

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**FLUORESCENČNÍ METODY PRO DETEKCI
BUNĚČNÉHO POŠKOZENÍ**

Disertační práce

AUTOR PRÁCE: Mgr. Jan Čapek
ŠKOLITEL: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2020

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

FLUOROMETRIC METHODS DETECTING CELL DAMAGE

Ph.D. Thesis

AUTHOR: Mgr. Jan Čapek

SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 14. 2. 2020

Mgr. Jan Čapek

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D., který mi byl oporou a vždy mi poskytl cenné a věcné rady. Děkuji také všem ostatním kolegům, děkuji Páje, Jirkovi, Janče, Filipovi, Ivě a Pětě. Dále děkuji své rodině, která mi během studia poskytla skvělé zázemí a prostor pro úspěšné sepsání závěrečné práce. Nesmím opomenout přátele, kteří po celou dobu studia a sepisování závěrečné práce byli trpěliví, děkuji Miloši, Karle, Pavlisi, Gordy, Tomáši a kluci z domečku U Pepíčka. V neposlední řadě patří velký dík mé přítelkyni, která mi byla oporou nejvyšší, děkuji Janičko.

SOUHRN

Fluorescenční metody jsou specifické, citlivé a selektivní. Často jsou pro tyto vlastnosti využívány v přírodních vědách pro detekci různých buněčných parametrů. Pomocí fluorescenčních sond jsme schopni detekovat intracelulární koncentrace analytů, potenciály na membránách buněk i organel či vizualizovat buněčné organely.

Cílem naší práce bylo optimalizovat spektrofluorimetrickou metodu pro rutinní detekci koncentrace glutathionu (GSH) v buňkách. Dále pak optimalizovat spektrofluorimetrickou metodu pro detekci fragmentované DNA a využít tyto, i další fluorescenční metody pro charakterizaci toxického působení CdCl_2 .

Při detekci intracelulárních koncentrací GSH jsme využili fluorescenční sondu monochlorobiman. Při vyhodnocení získaného fluorescenčního signálu v čase jsme optimalizovali analýzu detekovaného signálu. Koncentrace glutathionu vypočtené pomocí nově vypracované metodiky jsme následně porovnali jak se standardně používaným zpracováním naměřených dat, tak i s koncentracemi GSH naměřenou pomocí referenční metody využívající *o*-ftalaldehyd. Kromě shodných výsledků naměřených optimalizovanou i referenční metodou jsme prokázali také velmi silnou korelaci obou metod při analýze biologických vzorků ($r = 0,96$).

Pro spektrofluorimetrickou detekci fragmentované DNA jsme využili sondu Hoechst 33258, pomocí které jsme detekovali signifikantní vliv vybraných modelových toxinů na proces fragmentace DNA. Nejvyšší nárůst fluorescence Hoechst 33258 jsme detekovali u buněk ovlivněných 50 a 100 μM cisplatinou po 24 hod inkubací. Následně jsme v poslední části práce detekovali změny koncentrace GSH, fragmentaci DNA, mitochondriální membránový potenciál a produkci ROS u buněk inkubovaných s CdCl_2 .

KLÍČOVÁ SLOVA

Glutathion, monochlorobiman, fragmentace DNA, reaktivní formy kyslíku, kadmium.

SUMMARY

Fluorescent methods are specific, sensitive and selective. These properties are frequently used in scientific studies to detect various cellular parameters. Using fluorescence probes, we are allowed to detect intracellular concentrations of analytes, membrane potentials in cells and organelles or to visualize cell organelles.

The aim of our work was to optimize spectrofluorimetric method for routine measurement of glutathione (GSH) concentration in cells. Other partial aims of the study were to optimize the spectrofluorimetric method for the detection of fragmented DNA and to use these and other fluorometric methods to characterize the toxic effect of CdCl₂.

We used the fluorescent probe monochlorobimane to detect intracellular GSH concentrations. Firstly, we optimized the evaluation of fluorescence intensity signal over time. Consequently, we compared the glutathione concentrations obtained using the optimized calculation method with both the standardly used method and with the GSH levels measured using the reference *o*-phthalaldehyde method. We found the similarity of the results obtained using optimized and reference methods when we obtained a very strong correlation of both methods in the analysis of biological samples ($r = 0.96$).

For spectrofluorometric detection of fragmented DNA, we used the Hoechst 33258 probe to detect a significant effect of selected model toxic compounds on DNA fragmentation. The highest increase of Hoechst 33258 fluorescence was detected in cells treated with 50 and 100 μ M cisplatin after 24 h. Subsequently, we detected changes in GSH concentration, DNA fragmentation, mitochondrial membrane potential and ROS production in cells incubated with CdCl₂.

KEYWORDS

Glutathione, monochlorobimane, DNA fragmentation, reactive oxygen species, cadmium.

OBSAH

1. ÚVOD	14
2. TEORETICKÁ ČÁST	15
2.1 Fluorescence	15
2.1.1 Elektromagnetické záření	16
2.1.2 Absorpce záření	16
2.1.3 Jablonského diagram.....	17
2.1.4 Excitační a emisní spektra.....	19
2.1.5 Zhášení fluorescence	20
2.1.6 Možnosti detekce fluorescencenčního záření	20
2.2 Mitochondrie	20
2.2.1 Buněčné dýchání	22
2.2.1.1 NADH-ubichinon-oxidoreduktáza (komplex I)	22
2.2.1.2 Sukcinát-ubichinon-oxidoreduktáza (komplex II).....	23
2.2.1.3 Ubichinol-cytochrom c-oxidoreduktáza (komplex III).....	24
2.2.1.4 Cytochrom c-oxidáza (komplex IV)	25
2.2.1.5 ATP-syntáza (komplex V)	26
2.2.2 Mitochondriální membránový potenciál	27
2.2.3 Vliv kadmia na mitochondrie.....	28
2.2.4 Detekce mitochondriálního membránového potenciálu	29
2.2.4.1 Sondy JC	29
2.2.4.2 Rhodaminy	31
2.3 Buněčné jádro	32
2.3.1 Vizualizace buněčného jádra.....	34
2.3.1.1 Hoechst.....	34
2.3.1.2 DAPI.....	35
2.3.1.3 Propidium jodid	36
2.4 Reaktivní formy kyslíku	36
2.4.1 Zdroje reaktivních forem kyslíku	41
2.4.1.1 Mitochondrie	41
2.4.1.2 Peroxisomy a endoplazmatické retikulum	42
2.4.1.3 Exogenní induktory volných radikálů	43
2.4.2 Reaktivní formy kyslíku ve fyziologických procesech.....	43
2.4.3 Antioxidační výbava buněk	43
2.4.4 Detekce reaktivních forem kyslíku	44
2.4.4.1 MitoSox	44
2.4.4.2 2,7-dichlórodihydrofluorescein	45
2.4.4.3 5,6-chlór-methyl-2',7'-dichlórodihydrofluorescein diacetátu.....	46
2.4.4.4 Amplex Red	47
2.4.4.5 1,3-difenyliisobenzofuran	47
2.4.4.6 2-(2-pyridil)-benzothiazolin	48
2.4.4.7 Ostatní fluorescenční sondy pro detekci ROS	48

2.5 Glutathion	48
2.5.1 Struktura a funkce glutathionu	49
2.5.2 γ -glutamylový cyklus	49
2.5.3 Antioxidační funkce glutathionu	51
2.5.3.1 Glutathionperoxidáza	52
2.5.3.2 Glutathionreduktáza	53
2.5.4 Glutathion-S-tranferázy	53
2.5.5 Ostatní funkce glutathionu	54
2.5.6 Detekce glutathionu	55
2.5.6.1 Monochlorobiman a monobromobiman	55
2.5.6.2 o-ftalaldehyd	56
2.5.6.3 Další metody detekce glutathionu	57
3. CÍLE PRÁCE	59
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	60
4.1 Seznam použitých chemikálií	60
4.2 Příprava roztoků	61
4.3 Přístroje a laboratorní materiál	64
4.4 Příprava biologického materiálu	65
4.4.1 Kultivace HK-2 buněk	65
4.4.2 Kultivace buněk A549	65
4.4.3 Kultivace buněk HepG2	65
4.5 Stanovení glutathionu – bimany	66
4.5.1 Princip detekce	66
4.5.2 Optimalizace koncentrace bimanů	66
4.5.3 Optimalizace výpočtu koncentrace glutathionu	67
4.5.4 Komparace stanovení glutathionu pomocí bimanů a o-ftalaldehydu	67
4.5.5 Korelace stanovení glutathionu pomocí bimanů a o-ftalaldehydu	68
4.6 Detekce fragmentované DNA – Hoechst 33258	69
4.6.1 Princip metody	69
4.6.2 Optimalizace koncentrace sondy Hoechst 33258	69
4.6.3 Vliv vybraných toxinů na fragmentaci DNA	69
4.7 Využití fluorescenčních sond při studiu toxicity CdCl₂	70
4.7.1 Koncentrace glutathionu	70
4.7.2 Mitochondriální membránový potenciál	70
4.7.3 Reaktivní formy kyslíku	70
4.7.4 Detekce fragmentované DNA	71
4.8 Statistické zpracování experimentálních dat	71
5 VÝSLEDKY	72

5.1 Stanovení glutathionu – bimaný	72
5.1.1 Optimalizace koncentrace bimanů.....	72
5.1.2 Optimalizace výpočtu koncentrace glutathionu.....	75
5.1.3 Komparace stanovení glutathionu pomocí bimanů a o-ftalaldehydu	77
5.1.4 Korelace stanovení glutathionu pomocí bimanů a o-ftalaldehydu.....	78
5.2 Detekce fragmentované DNA – Hoechst 33258	79
5.2.1 Optimalizace koncentrace sondy Hoechst 33258.....	79
5.2.2 Vliv vybraných toxinů na fragmentaci DNA.....	80
5.3 Využití fluorescenčních sond při studiu toxicity CdCl₂	80
5.3.1 Koncentrace glutathionu	81
5.3.2 Mitochondriální membránový potenciál	81
5.3.3 Reaktivní formy kyslíku.....	84
5.3.4 Detekce fragmentované DNA	86
6. DISKUZE	87
7. ZÁVĚR	96
8. SEZNAM LITERATURY	97
9. PŘÍLOHY	108
9.1 Originální data k výsledkové části.....	108
9.2 Původní práce autora	110

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

- Obrázek 1: Možné cesty návratu molekuly do základního stavu (str. 15).
- Obrázek 2: Elektromagnetické spektrum (str. 16).
- Obrázek 3: Elektronové rozložení u singletového a tripletového stavu (str. 17).
- Obrázek 4: Jablonského diagram (str. 18).
- Obrázek 5: Mitochondriální funkce (str. 21).
- Obrázek 6: Jednotlivé komplexy mitochondriální respirace (str. 22).
- Obrázek 7: Redukce ubichinonu na ubichinol (str. 23).
- Obrázek 8: Napojení jednotlivých komplexů dýchacího řetězce na Q-cyklus (str. 25).
- Obrázek 9: Elektronový transport komplexem IV (str. 26).
- Obrázek 10: Struktura ATP-syntázy (str. 27).
- Obrázek 11: Vliv mitochondriálního membránového potenciálu na metabolismus mitochondrií (str. 28).
- Obrázek 12: Struktura buněčného jádra (str. 32).
- Obrázek 13: Vznik reaktivních forem kyslíku postupnou redukcí (str. 37).
- Obrázek 14: Faktory a komplexy dýchacího řetězce účastníci se tvorby superoxidového radikálu v komplexu III (str. 42).
- Obrázek 15: Přehled enzymatických a neenzymatických antioxidantů (str. 44).
- Obrázek 16: Deacetylace lipofilní sondy DCFH-DA (str. 46).
- Obrázek 17: Oxidace sondy Amplex Red (str. 47).
- Obrázek 18: Reakce 2-(2-pyridil)-benzothiazolinu se superoxidovým radikálem (str. 48).
- Obrázek 19: Struktura glutathionu (str. 49).
- Obrázek 20: Metabolismus glutathionu (str. 50).
- Obrázek 21: Reakce GSH při antioxidační ochraně buněk (str. 52).
- Obrázek 22: Detoxikace xenobiotik konjugací s GSH (str. 54).
- Obrázek 23: Reakce mezi sondou MCB a GSH (str. 56).
- Obrázek 24: Reakce OPA s GSH (str. 57).
- Obrázek 25: Detekce mitochondriálního potenciálu s využitím JC-1 (str. 83).
- Obrázek 26: Detekce produkce ROS pomocí sondy CM-H₂DCFDA (str. 85).

- Graf 1: Optimalizace koncentrace sondy MCB u buněk A549 (str. 72).
- Graf 2: Optimalizace koncentrace sondy MBB u buněk A549 (str. 73).
- Graf 3: Vliv GST katalýzy na průběh reakcí MCB a MBB (str. 74).
- Graf 4: Vliv DEM na depleci GSH u buněk HK-2 (str. 75).
- Graf 5: Optimalizovaný postup výpočtu koncentrace GSH s použitím MCB u buněk HK-2 (str. 76).
- Graf 6: Korelace výsledků získaných metodou MCB a OPA (str. 79).
- Graf 7: Optimalizace koncentrace sondy Hoechst 33258 (str. 79).
- Graf 8: Vliv toxinů na fragmentaci DNA po expozici CdCl_2 (str. 80).
- Graf 9: Vliv CdCl_2 na koncentraci glutathionu (str. 81).
- Graf 10: Vliv CdCl_2 na mitochondriální potenciál (str. 82).
- Graf 11: Detekce ROS u buněk HK-2 exponovaných CdCl_2 (str. 84).

- Tabulka 1: Porovnání fluorescenčních sond JC (str. 30).
- Tabulka 2: Fluorescenční charakteristiky rhodaminů (str. 31).
- Tabulka 3: Porovnání sond typu Hoechst (str. 35).
- Tabulka 4: Přehled reaktivních forem kyslíku (str. 40).
- Tabulka 5: Změna R^2 v různých časových úsecích při měření koncentrace GSH u buněk HK-2 (str. 76).
- Tabulka 6: Porovnání intracelulární koncentrace glutathionu získané pomocí standardní a optimalizované metody výpočtu u buněk HK-2 (str. 77).
- Tabulka 7: Porovnání intracelulární koncentrace glutathionu měřené pomocí metod MCB, MBB a OPA (str. 78).
- Tabulka 8: Vliv CdCl_2 na fragmentaci DNA u buněk HK-2 (str. 86).

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-NPA	3-nitropropionová kyselina
AA	antimycin
ADP	adenosindifosfát
AO	atomový orbital
APAP	acetaminofen
CAT	kataláza
CisPt	cisplatina
CM-H ₂ DCFDA	5-,6-chlórómethyl-2',7'-dichlórodihydrofluorescein diacetát
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DCFH	2,7-dichlórodihydrofluorescein
DEM	diethylmalonát
DFF	fragmentační faktor DNA (<i>DNA Fragmentation Factor</i>)
DPBF	1,3-difenylisobenzofuran
DPI	difenyljodid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	rekombinantní epidermální růstový faktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EMZ	elektromagnetické záření
ETC	elektronový transportní řetězec (<i>Electron Transport Chain</i>)
EtOH	ethanol
FBS	fetální bovinní sérum
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzen
FITC	fluoresceinisothiokyanát
GCL	glutamátcysteinligáza
GFP	zelený fluorescenční protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GGT	γ-glutamyltransferáza
GPx	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
GSH	glutathion
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
GST	glutathion-S-transferáza
HE	hydroethidium

HO ₂ •	hydroperoxylový radikál
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (<i>Inner Mitochondrial Membrane</i>)
JC-1	5,5',6,6'-tetrachlór-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbokyanin jodid
JC-9	3,3'-dimethyl- α -naftoxokarbocyanin jodid
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
MBB	monobromobiman
MCB	monochlorobiman
MEM	minimální esenciální médium (<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>)
Mito-HE	nabíý trifenyfosfoniový zbytek
MPTP	mitochondriální transitní pór (<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>)
•OH	hydroxylový radikál
¹ O ₂	singletový kyslík
O ₂ • ⁻	superoxidový radikál
OMM	vnější mitochondriální membrána (<i>Outer Membrane of Mitochondria</i>)
ONOO ⁻	peroxydusitan
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd
OSCP	k oligomycinu citlivý protein (<i>Oligomycin Sensitivity Conferring Protein</i>)
PYR	pyruvát
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDH	sukcinátdehydrogenáza
t-BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxid
TIM	enzymový komplex přenášeýící molekuly přes vnitřní membránu mitochondrií (<i>Translocase of the Inner Membrane</i>)
TOM	enzymový komplex přenášeýící molekuly přes vnější membránu mitochondrií (<i>Translocase of the Outer Membrane</i>)
TRITC	tetramethylrhodamin
TTFA	theonyltrifluoroaceton
VDAC	napěýově závislý aniontový kanál (<i>Voltage Depent Anion Channel</i>)

1. Úvod

Fluorescence je fyzikálně-chemický děj, který je hojně využíván v biologických metodách. Pomocí fluorescenčních technik jsme schopni velice citlivě, specificky a rychle detekovat např. reaktivní formy kyslíku (ROS), koncentraci glutathionu, mitochondriální membránový potenciál či lokalizovat buněčné jádro.

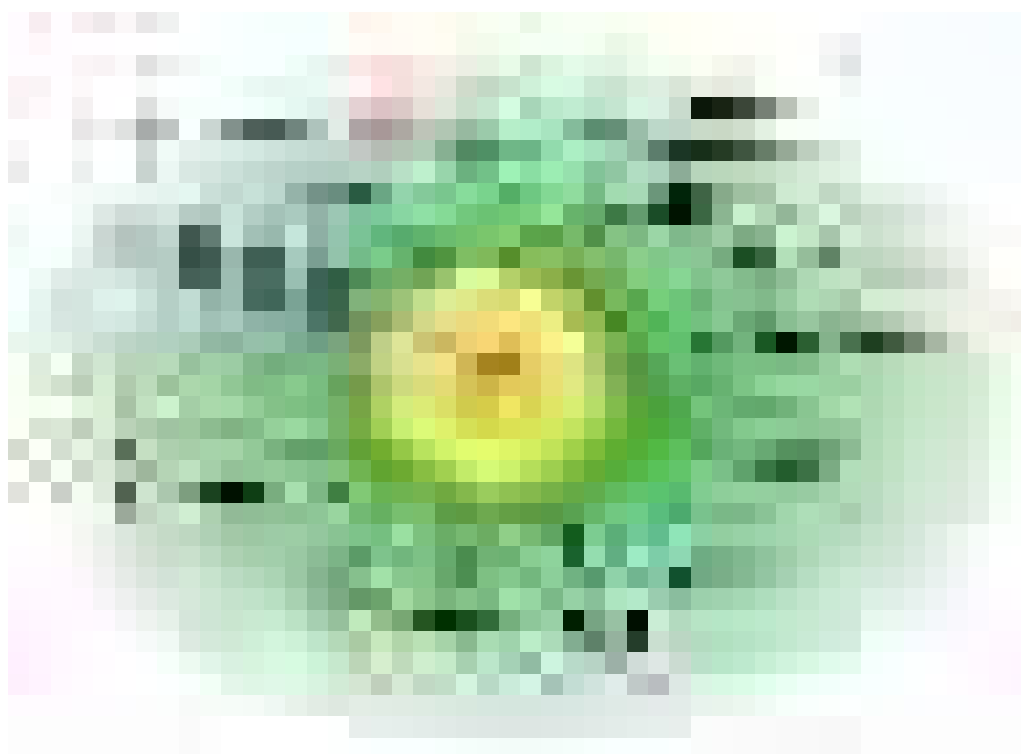
V každé živočišné buňce se ROS tvoří v nízkých koncentracích fyziologicky, a to zejména v dýchacím řetězci mitochondrií. Při patologickém působení řady látek naopak dochází ke zvýšené tvorbě ROS, které v konečném důsledku mohou vést k buněčné smrti. Buňky obsahují velice sofistikovaný a složitý systém antioxidační obrany, který vede k eliminaci ROS. Velice důležitým antioxidantem, který má řadu významných funkcí, nejenom eliminaci ROS, je glutathion. Z tohoto důvodu je intracelulární koncentrace glutathionu velice důležitým parametrem pro posouzení antioxidačního systému buněk.

Buněčné jádro je velice důležitá organela zodpovídající za uchování genetické informace. Při pokročilém buněčném poškození dochází u buněk vlivem působení např. toxinů k jaderným změnám, mezi které můžeme řadit kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA. Detekce fragmentované DNA je využívána jako marker buněčné smrti, a je proto velice důležitým parametrem.

