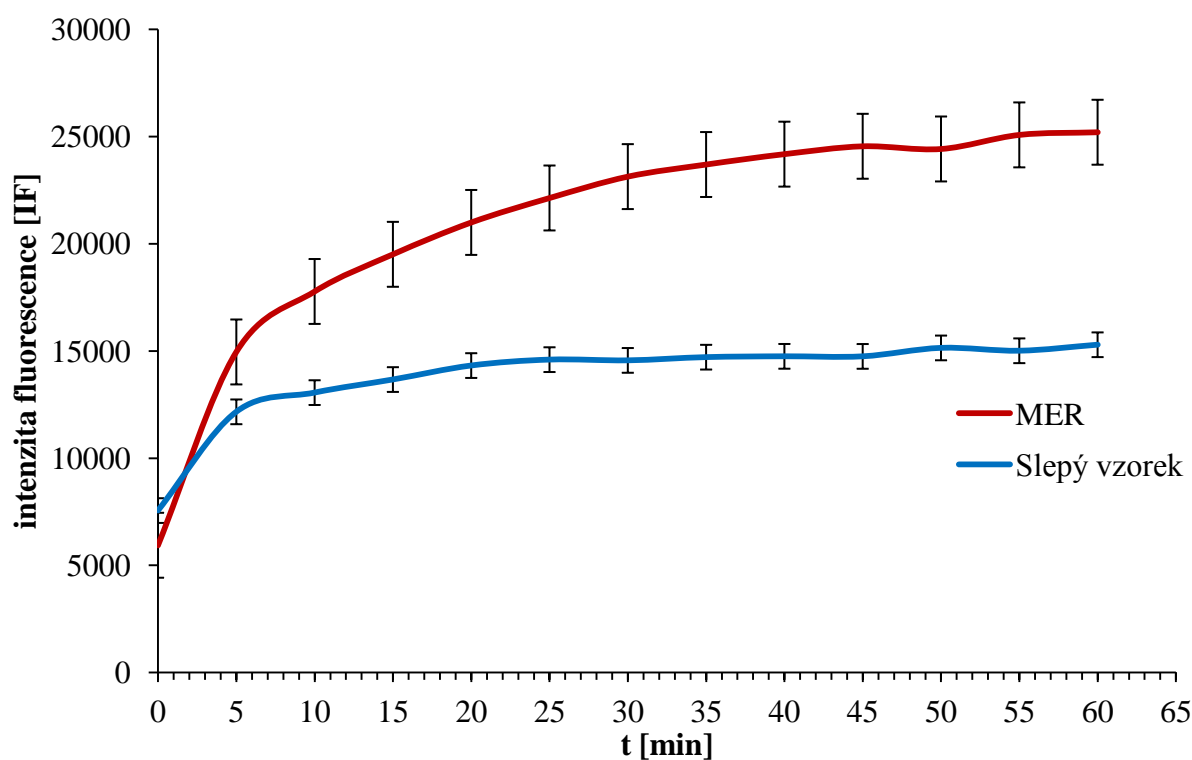
Pomocí spektrofluorimetrické metody jsme optimalizovali stanovení aktivity CYP 1A2 u buněčných linií HepG2, A549 a HK-2. Viděli jsme zřetelný nárůst hodnot fluorescenčního signálu odpovídající aktivitě CYP 1A2 u buněčné linie HepG2 a mírný nárůst signálu u buněčné linie A549. U obou těchto linií jsme dokázali odlišit signál vzorku od signálu pozadí. U buněčné linie HK-2 jsme tento rozdíl nedokázali zaznamenat.

Metodou HPLC se spektrofotometrickým detektorem jsme stanovovali aktivitu CYP 1A2 u zvolených buněčných linií pomocí detekce koncentrace vzniklého RES. Ale u žádného ze vzorků buněčné linie jsme nebyli schopni jeho koncentraci pomocí HPLC detekovat. Hodnoty se tedy nejspíše pohybovaly pod mezí detekce, a proto nemohla být HPLC metoda porovnána s metodou spektrofluorimetrickou.

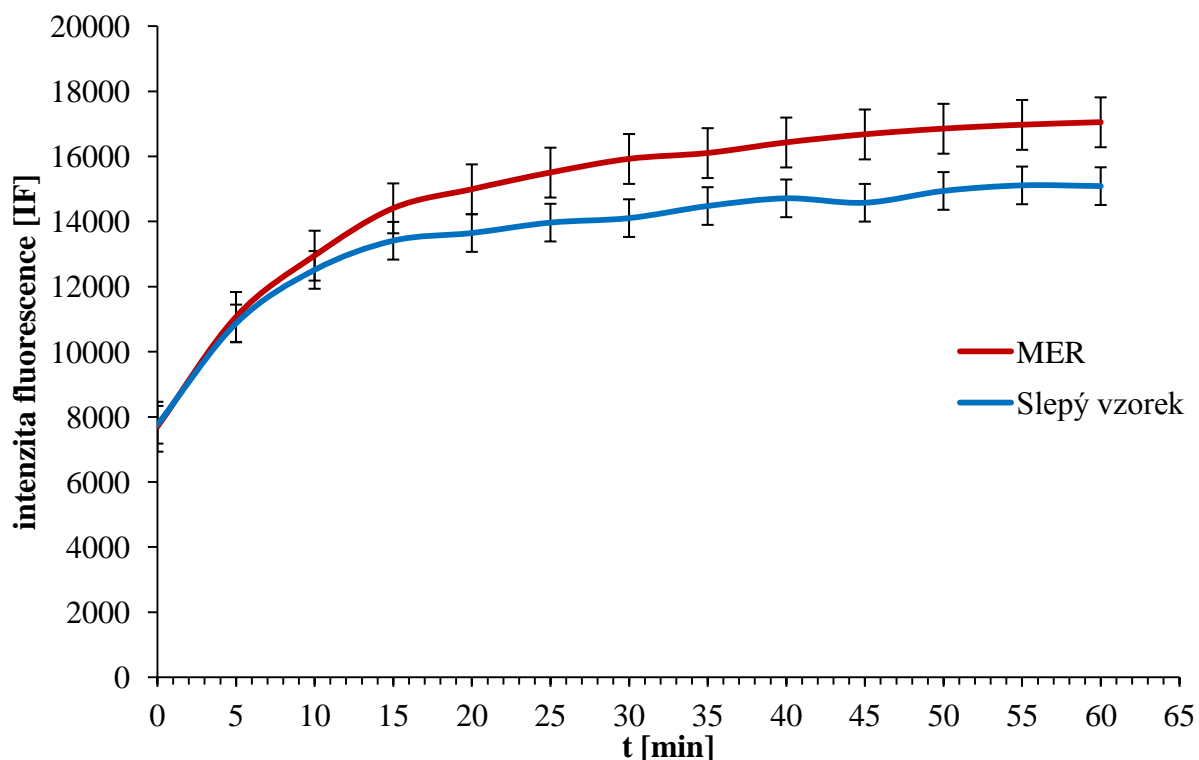
#### 4.4 Využití spektrofluorimetrické metody pro stanovení aktivity CYP 1A2 u buněčných linií

Optimalizovanou a zavedenou spektrofluorimetrickou metodu jsme aplikovali na stanovení aktivity CYP 1A2 ve třech typech buněk – a to v HepG2, A549 a HK-2.