2. Teoretická část

2.1 Fluorescence

Fluorescence je fyzikálně-chemický děj, jenž se řadí k luminescenci. V principu se jedná o děj, který souvisí s excitací, tedy absorpcí fotonu nějakou látkou. Konkrétně, excitační energii absorbují elektrony, které ve snaze o dostání se zpět do energeticky výhodnější pozice přebytečnou energii vyzáří ve formě emisního záření s vyšší vlnovou délkou a nižší energií a to formou několika možných cest (obrázek 1). Luminescenčních dějů je celá řada. Řadíme mezi ně např. fotoluminiscenci (fluorescence, fosforescence), elektroluminiscenci, termoluminiscenci, chemiluminiscenci či bioluminiscenci (Valeur, 2001). Fluorescencenční techniky jsou využívány jak ve fyzikálních, chemických, tak například i lékařských oborech. Využívána je i jako nástroj detekce při vizualizaci buněčných struktur např. pomocí fluorescenčních sond. Vzhledem k samotnému principu fluorescence je tato technika velice citlivá (Andrews, 2009).



Obrázek 1: Možné cesty návratu molekuly do základního stavu (převzato z (Valeur, 2001)).

2.1.1 Elektromagnetické záření

Elektromagnetické záření (EMZ) má vlnově-korpuskulární charakter. Foton, jenž je elementární částicí a slouží k popisu přenosu elektromagnetické energie, má určitou energii a hybnost. Vlastnosti EMZ záření jsou pospány jeho energií. Ostatní parametry EMZ záření (vlnová délka a frekvence záření) mohou být dopočítány s využitím vztahu $c = \lambda \times f$.

Elektromagnetické spektrum lze rozdělit do několika kategorií v závislosti na vlnové délce daného záření světla. Největší vlnovou délku mají rádiové vlny. Vlnová délka poté postupně klesá u záření mikrovlnného, infračerveného, viditelného, ultrafialového, rentgenového, až po nejkratší vlny, které má záření gama (obrázek 2).



Obrázek 2: Elektromagnetické spektrum a využití jednotlivých záření různých vlnových délek pro chemické metody (převzato z (Ball, 2007)).

2.1.2 Absorpce záření

Elektron dané molekuly může po absorpci záření přecházet ze svého základního stavu v příslušném orbitalu do neobsazeného orbitalu o vyšší energii. Jedná se pak o excitovanou molekulu. Pro pochopení jednotlivých dovolených a zakázaných elektronových přechodů je potřebná znalost teorie molekulových orbitalů.

Jednotlivé atomové orbitály (AO) se na základě vedlejšího kvantového čísla (L) dělí na orbitály typu **s** (L = 0), **p** (L = 1), **d** (L = 2) a **f** (L = 3). Interakcí jednotlivých atomových orbitalů vznikají orbitály molekulové (vazebné, antivazebné). Rozdíl mezi

těmito dvěma typy molekulových orbitalů je v energii s tím, že orbital vazebný má energii nižší než oba AO, ze kterých vznikl. U antivazebného orbitalu je situace opačná. Při obsazování molekulových orbitalů platí všeobecně známá pravidla (Pauliho princip, Hundovo pravidlo) týkající se obsazování AO, tedy že se nejdříve obsazuje orbital s nižší energií (Sedmidubský *et al.*, 2011). Molekulové orbitály můžeme značit řeckými písmeny σ a π , kdy obsazením těchto orbitalů dochází ke vzniku vazeb, a to i násobných, pokud dojde k obsazení současně orbitalu δ a π (dvojná vazba) popřípadě orbitalu δ a dvou orbitalů π (trojná vazba) (Valeur, 2001). Molekuly se mohou nacházet v různých stavech, mezi které řadíme singletový a tripletový (obrázek 3). Molekuly se mohou nacházet v různých stavech, mezi které řadíme singletový a tripletový (obrázek 1). To, v jakém stavu se daná látka nachází, závisí na spinové multiplicitě. Spinovou multiplicitu můžeme spočítat jako $2S + 1$, kde S reprezentuje celkový spin systému. Pro singletový stav tedy platí ($2 \cdot 0 + 1 = 1$) a pro tripletový ($2 \cdot 1 + 1 = 3$) (Gryn'ova *et al.*, 2015).



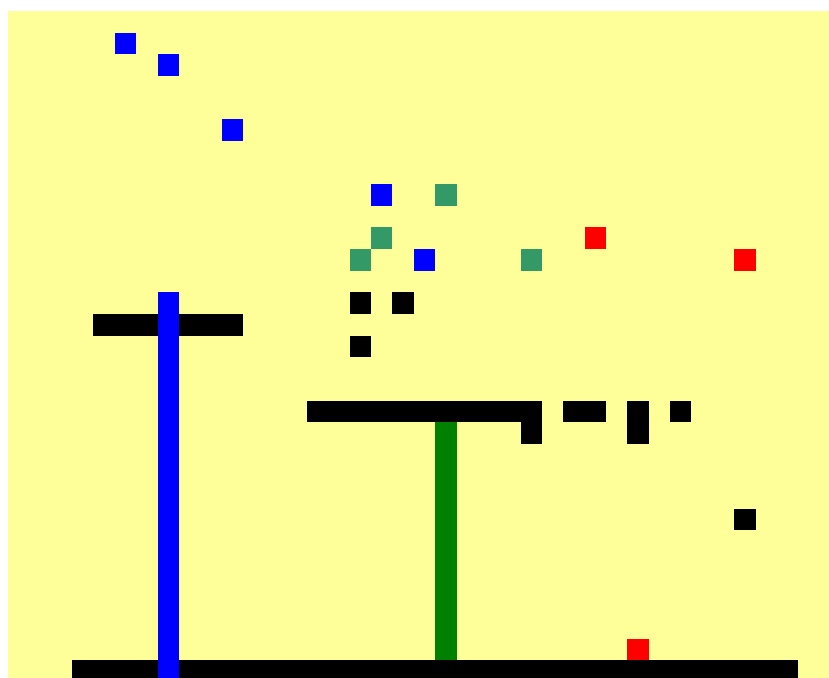
Obrázek 3: Elektronové rozložení u singletového a tripletového stavu molekul (převzato z (Valeur, 2001)).

2.1.3 Jablonského diagram

Jablonského diagram je často používán pro popis absorpce a emise záření látek (obrázek 4). Zobrazuje jednotlivé energetické stavy, vibrační hladiny a v neposlední řadě možnosti elektronových přechodů a s tím související emisi záření. Jak je patrné z obrázku 4, diagram zobrazuje jednotlivé energetické hladiny, kde S_0 je hladina základní, další S_1 a S_2 jsou energetické hladiny s vyšší energií, kde mohou elektrony existovat v řadě vibračních hladin. Pro vznik fluorescenčního záření dochází k přechodu elektronu z nejnižší vibrační hladiny daného excitovaného

stavu do některé energetické hladiny stavu základního. Po absorpci záření je molekula excitována díky přechodu elektronů do některé z excitovaných hladin (S1 či S2). Dále nejčastěji dochází k tzv. vnitřní konverzi a vibrační relaxaci, což je nezářivý přechod elektronů do nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu s nejnižší energií (S1). Tato skutečnost je nazývána Kashovo pravidlo.

Ve sledu událostí tedy nejdříve dochází k vnitřní konverzi tj. přechodu ze stavu S2 do stavu S1, dále pak k vibrační relaxaci, tj. přechod elektronu na nejnižší vibrační hladinu. Vnitřní konverze je možná i ze stavu S1 do stavu S0, ale vzhledem k větší energetické mezeře právě mezi S1 a S0 je méně účinná než přechod z S2 do S1 (Lakowicz, 2006; Valeur, 2001). Po tomto přechodu, který trvá zpravidla 10^{-12} s, následuje vlastní fluorescence trvající okolo 10^{-8} s vlivem přechodu elektronu do základního energetického stavu (S0). Důležité je zmínit možnost přechodu molekul do tripletového stavu (T1).



Obrázek 4: Jablonského diagram (převzato z (Lakowicz, 2006)).

Tento děj se nazývá mezisystémová konverze a dochází při ní ke spinové konverzi. Mezisystémová konverze může soutěžit s jinými ději jako je deexcitace z hladiny S1 (fluorescence či vnitřní konverze z hladiny S1 do S0). Přechod mezi stavy s různou multiplicitou je zpravidla zakázaný, ale spinová orbitální vazba (vazba mezi orbitálním magnetickým momentem a spinovým magnetickým momentem) může být dostatečně velká na to, aby to možné bylo (Valeur, 2001).

Emise záření vzniklá přechodem elektronu ze stavu T1 do základního stavu se nazývá fosforescence. Fosforescence má zpravidla vyšší vlnovou délku a tedy nižší energii ve srovnání s fluorescencí. Vzhledem k řádově nižším rychlostním konstantám je doba trvání fosforescence daleko delší než u fluorescence (Andrews, 2009; Lakowicz, 2006).

Dalším typem fluorescence je tzv. zpožděná fluorescence, která může nastat, pokud je energetický rozdíl mezi hladinami T1 a S1 malý a životnost stavu T1 je dostatečně dlouhá. Za splnění výše uvedených podmínek dojde k reverzní mezisystémové konverzi (přechod z T1 do S1). Emise má stejné spektrální rozložení jako normální fluorescence, její trvání je ale mnohem delší. Tento typ fluorescenční emise je tepelně aktivovaný, proto se zvyšující se teplotou dochází k růstu účinnosti (Valeur, 2001).

2.1.4 Excitační a emisní spektra

Každá látka, která je schopná fluorescence, má své excitační a emisní charakteristiky. Jinými slovy, pro každou látku (molekulu) je dána vlnová délka excitace a emise. Pokud jako zdroj pro excitaci dané molekuly použijeme záření o vlnové délce maxima její excitace, dostaneme největší fluorescenční výtěžek, protože látka bude nejvíce emitovat. Naopak při jiných vlnových délkách excitace než maximálních dostaneme nižší kvantový výtěžek. Rozdíl mezi vlnovými délkami excitace (absorpce) a emise se nazývá Stokesův posun, který říká, že vlnová délka emitovaného záření má vždy vyšší vlnovou délku a nižší energii než excitační záření. Ke ztrátě energie dochází zejména nezářivými mechanismy, mezi něž řadíme například uvolnění tepla či výše zmíněnou vibrační relaxaci (Andrews, 2009; Lakowicz, 2006). Důležité je zmínit skutečnost, že kvantový výtěžek a ani doba trvání fluorescence nejsou závislé na excitačním záření. Tuto skutečnost popisuje Vavilovův zákon (Lakowicz, 2006; Valeur, 2001). Při srovnání hmotnosti jader a elektronů je jádro mnohořádově těžší. Z tohoto důvodu je přechod elektronů do excitovaného stavu daleko rychlejší než vibrace jader. Vzdálenost jádra od elektronů je zachována a její optimální hodnota se ustanovuje až poté. Toto zjištění je známé jako Franckův-Condonův princip (Coolidge *et al.*, 1936).

2.1.5 Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence se vyskytuje při práci s fluorochromy poměrně často. Může být negativním přínosem při měření, ale i záměrným užitím například u různých typů senzorů. Zhášení fluorescence můžeme rozdělit na statické a dynamické. Při dynamickém zhášení se molekula fluoroforu sráží s jinou molekulou, kde po srážce následuje nezářivý přechod. Naopak při statickém zhášení tvoří fluorochrom komplex se zhášedlem, například díky fotoindukovanému elektronovému transferu. Důležité je poznamenat, že při statickém zhášení dochází ke snížení intenzity fluorescence nikoliv její doby (Andrews, 2009).

2.1.6 Možnosti detekce fluorescencenního záření

Fluorimetrická detekce je velice často využívána pro její vysokou citlivost. Své využití nachází u řady metod, mezi které patří například vysokoučinná kapalinová chromatografie (Martin *et al.*, 2001; Rey *et al.*, 2016), spektrofluorimetrie (Dekaliuk *et al.*, 2015; Salman *et al.*, 2019), fluorescenní mikroskopie (Smiley *et al.*, 1991) a řada dalších. Při kvantifikaci je hojně využívána spektrofluorimetrická detekce například pro stanovení intracelulárních koncentrací sledovaných analytů. Pro vizualizaci buněčných struktur (jádro, mitochondrie, cytoskeletární systém) je vhodné využití fluorescenní mikroskopie. Zejména pro fluorescenní mikroskopii je důležité vybrat vhodnou instrumentaci v podobě fluorescenních filtrů. Existuje řada fluorescenních kostek pro detekci vymezeného emitovaného záření (např. DAPI). Výjimkou v dnešní době nejsou ani kombinované fluorescenní kostky pro dvě vlnové délky emise při jedné vlnové délce excitace (např. GFP spolu s TRITC). Z tohoto vyplývá, že emise může být i širokopásmová, tedy otevřená. Toto je značně odlišné od spektrofluorimetrických metod, kde vlnovou délku excitace a emise nastavíme pomocí monochromátorů.

2.2 Mitochondrie

Mitochondrie jsou 0,5–2 μm velké kulovité či vláknité semiautonomní organely nacházející se v eukaryotních buňkách (obrázek 5), kde mohou tvořit komplexní síť. Hlavní úlohou mitochondrií je tvorba energie v podobě adenosin trifosfátu (ATP), ale samozřejmě i řada dalších anabolických, katabolických či fyziologických

a patologických reakcí. Mezi tyto reakce patří například produkce NADH, syntéza aminokyselin a hemu, v neposlední řadě i syntéza fosfolipidů pro membránovou biogenezi (Rizzuto *et al.*, 2012). Velmi důležitá je schopnost buněčné signalizace zprostředkovaná mitochondriemi. Buněčná signalizace je u mitochondrií zprostředkována produkty a metabolity, mezi něž můžeme zařadit i ATP a reaktivní formy kyslíku (*Reactive Oxygen Species*; ROS). Mitochondriální dynamika je velice důležitá pro udržení homeostázy a při jejím porušení může docházet ke vzniku patologických stavů. Mitochondrie hrají samozřejmě roli i při apoptotických procesech (Herst *et al.*, 2017), produkci ROS, tumorigenezi (Kalyanaraman *et al.*, 2018) a řadě dalších procesů, které úzce souvisí s mitochondriální signalizací.



Obrázek 5: Mitochondriální funkce (převzato z (Herst *et al.*, 2017)).

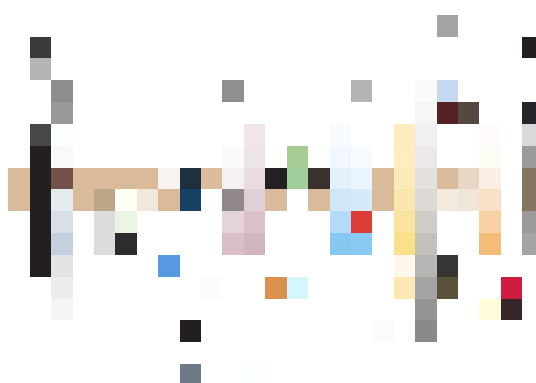
Mitochondrie jsou od cytoplasmy odděleny vnější a vnitřní mitochondriální membránou. Vnější mitochondriální membrána (*Outer Membrane of Mitochondria*; OMM) obsahuje tři rodiny integrálních membránových proteinů. Tyto integrální membránové proteiny tvoří různé proteinové transportní komplexy, mezi které řadíme např. generální importní pór TOM, inzertázu SAM či napětově řízené aniontové transportéry (*Voltage-Dependent Anion Channel*; VDAC). Tyto transportní komplexy jsou plně dostatečné pro komunikaci mezi mitochondriemi a okolním prostředím (Bayrhuber *et al.*, 2008). Přes vnější membránu tedy volně prochází ionty a malé nenabitě molekuly. Vzhledem k pórovitosti OMM na ní neexistuje mitochondriální membránový potenciál ($\Delta\Psi$). Naproti tomu vnitřní mitochondriální membrána (*Inner*

Mitochondrial Membrane; IMM) je difúzní bariéra nepropustná pro všechny ionty a většinu molekul. Pro jejich transport jsou důležité specifické a selektivní transportní proteiny. Na vnitřní mitochondriální membráně se ustanovuje $\Delta\Psi$ a membrána vymezuje uspořádáním se do křivky vnitřní prostor mitochondrií zvaný matrix. Nízká hodnota pH v mezimembránovém prostoru mitochondrií vytváří transmembránový elektrochemický gradient, který je důležitý pro syntézu ATP. Dále se v matrix vyskytuje DNA uspořádaná do tzv. nukleoidů (Kuhlbrandt, 2015).

2.2.1 Buněčné dýchání

Jak již bylo napsáno výše, mitochondrie obsahují enzymy účastnící se řady metabolických drah, jako je Krebsův cyklus, metabolismus mastných kyselin a řada dalších. Všechny tyto dráhy jsou velice důležité pro jejich napojení do dýchacího řetězce, protože při nich vznikají redukované kofaktory.

Redukované kofaktory jsou posléze reoxidovány v dýchacím řetězci a uvolněné elektrony jsou přenášeny přes komplexy dýchacího řetězce I–IV. Transport elektronů je doplněn translokací H^+ přes jednotlivé komplexy do mezimembránového prostoru. Protony jsou poté využity pro syntézu ATP. Proces transportu elektronů je nazýván elektronový transportní řetězec (*Electron Transport Chain*; ETC) (obrázek 6).

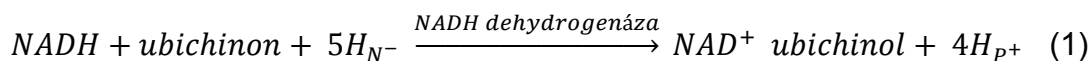


Obrázek 6: Jednotlivé komplexy mitochondriální respirace (převzato z (Brownlee, 2001)). Zkratky: NADH – nikotinamidadenindinukleotid; FAD – flavinadenindinukleotid; Q – koenzym Q10; ATP – adenosintrifosfát; ADP – adenosindifosfát; Pi – fosfátový zbytek; $\Delta\mu_{H^+}$ - protonmotivní síla.

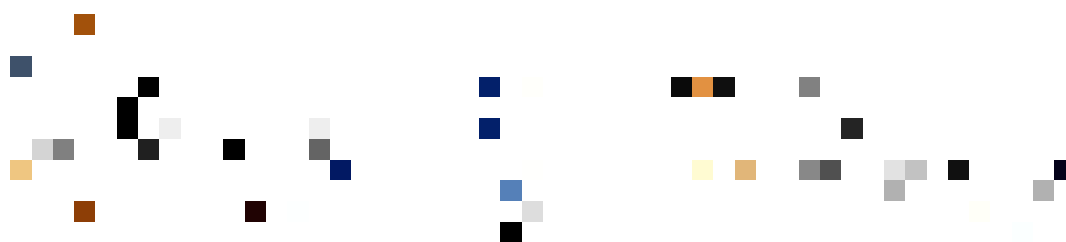
2.2.1.1 NADH-ubichinon-oxidoreduktáza (komplex I)

V mitochondriích jsou elektrony přenášeny z NADH na O_2 pomocí tří velkých enzymových komplexů (NADH-dehydrogenáza, cytochrom c-reduktáza a cytochrom c-oxidoreduktáza). Prvním a největším enzymem dýchacího řetězce je NADH-

ubichinon-oxidoreduktáza (NADH-dehydrogenáza; EC 1.6.99.3), která katalyzuje následující reakci (reakce 1):



Dolní indexy u protonů reprezentují negativní vnitřní (N) a pozitivní vnější (P) stranu vnitřní mitochondriální membrány. Enzym NADH-dehydrogenáza je složen zhruba ze 45 podjednotek (Brownlee, 2001), které jsou kódovány nukleárně a poté importovány z cytoplazmy (Weiss *et al.*, 1991). V aktivním centru enzymu dochází k oxidaci NADH na NAD^+ a jednotlivé elektrony jsou transportovány přes řadu redoxních center až k akceptoru elektronů, kterým je ubichinon. Z ubichinonu se dvouelektronovou redukcí tvoří ubichinol (obrázek 7), který elektrony transportuje na komplex III.



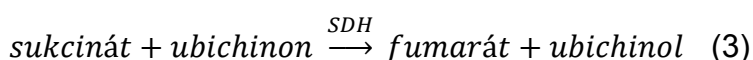
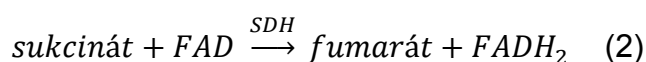
Obrázek 7: Redukce ubichinonu na ubichinol.