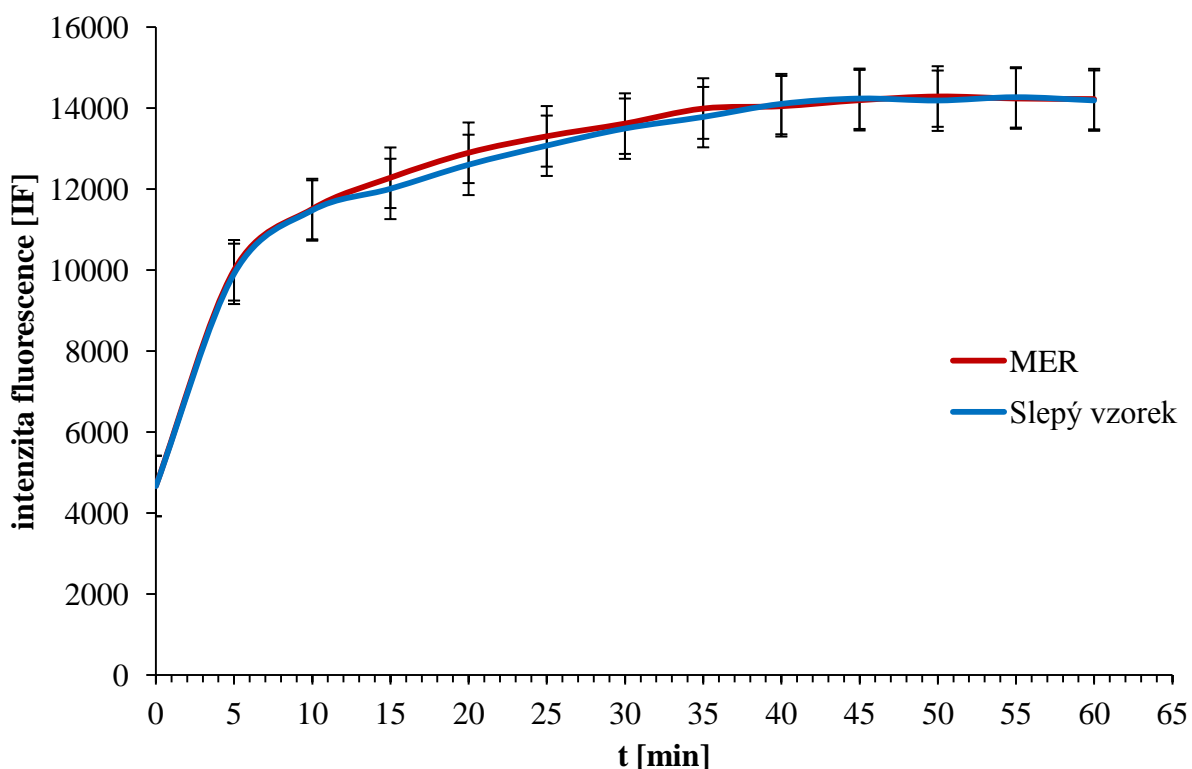
Nejvyšší aktivitu CYP 1A2 jsme zaznamenali u buněčné linie HepG2 (graf 15). Z grafu lze jasně odlišit fluorescenční signál odpovídající aktivitě CYP 1A2 u buněk oproti signálu slepého vzorku. Nižší aktivitu CYP 1A2 vykazuje buněčná linie A549 (graf 16), kdy u této buněčné linie dokážeme stále odlišit signál buněk od signálu slepého vzorku. Nejnižší signál, respektive, nulová aktivita CYP 1A2 byla zaznamenána u buněčné linie HK-2 (graf 17). U této linie jsme již nedokázali odlišit signál buněk od signálu slepého vzorku.



**Graf 15:** Stanovení aktivity CYP 1A2 pomocí substrátu MER v buňkách linie HepG2. (HepG2 buňky; 7-methoxyresorufin (MER; 40  $\mu$ M). Čas měření 0-60 min. při  $\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{EM}} = 535/582$  nm.)



**Graf 16:** Stanovení aktivity CYP 1A2 pomocí substrátu MER v buňkách linie A549. (A549 buňky; 7-methoxyresorufin (MER; 40  $\mu$ M). Čas měření 0-60 min. při  $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 535/582$  nm, průměr  $\pm$  SD, n = 3; původní data příloha 2 - 2.1 a 2.2.)



**Graf 17:** Stanovení aktivity CYP 1A2 pomocí substrátu MER v buňkách linie HK-2. (HK-2 buňky; 7-methoxyresorufin (MER; 40  $\mu$ M). Čas měření 0-60 min. při  $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 535/582$  nm, průměr  $\pm$  SD, n = 3; původní data příloha 2 - 2.3 a 2.4.)

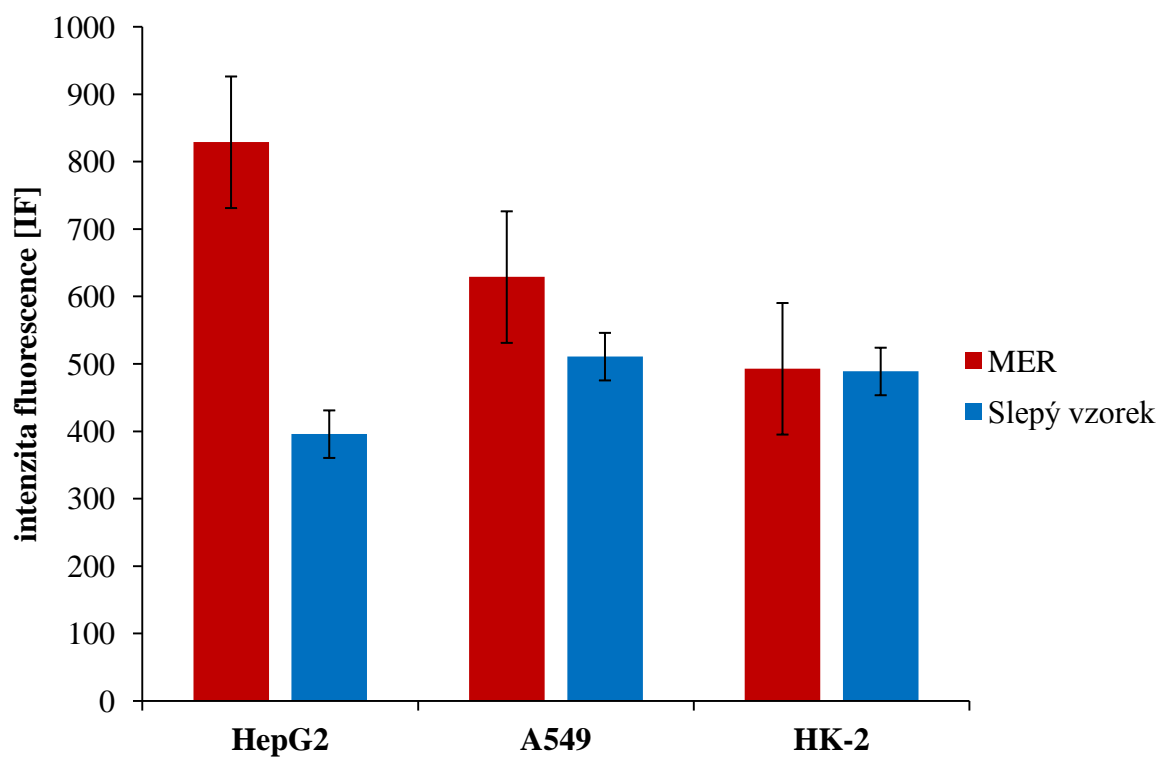


Změnu intenzity fluorescence jsme porovnávali při první 10 minutách měření. V tabulce 9 můžeme vidět potvrzení zjištění z předchozích měření u grafů 15, 16 a 17, kde se změna intenzity fluorescence u buněk HepG2 značně liší od změny intenzity fluorescence slepého vzorku, což nám ukazuje na vysokou aktivitu CYP 1A2. U buněk A549 je změna intenzity fluorescence, tedy aktivita CYP 1A2, nižší než u buněčné linie HepG2 a u buněčné linie HK-2 jsme potvrdili aktivitu nejnižší, respektive nulovou.

**Tabulka 9:** Porovnání změny intenzity fluorescence u jednotlivých buněčných linií

Typ linie	$\Delta$ IF/min u buněk [IF]	$\Delta$ IF/min u slepých vzorků [IF]
HepG2	3473	2462
A549	3071 $\pm$ 261,2	2444 $\pm$ 964,6
HK-2	2145 $\pm$ 196,5	2359 $\pm$ 253,8

Graf 18 znázorňuje průměry jednotlivých změn intenzit fluorescence odpovídajících aktivitě CYP 1A2 do patnácté minuty měření. Na grafu vidíme klesající aktivitu CYP 1A2 u jednotlivých buněčných linií. Dále můžeme srovnat změny intenzit fluorescence buněk se změnou intenzit fluorescence slepých vzorků, kde zaznamenáváme výrazný odstup u buněk HepG2, vs. menší rozdíl signálu u buněk A549 a nulový rozdíl u buněk HK-2.



**Graf 18:** Průměrná změna intenzit fluorescence u jednotlivých buněčných linií. (7-methoxyresorufin (MER; 40 μM), průměr z času měření prvních 15 minut, průměr ± SD, n = 1-3; původní data příloha 3 - 3.1 - 3.6.)

## 5 DISKUZE

7-methoxyresorufin je jeden ze substrátů, který se používá k charakterizaci biotransformační aktivity CYP 1A2. Po proběhnutí O-demethylace 7-methoxyresorufinu za katalýzy CYP 1A2 vzniká fluorescenční produkt resorufin, který můžeme detekovat. Metod detekce je několik, nejčastěji se využívá metoda spektrofluorimetrická a metoda HPLC s fluorescenční detekcí. Nejedná se ale o specifickou reakci cytochromu 1A2, protože jednotlivé izoenzymy mohou přeměňovat stejné substráty. I přes odlišnost izoenzymů CYP 1A2 a CYP 1A1 se specifita jejich substrátů může překrývat kvůli podobnostem mezi aktivními místy těchto cytochromů (Chang, Waxman, 2006; Zamaratskaia, Zlabek, 2009).

Cílem mé diplomové práce bylo optimalizovat jednotlivé kroky přípravy pro stanovení intracelulární aktivity izoenzymu CYP 1A2 pomocí spektrálních metod a HPLC. Při práci jsme vycházeli ze standardních postupů, při kterých jsme nejprve optimalizovali přípravu biologického materiálu, poté koncentraci substrátu a následně dobu inkubace a detekce, po kterou jsme množství vzniklého produktu měřili (Lake et al., 2009).

K optimalizaci našeho postupu jsme měli k dispozici jako biologický materiál buněčné linie HepG2, A549 a HK-2, u kterých jsme zjišťovali aktivitu CYP 1A2 přímo v buňkách. Většina autorů stanovuje aktivitu CYP 1A2 v mikrozomech a to především v jaterních mikrozomech (Zamaratskaia, Zlabek, 2009). Jaterní mikrozomy mají vysoký obsah cytochromů P450, a proto se CYP aktivita v nich detekuje snáze.

Pomocí námi zvoleného substrátu 7-methoxyresorufinu, lze stanovit aktivitu CYP 1A2 nejen v buňkách, což bylo i cílem mé práce, ale také v již zmíněných mikrozomech (Zamaratskaia, Zlabek, 2009). V mikrozomech lze dále stanovit aktivitu CYP 1A2 i pomocí substrátu 7-ethoxyresorufinu. Produktem těchto reakcí je resorufin, který můžeme fluorescenčně detekovat (Turpeinen et al., 2006; Wanwimolruk, Wanwimolruk, 2006). Resorufin ale není jediným fluorescenčním produktem, pomocí kterého lze stanovit aktivitu CYP 1A2. Kyano-hydroxykumarin, který vzniká ze substrátu 3-kyano-7-ethoxykumarinu, zařazujeme také do produktů, pomocí kterých můžeme fluorescenčně aktivitu CYP 1A2 stanovit (Donato et al., 2004). Dalším substrátem, který lze použít ke stanovení aktivity CYP 1A2 v mikrozomech jater, je fenacetin, kde pomocí O-deethylace vzniká známý produkt acetaminofen (paracetamol). Tento produkt lze pak detekovat pomocí HPLC s UV detektorem (Polasek et al., 2006).