Redoxním centrem je flavinmononukleotid (FMN) a řada Fe-S klastrů. Po prostupu elektronů enzymem na ubichinon dochází k translokaci čtyř protonů (H^+) do mezimembránového prostoru (Walker, 1992). Protony jsou později využity k syntéze ATP.

2.2.1.2 Sukcinát-ubichinon-oxidoreduktáza (komplex II)

Sukcinát-ubichinon-oxidoreduktáza, nebo také sukcinátdehydrogenáza (SDH; EC 1.3.5.1) je součástí jak citrátového cyklu, tak i dýchacího řetězce. V rámci citrátového cyklu oxiduje sukcinát na fumarát (reakce 2 a 3). V dýchacím řetězci SDH redukuje ubichinon na ubichinol. Ze sukcinátu jsou elektrony přenášeny na ubichinon přes prostetickou skupinu flavinadenindinukleotidu (FAD), klastry ([2Fe-2S], [4Fe-

4S], [3Fe-4S]) a hem, který formuje integrální část enzymu (Sun *et al.*, 2005). Eukaryotická SDH se skládá ze čtyř podjednotek, které jsou kódovány nukleárním genomem. Je to jediný komplex dýchacího řetězce, kterému chybí podjednotky kódované mitochondriálním genomem a který nepřenáší H⁺ do mezimembránového prostoru. Struktura SDH sestává z hydrofilní hlavy směřující do mitochondriální matrix a hydrofobního ocasu, který je umístěn ve vnitřní mitochondriální membráně s přesahem do mezimembránového prostoru.

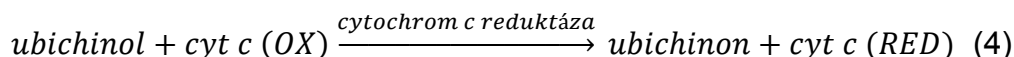


Hydrofilní hlava se skládá ze dvou podjednotek tvořících katalytické jádro (SdhA, SdhB), které mají navázaný FAD (SdhA) a Fe-S klastry (SdhB). Hydrofobní ocas je tvořen podjednotkami SdhC a SdhD, které váží hem b a obsahují dvě vazebná místa pro ubichinon (Rutter *et al.*, 2010).

2.2.1.3 Ubichinol-cytochrom c-oxidoreduktáza (komplex III)

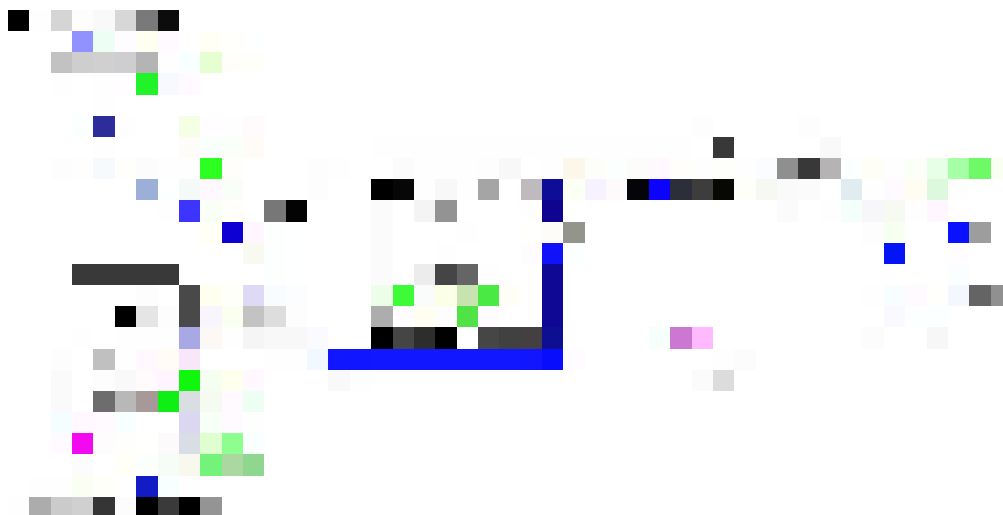
Mitochondriální komplex III (EC 1.10.2.2) se skládá z 11 podjednotek, z nichž pouze jediná (cytochrom b) je kódována mitochondriálním genomem. Komplex III je dimer se čtyřmi metaloproteinovými centry v každém monomeru (hem b_H a b_L cytochromu b, hem c1 cytochromu c1 a [2Fe–2S]), který je úzce spojený s komplexy I a IV dýchacího řetězce, s kterými tvoří respirasom (Schagger *et al.*, 2000).

Důležitá úloha komplexu III je v oxidaci ubichinolu na ubichinon za současné redukce cytochromu c na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány (Q-cyklus; reakce 4). Oxidace ubichinolu probíhá v tzv. Q_P místě, kde dochází k odklonu drah pro dva přenášené elektrony.



První elektron je transportován dráhou s vysokým potenciálem přes [2Fe–2S], cytochrom c1 až na cytochrom c. Po odtržení jednoho elektronu od ubichinolu dochází ke vzniku semichinoidní formy. Druhý elektron postupuje dráhou s nízkým potenciálem a redukuje ubichinon na semichinon, nebo semichinon na ubichinol.

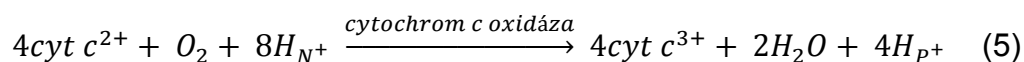
Pro redukci ubichinonu jsou potřebné dva elektrony a z tohoto důvodu musí výše zmíněná reakce proběhnout dvakrát. V konečném důsledku v rámci Q-cyklus, probíhá oxidace dvou molekul ubichinolu za současné translokace čtyř H^+ do mezimembránového prostoru (Benit *et al.*, 2009) (obrázek 8).



Obrázek 8: Napojení jednotlivých komplexů dýchacího řetězce na Q-cyklus (převzato z (Paddenberg *et al.*, 2003)). Zkratky: AA - antimycin; DPI - difenyljodid, 3-NPA - 3-nitropropionová kyselina; TTFA – thenoyltrifluoroaceton; NADH – nikotinamidadenin dinukleotid; Q – koenzym Q10.

2.2.1.4 Cytochrom c-oxidáza (komplex IV)

Cytochrom c-oxidáza (EC 1.9.3.1) katalyzuje jednoelektronovou oxidaci cytochromu c za současné čtyřelektronové redukce kyslíku na vodu (reakce 5).



Je součástí velké rodiny hemoxidáz obsahujících atomy mědi, jejichž společným znakem je přítomnost jaderné podjednotky 1, která obsahuje bis-histidinem koordinovaný nízko otáčivý hem a katalytické místo tvořené s histidinem ligovaného hemu a iontu mědi ligovaného třemi histidinovými zbytky (Rich, 2017). Cytochrom c-oxidáza se skládá z celkem 13 podjednotek a ve svém aktivním centru obsahuje řadu kovů (Fe, Cu, Mg a Zn).

Počátečním akceptorem elektronů při vnitřním elektronovém transportu je dinukleární centrum CuA, které je umístěno v hydrofilním prostředí podjednotky 2 (obrázek 9). Z centra CuA je poté elektron transportován přes hem do katalytického

centra, kde se naváže na hem a₃ v blízkosti centra Cu_B. Pro úplný katalytický cyklus, tedy redukci kyslíku na vodu, jsou potřebné čtyři elektrony a všechny jsou předávány výše popsanou cestou (Yoshikawa *et al.*, 2015) (obrázek 9).



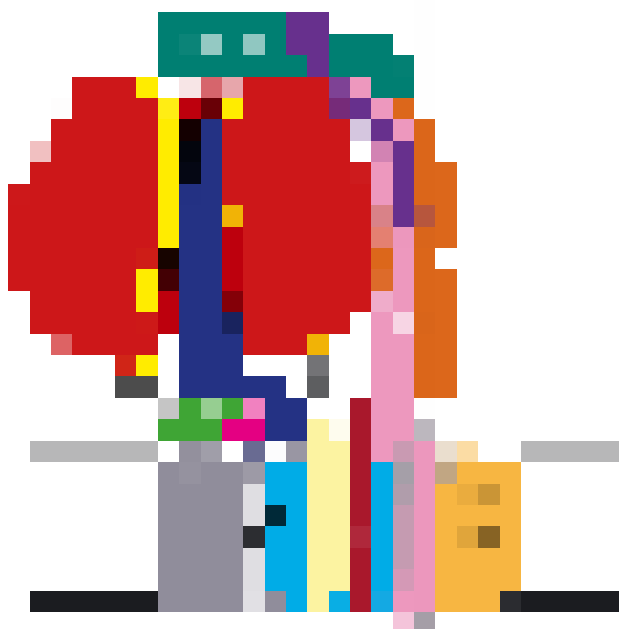
Obrázek 9: Elektronový transport komplexem IV (převzato z (Rich, 2017)).

2.2.1.5 ATP-syntáza (komplex V)

Produkce mitochondriálního ATP je velice důležitá pro energetické pokrytí řady procesů, které v mitochondriích probíhají (obrázek 10). Komplex V, nebo-li ATP-syntáza (EC 3.6.3.14), katalyzuje vznik ATP z ADP a anorganického fosfátu (Pi). Sestává ze dvou základních komplexů (F1 a F₀). Komplex F₀ je vázaný na vnitřní mitochondriální membránu, čímž kotví samotný enzym. Komplex F1 obsahuje podjednotky α a β celkem po třech kopiích a dále po jedné kopii podjednotek γ , δ a ϵ , které tvoří centrální stonek komplexu V. Komplex F₀ obsahuje podjednotky a, b, d, F₆, k oligomycinu citlivý protein (*Oligomycin Sensitivity-Conferring Protein*; OSCP) a c-kroužek.

Všechny podjednotky, vyjma podjednotky a, tvoří periferní stonek, který leží na jedné straně komplexu. Principem samotného mechanismu je využití energie získané transportem H⁺ z mezimembránového prostoru do matrix mitochondrií přes F₀ část komplexu V. Tato energie se následně využije pro syntézu ATP v F1 části. Protonový gradient vytváří protonmotivní sílu, která má dvě složky (ΔpH a $\Delta\Psi$). Uvolněná energie způsobuje rotaci c-kroužku části F₀ a podjednotek γ , δ a ϵ části F1. Při této

rotaci procházejí protony Fo částí až do c-kroužku a rotace podjednotky γ části F1 poskytuje energii pro syntézu ATP. Celý proces se nazývá rotační katalýza (Jonckheere *et al.*, 2012).



Obrázek 10: Struktura ATP-syntázy (převzato z (Neupane *et al.*, 2019)).

2.2.2 Mitochondriální membránový potenciál

Potenciál mitochondriální membrány ($\Delta\Psi$) je výsledkem redoxních transformací spojených s aktivitou Krebsova cyklu, Beta oxidace mastných kyselin, dekarboxylace pyruvátu a řady dalších dějů. Slouží jako přechodná forma energie, která je využívána ATP-syntázou pro syntézu ATP. Výsledkem transformací není vznik pouze $\Delta\Psi$, ale i protonového gradientu, které společně vytvářejí protonmotivní sílu. Za normálních okolností buňky velice citlivě udržují intracelulární koncentraci ATP a $\Delta\Psi$, což je nezbytné pro jejich fyziologické fungování. Je tedy faktorem určujícím životaschopnost mitochondrií, které se účastní eliminace poškozených mitochondrií a v neposlední řadě hraje roli při transportu nabitých sloučenin důležitých pro fungování mitochondrií (Zorova *et al.*, 2018) (obrázek 11).



Obrázek 11: Vliv mitochondriálního membránového potenciálu na metabolismus mitochondrií (převzato z (Zorova *et al.*, 2018)).

Celková hybná síla protonů proudících do mitochondrie (Δp) reprezentuje kombinaci mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\Psi$) a pH gradientu mitochondrií (ΔpH_m ; chemický či koncentrační gradient). Při použití Nernstova faktoru můžeme vytvořit jednoduchou rovnici (rovnice 6).

$$\Delta p \text{ (mV)} = \Delta\Psi_m - \Delta pH_m \quad (6)$$

Pokud použijeme přibližné fyziologické hodnoty pro $\Delta\Psi = 150$ mV a pro $\Delta pH_m = -0,5$ jednotek, kde záporné znaménko reprezentuje alkalické prostředí mitochondriální matrix, dostaneme po dosazení do rovnice $\Delta p = 150 - 60 \cdot (-0,5) = 180$ mV. Hodnoty Δp optimálně leží ve fyziologickém rozmezí 180–220 mV s tím, že příspěvek $\Delta\Psi$ je okolo 150–180 mV a příspěvek ΔpH_m okolo 0,5–1 jednotky, což odpovídá 30–60 mV (Perry *et al.*, 2011). Velkou roli $\Delta\Psi$ hraje při různých patologických dějích, ať je změna $\Delta\Psi$ příčinou, nebo důsledkem. Jednu z nejvýznamnějších rolí hraje $\Delta\Psi$ v procesu apoptózy (Wang *et al.*, 2009).

Lze pak říci, že viabilní buňky mají vysoké hodnoty $\Delta\Psi$, naopak buňky jakýmkoliv způsobem poškozené mají hodnotu $\Delta\Psi$ nízkou. Fluktuační $\Delta\Psi$ je jedním z parametrů, který je u buněk sledován zejména pomocí fluorescenčních sond.

2.2.3 Vliv kadmia na mitochondrie

Kadmium je vysoce toxický kov, který se vyskytuje v kontaminovaných potravinách, vzduchu, prachu či kouři. Po absorpci kadmia v gastrointestinálním traktu dochází k transportu do jater, kde působí hepatotoxicky (Al-Nasser, 2000; Mithofer *et al.*, 1992). Protože jsou do energetického systému buňky zapojeny

mechanismy zachování intracelulárních hladin GSH, může být deplece GSH tedy obecným jevem spojeným s poškozením mitochondriálních funkcí (Al-Nasser, 2000). Fyziologický stav mitochondrií závisí na protonovém elektrochemickém gradientu generovaném respiračním řetězcem. Kadmium je jednou z mnoha látek, která narušuje elektrochemický gradient v mitochondriích, což v konečném důsledku vede k poklesu $\Delta\Psi$ a následně k buněčné smrti (Dorta *et al.*, 2003). Konkrétním mechanismem je působení kadmia jako agonisty mitochondriálního póru (*Mitochondrial Permeability Transition Pore*; MPTP), dochází k otevření MPTP a následnému efluxu vápníku, což vede k mitochondriální dysbalanci (Zhang *et al.*, 2011). Po otevření póru MPTP dále dochází k úniku ATP a proapoptotických faktorů. Dále kadmium způsobuje agregaci membránových proteinů mitochondrií prostřednictvím vazby kadmia na volné thiolové skupiny či indukci tvorby ROS na úrovni komplexu III mitochondriálního respiračního řetězce (Belyaeva *et al.*, 2012; Zoratti *et al.*, 1995).

2.2.4 Detekce mitochondriálního membránového potenciálu



Fluorescenční sondy pro detekci $\Delta\Psi$ mají převážně lipofilní charakter, jsou kationické a existuje jich velké množství. Díky jejich náboji a lipofilní povaze hladce prostupují buněčnými membránami a hromadí se v mitochondriích, kde velice jemně a specificky reagují na fluktuace $\Delta\Psi$ (Scaduto *et al.*, 1999). Mezi tyto sondy patří např. rhodaminové deriváty (tetramethyl- či tetraethylestery, rhodamin 123), dále pak kationické sondy JC-1 a JC-10 (Elefantova *et al.*, 2018).

2.2.4.1 Sonda JC

Sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbo-cyanin jodid) má kationické a lipofilní vlastnosti, díky kterým proniká přes buněčné membrány až do mitochondrií. Pokud mají buňky nízký mitochondriální membránový potenciál a jsou tedy poškozené, sonda JC-1 zůstává v monomerní formě a tyto monomery emitují fluorescenční záření při 535 nm. Naopak u buněk viabilních, které mají vysoký mitochondriální membránový potenciál, tvoří sonda JC-1 tzv. J-agregáty, které posouvají emisi na 595 nm. Excitační vlnová délka pro sondu JC-1 je 485 nm (Elefantova *et al.*, 2018; Chazotte, 2011; Salvioli *et al.*, 1997). Ve srovnání s jinými fluorescenčními sondami, jako jsou tetramethylrhodaminmethylester (TMRM) či

DiOC₆(3), je při práci s JC-1 pracováno s daleko vyšší koncentrací pracovního roztoku, což může mít jistý vliv na její zhášení. Poměr mezi červenou (*red*; R) a zelenou (*green*; G) fluorescencí slouží k posouzení hodnoty $\Delta\Psi$ u buněk. Při spektrofluorimetrickém měření získáme výše popsany R/G poměr, kde čím vyšší je jeho hodnota, tím mají mitochondrie buněk vyšší $\Delta\Psi$. Jak je patrné, výsledky naměřené s využitím sondy JC-1 se dají kvantifikovat. Pro kvalitativní vyhodnocení lze použít fluorescenční mikroskopii (Kroemer *et al.*, 2007). Kromě sondy JC-1 existují její analogy, které budou popsány dále (tabulka 1).

Tabulka 1: Porovnání fluorescenčních sond JC (upraveno dle (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011; Jinfang L. *et al.*, 2010; Salvioli *et al.*, 1997)).

Název sondy	Struktura	Rozpustnost v H ₂ O	Ex/Em (nm)
JC-1		Nízká	485/535(595)
JC-9		Nízká	485/535(595)
JC-10	neznámá	Vysoká	485/535(595)

Fluorescenční sonda JC-9 (3,3'-dimethyl- α -naftoxokarbokyanin jodid) má stejné spektroskopické vlastnosti jako sonda JC-1 (Ex/Em = 485/535 (585) nm), rozdíl mezi těmito sondami je v jejich rozpustnosti. V mitochondriích s vysokým $\Delta\Psi$ tvoří stejně jako sonda JC-1 J-agregáty, naopak v mitochondriích s nízkým $\Delta\Psi$ zůstává v monomerní formě a emituje zelené fluorescenční světlo (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011).

Sonda JC-10 byla vyvinuta jako náhrada za sondu JC-1. Ve srovnání se sondou JC-1 má sonda JC-10 lepší rozpustnost ve vodě. Sonda JC-1 je schopna precipitovat ve vodných roztocích už při 1 pM koncentraci ve srovnání se sondou JC-10, která precipituje při vyšších koncentracích. Stejně jako sonda JC-1 selektivně vstupuje do mitochondrií buněk, kde velice specificky reaguje na změny $\Delta\Psi$. Po vstupu do mitochondrií se mění fluorescenční záření sondy JC-10 ze zelené na červenou díky tvorbě agregátů v závislosti na polarizaci membrány. Dochází tedy

k posunu emitovaného světla z 535 nm (monomerní forma; zelené záření) na 595 nm (J-agregáty; červené záření). Pro detekci záření sondy JC-10 můžeme použít filtry či monochromátory v průtokových cytometrech, fluorescenčních mikroskopech či spektrofluorimetrech. Využití sondy JC-10 je cílené pro měření v mikrotitrační destičce, kde sonda JC-1 není hojně využívána pro svou malou rozpustnost ve vodě. Další výhodou sondy JC-10 je skutečnost, že poskytuje daleko větší poměr signálu k pozadí (Jinfang L. *et al.*, 2010). Pro kvantitativní vyhodnocení lze stejně jako u sondy JC-1 sledovat změnu poměru R/G, kde platí, že čím vyšší je poměr R/G, tím více jsou buňky viabilní.

2.2.4.2 Rhodaminy

Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM) a tetramethylrhodaminethylester (TMRE) jsou lipofilní kationické fluorescenční sondy (tabulka 2). Tyto sondy se velice rychle akumulují ve viabilních buňkách v důsledku záporného náboje mitochondriálního matrix v porovnání s cytolem. Pokud dojde u mitochondrií buněk ke snížení $\Delta\Psi$, dochází ke úniku TMRM či TMRE z mitochondrií a intenzita sledované fluorescence se snižuje (Scaduto *et al.*, 1999). Poměr koncentrace sond TMRM (TMRE) v mitochondriích ke koncentraci v cytosolu umožňuje vypočítat $\Delta\Psi$ pomocí Nernstovy rovnice. Spektrální charakteristiky sondy TMRM jsou stejné jako u sondy TMRE s excitací 549 nm a emisí 575 nm (Loew *et al.*, 1993).

Tabulka 2: Fluorescenční charakteristiky rhodaminů (upraveno dle (Baracca *et al.*, 2003; Loew *et al.*, 1993)).

Název sondy	Excitace (nm)	Emise (nm)
TMRM	549	575
TMRE	549	575
Rh-123	507	529

Rhodamin 123 (Rh-123) se v mitochondriích akumuluje díky jeho kladnému náboji. Díky svým lipofilním vlastnostem proniká buněčnými membránami až do matrix mitochondrií. Z výše zmíněných důvodů jsou tato barviva hojně využívána pro detekci $\Delta\Psi$ a lokalizaci mitochondrií v živých buňkách (Baracca *et al.*, 2003), kde se využívá jejich spektroskopických vlastností, nebo alternativně možnosti izotopového značení. První užití Rh-123 bylo v intaktních buňkách, kde se hromadil

v závislosti na $\Delta\Psi$. Později, na izolovaných mitochondriích, byl prokázán červený posun u energizovaných mitochondrií. Díky tomuto zjištění byla sonda Rh-123 uznána za vhodnou pro měření $\Delta\Psi$ (Emaus *et al.*, 1986). Rhodaminové sloučeniny včetně Rh-123 jsou stále preferenčně používány v buněčných studiích (Baracca *et al.*, 2003; Emaus *et al.*, 1986). Sonda Rh-123 emituje při 529 nm (zelené záření), maximální výška excitačního pásu je 507 nm.

2.3 Buněčné jádro

Buněčné jádro bylo první objevenou intracelulární strukturou v roce 1802 Franzem Bauerem. Studium jádra bylo velice obtížné vzhledem k omezenému množství metod. Později byly postupně vyvinuty metody pro detekci intranukleárních struktur, díky kterým byla struktura jádra postupně popsána. Jádro eukaryotní buňky je rozděleno do kompartmentů, které od sebe nejsou odděleny membránami (Dundr *et al.*, 2001). Molekulární stránka buněčného jádra je složitá (obrázek 12), nicméně lze říci, že buněčné jádro je pro život buňky nezbytně důležité. V jádře je uložena genetická informace v podobě DNA a probíhají v něm procesy replikace DNA, transkripce a sestřih mRN).



Obrázek 12: Struktura buněčného jádra (převzato z (Sazer *et al.*, 2018)).

Jádro je obklopeno jaderným obalem, který obsahuje jaderné póry důležité pro transport látek mezi jádrem a cytoplazmou (např. Ca^{2+} transportér). Vnější jaderná membrána je napojena na ribozomy endoplazmatického retikula, naopak vnitřní jaderná membrána obsahuje vlastní sadu proteinů a je lemována sítí

lamininových vláken. Nejvíce prominentní strukturou je jadérko, ve kterém probíhá syntéza a zpracování rRNA. Jádro také obsahuje trojrozměrnou fibrilární síť označovanou jako nukleoskeleton. Většina jaderných funkcí souvisí s touto strukturou (Wasag *et al.*, 2016).

Lokalizace buněčného jádra je velice důležitá pro popis buněčné integrity. Při různých patologických stavech se aktivují obranné buněčné mechanismy. Bez ohledu na mutace v DNA můžeme říci, že při akutním buněčném poškození se v prvních fázích aktivují rychlé obranné mechanismy (koncentrace antioxidantů). V pozdějších fázích se přidává velké množství dalších mechanismů ve snaze buňku vyvézt z patologického stavu. V poslední fázi dochází zpravidla k poškození jádra, které jak bylo zmíněno výše, je markerem pozdních stádií buněčného poškození. Poškození jaderné struktury můžeme pozorovat u toxického poškození, tedy zejména při apoptóze (Prokhorova *et al.*, 2015). Dále pak u řady nemocí, mezi které můžeme řadit Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu (Candy *et al.*, 1983). Poškození jádra je zpravidla spojeno v konečném důsledku s každým patologickým znakem. Podrobnější popis mechanismu a seznamu patologických stavů je nad rámec této práce.

V pozdějších fázích apoptózy dochází ke kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA. Kondenzace chromatinu je podmíněna aktivací kaspázy 6. Substrátem pro kaspázu 6 jsou jaderné lamininy, které zodpovídají za homogenitu jaderného chromatinu. Po rozvolnění lamininů působením kaspázy 6 dochází v konečném důsledku ke kondenzaci buněčného chromatinu. Kondenzovaný chromatin je využívaným markerem při detekci apoptotických buněk s využitím fluorescenčních technik (Ruchaud *et al.*, 2002).

Ke štěpení DNA dochází na fragmenty o velikosti 180-200 bp v místech mezi nukleosomy, proto jsou DNA fragmenty využívány jako markery apoptózy. Fragmentaci DNA zprostředkovává fragmentační faktor DNA (*DNA Fragmentation Factor*; DFF). Tento heterodimer je složen ze dvou podjednotek o velikosti 40 a 45 kDa. Katalytická podjednotka je štěpena pomocí kaspázy 3 za vzniku aktivního faktoru, který štěpí DNA bez potřeby dalších cytosolických proteinů (Liu *et al.*, 1997).

2.3.1 Vizualizace buněčného jádra



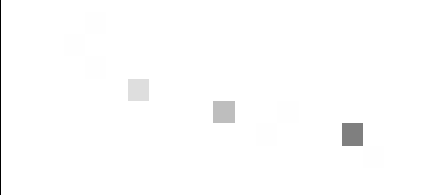
Pro detekci buněčného jádra existuje řada nejen fluorescenčních technik, které mají svou specifitu ve vazbě na nukleové kyseliny. Látky, které se používají pro lokalizaci jádra, mají podobnou specifitu vazby na vybrané báze nukleových kyselin. Rozdíl mezi nimi je zejména v jejich rozpustnosti, toxicitě a v neposlední řadě v použití u buněk živých či mrtvých. Fluorescenčních sond existuje celá řada, mezi nejpoužívanější patří sondy Hoechst, DAPI či propidium jodid.

2.3.1.1 Hoechst

Modré fluorescenční sondy Hoechst na bázi bisbenzimidů jsou rodinou lipofilních látek používaných pro barvení jaderné DNA. Rozlišujeme tři typy sond Hoechst: 33258, 33342, 34580. Hojně používaný Hoechst 33258 ((2-[2-(4-hydroxyfenyl)-6-benzimidazolyl-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazol]), stejně jako ostatní barvy Hoechst, se preferenčně a specificky váže do malé drážky DNA bohaté na adenin (A) a thymin (T), tedy do tzv. A-T oblasti (Martin *et al.*, 2005). Po vazbě na úseky jaderné DNA se stává fluorescenčním a vytváří jasnou lokalizaci DNA s vysokou specifitou z důvodu, že jeho vazba na jiné části buňky je minimální (Stokke *et al.*, 1985). Jedinou látkou, která zhasí barviva na bázi bisbenzimidů, je 5-bromouridin. Tohoto se využívá při stanovení obsahu bází A-T, kdy je 5-bromouridin inkorporován do chromosomů (Weisblum *et al.*, 1974). Ke zhasení, i když malému, může docházet při použití velké koncentrace sondy Hoechst 33258, kdy dochází k nespecifické vazbě. Nespecifická vazba může být do značné míry ovlivněna prostředím, kdy relativně nízká koncentrace ethanolu blokuje nespecifickou vazbu této sondy (Stokke *et al.*, 1985). Pro specifickou vazbu sond Hoechst jsou potřebné alespoň tři za sebou jdoucí páry A-T bází. Pokud je ve vazebném místě přítomna aminoskupina guaninu, k vazbě sondy nedojde (Loontjens *et al.*, 1990).

Hoechst 33342 (2'-[4-ethoxyfenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid trihydrát) je fluorescenční sonda, která se váže se stejnou specifitou do A-T oblasti DNA jako všechny ostatní sondy Hoechst. Mezi sondami Hoechst 33258 a 33342 jsou jen jemné odlišnosti, zejména co se týče toxicity. Pokud jsou buňky dlouhou dobu exponovány sondě Hoechst 33342, dojde k jejímu efluxu z buněk pomocí ABC transportérů (Canitrot *et al.*, 1996). Spektrální charakteristiky jsou také odlišné a jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Porovnání sond typu Hoechst (upraveno dle (Martin *et al.*, 2005; Thai *et al.*, 2016)).

Název sondy	Struktura	Rozpustnost v H ₂ O	Ex/Em (nm)
Hoechst 33258		Vysoká	352/461
Hoechst 33342		Nízká	361/497
Hoechst 34580		Nízká	392/440

2.3.1.2 DAPI

Lipofilní sonda DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) byla poprvé syntetizována a použita v roce 1971 (Dann O. *et al.*, 1971). Vazba DAPI do oblastí bohatých na A-T páry je velice specifická a dochází ke vzniku silně fluorescenčního komplexu. Pro vazbu této sondy je důležitá přítomnost alespoň 3-4 párů bazí A-T. K vazbě dochází v malé drážce DNA-helixu s velice vysokou afinitou vazby (Eriksson *et al.*, 1993). Detailní popis vazby byl sledován při vazbě DAPI na dodekamer [d(CGCGAATTCGCG)]₂, kde se nachází malá drážka centrální sekvence AATT (Larsen *et al.*, 1989). Možná vazba DAPI je i do smíšených párů A-T a G-C. Tato vazba není tak afinitní a fluorescence komplexu nevykazuje takovou intenzitu. Vazba DAPI je možná také při vizualizaci RNA, kde se sonda váže preferenčně do oblastí bohatých na A-U páry (Banerjee *et al.*, 2008). Při detekci komplexu DAPI s DNA sledujeme fluorescenční záření při 460 nm, maximální absorpce je při 358 nm. Rozdíl mezi sondou DAPI a Hoechst je v penetraci buněčnými membránami. Sonda Hoechst se využívá pro barvení jádra živých buněk, sonda DAPI pro barvení jádra buněk fixovaných (Otto, 1990).

2.3.1.3 Propidium jodid

Propidium jodid (3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-fenylfenantren diiodid; PI) je interkalační sonda, které se používá pro vizualizaci buněčného jádra. Jeho vazba na jednotlivé báze DNA je bez sekvenční preference a při vazbě připadá jedna molekula sondy na zhruba pět nukleových bazí. Po interkalaci do DNA dochází ke zhruba 30násobnému zvýšení fluorescence PI (Wang, 1974). Vizualizace jádra pomocí PI je využíváno zejména u poškozených buněk, které mají kondenzovaný chromatin a ztratily integritu membrán. Ztráta integrity membrán je důležitá pro prostup PI do buněk kvůli jeho velmi hydrofilním vlastnostem (Olive *et al.*, 1994). Použití této sondy je vhodné při detekci apoptotických buněk. Po interkalaci PI do DNA vzniklý komplex (PI/DNA) emituje záření 617 nm s excitací při 535 nm.

2.4 Reaktivní formy kyslíku

Volné radikály kyslíku, které jsou skupinou patřící do reaktivních forem kyslíku (*Reactive Oxygen Species*; ROS), jsou velmi zkoumanou skupinou látek. Historie jejich objevení se datuje k roku 1900. Podrobnější popis a mechanismus vzniku byl popsán roku 1954. Stále rostoucí studium jejich vzniku a mechanismu reakcí v organismu byly a jsou předmětem velkého počtu studií. Způsobeno to je zejména jejich klíčovou rolí ve fyziologických, ale i patologických procesech, kterých se účastní (Gomberg, 1990). Chemie kyslíku je velice obsáhlou oblastí chemie, a zároveň velice studovanou. Za inertnost molekulárního kyslíku (O_2) zodpovídá jeho elektronová struktura. Přesto, že O_2 obsahuje sudý počet elektronů, má ve svých molekulových orbitalech dva nepárové elektrony a nachází se v tripletovém stavu. Tyto dva nepárové elektrony mají stejné spinové kvantové číslo. Pokud dojde k oxidační reakci, je snahou O_2 přijmout dva elektrony spinově opačné, aby došlo k zaplnění volného místa v orbitalech.

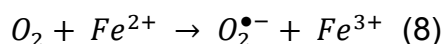
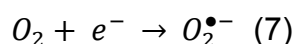
Obvykle jsou elektronové páry v atomech či molekulách antiparalelní, což silně omezuje oxidační vlastnosti O_2 . Nejčastější jsou jednoelektronové redukce O_2 , při kterých dochází ke vzniku superoxidu (Apel *et al.*, 2004; Cadenas, 1989). Postupnou redukcí tripletového kyslíku vznikají reaktivní formy (obrázek 13), které hrají důležitou úlohu i v patologii mnohých onemocnění. Jednoelektronová redukce O_2 za vzniku superoxidového radikálu ($O_2^{\bullet-}$) je první iniciační reakcí vzniku

dalších kyslíkových radikálů. Tato reakce je termodynamicky velice nepříznivá a pro překonání spinové restrikce je důležitá interakce O_2 s jiným paramagnetickým centrem.

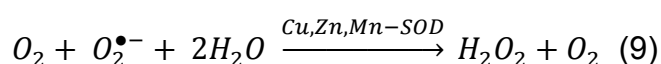


Obrázek 13: Vznik reaktivních forem kyslíku postupnou redukcí (převzato z (Apel et al., 2004)).

Jedná se zejména o dvojmocné kovy, které katalyzují jednoelektronovou redukcí za jejich současné oxidace (reakce 7 a 8).



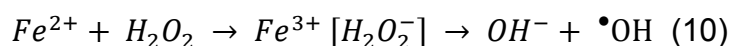
Superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$) vzniká především v mitochondriích a jeho reaktivita s biomolekulami je poměrně nízká. Mezi enzymy účastnicími se jeho vzniku řadíme např. xanthinoxidázu, lipooxygenázu či cyklooxygenázu (McIntyre et al., 1999). Superoxidový radikál může existovat ve dvou možných formách, a to ve formě $O_2^{\bullet-}$ nebo jako hydroperoxylový radikál (HO_2^{\bullet}). Ve formě hydroperoxylového radikálu existuje v prostředí s nízkým pH (Bielski B. H. J. et al., 1995) a proniká lépe skrze fosfolipidové dvojvrstvy ve srovnání s formou $O_2^{\bullet-}$, která je nabitá. Naopak v prostředí s fyziologickým pH je běžnější formou $O_2^{\bullet-}$ (Phaniendra et al., 2015). V další reakci může superoxidový radikál reagovat s dalším superoxidovým radikálem za vzniku peroxidu vodíku a O_2 (reakce 9). Tuto reakci katalyzuje enzym superoxidodismutáza (SOD) (Perry et al., 2010).



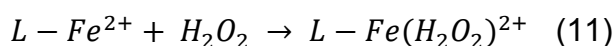
Superoxidový radikál je řazen mezi málo reaktivní formy kyslíku. Významným produktem dismutační reakce do které vstupuje $O_2^{\bullet-}$ je H_2O_2 . Ten se stává významným činitelem při vzniku nejreaktivnější formy v rámci skupiny ROS, kterou je hydroxylový radikál ($\bullet OH$).

Hydroxylový radikál je neutrální formou hydroxidového ionu. Řadí se mezi nejreaktivnější volné radikály. Může reagovat s celou řadou organických i anorganických sloučenin, mezi které můžeme řadit DNA, proteiny, lipidy a řadou dalších, což v konečném důsledku vede k vážnému buněčnému poškození (Andresen *et al.*, 2008). Hydroxylový radikál může vznikat jako produkt Fentonovy, nebo Haber-Weissovy reakce.

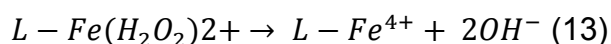
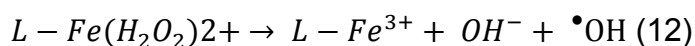
Základem Fentonovy reakce je reakce mezi H_2O_2 a Fe^{2+} . Železo je základní složkou řady proteinů, které se podílejí na přenosu či metabolismu kyslíku. Musí být transportováno a vždy přítomno pro případnou syntézu proteinů obsahujících železo. Důležitá je schopnost železa podstoupit cyklickou oxidaci a redukci. Ta, jako taková, může přímo vést ke vzniku volných radikálů, které mohou způsobit buněčné poškození v širokém rozsahu. Při reakci Fe^{2+} s H_2O_2 dochází ke vzniku oxidované formy železa (Fe^{3+}) a také $\bullet OH$ a OH^- (reakce 10).

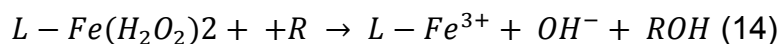


Nicméně z termodynamického hlediska je průběh reakce 11 energeticky velice náročný. Pravděpodobnější je vznik železnato-peroxidového komplexu. V reakci 11 železo vystupuje jako komplex s ligandem, kterým může být jakýkoliv biologický chelátor (ethylendiamintetraoctová kyselina, fosfát).



Při těchto reakcích dochází ke vzniku železnatých iontů s vyšším oxidačním číslem. Další reakce můžou proběhnout vznikem $\bullet OH$ (reakce 12), dále vznikem OH^- (reakce 13), nebo přímou oxidací substrátu (R) (reakce 14) (Lewis *et al.*, 2009; Phaniendra *et al.*, 2015).





Další možnou reakcí, při které dochází ke vzniku $\bullet OH$, je Haber-Weissova reakce. Při této reakci spolu reagují méně reaktivní $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 (reakce 15). Stejně jako při Fentonově reakci dochází ke vzniku velice toxického $\bullet OH$. Pro tuto reakci platí velice nepříznivé termodynamické podmínky, při kterých je ve vodném roztoku rychlostní konstanta blízká nulové hodnotě. Pro proběhnutí reakce je potřebná přítomnost přechodného kovu jako katalyzátoru. Zde jako katalyzátor slouží železo stejně jako tomu je u Fentonovy reakce. U obou těchto reakcí dochází ke vzniku vysoce reaktivního $\bullet OH$, který v konečném důsledku silně poškozuje buňky (Weinstein *et al.*, 1979).

Singletový kyslík (1O_2) je vysoce reaktivní forma kyslíku. Jedná se o vysoce excitovaný metastabilní stav molekulárního kyslíku. Singletový kyslík vzniká při fotochemických reakcích, nebo i fyziologicky v dýchacím řetězci mitochondrií. Při excitaci je molekulární kyslík excitovaný do prvního stavu $^1\Delta_g$ a poté do vyššího excitovaného stavu. V prvním excitovaném stavu ($^1\Delta_g$) má O_2 dva elektrony s opačným spinem ve stejném π orbitalu, zatímco ve vyšším excitovaném stavu má O_2 po jednom elektronu s opačným spinem v každém π orbitalu (Cadenas, 1989). První excitovaný stav je vysoce reaktivní. Takto excitovaný 1O vzniká i fyziologicky, např. při aktivaci neutrofilů a eozinofilů (Hampton *et al.*, 1998). Je to vysoce účinné oxidační činidlo, které může způsobit fatální poškození DNA (Sies *et al.*, 1992) či celých buněk (Kanofsky, 1989).

Peroxylový radikál (ROO^\bullet) vzniká z O_2 v živých systémech. Nejjednodušší formou peroxylového radikálu je HO_2^\bullet , který vzniká protonací superoxidu (De Grey, 2002). Okolo 0,3 % $O_2^{\bullet -}$ je v cytosolu buněk v protonované formě. Iniciuje peroxidaci mastných kyselin a může podporovat vznik nádorů (Phaniendra *et al.*, 2015).

Peroxid vodíku se tvoří přímo při dismutační reakci, kterou katalyzuje SOD. Neřadí se mezi volné radikály, ale je jednou z forem ROS, která proniká snadno membránami buněk. Poškození buňky může H_2O_2 způsobit i při velice nízkých koncentracích okolo 10 μM . Jeho vlivem nedochází k přímému poškození DNA, poškození DNA je způsobeno až díky $\bullet OH$, který vzniká z H_2O_2 v přítomnosti iontů přechodných kovů (Halliwell *et al.*, 2000). Mezi enzymy, které eliminují vzniklý H_2O_2 , řadíme katalázu, glutathionperoxidázu a peroxiredoxiny (Mates *et al.*, 1999).

Kyselina chlorná (HOCl) je hlavním oxidantem produkovaným aktivovanými neutrofily v místě zánětu z H_2O_2 a chloridových iontů (Cl^-). Tuto reakci katalyzuje enzym myeloperoxidáza (reakce 15). Kyselina chlorná je velice reaktivní látka, která se podílí na oxidačních a chloračních reakcích (Albrich *et al.*, 1981). Může oxidovat thioly, askorbát, urát, pyridin a řadu dalších sloučenin. V konečném důsledku může HOCl poškozovat DNA (Prutz, 1996).