V naší práci jsme nejprve začali optimalizací vhodné koncentrace substrátu 7-methoxyresorufinu. Počáteční koncentraci 7-methoxyresorufinu jsme zvolili 8  $\mu\text{M}$  v souladu s pracemi ostatních autorů (Lake et al., 2009; Donato et al., 1993). Kvůli výsledkům s nedostatečnou senzitivitou jsme však také testovali koncentrace v rozsahu 1-50  $\mu\text{M}$  MER, což bylo v souladu s prací dalších autorů (Zamaratskaia, Zlabek, 2009). Aktivitu CYP 1A2 u buněčných linií jsme poté v rámci těchto pokusů stanovovali při vybraných koncentracích 4, 20 a 40  $\mu\text{M}$  MER. Z výsledků vyplynulo, že jako optimální se jevila koncentrace 40  $\mu\text{M}$  MER. Docházelo zde k nejvyššímu a nejrychlejšímu nárůstu fluorescenčního signálu odpovídající aktivitě CYP 1A2. Proto jsme tuto koncentraci používali při všech dalších měřeních.

S optimalizovanou koncentrací jsme testovali také optimální dobu fluorimetrického měření, kdy jsme zjistili, že po 60 min měření již nedochází ke změně fluorescenčního signálu u buněk. Proto jsme i tuto dobu měření stanovili jako maximální a optimální.

Dále jsme testovali optimální metody detekce. Možností detekce vzniklého produktu resorufinu je několik - spektrální či HPLC s mnoha typy detekcí (Chang, Waxman, 2006; Murray et al., 1993). My jsme si zvolili metody - spektrofotometrickou, spektrofluorimetickou a HPLC s UV detekcí.

Z důvodu možnosti spektrofotometrického stanovení jiných substrátů typických ke stanovení aktivity CYP 1A2 jsme využili měření změny absorbance i u našeho substrátu 7-methoxyresorufinu. Dalším takovým substrátem je např. acetanilid, kde po proběhnutí reakce 4-hydroxylace dojde ke vzniku produktu 4-hydroxyacetanilidu, který lze přímo detekovat pomocí HPLC s UV detekcí nebo pomocí derivatizace 4-aminofenolu dojde ke vzniku modrého komplexu, který lze spektrofotometricky stanovit (Shertzer et al., 2008). Po detekci produktu resorufinu vzniklého ze substrátu 7-methoxyresorufinu u našich buněčných linií jsme ale zjistili, že je tato metoda z důvodu nízké sensitivity nevhodná. Nedocházelo zde k žádné detekovatelné změně absorbance a ani jsme nebyli schopni odlišit absorpční signál buněk od signálu slepého vzorku.

Druhou metodou, kterou jsme stanovovali aktivitu CYP 1A2 v buňkách byla metoda spektrofluorimetrická (Chang, Waxman, 2006; Lake et al, 2009). Tato metoda se ukázala být velmi vhodná pro měření aktivity CYP 1A2. Viděli jsme zřetelný nárůst hodnot fluorescenčního signálu odpovídající aktivitě CYP 1A2 u buněčné linie HepG2 a mírný nárůst signálu u buněčné linie A549. U obou těchto linií jsme dokázali odlišit signál vzorku od signálu pozadí. U buněčné linie HK-2 jsme tento rozdíl nedokázali zaznamenat.

Další metodu, kterou jsme použili k detekci vzniklého množství produktu resorufinu a tím tedy i ke zjištění aktivity CYP 1A2, je metoda HPLC, kde jsme měli k dispozici UV/VIS detektor. Nejprve jsme se věnovali problému separace standardů resorufinu a 7-methoxyresorufinu od sebe. Zvolili jsme mobilní fázi směs acetonitrilu s fosfátovým pufrům v souladu s odbornou prací (Zamaratskaia, Zlabek, 2009). Zjistili jsme ale, že dochází k negativní fragmentaci obou molekul v přítomnosti fosfátového pufru, a proto jsme ho nahradili deionizovanou vodou. Po stabilizaci chování obou standardů v mobilní fázi bylo naším cílem odlišení těchto standardů, které se nám podařilo v mobilní fázi složené ze směsi acetonitrilu s deionizovanou vodou (60:40; v/v). Toto prostředí jsme využili ke stanovení aktivity CYP 1A2 u buněčných linií pomocí detekce vzniklého produktu resorufinu. U žádného ze vzorků buněčné linie jsme ale nebyli schopni jeho koncentraci pomocí HPLC/UV/VIS detekovat. Hodnoty se tedy nejspíše pohybovaly pod mezí detekce. Ke zjištění aktivity CYP 1A2 by pravděpodobně bylo výhodnější použít citlivější fluorescenční detektor (Lake et al., 2009; Burke et al., 1994).

Zavedenou spektrofluorimetrickou metodu stanovení aktivity CYP 1A2 jsme využili pro potvrzení výskytu CYP 1A2 u testovaných buněčných linií. Měli jsme k dispozici buněčnou linii pocházející z lidských buněk hepatocytárního karcinomu HepG2, linii lidských epitelálních ledvinných buněk proximálního tubulu HK-2 a buněčnou linii lidského plicního adenokarcinomu A549. Izoenzymy patřící do podrodiny CYP 1A se od sebe odlišují z hlediska výskytu v jednotlivých orgánech. CYP 1A2 se vyskytuje zejména v játrech (Stiborová a kol., 1999). Izoenzym CYP 1A1 se vyskytuje ve velmi malé koncentraci v játrech, ale naopak ve vysoké koncentraci v plicích (Wei, Caccavale et al., 2001).