Každý volný radikál i ostatní ROS mají omezenou dobu existence, která vždy závisí na okolních podmínkách a na povaze daného radikálu (tabulka 4).

Tabulka 4: Přehled reaktivních forem kyslíku (upraveno dle (Phaniendra *et al.*, 2015)).

Reaktivní forma kyslíku	Symbol	Poločas rozpadu
Superoxid	$O_2^{\bullet-}$	10^{-6} s
Hydroxylový radikál	$\bullet OH$	10^{-10} s
Alkoxylový radikál	$RO\bullet$	10^{-6} s
Peroxylový radikál	$ROO\bullet$	17 s
Peroxid vodíku	H_2O_2	Stabilní (x.s, min)
Singletový kyslík	1O_2	10^{-6} s
Ozón	O_3	1 s
Organický peroxid	ROOH	Stabilní (min)
Kyselina chlorná	HOCl	Stabilní (min)
Kyselina bromná	HOBr	Stabilní (min)

Kromě výše zmíněných ROS můžeme zvažit i vydělit také skupinu reaktivních forem dusíku (*Reactive Nitrogen Species*; RNS). Hrají roli jak při fyziologických procesech nutných pro zachování homeostázy či signalizace, tak v patologických procesech. V biologických systémech je primárním zdrojem všech RNS oxid dusnatý, který je syntetizován za účasti NO-syntetáz. Nejvýznamnějšími reakcemi NO jsou reakce s přechodnými kovy (Fe^{2+} , Cu^{2+}), proteiny, jinými volnými radikály či kyslíkem. Při reakci NO s $O_2^{\bullet-}$ dochází ke vzniku peroxydusitanu ($ONOO^-$). Ten je velice nestabilní a produktem rozpadu je dusičnan, který je v biologických systémech inertní a z tohoto důvodu je tato reakce vynikající pro zachycení a neutralizaci $O_2^{\bullet-}$ (Patel *et*

al., 1999). Na druhou stranu NO hraje významnou roli při reakci s hemoglobinem v erythrocytech za vzniku methemoglobinu. Reaktivita RNS je obdobná jako u ROS s ohledem na skutečnost, že ROS vznikají v daleko větší koncentraci (Patel *et al.*, 1999).

2.4.1 Zdroje reaktivních forem kyslíku

Reaktivní formy kyslíku vznikají jako výsledek metabolických pochodů. Buněčných částí, kde ROS vznikají, je celá řada. Vzhledem k velmi rychlému obratu kyslíku mezi ně řadíme mitochondrie, dále pak peroxisomy a endoplazmatické retikulum. Zdroje ROS mohou být samozřejmě i exogenní.

2.4.1.1 Mitochondrie

Mitochondriálnímu elektronovému transportnímu řetězci (ETC) byla jako prvnímu přisuzována role generátora ROS v buňkách. Při transportu elektronů některé z elektronů z ETC redukují O_2 , který je ve vysoké koncentraci přítomen na $O_2^{\bullet-}$ (Loschen *et al.*, 1971). Takto vzniklý $O_2^{\bullet-}$ je velmi rychle dismutován pomocí mitochondriální superoxiddismutázy (Mn-SOD) za vzniku H_2O_2 (Loschen *et al.*, 1974). Mitochondriální ETC je složen z několika elektronových transportérů (flavoproteiny, proteiny obsahující železo a síru, ubichinon a cytochromy) s redox potenciály v rozmezí $-0,200$ až $+0,600$ V (Ballard *et al.*, 2015). Podle příslušných redox potenciálů jsou jednotlivé elektronové nosiče uspořádány do jednotlivých komplexů dýchacího řetězce I–IV. Elektrony, které jsou do dýchacího řetězce dopravovány ve formě redukčních ekvivalentů NADH či $FADH_2$, vstupují skrz komplexy I a II. Postupně jsou předávány až do posledního komplexu IV, kde redukují O_2 za H_2O . Termodynamicky by však všechny tyto elektronové transportní systémy mohly přenést elektron rovnou na O_2 a redukovat ho na $O_2^{\bullet-}$. Ve skutečnosti jsou v dýchacím řetězci pouze dvě hlavní místa, kde dochází ke generaci ROS. Jsou to komplex I a III (Kushnareva *et al.*, 2002).

V komplexu III jsou známa dvě specifická vazebná místa pro koenzym Q_{10} , a to Q_i a Q_o . Produkce $O_2^{\bullet-}$ je situována do místa Q_o . Při přidání antimycinu A jako inhibitoru místa Q_i se produkce $O_2^{\bullet-}$ zvyšuje (Wikstrom *et al.*, 1972), naopak při přidání inhibitoru myxothiazolu pro místo Q_o se produkce ROS snižuje (Muller *et al.*, 2002). Za fyziologických podmínek produkce ROS na komplexu III závisí

na mitochondriálním membránovém potenciálu ($\Delta\Psi$). Rychlost tvorby $O_2^{\bullet-}$ se může exponenciálně zvyšovat s rostoucím $\Delta\Psi$ (obrázek 14). Toto přímo koreluje se skutečností, že vlivem fluktuací $\Delta\Psi$ dochází ke zpomalení transportu elektronů z hemu b_L na hem b_H . Hem b_L se poté nachází ve více redukovaném stavu ve srovnání s hemem b_H a dochází ke zvýšené produkci $O_2^{\bullet-}$ (Bleier *et al.*, 2013).



Obrázek 14: Faktory a komplexy dýchacího řetězce účastníci se tvorby superoxidového radikálu v komplexu III (převzato z (Bleier *et al.*, 2013)). Zkratky: $\Delta\Psi$ – mitochondriální membránový potenciál; SOD – superoxid dismutáza.

V komplexu I dochází při produkci $O_2^{\bullet-}$ k reakci mezi O_2 a redukovanou formou flavinmononukleotidu (FMN). Množství redukovaného FMN závisí na poměru $NADH/NAD^+$ (Murphy, 2009).

2.4.1.2 Peroxisomy a endoplazmatické retikulum

V peroxisomech je hlavním metabolickým procesem, který produkuje H_2O_2 , β -oxidace mastných kyselin, ato přesně acyl-CoA-oxidáza. Mezi další enzymy, které se účastní tvorby ROS, patří urát oxidáza, D-aspartát oxidáza či xanthin oxidáza (Phaniendra *et al.*, 2015).

Endoplazmatické retikulum přispívá produkcí ROS nezanedbatelně díky enzymům cytochromu P450. Dalším velice významným enzymem, který katalyzuje přenos elektronů z dithiolů na O_2 za vzniku H_2O_2 , je thioloxidáza Erop1p (Gross *et al.*, 2006).

2.4.1.3 Exogenní induktory volných radikálů

Mezi exogenní induktory ROS řadíme poluce ve vodě či vzduchu, kouření, ultrafialové záření, pesticidy, vysoká teplota, alkohol a řadu dalších. Všem těmto exogenním zdrojům jsme každý den vystaveni a v našem těle se tvoří velké množství ROS. Tyto ROS jsou specifickými antioxidantními enzymy odbourávány za vzniku neškodných produktů. Všechny tyto reakce velice zatěžují metabolismus a vždy je jen otázkou času, kdy dojde vlivem ROS k vážnějšímu buněčnému poškození (Ziech *et al.*, 2010).

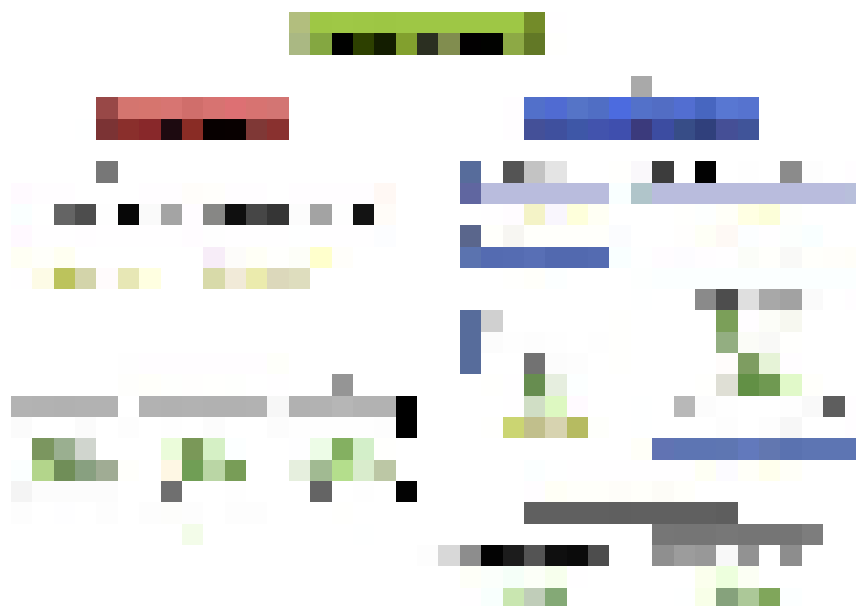
2.4.2 Reaktivní formy kyslíku ve fyziologických procesech

Reaktivní formy kyslíku a dusíku se kromě své patologické participace účastní i fyziologických procesů nutných pro zajištění homeostázy. Jsou známy růstové faktory a cytokiny, které spouštějí produkci ROS v nefagocytárních buňkách díky příslušným receptorům. Takto vzniklé ROS zprostředkovávají zpětnovazebný účinek na signální transdukcii z těchto receptorů. Úloha ROS byla prokázána u signalizace nervového růstového faktoru (Martorana *et al.*, 2018) či epidermálního růstového faktoru (Weng *et al.*, 2018). U inzulínového receptoru hraje významnou roli H_2O_2 , který u intaktních buněk indukuje podobné účinky jako inzulín. Dále pak změny v cytosolární koncentraci Ca^{2+} hrají významnou roli při modulaci řady intracelulárních signálních drah, včetně drah závislých na kalmodulinu. Řada těchto signálních drah je zapojena i do procesu apoptózy. Hladina cytosolárního Ca^{2+} může být zvýšena právě prostřednictvím ROS mobilizací intracelulárních zásob Ca^{2+} (Droge, 2002). V neposlední řadě hrají ROS svoji úlohu i při aktivaci mitogen aktivovaných proteinových kináz (*Mitogen-Activated Protein Kinases*; MAPK) (Son *et al.*, 2013), proteinkinázy C (Wu *et al.*, 2006) či transkripčního faktoru NF- κ B (Morgan *et al.*, 2011).

2.4.3 Antioxidační výbava buněk

Vzhledem k množství reaktivních forem kyslíku a dusíku, které vznikají jak fyziologicky, tak i patologicky, je potřebná přítomnost látek nacházejících se v buňkách, které koncentrace ROS i RNS modulují. Látky snižující koncentrace ROS a RNS se nazývají antioxidanty a známe jich celou řadu. Jedním z hlavních antioxidantních enzymů je superoxiddismutáza (SOD). Jedná se o skupinu

multimerních metaloproteinů, které se účastní vylučování $O_2^{\bullet-}$. Existuje řada isoformů SOD, mezi které řadíme Cu/Zn-SOD (dimer), Fe-SOD (dimer) a Mn-SOD (tetramer). Pouze Cu/Zn-SOD a Mn-SOD se nacházejí v buněčné výbavě eukaryotických buněk (Scandalios, 1993).



Obrázek 15: Přehled enzymatických a neenzymatických antioxidantů (převzato z (Carocho *et al.*, 2013)).

Dalším enzymem je kataláza (CAT), která katalyzuje rozklad H_2O_2 na H_2O a O_2 . Reakce, při kterých vystupuje CAT, jsou velice rychlé a jedna molekula CAT dokáže katalyzovat rozpad milionů molekul H_2O_2 za minutu (Suttorp *et al.*, 1986). Kyselina močová je konečným produktem metabolismu purinů u lidí. S biologicky aktivními oxidanty je schopna tvořit alantoin (Kand'ar *et al.*, 2006). Mezi další antioxidanty řadíme glutathion, flavonoidy, karotenoidy, minerály a řadu dalších, jejichž přehled je uveden na obrázku 15 (Carocho *et al.*, 2013; Winyard *et al.*, 2005).

2.4.4 Detekce reaktivních forem kyslíku

2.4.4.1 MitoSox

Hydroethidium (HE) je selektivní sonda pro detekci $O_2^{\bullet-}$, která reaguje velice rychle na změny koncentrace $O_2^{\bullet-}$ a tvoří s ním červený fluorescenční produkt 2-hydroxyethidiový kation ($2-OH-E^+$). Hydroethidin je redukováná forma ethidia, která může být v buňkách oxidována na ethidium. Vzniklé ethidium interkaluje

nukleové kyseliny, což významně zvyšuje jeho fluorescenci emitovanou při 610 nm s excitací při 535 nm (Zielonka *et al.*, 2008).

Pro potřeby detekce $O_2^{\bullet-}$, který je tvořen v mitochondriích, byl syntetizován nový analog hydroethidinu. Tento analog nese nabitý trifenylofosfoniový zbytek (Mito-HE; Mito-Sox Red). Protože je fosfoniový zbytek kladně nabitý a obklopen třemi lipofilními fenylovými skupinami, velice snadno proniká přes buněčné membrány a to hlavně přes vnitřní mitochondriální membránu. Po prostupu buněčnými membránami se hromadí v mitochondriích v závislosti na negativním $\Delta\Psi$ (Robinson *et al.*, 2006). Důležité je, že redistribuce MitoSox z mitochondrií je závislá na snižujícím se $\Delta\Psi$ na základě různých stimulů, kterými nemusejí být ROS. Z tohoto důvodu se při použití MitoSox jedná o test semi-kvantitativní. Velice důležitý je fakt, kdy dojde k prostupu MitoSox z mitochondrií do cytoplazmy, kde je vyšší nabídka nukleových kyselin, dochází ke zvýšení fluorescence. Tato zvýšená fluorescence je tedy nezávislá na mitochondriální produkci ROS, což může výsledky jednotlivých měření zkreslovat. Při vzniku oxidačních produktů MitoSox v mitochondriích může docházet ke změnám hodnot $\Delta\Psi$, což může snížit vstup dalších molekul MitoSox do mitochondrií a celkově ovlivnit měření z důvodu poklesu koncentrace MitoSox a ROS, které nejsou díky rozpojení dýchacího řetězce produkovány (Roelofs *et al.*, 2015). Fluorescenční produkt emituje záření při 580 nm s excitací při 540 nm.

2.4.4.2 2,7-dichlórodihydrofluorescein

Sonda 2,7-dichlórodihydrofluorescein (DCFH) je specifický indikátor přítomnosti H_2O_2 . Mezi další ROS, které dokáží oxidovat DCFH na fluorescenční produkt DCF, patří i hydroxylový ($\bullet OH$), peroxylový ($ROO\bullet$) radikál a oxid dusnatý ($NO\bullet$). Diacetátová forma DCFH (DCFH-DA) je využívána pro detekci ROS u buněk díky schopnosti penetrovat buněčné membrány díky přítomnosti acetátu. Dvě acetátové skupiny jsou po prostupu DCFH-DA do buněk hydrolyzovány pomocí intracelulárních esteráz. Pro oxidaci DCFH pomocí H_2O_2 je důležitá přítomnost peroxidáz. Mezi další látky schopné oxidovat DCFH patří hematin či cytochrom c (Royall *et al.*, 1993). Právě z důvodu katalýzy oxidace DCFH pomocí cytochromu c je nutné při testování apoptózy přistupovat k měření s jistou dávkou opatrnosti, protože při apoptóze dochází ke zvýšení cytosolické koncentrace cytochromu c, což může zvýšit fluorescenci této sondy bez jakékoliv produkce H_2O_2 (Gomes *et al.*, 2005). K oxidaci DCFH dochází také působením H_2O_2 v přítomnosti Fe^{2+} , což je ale

nejspíše způsobeno vznikajícím $\cdot\text{OH}$. Naopak $\text{O}_2^{\bullet-}$ není schopen oxidovat sondu DCFH (Crow, 1997). Za přítomnosti viditelného světla nebo ultrafialového záření může docházet k fotoredukci DCF (obrázek 16).



Obrázek 16: Deacetylace lipofilní sondy DCFH-DA a následná oxidace DCFH na fluorescenční produkt DCF spolu s možným vznikem semichinonové formy $\text{DCF}^{\bullet-}$ (převzato z (Gomes et al., 2005)).

Při tomto redukčním mechanismu dochází ke vzniku semichinonového radikálu ($\text{DCF}^{\bullet-}$), který při reakci s O_2 dává vznik $\text{O}_2^{\bullet-}$. Dismutací $\text{O}_2^{\bullet-}$ vzniká H_2O_2 , který poté uměle zvyšuje oxidaci DCFH. V důsledku oxidace DCFH dochází ke vzniku fluorescenčního produktu DCF, který vykazuje silnou fluorescenci. Tato skutečnost uměle navyšuje intenzitu fluorescence produktu DCF a dává falešně pozitivní výsledek (Chignell et al., 2003). Fluorescenční produkt emituje fluorescenční záření při 522 nm s excitací při 498 nm.

2.4.4.3 5,6-chlórmetyl-2',7'-dichlórodihydrofluorescein diacetátu

Sonda 5,6-chlórmetyl-2',7'-dichlórodihydrofluorescein diacetát (CM- H_2DCFDA) se využívá pro detekci produkce ROS. Použití sondy CM- H_2DCFDA je velice snadné a použitelné u všech buněčných linií. Nevýhodou je nespecifita určení daného typu ROS. Z tohoto důvodu se používá pouze pro stanovení hladin oxidantů v buňkách. Sonda CM- H_2DCFDA je diacetátová forma a tak stejně jako v případě

sondy DCFH dochází po prostupu do buněk k deacetylaci pomocí intracelulárních esteráz. Následně oxidací pomocí ROS vzniká fluorescenční produkt CM-DCF. Pro kvantitativní stanovení je vhodné využít konfokální laserový mikroskop nebo spektrofluorimetr. Fluorescenční produkt emituje záření při 527 nm s excitací při 492 nm. Při excitaci je nutné volit intenzitu záření co nejnižší z důvodu možné fotooxidace (Oparka *et al.*, 2016).

2.4.4.4 Amplex Red

Amplex Red (N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin) je nefluorescenční molekula, která je oxidována pomocí H_2O_2 v přítomnosti křenové peroxidázy (HRP) na vysoce fluorescenční produkt resorufin (obrázek 17), který emituje při 587 nm s excitací 563 nm. Amplex Red reaguje se stechiometrickým množstvím H_2O_2 . Může být také použita pro detekci $\text{O}_2^{\bullet-}$ ve směsi se SOD, která konvertuje $\text{O}_2^{\bullet-}$ na H_2O_2 . Fluorescence pozadí při měření je velice nízká a vzniklý fluorescenční produkt je velice stabilní.



Obrázek 17: Oxidace sondy Amplex Red na fluorescenční (resorufin) a nefluorescenční (resazurin) produkt (převzato z (Towne *et al.*, 2004)).

Tyto vlastnosti zvyšují citlivost měření. Významná ztráta fluorescence může být způsobena oxidací resorufinu na nefluorescenční produkt resazurin. Tuto reakci katalyzuje také HRP (Towne *et al.*, 2004).

2.4.4.5 1,3-difenylišobenzofuran

Sonda 1,3-difenylišobenzofuran (DPBF) je molekula, která při inkorporaci do fosfolipidů lipozómů nabývá fluorescenčních vlastností. Používá se pro detekci $\text{O}_2^{\bullet-}$ a $^1\text{O}_2$, se kterými reaguje a dochází ke snížení intenzity fluorescence. Míra fluorescence nepřímě koreluje s rostoucí koncentrací $\text{O}_2^{\bullet-}$ a $^1\text{O}_2$ (Ohyashiki *et al.*, 1999).

2.4.4.6 2-(2-pyridil)-benzothiazolin

Sonda 2-(2-pyridil)-benzothiazolin je používána pro detekci $O_2^{\bullet-}$. Často je této sondy používáno i pro popis SOD aktivity v buňkách. Molekula 2-(2-pyridil)-benzothiazolinu je nefluorescenční forma, která po reakci se $O_2^{\bullet-}$ tvoří silně fluorescenční produkt 2-(2-pyridil)-benzothiazol (obrázek 18) (Tang *et al.*, 2004).



Obrázek 18: Reakce 2-(2-pyridil)-benzothiazolinu se superoxidovým radikálem (převzato z (Gomes *et al.*, 2005)).

2.4.4.7 Ostatní fluorescenční sondy pro detekci ROS

Fluorescenčních sond používaných pro detekci ROS existuje nepřehledné množství. Kromě výše jmenovaných se můžeme setkat se skopoletinem (7-hydroxy-6-methoxy-kumarin), který se používá pro detekci H_2O_2 (Corbett, 1989). Dále pak uplatnění našla homovanilická kyselina, která je produktem metabolismu dopaminu v mozku. V prostředí s H_2O_2 a HRP tvoří vysoce fluorescenční dimer (Barja, 2002). Pro detekci 1O_2 je využíván 9,10-dimethylantracen, který po reakci se 1O_2 vytváří vysoce fluorescenční produkt 9,10-endoperoxid (Lavi *et al.*, 2002). V neposlední řadě se jedná o sondy detekující $^{\bullet}OH$, mezi které řadíme 1,3-cyklohexandion (Tai *et al.*, 2002), tereftalát sodný (Tang *et al.*, 2005) či kumarin-3-karboxylovou kyselinu (Manevich *et al.*, 1997).

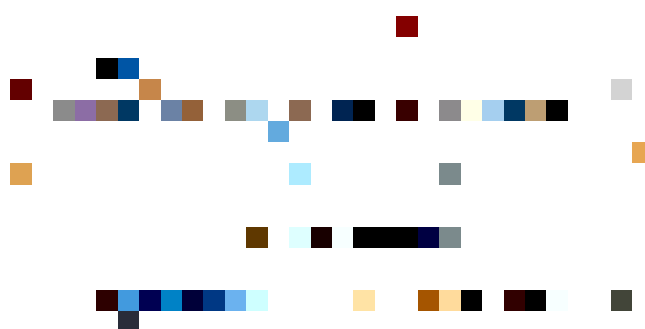
2.5 Glutathion

Glutathion (GSH) je tripeptid (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycin), který je přítomný v buňkách rostlin, u hub i živočichů. Jedná se o velice účinný antioxidant, zejména ve vztahu k jeho poměrně vysoké koncentraci v savčích buňkách (1–10 mM). Takto vysoké koncentrace GSH jsou především v jaterních buňkách (hepatocyty) a jedná se tedy o nejhojnější neproteinový thiol. V játrech se GSH účastní řady detoxikačních reakcí a dále moduluje buněčnou proliferaci (Aw, 2003), apoptózu (Franco *et al.*,

2009) či imunitní funkce (Droge *et al.*, 2000). Glutathion je velice významná molekula, která se stala předmětem řady studií, zejména ve vztahu ke stanovení intracelulární koncentrace GSH, která je velice významným ukazatelem stavu buněk (Forman *et al.*, 2009).

2.5.1 Struktura a funkce glutathionu

Glutathion se vyskytuje ve dvou formách. První je redukovaná forma GSH, druhou formou je oxidovaná forma (GSSG). Redukovaná forma GSH je převládající formou a tvoří více než 98 % (obrázek 19). V eukaryotických buňkách existují tři hlavní rezervoáry GSH. Většina buněčného GSH se nachází v cytosolu (80–85 %). V mitochondriích se nachází 10–15 % GSH a malé procento GSH je v endoplazmatickém retikulu (Meredith *et al.*, 1982).



Obrázek 19: Struktura glutathionu (převzato z (Lu, 2009)).

Glutamát a cystein jsou v GSH spojeny unikátní γ -karboxylovou vazbou místo obvyklé α -karboxylové. Z tohoto důvodu je vazba mezi těmito dvěma aminokyselinami velice pevná a jediný enzym, který může tuto vazbu narušit, je velice specifická γ -glutamyltranspeptidáza (γ -glutamyltransferáza; GGT). Díky této vazbě je GSH rezistentní vůči intracelulární degradaci a může být metabolizován pouze extracelulárně, protože enzym GGT je buňkami exprimován pouze na vnější buněčné membráně (Meister *et al.*, 1983).

2.5.2 γ -glutamylový cyklus

Glutathion je syntetizován intracelulárně působením příslušných enzymů. Prvním enzymem při syntéze GSH je γ -glutamylcysteinsyntetáza (glutamát-cysteiniligáza; GCL) a GSH-syntetáza (obrázek 20: reakce 1 a 2). GCL katalyzuje

vznik γ -glutamylcysteinu z glutamátu a cysteinu. Enzym GCL je heterodimer složený z těžké (GCLc, 73 kDa) a lehké (GCLm, 31 kDa) podjednotky. Těžká, katalytická podjednotka obsahuje aktivní místo pro zpětnovazebnou inhibici tohoto enzymu pomocí GSH a obsahuje v aktivním centru metaloprotein se Zn. Lehká, modulační podjednotka plní regulační funkci formou modulace kinetických vlastností GCL (Griffith *et al.*, 1999). Poměr podjednotek GCLc/GCLm nemusí být vždy uvnitř buňky ekvimolární. Jejich relativní poměry se mohou měnit vlivem různých oxidačních stresorů (Toroser *et al.*, 2006). GSH-syntetáza je homodimer (118 kDa) a katalyzuje připojení glycinu k γ -glutamylcysteinu za vzniku GSH (Dickinson *et al.*, 2002).



Obrázek 20: Metabolismus glutathionu (převzato z (Meistner, 1995)). Reakce: 1 - γ -glutamylcysteinsyntetáza; 2 - GSH-syntetáza; 3 - γ -glutamyltransferáza; 4 - dipeptidáza; 5 - γ -glutamylcyklotransferáza; 6 - 5-oxo-prolináza; 7 - glutathion-S-transferáza; 8 - dipeptidáza; 9 - glutathionperoxidáza; 10 - glutathiontranshydrogenáza; 11 - reakce GSH s volnými radikály; 12 - glutathionereduktáza.

Degradace GSH a GSSG je katalyzována pomocí GGT (obrázek 20: reakce 3) a následně je γ -glutamyl přenesen na příslušné akceptory, kterými jsou cystin, glutamin, methionin, H_2O či samotný GSH. Přes buněčné membrány transportovaný

GSH se na vnější membráně setkává s GGT, která je exprimovaná právě tam. Produktem reakce GSH s GGT jsou γ -glutamylované aminokyseliny a cysteinylglycin (obrázek 20: reakce 13). Vzniklé γ -glutamylované aminokyseliny jsou transportovány zpět do buněk. Intracelulární γ -glutamylové aminokyseliny jsou substráty pro enzym γ -glutamylcyklotransferázu, která je konvertuje na odpovídající aminokyseliny a 5-oxo-L-prolin. Konverze 5-oxo-L-prolinu na L-glutamát je závislá na ATP a katalyzována intracelulárním enzymem 5-oxo-prolinázou (obrázek 20: reakce 6). Cysteinylglycin, který je produktem transpeptidázové reakce, je štěpen dipeptidázou (obrázek 20: reakce 4). Všechny výše popsané reakce představují γ -glutamylový cyklus, který je zodpovědný za syntézu GSH (Meistner, 1995).

Jednotlivé produkty reakcí mohou dále reagovat s různými látkami. Vzniklý GSH může reagovat neenzymaticky s elektrofilními sloučeninami či glutathion-S-transferázami (obrázek 20: reakce 7) za vzniku S-substituovaných derivátů GSH. S-substituované cysteinylglyciny jsou zpracovávány dipeptidázami za vzniku příslušných S-substituovaných cysteinů, které mohou podstoupit N-acetylaci, nebo další transpeptidaci za vzniku γ -glutamylového derivátu (obrázek 20: reakce 4 a 8) (Meister *et al.*, 1983).

2.5.3 Antioxidační funkce glutathionu

Antioxidační funkce GSH jsou do značné míry reprezentovány reakcemi katalyzovanými glutathionperoxidázami (GPx). Tyto peroxidázy degradují H_2O_2 a peroxidy lipidů za současně oxidace GSH na GSSG. Takto vzniklá oxidovaná forma (GSSG) je zpětně redukována na GSH pomocí glutathionreduktáz za spotřeby NADPH (obrázek 21). Tento sled reakcí tvoří tzv. redoxní cyklus. Organické peroxidy mohou být redukovány také GPx nebo GSH-S-transferázami. Kataláza je další enzym, který snižuje koncentraci H_2O_2 , ovšem její výskyt je majoritně v peroxisomech. Z tohoto důvodu je GSH velice důležitý v mitochondriích při obraně proti fyziologicky i patologicky generovanému oxidačnímu stresu (Lu, 2009). Oxidovaná forma (GSSG) může být aktivně transportována z buňky nebo reagovat se sulfhydrylovou skupinou proteinů vedoucí k tvorbě smíšeného disulfidu. Z výše napsaného vyplývá, že těžký oxidační stres způsobuje depleci intracelulárního GSH (Lu, 2009).

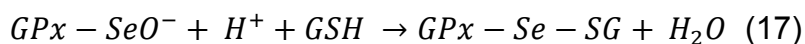


Obrázek 21: Reakce GSH při antioxidační ochraně buněk (převzato z (Balendiran *et al.*, 2004)).
Zkratky: RSH – thiohy; Se- Selen; NADPH – nikotinamidadeninukleotid (redukovaná forma).

2.5.3.1 Glutathionperoxidáza

Glutathionperoxidázy (GPx) patří do rodiny fylogeneticky příbuzných enzymů. Savčí GPx jsou selenoproteiny se selenocysteinem v katalytickém centru (GPx1–GPx4), naopak GPx6 je selenoprotein vyskytující se pouze u lidí. Celkem je známo osm enzymů GPx (Surai *et al.*, 2018). Lokalizace jednotlivých GPx se liší, GPx1 se vyskytuje v cytosolu a mitochondriích, GPx2 ve střevním epitelu, GPx3 v plazmě a všechny tyto tři izoformy GPx se vyskytují ve vodné fázi. Naopak izoforma GPx4 chrání buněčné membrány před oxidačními účinky různých látek. Všechny tyto izoformy, včetně GPx6 jsou selenoproteiny. Ostatní GPx (GPx5, GPx7 a GPx8) obsahují cystein (Kryukov *et al.*, 2003). Katalytické centrum GPx obsahuje aminokyseliny, mezi které patří cystein (selenocystein), glutamin, tryptofan a asparagin (Tosatto *et al.*, 2008). Mezi homotetramery řadíme GPx (1, 2, 3, 5 a 6), mezi monomery řadíme GPx (4, 7 a 8). Homotetramerické enzymy reagují zejména s hydroperoxidy, naopak monomerické enzymy reagují s komplexnějšími lipidovými hydroperoxidy (Takebe *et al.*, 2002).

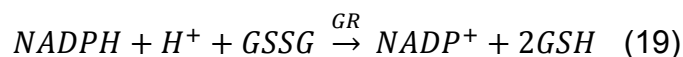
GPx obsahující selenocystein (Se-GPx) reagují ve formě selenolátu s H_2O_2 za vzniku kyseliny selenenové, která je redukována zpět na selenolát pomocí dvou molekul GSH (reakce 16, 17 a 18) (Toppo *et al.*, 2009).



GPx, které ve své molekule obsahují cystein (Cys-GPx), mají odlišný reakční mechanismus ve srovnání s Se-GPx. Aktivní místo Cys-GPx je stejně jako u Sec-GPx lokalizováno ve specifickém motivu blízko N-konce a pomocí H₂O₂ se oxiduje na sulfenovou kyselinu.

2.5.3.2 Glutathionreduktáza

Glutathionreduktáza (GR; EC 1.8.1.7) je velice silně substrátově specifický enzym patřící do skupiny pyridinnukleotiddisulfidových oxidoreduktáz. Tyto oxidoreduktázy patří do rodiny flavoenzymů, které hrají zásadní roli při katalýze redukce GSSG na GSH (reakce 19). Tato reakce je zprostředkována pomocí GR a redukčním ekvivalentem NADPH. Enzym GR je homodimer (100–120 kDa), který se skládá ze dvou podjednotek uspořádaných do motýlkové konformace s FAD, která plní úlohu prostetické skupiny (Berkholz *et al.*, 2008). Každá z podjednotek je tvořena čtyřmi doménami, kde se nachází katalytické místo směrem od N k C konci polypeptidového řetězce, vazebné místo pro FAD a vazebné místo pro NADPH. Domény FAD a NADPH jsou velice blízko sebe a transport elektronů s H⁺ je veden přes dvě specifická místa flavinu (*re* a *si* místo). Redukční ekvivalent NADPH je v blízkém kontaktu se isoalloxizalovým kruhem flavinu (Picaud *et al.*, 2002). Během redoxního cyklu dochází k transformaci elektronů z NADPH na FAD, což je zprostředkováno disulfidickým mostem mezi cysteinem 58 a cysteinem 63. Poté reaguje GSSG s redoxním aktivním místem enzymu GR, kde produktem reakce jsou dvě molekuly GSH (Ithayaraja, 2011).



2.5.4 Glutathion-S-transferázy

Glutathion-S-transferázy (GST; EC 2.5.1.18) zahrnují velkou supergenovou rodinu a jsou kódovány minimálně na sedmi chromozómech. Funkcí GST enzymů je

katalýza konjugace elektrofilních substrátů s GSH v rámci detoxikačních reakcí (obrázek 22). Konkrétně mezi důležité substráty GST patří polycyklické aromatické uhlovodíkové epoxidy odvozené z katalytických reakcí cytochromu P-450, či produkty oxidačního stresu (Strange *et al.*, 2001). Při detoxikaci dochází k reakci mezi elektrofilem a -SH skupinou GSH. Touto reakcí dochází k neutralizaci elektrofilních míst těchto sloučenin za vzniku produktů rozpustnějších ve vodě. Konjugáty GSH jsou dále metabolizovány štěpením glutamátových a glycinových zbytků. Dále jsou pak volné aminokyselinové skupiny acetylovány za vzniku cysteinylového zbytku a v konečné fázi kyseliny merkapturové. Tyto S-alkylované deriváty N-acetylcysteinu jsou pak vylučovány z těla (Armstrong, 1991).



Obrázek 22: Detoxikace xenobiotik konjugací s GSH (převzato z (Townsend *et al.*, 2003)).

2.5.5 Ostatní funkce glutathionu

Úloha GSH je kromě výše zmíněného také v buněčné signalizaci, genové expresi či apoptóze (Blackburn *et al.*, 1999). Dále se GSH účastní např. interakcí s proteiny či buněčné proliferace. Řada proteinů v našem těle (fosforyláza, kreatinkináza a další) jsou ve glutathionylované formě, která je pro jejich správné fungování nezbytná. Při kancerogenezi se GSH účastní modulace imunitní reakce, ale může plnit i patogenní roli, ve smyslu protektivní látky rakovinových buněk (Balendiran *et al.*, 2004). V neposlední řadě plní GSH funkci rezervoáru L-cysteinu. Denní obrat lidského těla GSH činí zhruba 40 mmol/l a z tohoto důvodu je nutná

přítomnost L-cysteinu ve formě cystinu vždy v poměrně vysoké koncentraci (Stipanuk *et al.*, 2006).

2.5.6 Detekce glutathionu

Pro detekci GSH je možné použití široké řady metod, mezi které patří díky své velké specifitě a citlivosti metody kapalinové chromatografie (Amarnath *et al.*, 2003; Shackman *et al.*, 2007), dále hmotnostní spektrometrie (Dieckhaus *et al.*, 2005), plynová chromatografie (Kataoka *et al.*, 1995), elektrochemické metody (Kominkova *et al.*, 2015). Nejčastější metody pro detekci GSH jsou založeny na spektrofotometrické detekci, kde GSH reaguje s kyselinou 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou (Ellman, 1959). V neposlední řadě jsou často používány heterocyklické fluorescenční bimany (Kamencic *et al.*, 2000; Kosower *et al.*, 1978) a o-ftalaldehyd (Rousar *et al.*, 2012).

2.5.6.1 Monochlorobiman a monobromobiman

Monobromobiman (MBB) a monochlorobiman (MCB) jsou heterocyklické fluorescenční sondy užívané zejména pro detekci intracelulární koncentrace GSH (Fernandezcheca *et al.*, 1990; Kamencic *et al.*, 2000; Kosower *et al.*, 1978).

Sonda MBB je využívána pro detekci intracelulární koncentrace thiolů, tedy zejména GSH (Sebastia *et al.*, 2003), dále pak hemoglobinu červených krvinek (Kosower *et al.*, 1979; Kosower *et al.*, 1980) či sulfanu. Je známo několik různých forem MBB, které se od sebe liší převážně svou rozpustností ve vodě (Wintner *et al.*, 2010).

Specifita vazby MBB je zaměřena pouze na thiolovou skupinu cysteinu, který je součástí proteinů. Pomocí MBB nelze detekovat specifický tripeptid (např. GSH), ale sumu všech sloučenin obsahujících cystein (Sebastia *et al.*, 2003). Při reakci MBB s thiolovou skupinou se jedná o nukleofilní substituční reakci, ve které je fluorescenční thioether tvořen thiolátem a nefluorescenčním bromalkanem. Reakční produkt s GSH má maximální absorpci při 390 nm, která je nepříliš odlišná od maximální absorpce MBB při 396 nm. Na druhou stranu intenzivní emise fluorescence produktu při 482 nm je řádově vyšší než emise fluorescence samotné sondy MBB. Výsledný fluorescenční produkt je ve srovnání s nefluorescenční MBB silně hydrofilní (reakce 20).



V rovnici 20 je zobrazena reakce mezi MBB a thiolem. Prvním krokem této reakce je vytěsnění bromu thiolem. Ve druhém kroku může bromid reagovat s méně reaktivní nukleofilní skupinou, pokud je přítomna v blízkosti bromomethylové skupiny.

Bromobimany jsou méně reaktivní než chlorobimany s jinými nukleofily (aminy, karboxyláty), zejména v neutrálním roztoku, ve kterém jsou aminy převážně ve formě amonných iontů. I přes vyšší koncentraci buněčných aniontů jako nukleofilů jsou méně reaktivní ve srovnání s thiolovanými anionty (Kosower *et al.*, 1978).

Monochlorobiman je na rozdíl od sondy MBB daleko specifitější při reakci s GSH (Fernandezcheca *et al.*, 1990; Kamencic *et al.*, 2000; Rice *et al.*, 1986). Při prostupu buněčnou membránou reaguje MCB s GSH za vzniku fluorescenčních biman-glutathionových aduktů v GST katalyzované reakci (obrázek 23). Vzhledem ke své specifitě pro GSH je MCB hojně užíván pro detekci koncentrace GSH fluorimetrickou metodou v tkáňových homogenátech, nebo intaktních buňkách (Machado *et al.*, 2012).

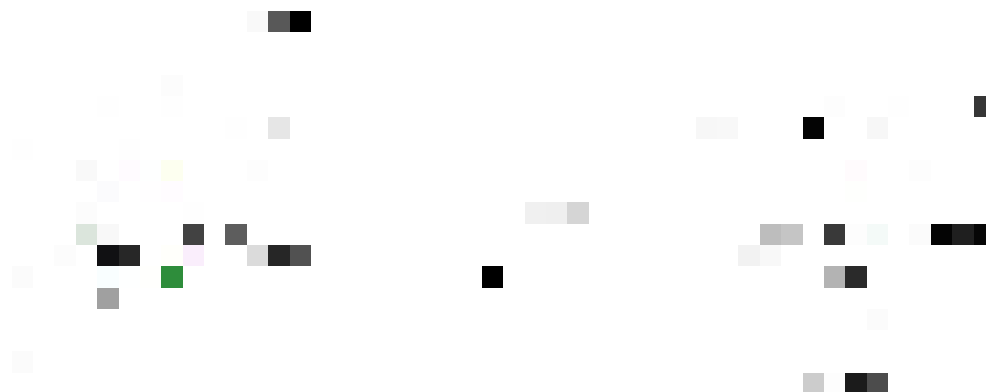


Obrázek 23: Reakce mezi sondou MCB a GSH za vzniku fluorescenčního biman-glutathionového aduktu (převzato z (Rice *et al.*, 1986)). Zkratky: mBCI – Monochlorobiman; GSH – glutathion; B-SG – fluorescenční produkt.

2.5.6.2 o-ftalaldehyd

O-ftalaldehyd (OPA) je nefluorescenční derivatizační činidlo, které reaguje jako heterobifunkční reagent s primárním aminem v přítomnosti thiolu, kyanidu nebo siřičitanu za vzniku fluorescenčního produktu isoindolu. Při reakci OPA s GSH dochází ke vzniku fluorescenčního produktu OPA-GSH, což je tricyklický derivát

isoindolu (obrázek 24). Takto vzniklý fluorescenční produkt je stabilní po dobu několika dní při pokojové teplotě (Neuschwandertetri *et al.*, 1989).