Vzhledem k buněčným liniím, které jsme měli k dispozici, jsme v souladu s prací ostatních autorů zjistili, že CYP 1A2 aktivita se u buněčné linie HepG2 vyskytuje v nejvyšší míře (Choi et al., 2014). K našemu překvapení jsme z literatury zjistili, že u buněčné linie A549 se údajně CYP 1A2 nevyskytuje, ale byl zaznamenán výskyt izoenzymu CYP 1A1 (Hukkanen et al., 2000). Vysvětlení pro tento rozpor našich a publikovaných údajů je možnost, že vlivem překrytí specifit substrátů, o kterém se zmiňují autoři (Zamaratskaia, Zlabek, 2009), mohlo u buněčné linie A549 dojít k částečné detekci aktivity CYP 1A1 namísto 1A2. Poslední testovanou buněčnou linií byly buňky HK-2, u nichž v našich experimentech ale aktivita CYP 1A2 nebyla zaznamenána. V literatuře ale výskyt CYP 1A2 potvrzen byl (Arbillaga et al., 2007), proto možným vysvětlením tohoto rozporu může být rozdílný fenotyp kultivovaných buněk, nebo opět překryv substrátové specifity měřené u ostatních autorů (Arbillaga et al., 2007).

## 6 ZÁVĚR

V mé práci jsme optimalizovali jednotlivé kroky postupu přípravy vzorků pro stanovení aktivity CYP 1A2. V rámci optimalizace jsme jako nejvhodnější metodu stanovení aktivity CYP 1A2 zvolili spektrofotometrickou metodu při době trvání analýzy 1 hodinu. Jako nejvhodnější u činidla 7-methoxyresorufinu jsme určili koncentraci 40  $\mu\text{M}$ .

Zavedené a námi optimalizované postupy u jednotlivých metod jsme využili pro průkaz aktivity a vůbec samotné přítomnosti cytochromů CYP 1A2 v biologickém materiálu. Ve vzorcích buněčné linie HepG2 a A549 jsme prokázali přítomnost CYP 1A2. Ve vzorcích buněčné linie HK-2 jsme aktivitu CYP 1A2 nezaznamenali.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58, s. 737-747.
- [2] Arbillaga, L., Azqueta, A., Ezpeleta, O., López de Cerain, A. Oxidative DNA damage induced by Ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity. *Mutagenesis*, 2007, 22, s. 35-42.
- [3] Baati, T., Horcajada, P., Gref, R., Couvreur, P., Serre, Ch. In vitro determination of the CYP 3A4 activity in rat hepatic microsomes by liquid-phase extraction and HPLC-photodiode array detection. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2012, 66, s. 29-34.
- [4] Blevins, M. A. Human Cytochrome P450 2E1: Functional Comparison to Cytochromes P450 2A13 and 2A6. Kansas: University of Kansas, 2008. s. 121. UMI Number: 1450505.
- [5] Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, s. 248-254.
- [6] Burke, M. D., Thompson, S., Weaver, R. J., Wolf, C. R., Mayer, R. T. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 1994, 48, s. 923-936.
- [7] Caro, A. A., Cederbaum, A. I. Role of intercellular calcium and phospholipase A2 in arachidonic acid-induced toxicity in liver cells overexpressing CYP2E1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 457, s. 252-263.
- [8] Choi, J. M., Oh, A. J., Lee, S. Y., Im, J. H., Oh, J. M., Ryu, Ch. S., Kwak, H. Ch., Lee, J. Y., Kang, K. W., Kim, S. K. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Archives of Pharmacological Research*, 2014, 38, s. 691-704.
- [9] Donato, M. T., Gómez-Lechón, M. J., Castell, J. V. A Microassay for Measuring Cytochrome P450IA1 and P450IIB1 Activities in Intact Human and Rat Hepatocytes Cultured on 96-Well Plates. *Analytical Biochemistry*, 1993, 213, s. 29-33.
- [10] Donato, M. T., Jiménez, N., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J. Fluorescence-based assay for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metabolism and Disposition*, 2004, 32, s. 699-706.
- [11] Dostálek, M a kol. *Farmakokinetika*. Praha: Grada, 2006. 220 s. ISBN 80-247-1464-7.

- [12] Ernstgård, L., Warholm, M., Johanson, G. Robustness of chlorzoxazone as an in vivo measured of cytochrome P450 2E1 activity. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2004, 58, s. 190-200.
- [13] Fisher, M. B., Campanale, K., Ackermann, B. L., Vandenbranden, M., Wrighton, S. A. In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin. *Drug Metabolism and Disposition*, 2000, 28 (5), s. 560-566.
- [14] Ghosal, A., Hapangama, N., Yuan, Y., Lu, X., Horne, D., Patrick, J. E., Zbaida, S. Rapid determination of enzyme activities of recombinant human cytochromes P450, human liver microsomes and hepatocytes. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2003, 24, s. 375-384.
- [15] Groves, J. T. Models and Mechanisms of Cytochrome P450 Action. In Paul R. Ortiz de Montellano, *Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. s. 1-34. ISBN 0—306-48324-6.
- [16] Guengerich, F. P. Cytochrome P450. In Ioannides, C. (Ed.), *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd., 2001, s. 33-65. ISBN 0-470-84630-5.
- [17] Gundert-Remy, U., Bernauer, U., Blomeke, B., Doring, B. et al. Extrahepatic metabolism at the body's internal-external interfaces. *Drug Metabolism Reviews*. 2014, s. 1-34.
- [18] Hänninen, O. O. P. Biotransformation of Xenobiotics and Hormones. In Hänninen, O. O. P., Atalay M. (Ed.), *Physiology and maintenance. Enzymes: The Biological Catalysts of Life Nutrition and Digestion*. Oxford: Eolss Publishers Co. Ltd., 2009. s. 118-139. ISBN 978-1-4826-040-5.
- [19] Hukkanen, J., Lassila, A., Päivärinta, K., Valanne, S., Sampo, S., Hakkola, J., Pelkonen, O., Raunio, H. Induction and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450s in the Human A549 Lung Adenocarcinoma Cell Line. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2000, 22, s. 360-366.
- [20] Chang, T. K. H., Crespi, Ch. L., Waxman, D. J. Spectrophotometric Analysis of Human CYP2E1-Catalyzed p-Nitrophenol Hydroxylation. In I. R. Phillips, E. A. Shephard (Ed.), *Cytochrome P450 Protocols*. New Jersey: Humana Press, 2006. s. 127-131. ISBN: 978-1-59259-998-1.
- [21] Chang, T. K. H., Waxman, D. J. Enzymatic Analysis of cDNA-Expressed Human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 With 7-Ethoxyresorufin as substrate. In I. R. Phillips, E. A. Shephard (Ed.), *Cytochrome P450 Protocols*. New Jersey: Humana Press, 2006. s. 127-131. ISBN: 978-1-59259-998-1.