Obrázek 24: Reakce OPA s GSH (převzato z (Michaelsen *et al.*, 2009)).

Reakce OPA je specifická jak pro GSH, tak i pro γ -glutamylcystein, protože oba obsahují aminové i thiolové funkční skupiny (Senft *et al.*, 2000). Na rozdíl od GSSG a většiny aminokyselin, reakce mezi OPA a GSH nevyžaduje přidání thiolu, jako je např. 2-merkptoethanol. Při detekci GSSG je potřeba redukovat GSSG na GSH pomocí dithiotreitolu (Michaelsen *et al.*, 2009). Pro detekci produktu OPA-GSH může být i použita metoda měření absorpance v UV oblasti při 338 nm s citlivostí 70 nM GSH, oproti fluorescenční metodě s citlivostí 3 nM GSH (Tsikas *et al.*, 1999).

2.5.6.3 Další metody detekce glutathionu

Ellmanova metoda je založena na derivatizaci GSH a GSSG pomocí 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoové kyseliny a její využití je zejména v spektrofotometrické enzymové reakci vázané na GR nebo v GSH-recyklační metodě založené na redukcí GSSG na GSH v přítomnosti NADPH, tzv. Tietzeho metodě (Tietze, 1969). Při Ellmanově metodě dochází ke vzniku barevného produktu 5-thionitrobenzoátu, kdy je detekována rychlost tvorby (Araujo *et al.*, 2008).

Dalším derivatizačním činidlem pro aminoskupiny je 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB). Výhodou FDNB je umožnění současné detekce GSH a GSSG v jednom cyklu reakce (Reed *et al.*, 1980). Často se využívá N-ethylmaleimid pro maskování GSH, aby se zabránilo jeho autooxidaci, což následně umožňuje pouze detekci GSH (Giustarini *et al.*, 2003).

Vysoce fluorescenční produkty poskytují deriváty maleimidu jako je fluorescein-5-maleimid, dále pak 9-acetoxy-2-(4-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)fenyl)-3-oxo-3H-nafto[2,1-b]pyran či N-(2-akridonyl)-maleimid. Všechny tyto látky mají velmi vysokou afinitu k thiolové skupině, jsou velice specifické a vykazují nízkou fluorescenci pozadí (Monostori *et al.*, 2009).

Metod, které jsou využívány pro kvantifikaci GSH a GSSG v buňkách, je celá řada. Využívána jsou derivatizační činidla, fluorofory, které v konečném důsledku vedou ke kvantifikaci GSH s využitím řady konvekčních detekčních metod založených na HPLC, hmotnostní spektrometrii či fluorescenční mikroskopii. Vedle spektrofotometrických metod je z hlediska citlivosti využíváno zejména spektrofluorimetrických či chemiluminiscenčních metod využívaných pro kvantifikaci nízkých intracelulárních koncentrací GSH (Monostori *et al.*, 2009).

3. Cíle práce

- 1) Optimalizovat spektrofluorimetrickou metodu pro rutinní detekci koncentrace glutathionu v buňkách.
- 2) Optimalizovat spektrofluorimetrickou metodu pro detekci fragmentované DNA.
- 3) Použít fluorescenční metody pro charakterizaci toxického působení CdCl_2 .

4. Experimentální část

4.1 Seznam použitých chemikálií

- 5,5',6,6'-tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbokyanin jodid, JC-1
($C_{25}H_{27}Cl_4IN_4$; Mr = 652,2316; Enzo, USA)
- 5,6-chlórmetyl-2',7'-dichlórodihydrofluorescein diacetát, CM-H₂DCFDA
($C_{27}H_{19}Cl_3O_8$; Mr = 577,8; Molecular Probes, USA)
- Acetaminofen, APAP ($CH_3CONHC_6H_4OH$; Mr = 151,2; Sigma Aldrich, SRN)
- Cisplatina, CisPt ($Pt(NH_3)_2Cl_2$; Mr = 300,1; Sigma Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda ($G < 0,1 \mu S$)
- Diethylmalonát ($CH_2(COOC_2H_5)_2$; Mr = 160,2; Sigma Aldrich, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose* (Sigma Aldrich, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 (1:1)* (s/bez fenolové červeně), DMEM/F-12 (Sigma Aldrich, USA)
- Ethanol, EtOH (C_2H_6OH ; Mr = 46,07; Merck KGaA, SRN)
- Fetální bovinní sérum, FBS (Gibco, USA)
- Fosfátový pufr (pH 7,4), PBS (Gibco, USA)
- Fosfátový pufr podle Dulbecca, DPBS (Molecular Probes, USA)
- HEPES (Gibco, USA)
- Hoechst 33258 ($C_{25}H_{37}Cl_3N_6O_6$; Mr = 623,96; Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid kademnatý ($CdCl_2$; Mr = 183,3; Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid rtuťnatý ($HgCl_2$; Mr = 271,5; Sigma Aldrich, USA)
- Insulin/transferin/seleničitan sodný, ITS (Sigma Aldrich, USA)
- Minimum essential medium eagle*, MEM (Sigma Aldrich, USA)
- Monobromobiman ($C_{10}H_{11}BrN_2O_2$; Mr = 271,1; Sigma Aldrich, USA)
- Monochlorobiman ($C_{10}H_{11}ClN_2O_2$; Mr = 226,7; Sigma Aldrich, USA)
- Neesenciální aminokyseliny, NAA (Gibco, USA)
- o-ftalaldehyd ($C_8H_6O_2$; Mr = 134,1; Sigma Aldrich, USA)
- Penicilin/streptomycin, P/S (Gibco, USA)
- Pyruvát sodný, PYR (Gibco, USA)
- Rekombinantní epidermální růstový faktor, EGF (Gibco, USA)
- tert-butylhydroperoxid, t-BHP ($C_4H_{10}O_2$; Mr = 90,12; Sigma Aldrich, USA)

4.2 Příprava roztoků

Pracovní roztok DPBS – koncentrovaný roztok DPBS jsme ředili v poměru 1:10, tedy např. byly pipetovány 2 ml pufru DPBS do 18 ml deionizované vody.

Zásobní roztok JC-1 ($c = 2 \text{ mg/ml}$) – zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním 5 mg sondy JC-1 ve 2,5 ml DMSO a roztok byl uchován v mrazáku při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pracovní roztok JC-1 ($c = 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$) – alikvot 50 μl zásobního roztoku JC-1 jsme pipetovali do 4,95 ml pufru DPBS.

Zásobní roztok CM-H₂DCFDA ($c = 400 \text{ } \mu\text{M}$) – pipetovali jsme 86,5 μl DMSO do mikrozkušavky k 50 μg sloučeniny.

Pracovní roztok CM-H₂DCFDA ($c = 2 \text{ } \mu\text{M}$) – pipetovali jsme 20 μl zásobního roztoku CM-H₂DCFDA do 3980 μl pufru DPBS.

Zásobní roztok Hoechst 33258 ($c = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$) – do 960 μl H₂O jsme napipetovali 40 μl Hoechst 33258 ($c = 1 \text{ mg/ml}$).

Pracovní roztok acetaminofenu (APAP; $c = 10 \text{ mM}$) – navážka 0,0048 g APAP byla rozpuštěna ve 2 ml kompletního kultivačního média. Pracovní roztok byl připravován vždy čerstvý.

Zásobní roztok monochlorobimanů (MCB; $c = 10 \text{ mM}$) – navážku 5 mg sondy MCB jsme rozpustili v 2,206 ml dimethylsulfoxidu. Roztok jsme skladovali v mrazáku při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zásobní roztok monobromobimanu (MBB; $c = 10 \text{ mM}$) – navážku 5 mg sondy MBB jsme rozpustili v 1,844 ml dimethylsulfoxidu. Roztok jsme skladovali v mrazáku při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zásobní roztok HCl ($c = 1 \text{ M}$) – K 9141 μl deionizované vody jsme napipetovali 859 μl koncentrované 36% kyseliny chlorovodíkové. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok glutathionu (GSH; $c = 1 \text{ mM}$) – 0,0397 g GSH jsme rozpustili ve 100 ml deionizované vody. Roztok jsme připravovali před každým měřením čerstvý.

Zásobní roztok kyseliny metafosforečné (MPA; 5%) – K 95 ml deionizované vody jsme přidali 5 ml MPA. Roztok jsme připravovali před každým měřením čerstvý.

Zásobní roztok CdCl₂ ($c = 20 \text{ mM}$) – 0,0183 g CdCl₂ jsme rozpustili v 5 ml deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok HgCl₂ ($c = 10 \text{ mM}$) – 0,0136 g HgCl₂ jsme rozpustili v 5 ml deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok cisplatiny (cisPt; $c = 1 \text{ mM}$) – 0,0015 g cisPt jsme rozpustili v 5 ml deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok diethylmalonátu (DEM; $c = 100 \text{ mM}$) – 18 μl DEM jsme napipetovali do 982 μl deionizované vody. Roztok jsme připravovali před každým měřením čerstvý.

Zásobní roztok o-ftalaldehydu (OPA; 0,1%) – 0,1 g OPA jsme rozpustili v 10 ml methanolu. Roztok jsme skladovali v mrazáku při -20 °C.

Zásobní roztok K₂HPO₄ ($c = 100 \text{ mM}$) – 8,71 g K₂HPO₄ jsme rozpustili v 500 ml deionizované vody. Takto připravený pufr jsme upravili na pH 8 pomocí 1 M HCl. Připravený pufr jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok NaOH ($c = 0,1 \text{ M}$) – 0,04 g NaOH jsme rozpustili v 10 ml deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok EDTA (c = 2 mM) – 0,1461 g EDTA jsme rozpustili v 100 ml deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok H₂O₂ (c = 10 mM) – 15,3 µl H₂O₂ (30%) jsme přidali do 10 ml deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok *tert*-butylhydroperoxidu (t-BHP; c = 100 mM) – 18,1 µl t-BHP (5,5 M) jsme přidali do 1 ml deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Biologický materiál:

Buněčná linie proximálního tubulu, HK-2 (ATCC, USA)

Buněčná linie lidského adenokarcinomu, A549 (ATCC, USA)

Buněčná linie karcinomu jater, HepG2 (ATCC, USA)

4.3 Přístroje a laboratorní materiál

Cytospiny (SPL, Korea)

Destičkový spektrofoto- a spektrofluorimetr Infinite M200 (Tecan, Rakousko)

Destičkový spektrofoto- a spektrofluorimetr Spark (Tecan, Rakousko)

Lednice s mrazákem (-20 °C) (Liebherr, ČR)

Magnetická míchadla (Heidolph & Big Squit Star, SRN)

Mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, JAP)

Mikrotitrační destičky 96j (Thermo, Finsko)

Mikrozkumavky, objem 1,5; 2,5 a 5 ml (Eppendorf, SRN)

Odstředivka 35 R (Hettich, SRN)

Odstředivka Mikro 20 R (Hettich, SRN)

pH-metr pH 720 (InoLab, Německo)

Pipety Finnpiette (Thermo, Finsko)

Počítačka buněk (Beckman, USA)

Spektrofluorimetr Aminco-Bowman (Thermo, Finsko)

Termostatovaná míchačka (Biosan, Lotyšsko)

Třepačky, vortexy (Reax top Heidolph, SRN, IKA Sweden)

Váhy 440-35N a analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, SRN)

Vodní lázeň s termostatem a ultrazvukem (Bandelin Sonorex, SRN)

Výrobník ledu (EVERmed, Itálie)

software:

ACD/ChemSketch 12 (Advanced Chemistry Development software, Kanada)

Endnote X4 (Thomson, USA)

i-control 1.6 (Tecan, Rakousko)

Microsoft Office (Word, Excel, Power Point; Microsoft, USA)

OriginPro 9 (OriginLab, USA)

Nikon NIS-Elements (Nikon, Japonsko)

4.4 Příprava biologického materiálu

4.4.1 Kultivace HK-2 buněk

Buněčnou HK-2 linii jsme kultivovali v kompletním kultivačním médiu (základem kompletního kultivačního média bylo médium DMEM/F-12 (1:1), které jsme obohatili 5% (v/v) fetálním bovinním sérem, 1 mM pyruvátem, 50 µg/ml penicilinu, 50 µg/ml streptomycinu, 10 µg/ml insulinu, 5,5 µg/ml transferinu, 5 ng/ml seleničitanu sodného a 5 ng/ml epidermálního růstového faktoru). Do kultivačních lahví jsme přidali předem daný objem buněk, aby výsledné množství buněk bylo $0,4 \times 10^6$. Poté jsme kultivační nádobu doplnili kultivačním médiem na 10 ml. Buňky jsme umístili do inkubátoru, kde byly kultivovány při 37 °C v atmosféře obsahující 5% CO₂ a 95 % O₂. Každých 48 nebo 72 hod jsme měnili kultivační médium za čerstvé. Buňky jsme kultivovali do doby, než konfluence dosáhla 60 % a poté jsme buňky pasážovali. Densitu buněk získaných pasáží dané kultivační láhve jsme vypočítali s pomocí instrumentálního zařízení Beckman Coulter (Beckman, USA).

4.4.2 Kultivace buněk A549

Buněčnou linii A549 buněk jsme kultivovali v kompletním kultivačním médiu (základem kompletního kultivačního média bylo minimální esenciální médium, které bylo obohaceno 10% (v/v) fetálním bovinním sérem, 1 mM pyruvátem, penicilinem a HEPES pufrům). Do kultivačních lahví jsme přidali předem daný objem buněk, aby výsledné množství buněk bylo 1×10^5 . Poté jsme kultivační nádobu doplnili kultivačním médiem na 10 ml. Buňky jsme umístili do inkubátoru, kde byly kultivovány při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂ a 95 % O₂. Po třech dnech jsme buňky opláchli pomocí fosfátového pufru a vyměnili kultivační médium. Buňky jsme kultivovali do doby, než konfluence dosáhla 70 % a poté jsme buňky pasážovali. Densitu buněk získaných pasáží dané kultivační láhve jsme vypočítali s pomocí instrumentálního zařízení Beckman Coulter (Beckman, USA).

4.4.3 Kultivace buněk HepG2

Buněčnou linii HepG2 buněk jsme kultivovali v kompletním kultivačním médiu (základem kompletního kultivačního média bylo médium DMEM s vysokým obsahem glukózy 4500 g/l, které jsme obohatili 10% (v/v) fetálním bovinním sérem, 2 mM glutaminem, 10 mM HEPES, 50 µg/ml penicilinu, 50 µg/ml streptomycinu.

Do kultivačních láhví jsme přidali předem daný objem buněk, aby výsledné množství buněk bylo $0,4 \times 10^6$. Poté jsme kultivační nádobu doplnili kultivačním médiem na 10 ml. Buňky jsme umístili do inkubátoru, kde byly kultivovány při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂ a 95 % O₂. Každých 48 nebo 72 hod jsme měnili kultivační médium za čerstvé. Buňky jsme kultivovali do doby, než konfluence dosáhla 60 % a poté jsme buňky pasážovali. Denzitu buněk získaných pasáží dané kultivační láhve jsme vypočítali s pomocí instrumentálního zařízení Beckman Coulter (Beckman, USA).

4.5 Stanovení glutathionu – bimany

4.5.1 Princip detekce

Monochlorobimany a monobromobimany jsou heterocyklické fluorescenční sondy používané pro detekci intracelulární koncentrace GSH. Reakce mezi MCB a GSH za katalýzy GST je velice specifická a při této reakci dochází ke vzniku silně fluorescenčního biman-glutathionového produktu. Naopak MBB reagují pouze s thiolovou skupinou cysteinu, který je i součástí proteinů.

4.5.2 Optimalizace koncentrace bimanů

Pro jednotlivé optimalizační kroky byly použity buňky A549 a HK-2. Oba typy buněk byly vždy kultivovány 24 hod v 96jamkové destičce ve 100 µl kultivačního média při 37°C a 5 % CO₂. K buňkám po uplynutí inkubačního intervalu byly přidány jednotlivé látky a intracelulární koncentrace GSH byla detekována pomocí MCB a MBB.

Pro optimalizaci koncentrace MCB a MBB byly použity buňky A549. Po 24hod inkubaci bylo k buňkám přidáno 20 µl sondy MCB a MBB. Testované výsledné koncentrace byly 5, 10, 20 a 40 µM MCB a 1, 5, 10, 20 a 30 µM MBB. Fluorescence ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 394/490 \text{ nm}$) byla měřena kineticky po dobu 90 min pomocí spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 při 37 °C. Pro vyhodnocení optimální koncentrace sondy MCB a MBB byla vytvořena závislost fluorescenčního signálu na čase.

Dále jsme ověřovali vliv glutathion-S-transferázy u obou fluorescenčních sond MBB a MCB. Byly použity GSH standardy (5 a 20 µM), kde 100 µl standardu GSH bylo pipetováno do jamek 96jamkové destičky. Následně byla přidána GST

o výsledné aktivitě 2 U/ml. Poté bylo do každé jamky napipetováno 20 μ l sondy MCB či MBB aby výsledná koncentrace byla 10 či 40 μ M. Měření fluorescence ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 394/490$ nm) probíhalo kineticky po dobu 60 min.

Pro detekci intracelulární koncentrace GSH po předchozí depleci GSH u buněk HK-2 pomocí diethylmalonátu byly využity fluorescenční sondy MCB a MBB. K buňkám HK-2 byl přidán DEM aby výsledná koncentrace byla 0,1, 0,5 a 2 mM. Buňky byly s toxinem inkubovány po dobu 3 hod při 37 °C. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 20 μ l sondy MCB a MBB, aby výsledná koncentrace byla 10 či 40 μ M a fluorescence byla měřena kineticky po dobu 60 min ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 394/490$ nm) pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 při 37 °C.

4.5.3 Optimalizace výpočtu koncentrace glutathionu

Pro optimalizaci vyhodnocení intracelulární koncentrace GSH jsme využili buňky HK-2, pro detekci GSH byla použita sonda MCB. Buňky HK-2 byly inkubovány s cisplatinou (30 μ M a 50 μ M) po dobu 24 hod při 37 °C. Po inkubaci buněk s toxiny bylo k buňkám přidáno 20 μ l sondy MCB ($c = 40$ μ M). Fluorescence vzniklého biman-glutathionového produktu byla detekována hned po přidání sondy po dobu 60 min kineticky ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 394/490$ nm) pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 při 37 °C.

4.5.4 Komparace stanovení glutathionu pomocí bimanů a o-ftalaldehydu

Pro pokusy byly použity buňky A549 a HK-2. Oba typy buněk byly kultivovány 24 hod v 96jamkové či 24jamkové destičce ve 100 μ l kultivačního média při 37°C a 5% CO₂. K buňkám po uplynutí inkubačního intervalu byly přidány testované látky a intracelulární koncentrace GSH byla detekována pomocí MCB a MBB.

Roztoky MCB a MBB byly před každou analýzou připraveny vždy čerstvé ředěním pomocí DPBS pufru (pH 7) a temperovány při 37 °C. K buňkám (HK-2, A549) byl přidán DEM (0,5 a 2 mM) a buňky s ním byly inkubovány 3 hod při 37 °C. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 20 μ l roztoku MCB a MBB o výsledné koncentraci 40 μ M, respektive 10 μ M. Fluorescence ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 394/490$ nm) byla měřena po dobu 60 min pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 při 37 °C. Při vyhodnocení fluorescenčního signálu jsme využili „standardní“ výpočet koncentrace GSH (fluorescence byla vypočtena jako rozdíl mezi fluorescenčním signálem po 60 min

a 0 min) a také „optimalizovaný“ výpočet koncentrace GSH (fluorescence byla vyjádřena jako změna směrnice závislá na čase v lineární části křivky po 10 min měření fluorescenčního signálu; $\Delta \text{fluorescence}_{(0-10 \text{ min})}/10 \text{ min}$). Výsledná intracelulární koncentrace GSH byla vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %).

o-ftalaldehyd (OPA) je nefluorescenční derivatizační činidlo reagující s GSH za vzniku fluorescenčního produktu isoindolu. Reakce OPA je specifická jak pro GSH, tak i pro γ -glutamylcystein, protože oba obsahují aminové i thiolové funkční skupiny. Prvním krokem stanovení intracelulární koncentrace GSH pomocí OPA bylo přidání ledové kyseliny metafosforečné (10%, w/v), jako deproteinačního činidla v poměru 2:1 k buněčné suspenzi (HK-2, A549) ovlivněné toxiny (0,5 a 2 mM DEM; 3 hod) a následná inkubace buněk s MPA po dobu 10 min při 4°C. Následně byly buňky z jednotlivých jamek vyškrabány a centrifugovány (5 min, 4°C, 20000g). Poté bylo odebráno 50 μ l supernatantu, se kterým se pracovalo dále. Glutathionové standardy (0–1000 μ M) byly připraveny stejně naředěním pomocí kyseliny metafosforečné (10%, w/v). K 50 μ l vzorku či standardu bylo přidáno 1000 μ l fosfátového pufru (pH 8, 100 mM, s 1 mM EDTA). Dále bylo odebráno 60 μ l této směsi, ke které bylo přidáno 900 μ l fosfátového pufru a 60 μ l OPA (0,1%, w/v) v metanolu. Takto připravené vzorky a standardy byly inkubovány 15 min ve tmě. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno 75 μ l HCl (1 mM) a inkubováno 1 hod při 4°C v lednici. Poté byly jednotlivé vzorky a standardy proměřeny na spektrofluorimetru Aminco Bowman II (Thermo, USA). Spektrální charakteristiky pro detekci byly $\lambda_{\text{Ex/EM}} = 340/420 \text{ nm}$. Výsledná intracelulární koncentrace GSH byla vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %).