- [22] Isin, E. M., Guengerich, F. P. Substrate Binding to Cytochromes P450. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 392 (6), s. 1019-1030.
- [23] Jančová, P., Šiller, M. Phase II Drug Metabolism. In J. Paxton (Ed.), *Topics on Drug Metabolism*. InTech, 2012. s. 35-60. ISBN 978-953-51-0099-7.
- [24] Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2006. s. 52-55. ISBN 80-7080-586-2.
- [25] Konečný, J., Glatz, Z. Stanovení aktivity isoformy CYP450 2C9 pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. X. pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova univerzita, 2006. s. 71. ISBN 80-210-3942-6.
- [26] Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické listy*, 2000, 94, s. 913-918.
- [27] Lake, B. G., Price, R. J., Giddings, A. M., Walters, D. G. In Vitro Assays for Introduction of Drug Metabolism. In A. Dhawan, R. D. Hughes (Ed.), *Hepatocyte Transplantation*. Humana Press, 2009. s. 47-58. ISBN 978-1-59745-201-4.
- [28] Louzou, G. D., Cocker, J. The effect of alcohol and diallyl sulfide on CYP 2E1 activity in humans: a phenotyping study using chlorzoxazone. *Human & Experimental Toxicology*, 2001, 20, s. 321-327.
- [29] Luthra, A., Denisov, I. G., Sligar, S. G. Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 501, s. 26-35.
- [30] Mackenzie, P. I., Rogers, A., Treloar, J., Jorgensen, B. R., Miners, J. O., Meech, R. Identification of UDP glycosyltransferase 3A1 as a UDP N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283 (52), s. 36205-36210.
- [31] Martínková, J., Chládek, J., Mičuda, S., Cermanová, J., Grim, J. *Obecná farmakologie jako základ studia farmakologie experimentální a klinické*. 1. vydání. Hradec Králové: Olga Čermáková, 2001. ISBN 80-902883-4-0.
- [32] Mary Sobol, M. S., Dongping Ma, M. S., Cali, J. J. P450-Glo<sup>TM</sup> CYP3A4 Biochemical and Cell-Based Assay. *Cytochrome P450 assays*, 2007, 94, s. 15-18.
- [33] Matouš, B. et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha: Galén, 2010. s. 497-501. ISBN 978-80-7262-702-8.

- [34] Mishin, V. M., Koivisto, T., Lieber, Ch. S. The Determination of Cytochrome P450-Dependent p-Nitrophenol Hydroxylation by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Analytical Biochemistry*, 1996, 233, s. 212-215.
- [35] Murray, B. P., Edwards, R. J., Murray, S., Singleton, A. M., Davies, D. S., Boobis, A. R. Human hepatic CYP1A1 and CYP1A2 content, determined with specific anti-peptide antibodies, correlates with the mutagenic activation of PhIP. *Carcinogenesis*, 1993, 14, s. 585-592.
- [36] Murray, R. K. *Metabolismus xenobiotik*. V Murray, R. K. et al., Harperova biochemie. Jinočany: H&H, 2001. s. 743-748. ISBN 80-85787-38-5.
- [37] Parkinson, A. Biotransformation of xenobiotics. In C. D. Klaassen (Ed.), *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill Professional, 2001. s. 113-185. ISBN 978-0071347211.
- [38] Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakosi, P., Hukkanen, J., Raunio, H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol*, 2008, 82, s. 667-715.
- [39] Polasek, T. M., Elliot, D. J., Miners, J. O. Measurement of Human Cytochrome P4501A2 (CYP1A2) Activity In Vitro. In M. Mahin et al. (Ed.), *Current Protocols in Toxicology*: John Wiley & Sons, 2006. s. 4.19-4.19.9. ISBN 9780471140856.
- [40] Reakční cyklus cytochromu P450 [online]. [cit. 2017-02-08]. Dostupné z: <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node49.html>.
- [41] Shertzer, H. G., Nebert, D. W., Senfl, A. P., Dingeldein, M., Genter, M. B., Dalton, T. P. Spectrophotometric assay for acetanilide 4-hydroxylase, an estimate of CYP1A2 enzyme activity. *Toxicology Methods*, 2001, 11, s. 81-88.
- [42] Skálová, L., Boušová, I. a kol. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2011. 160 s. ISBN 978-80-246-1917-0.
- [43] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy*, 1999, 93, s. 229-237.
- [44] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., Martínek, V., Páca, J. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy*, 2004, 98, s. 876-890.

- [45] Testa, B., Krämer, S. D. The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction: Part 4. Reactions of Conjugation and Their Enzymes. *Chemistry & Biodiversity*, 2008, 5, s. 2171 – 2336.
- [46] Turpeinen, M., Korhonen, L. E., Tolonen, A., Uusitalo, J., Juvonen, R., Raunio, H., Pelkonen, O. Cytochrome P450 (CYP) inhibition screening: Comparison of free tests. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 29, s. 130-138.
- [47] Vitek, L. Bilirubin a interní choroby: význam pro kliniku a praxi. 1. vydání. Praha: Grada, 2009. 136 s. ISBN 978-80-247-2351-8.
- [48] Wanwimolruk, S., Wanwimolruk, P. Characterization of CYP1A enzyme in Adélie penguin liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2006, 144, s. 148-154.
- [49] Watt, K. C., Plopper, Ch. G., Buckpitt, A. R. Measurement of Cytochrome P450 2E1 Activity in Rat Tracheobronchial Airways Using High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Analytical Biochemistry*, 1997, 248, s. 26-30.
- [50] Wei, C., Caccavale, R. J., Kehoe, J. J., Thomas, P. E., Iba, M. M. CYP1A2 is expressed along with CYP1A1 in the human lung. *Cancer Letters*, 2001, 171, s. 113-120.
- [51] Wei, C., Caccavale, R. J., Weyand, E. H., Chen, S., Iba, M. M. Induction of CYP1A1 and CYP1A2 expressions by prototypic and atypical inducers in the human lung. *Cancer Letters*, 2002, 178, s. 25-36.
- [52] Zamaratskaia, G., Zlabek, V. EROD and MROD as Markers of Cytochrome P450 1A Activities in Hepatic Microsomes from Entire and Castrated Male Pigs. *Sensors*, 2009, 9, s. 2134-2147.
- [53] Zanger, U. M., Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 2013, 138, s. 103-141.
- [54] Zeldin, D. C., Seubert, J. M. Structure, Mechanism, and Regulation of Cytochromes P450. In R. C. Smart, E. Hodgson (Ed.), *Molecular and Biochemical Toxicology*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008. 948 s. ISBN 978-0-470-10211-4.
- [55] Zhou, S. F. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Current Drug Metabolism*, 2008, 9, s. 310-322.

## 8 PŘÍLOHY

**Příloha 1: Hodnoty absorbance resorufinu získané testováním na HepG2 buňkách pomocí spektrálních metod.**

Čas měření absorbance od podání 7-methoxyresorufinu [min]	Absorbance resorufinu		Průměrná absorbance resorufinu ± SD
0	0,1143	0,1177	0,1160 ± 0,002
5	0,1126	0,1185	0,1155 ± 0,004
10	0,1129	0,1212	0,1170 ± 0,006
15	0,1128	0,1207	0,1167 ± 0,006
20	0,1109	0,1209	0,1159 ± 0,007
25	0,1111	0,1183	0,1146 ± 0,005
30	0,1129	0,1202	0,1165 ± 0,005
35	0,1114	0,1196	0,1154 ± 0,006
40	0,1133	0,1203	0,1168 ± 0,005
45	0,1141	0,1219	0,1178 ± 0,006
50	0,1171	0,1215	0,1193 ± 0,003
55	0,1198	0,1233	0,1215 ± 0,002
60	0,1179	0,1260	0,1220 ± 0,006

**Příloha 2: Hodnoty intenzit fluorescence resorufinu získané testováním na buněčných liniích pomocí spektrofluorimetrické metody.**

**Příloha 2.1: Hodnoty intenzit fluorescence resorufinu získané testováním na buňkách A549 pomocí spektrofluorimetrické metody.**

Čas měření intenzity fluorescence od podání 7-methoxyresorufinu u buněk A549 [min]	Intenzita fluorescence resorufinu u buněk A549 [IF]			Průměrná intenzita fluorescence resorufinu ± SD u buněk A549 [IF]
0	7609	7627	7871	7702 ± 146,3
5	10496	11511	11214	11074 ± 521,8
10	12822	13162	12885	12956 ± 180,9
15	14218	14569	14443	14410 ± 177,8
20	14893	15249	14842	14995 ± 221,7
25	15252	15871	15399	15507 ± 323,4
30	15607	16264	15909	15927 ± 328,9
35	15869	16513	15938	16107 ± 353,6
40	16085	16510	16703	16433 ± 316,2
45	16504	16837	16699	16680 ± 167,3
50	16676	17060	16828	16855 ± 193,4
55	16772	17185	16964	16974 ± 206,7
60	17098	17182	16878	17053 ± 157,0

**Příloha 2.2: Hodnoty intenzit fluorescence resorufinu získané testováním slepých vzorků u buněčné linie A549 pomocí spektrofluorimetrické metody.**

Čas měření intenzity fluorescence od podání 7-methoxyresorufinu u slepých vzorků A549 [min]	Intenzita fluorescence resorufinu u slepých vzorků A549 [IF]			Průměrná intenzita fluorescence resorufinu ± SD u slepých vzorků A549 [IF]
0	8135	7528	7625	7763 ± 326,1
5	11035	10166	11421	10874 ± 642,8
10	12665	11944	12947	12519 ± 517,3
15	13383	12894	13968	13415 ± 537,7
20	13326	13309	14321	13652 ± 579,4
25	13767	13659	14489	13972 ± 451,3
30	13862	13941	14525	14109 ± 362,1
35	14347	14194	14902	14481 ± 372,5
40	14461	14387	15303	14717 ± 508,8
45	14225	14202	15318	14582 ± 637,8
50	14622	14674	15538	14945 ± 514,5
55	14953	14649	15742	15115 ± 564,1
60	14977	14654	15647	15093 ± 506,5

**Příloha 2.3: Hodnoty intenzit fluorescence resorufinu získané testováním na buňkách HK-2 pomocí spektrofluorimetrické metody.**

Čas měření intenzity fluorescence od podání 7-methoxyresorufinu u buněk HK-2 [min]	Intenzita fluorescence resorufinu u buněk HK-2 [IF]			Průměrná intenzita fluorescence resorufinu ± SD u buněk HK-2 [IF]
0	4683	4620	4721	4675 ± 51,0
5	10089	9764	10143	9999 ± 205,0
10	11729	11321	11483	11511 ± 205,4
15	12626	12141	12084	12284 ± 297,8
20	13376	12775	12549	12900 ± 427,4
25	13673	13095	13150	13306 ± 319,0
30	14090	13349	13421	13620 ± 408,6
35	14440	13659	13877	13992 ± 403,0
40	14405	13864	13878	14049 ± 308,4
45	14650	13891	14054	14198 ± 399,6
50	14633	14128	14107	14289 ± 297,8
55	14465	14048	14206	14240 ± 210,5
60	14614	14111	13954	14226 ± 344,8

**Příloha 2.4: Hodnoty intenzit fluorescence resorufinu získané testováním na slepých vzorků u buněčné linie HK-2 pomocí spektrofluorimetrické metody.**

Čas měření intenzity fluorescence od podání 7-methoxyresorufinu u slepých vzorků HK-2 [min]	Intenzita fluorescence resorufinu u slepých vzorků HK-2 [IF]			Průměrná intenzita fluorescence resorufinu ± SD u slepých vzorků HK-2 [IF]
0	4696	4873	4437	4669 ± 219,3
5	10230	10044	9456	9910 ± 404,0
10	11619	11432	10624	11225 ± 528,8
15	12185	12149	11688	12007 ± 277,1
20	12744	12817	12242	12601 ± 313,0
25	13305	13080	12834	13073 ± 235,6
30	13543	13704	13238	13495 ± 236,7
35	13695	14191	13454	13780 ± 375,8
40	14053	14368	13886	14102 ± 244,8
45	14177	14517	14008	14234 ± 259,2
50	14113	14389	14054	14185 ± 178,8
55	14106	14335	14361	14267 ± 140,3
60	14106	14268	14189	14188 ± 81,0

**Příloha 3 : Hodnoty změn intenzit fluorescence u jednotlivých buněčných linií.**

**Příloha 3.1 : Hodnoty intenzit fluorescence resorufinu u vzorků buněčných linií HepG2 a A549.**

Čas od podání 7-methoxyresorufinu u buněk [min]	Intenzita fluorescence HepG2 [IF]	Intenzita fluorescence A549 [IF]			Průměrná intenzita fluorescence A549 [IF]
0	7892	4254	4610	5030	4631 ± 317,2
1	11365	7609	7627	7871	7702 ± 119,5
2	13275	9027	9441	9307	9258 ± 172,5
3	14332	9788	10698	10653	10380 ± 418,8
4	15299	10496	11511	11214	11074 ± 426,1
5	15861	11238	11846	11750	11611 ± 266,9
6	16707	11534	12424	12035	11998 ± 364,3
7	16871	12018	12807	12426	12417 ± 322,2
8	18026	12047	13105	12919	12690 ± 461,2
9	17775	12822	13162	12885	12956 ± 147,7
10	18902	13227	13545	13260	13344 ± 142,8
11	19086	13293	13856	13665	13604 ± 233,8
12	19106	13413	14092	13915	13806 ± 287,6
13	19535	13919	14411	14094	14141 ± 203,6
14	19969	14218	14569	14443	14410 ± 145,2
15	20779	14368	14764	14335	14489 ± 194,9

**Příloha 3.2 : Hodnoty intenzit fluorescence resorufinu u vzorků buněčné linie HK-2.**

Čas od podání 7-methoxyresorufinu u buněk [min]	Intenzita fluorescence HK-2 [IF]			Průměrná intenzita fluorescence HK-2 [IF]
0	4683	4620	4721	4675 ± 51,0
1	6677	6693	7088	6820 ± 232,8
2	7972	7756	8479	8069 ± 371,1
3	8936	8506	8984	8809 ± 263,2
4	9414	9361	9471	9416 ± 55,5
5	10089	9764	10143	9999 ± 205,0
6	10243	10163	10376	10261 ± 107,6
7	10793	10382	10718	10631 ± 218,9
8	11018	10754	11005	10926 ± 148,8
9	11472	11015	11127	11205 ± 238,2
10	11729	11321	11483	11511 ± 205,4
11	11840	11590	11750	11727 ± 126,6
12	12043	11801	11677	11840 ± 186,1
13	12401	11953	11928	12094 ± 266,2
14	12356	11975	11934	12088 ± 232,7
15	12626	12141	12084	12284 ± 297,8

**Příloha 3.3 : Hodnoty intenzit fluorescence resorufinu u slepých vzorků buněčných linií HepG2 a A549.**

Čas od podání 7-methoxyresorufinu u slepých vzorků [min]	Intenzita fluorescence HepG2 [IF]	Intenzita fluorescence A549 [IF]			Průměrná intenzita fluorescence A549 [IF]
0	7553	6418	5452	4087	5319 ± 956,3
1	10015	8135	7528	7625	7763 ± 266,2
2	11251	9673	8648	9395	9239 ± 432,8
3	11329	10447	9743	10754	10315 ± 423,2
4	11793	11035	10166	11421	10874 ± 524,8
5	12158	11301	10750	12072	11374 ± 542,2
6	12590	11726	11369	12400	11832 ± 427,5
7	12880	12092	11576	12611	12093 ± 422,5
8	12725	12147	11510	12763	12140 ± 511,6
9	13272	12665	11944	12947	12518 ± 422,3
10	13054	12672	12177	13451	12767 ± 524,4
11	13416	12634	12356	13400	12797 ± 441,5
12	13513	12796	12457	13632	12962 ± 493,8
13	13536	13066	12795	13620	13160 ± 343,3
14	13559	13383	12894	13968	13415 ± 439,0
15	13664	13093	13137	13909	13380 ± 347,7

**Příloha 3.4 : Hodnoty intenzit fluorescence resorufinu u slepých vzorků buněčné linie HK-2.**

Čas od podání 7-methoxyresorufinu u slepých vzorků [min]	Intenzita fluorescence HK-2 [IF]			Průměrná intenzita fluorescence HK-2 [IF]
0	4696	4873	4437	4668 ± 219,3
1	7345	7109	6627	7027 ± 366,0
2	8521	8335	8078	8311 ± 222,4
3	9320	9041	8819	9060 ± 251,0
4	9582	9518	8961	9354 ± 341,6
5	10230	10044	9456	9910 ± 404,0
6	10622	10283	9663	10189 ± 486,3
7	10823	10516	10128	10489 ± 348,3
8	11077	10822	10326	10742 ± 381,9
9	11373	11139	10609	11040 ± 391,4
10	11619	11432	10624	11225 ± 528,8
11	11481	11679	11130	11430 ± 278,0
12	11753	11703	11350	11602 ± 219,7
13	12068	12017	11201	11762 ± 486,5
14	12053	11954	11395	11801 ± 354,8
15	12185	12149	11688	12008 ± 277,1



**Příloha 3.5 : Hodnoty změn intenzit fluorescence u vzorků jednotlivých buněčných linií HepG2, A549 a HK-2.**

Čas změny intenzity fluorescence u buněk [min]	Δ intenzity fluorescence/min [IF]		
	HepG2	A549	HK-2
1	3473,0	3071,0	2144,7
2	1910,0	1556,0	1249,7
3	1057,0	1121,3	739,7
4	967,0	694,0	606,7
5	562,0	537,7	583,3
6	846,0	386,3	262,0
7	164,0	419,3	370,3
8	1155,0	273,3	294,7
9	-251,0	266,0	279,0
10	1127,0	387,7	306,3
11	184,0	260,7	215,7
12	20,0	202,0	113,7
13	429,0	334,7	253,7
14	434,0	268,7	-5,7
15	810,0	79,0	195,3
16	382,0	209,0	282,7
Průměrná změna intenzity fluorescence [IF]	830 ± 882,9	630 ± 753,3	494 ± 531,1

**Příloha 3.6 : Hodnoty změn intenzit fluorescence u slepých vzorků jednotlivých buněčných linií HepG2, A549 a HK-2.**

Čas změny intenzity fluorescence u slepých vzorků [min]	$\Delta$ intenzity fluorescence/min [IF]		
	HepG2	A549	HK-2
1	2462,0	2443,7	2358,3
2	1236,0	1476,0	1284,3
3	78,0	1076,0	748,7
4	464,0	559,3	293,7
5	365,0	500,3	556,3
6	432,0	457,3	279,3
7	290,0	261,3	299,7
8	-155,0	47,0	252,7
9	547,0	378,7	298,7
10	-218,0	248,0	184,7
11	362,0	30,0	205,0
12	97,0	165,0	172,0
13	23,0	198,7	160,0
14	23,0	254,7	38,7
15	105,0	-35,3	206,7
16	231,0	117,0	105,7
Průměrná změna intenzity fluorescence [IF]	397 ± 646,9	511 ± 649,3	465 ± 589,5