4.5.5 Korelace stanovení glutathionu pomocí bimanů a *o*-ftalaldehydu

Buňky HK-2 a A549 byly inkubovány v buněčném médiu (100 μ l) v 96jamkové destičce. Následně byly buňky ovlivněny vybranými toxiny DEM (0,5 a 2 mM), *tert*-butylhydroperoxidem (50 a 500 μ M), cisplatinou (5, 30 a 50 μ M), chloridem rtuťnatým (20 μ M) a peroxidem vodíku (500 μ M). Inkubační doba buněk s toxiny byla 24 hod při 37 °C. Detekce intracelulární koncentrace GSH byla provedena s využitím metod využívajících MCB a OPA. Vyhodnocení fluorescenčního signálu sondy MCB bylo provedeno dle optimalizovaného postupu ($\Delta \text{fluorescence}_{(0-10 \text{ min})}/10 \text{ min}$). Výsledná intracelulární koncentrace GSH byla vztažena ke kontrolním buňkám

(= 100 %). Detekované intracelulární koncentrace glutathionu u jednotlivých buněčných linií ovlivněných danými toxiny byly použity pro výpočet korelačního koeficientu mezi metodami s MCB vs. OPA (n = 20).

4.6 Detekce fragmentované DNA – Hoechst 33258

4.6.1 Princip metody

Fluorescenční sonda Hoechst 33258 vykazuje silnou specifickou vazbu do oblastí DNA bohatých na adenin-tyminové páry. Po vazbě fluorescenční sondy dochází k několikanásobnému zvýšení intenzity fluorescence této sondy. Díky použití sondy Hoechst 33258 můžeme velice snadno detekovat DNA zlomy a fragmenty, které jsou průvodním jevem např. apoptózy.

4.6.2 Optimalizace koncentrace sondy Hoechst 33258

Pro optimalizaci koncentrace sondy Hoechst 33258 byly použity buňky HepG2, které byly kultivovány v 96jamkové destičce po dobu 24 hod při 37 °C. Poté byly buňky exponovány 100 μM CisPt po dobu 24 hod. V tomto optimalizačním kroku bylo zvoleno několik koncentrací sondy Hoechst 33258 (0,01; 0,1; 0,5; 1; 2 a 5 μg/ml). Sonda byla před měřením připravena čerstvá a k buňkám bylo přidáno 10 μl sondy. Sonda byla s buňkami inkubována 1 hod a po uplynutí časového intervalu byla ihned změřena fluorescence ($\lambda_{\text{EX/EM}} = 352/461 \text{ nm}$) v destičkovém spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 při 37 °C.

4.6.3 Vliv vybraných toxinů na fragmentaci DNA

Pro barvení fragmentované DNA pomocí Hoechst 33258 byly použity buňky HK-2, které byly kultivovány v 96jamkové destičce po dobu 24 hod při 37 °C. Po uplynutí kultivačního intervalu byly buňky HK-2 ovlivněny toxiny (40 μM FCCP, 50 a 100 μM CisPt a 50 μM t-BHP) v časových intervalech 2, 24 a 48 hod. Po uplynutí inkubace byla ihned detekována fluorescence sondy Hoechst 33258 v destičkovém spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 při 37 °C. Fluorescenční signál Hoechst 33258 byl vztažen k fluorescenčnímu signálu kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %).

4.7 Využití fluorescenčních sond při studiu toxicity CdCl₂

Pro testování nefrotoxicity kadmia byly použity buňky HK-2, které byly inkubovány v buněčném médiu (100 μ l) v 96jamkové destičce. Pro mikroskopickou detekci byly buňky kultivovány v cytopsinu (CS). Buňky byly inkubovány s CdCl₂ (0, 5, 25 a 200 μ M) po dobu 2, 6, 10 a 24 hod.

4.7.1 Koncentrace glutathionu

Intracelulární koncentrace GSH byly měřeny pomocí sondy MCB a výsledný fluorescenční signál byl vyhodnocen pomocí optimalizované metody (kapitola 4.5.3). Fluorescence ($\lambda_{\text{EX/EM}} = 394/490$ nm) byla měřena po dobu 20 min pomocí spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 při 37 °C. Výsledná intracelulární koncentrace GSH byla vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %).

4.7.2 Mitochondriální membránový potenciál

Detekci $\Delta\Psi$ jsme provedli s využitím sondy JC-1 (Enzo, USA). Sonda JC-1 velice snadno díky svému lipofilnímu charakteru proniká buněčnými membránami a velice citlivě reaguje na fluktuace $\Delta\Psi$. Pracovní roztok sondy JC-1 byl před každou analýzou připraven vždy čerstvý v DPBS pufru (pH 7). Po uplynutí inkubačních intervalů bylo k buňkám napipetováno 20 μ l sondy JC-1. Výsledná koncentrace sondy JC-1 ve vzorku byla 10 μ g/ml. Buňky byly inkubovány se sondou JC-1 po dobu 20 min a po uplynutí inkubačního intervalu promyty pomocí pufru DPBS (pH 7; 37 °C). Fluorescence v 96jamkových destičkách byla měřena pomocí spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 při 37 °C ($\lambda_{\text{EX/EM}} = 485/535(595)$ nm). Pro popis výsledné hodnoty $\Delta\Psi$ byl použit R/G poměr. Vedle toho byly použity cytopsiny pro mikroskopickou analýzu. Pro detekci byl použit mikroskop Nikon Eclipse 80i s použitím fluorescenčního filtru GFP/TRITC.

4.7.3 Reaktivní formy kyslíku

Detekci produkce ROS jsme provedli s využitím sondy CM-H₂DCFDA (Thermo, USA). Pracovní roztok sondy CM-H₂DCFDA byl před každou analýzou připraven vždy čerstvý v DPBS pufru (pH 7). Pro mikroskopickou detekci buněk v CS byly buňky inkubovány s vybranými koncentracemi CdCl₂ (5, 25 a 200 μ M) po dobu

24 hod. Po uplynutí inkubace byla k buňkám napipetována sonda CM-H₂DCFDA. Buňky byly inkubovány se sondou CM-H₂DCFDA po dobu 90 min. Výsledná koncentrace sondy byla 1 μM CM-H₂DCFDA. Po uplynutí inkubačního intervalu byly buňky promyty pomocí pufru DPBS (pH 7; 37 °C). Fluorescence byla měřena po dobu 60 min s využitím spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 při 37 °C ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 485/535 \text{ nm}$). Pro mikroskopickou detekci byl použit mikroskop Nikon Eclipse 80i s použitím fluorescenčního filtru FITC. Výsledná intracelulární koncentrace ROS byla vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %).

4.7.4 Detekce fragmentované DNA

Sonda Hoechst 33258 byla použita pro barvení fragmentované DNA v buňkách. Pracovní roztok sondy Hoechst 33258 byl před každou analýzou připraven vždy čerstvý v DPBS pufru (pH 7). Buňky byly inkubovány se sondou Hoechst 33258 po dobu 20 min. Výsledná koncentrace sondy byla 2 μg/ml Hoechst 33258. Fluorescence byla měřena s využitím spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 při 37 °C ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 352/461 \text{ nm}$). Výsledná hodnota fluorescence buněk ovlivněných CdCl₂ byla vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %).

4.8 Statistické zpracování experimentálních dat

Analýzu rozdílnosti naměřených hodnot jsme provedli v rámci vícečetného porovnání pomocí statistického testu ANOVA (1-W) a post-testu Tukey. Všechna data v práci jsou uvedena jako průměr ± SD nebo průměr ± SEM. Hladina významnosti $p = 0,05$ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

5 Výsledky

5.1 Stanovení glutathionu – bimany

5.1.1 Optimalizace koncentrace bimanů

Nejprve jsme optimalizovali koncentraci monochlorobimanů a monobromobimanů na buňkách lidského adenokarcinomu A549. Buňky A549 byly kultivovány v buněčném médiu 24 hod při 37 °C. Poté jsme k buňkám napipetovali sondy, tak aby výsledná koncentrace byla 5, 10, 20 a 40 μM MCB nebo 1, 5, 10, 20 a 30 μM MBB. Testovali jsme vliv koncentrace dané sondy na míru fluorescence v čase.



Graf 1: Optimalizace koncentrace sondy MCB u buněk A549. MCB (5; 10; 20; 40 μM); fluorescence ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 394/490 \text{ nm}$); 90 min ($n = 3$).

Jak je patrné z grafu 1, nejvyšší hodnotu intenzity fluorescence v každém časovém intervalu vykazuje sonda při koncentraci 40 μM MCB. Ostatní koncentrace sondy MCB mají podobný lineární průběh, ale s daleko nižšími hodnotami fluorescence. Na základě těchto závislostí byla koncentrace 40 μM MCB vybrána jako optimální a byla dále používána pro veškerá experimentální testování.

V grafu 2 jsou znázorněny závislosti času a testovaných koncentrací sondy MBB. Jak je z grafu patrné, jednotlivé časové závislosti mají parabolický charakter ve srovnání se sondou MCB. Použití 1 a 5 μM MBB vedlo k nízkému nárůstu

fluorescence v čase. Naopak u koncentrací 20 a 30 μM MBB došlo hned po přidání sondy MBB k velkému nárůstu fluorescence bez zjevné lineární části v prvních minutách. Jako optimální pro použití se proto jeví koncentrace 10 μM MBB, která poskytla poměrně vysokou míru fluorescence, a časový průběh nárůstu fluorescence byl po 20 min lineární. Z tohoto důvodu byla koncentrace 10 μM MBB zvolena jako optimální a dále používána pro testování.



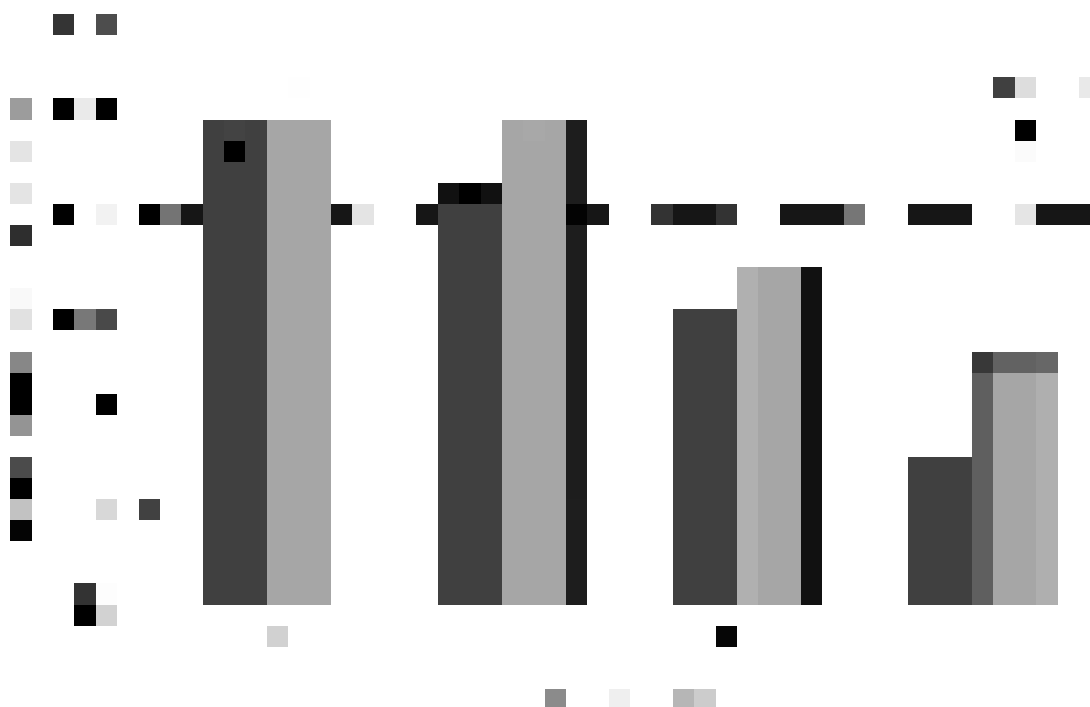
Graf 2: Optimalizace koncentrace sondy MBB u buněk A549. MBB (1; 5; 10; 20; 30 μM); fluorescence ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 394/490 \text{ nm}$); 90 min ($n = 3$).

Dále jsme testovali vliv glutathion-S-transferázy (GST) na fluorescenční výtěžek reakce mezi MCB/MBB a GSH. Vliv GST byl detekován u dvou koncentrací standardu GSH (5 a 20 μM). S ohledem na předchozí výsledky byly použity koncentrace 40 μM MCB a 10 μM MBB. Jak je patrné z grafu 3, u obou sond byl patrný vliv katalýzy v přítomnosti GST. Při použití MCB byl u reakce katalyzované GST nárůst fluorescence u 5 μM GSH vyšší o 836 %, resp. u 20 μM GSH byl nárůst fluorescence vyšší o 851 % oproti reakcím nekatalyzovaným GST. Naopak u reakce katalyzované GST při použití MBB byl nárůst fluorescence u 5 μM GSH vyšší o 361 %, resp. o 261% u 20 μM GSH oproti reakcím nekatalyzovaným GST. Vliv katalýzy GST u MBB a MCB je tedy prokazatelný.



Graf 3: Vliv GST katalýzy na průběh reakcí MCB a MBB se standardem glutathionu. (A – monochlorobiman (MCB); B – monobromobiman (MBB)). (■ GSH (20 μ M) + GST; □ GSH (20 μ M) bez GST; ● GSH (5 μ M) + GST; ○ GSH (5 μ M) bez GST); fluorescence $\lambda_{Ex/EM} = 394/490$ nm.

Při následných pokusech byla testována odezva detekovaného fluorescenčního signálu na indukovanou depleci glutathionu v buňkách pomocí diethylmalonátu (DEM). Pro určení optimálních koncentrací diethylmalonátu jako depletoru byly použity HK-2 buňky. Pro testování byly vybrány tři koncentrace DEM (0,1; 0,5 a 2 mM). Jak je patrné z grafu 4, se vzrůstající koncentrací DEM klesala intracelulární koncentrace GSH detekovaná pomocí obou typů sond. Je patrné, že koncentrace GSH detekované s využitím MCB byly po porovnání ke kontrolám oproti použití sondy MBB nižší. Rozdíl detekovaných koncentrací GSH mezi MCB a MBB byl u dvou nejnižších koncentrací DEM 11–13 % a nejvyšší rozdíl koncentrací byl u 2 mM DEM, a to 21 %. Přesné hodnoty koncentrací GSH jsou uvedeny v příloze 1.



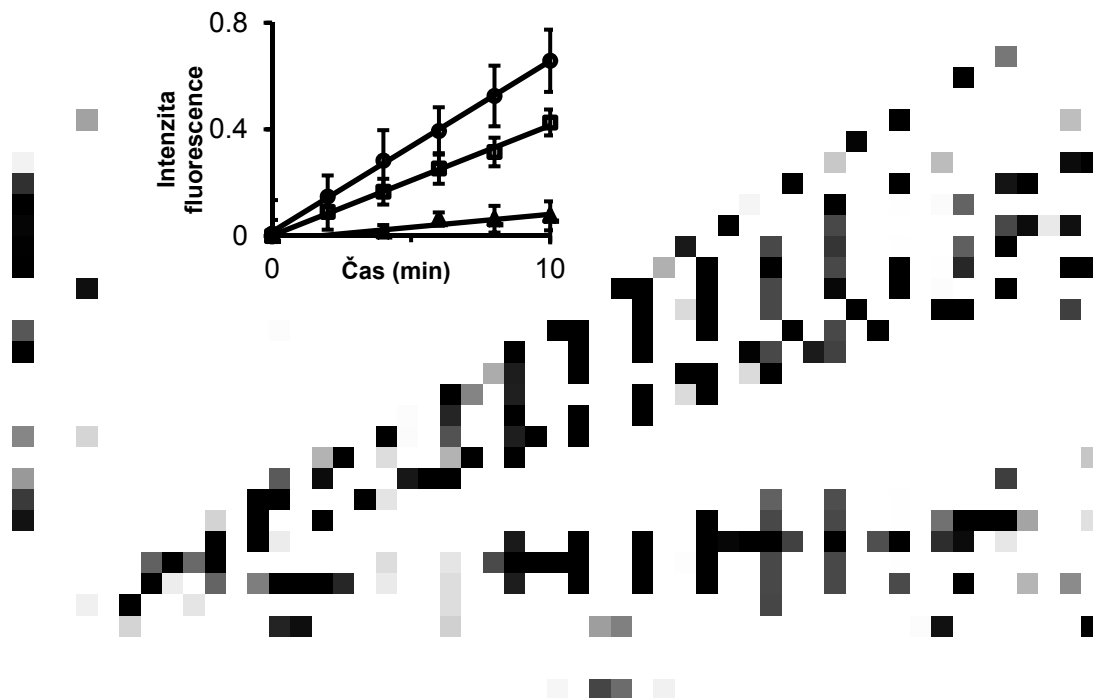
Graf 4: Vliv DEM na depleci GSH u buněk HK-2. DEM (0,1, 0,5 a 2 mM) inkubace 3 hod; fluorescence ($\lambda_{Ex/EM} = 394/490$ nm); standardní metoda po 60 min měření; Intracelulární koncentrace GSH byla vyjádřena jako % kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %); n = 3.

5.1.2 Optimalizace výpočtu koncentrace glutathionu

Pro detekci intracelulární koncentrace GSH jsme jako optimální použili $40 \mu\text{M}$ MCB. Buňky HK-2 jsme inkubovali s cisplatinou (30 a $50 \mu\text{M}$) jakožto modelovým toxinem po dobu 24 hod. Inkubace buněk s cisplatinou způsobila depleci intracelulárního GSH. Po přidání MCB k buňkám jsme měřili fluorescenci ($\lambda_{Ex/EM} = 394/490$ nm) po dobu 60 min. Jak je patrné z grafu 5, linearitu fluorescenčního signálu můžeme nalézt pouze v počáteční fázi měření. Zejména u kontrolních buněk s vyšší intracelulární koncentrací GSH nebyla patrná linearita fluorescenčního signálu po celou dobu kinetického měření (tabulka 5). Jak je z tabulky patrné, hodnota R^2 se v jednotlivých časových úsecích měnila, resp. s postupem času klesala a nejvyšší R^2 byl sledován v časovém úseku měření 0-10 min.

Pro rutinní měření jsme dále využívali pouze měření fluorescence v prvních 10 min. Změnu fluorescenčního signálu v tomto časovém intervalu jsme použili pro výpočet směrnice závislosti změny fluorescence za 1 min ($\Delta \text{fluorescence}_{(0-10\text{min})}/10$ min). Poté byly zjištěné hodnoty směrnic ($\Delta \text{fluorescence}/\text{min}$) u všech buněk vztaženy k hodnotám směrnic buněk kontrolních

(= 100 %). Pomocí tohoto optimalizovaného výpočtu jsme zjistili, že 30 a 50 μM CisPt způsobila snížení hladin GSH o 15 %, respektive o 64 %, ve srovnání s kontrolními buňkami.



Graf 5: Optimalizovaný postup výpočtu koncentrace GSH s použitím MCB u buněk HK-2 (○, kontrolní buňky; □, 30 μM CisPt; ▲, 50 μM CisPt); inkubace s CisPt 24 hod; fluorescence ($\lambda_{EX/EM} = 394/490 \text{ nm}$); 60 min. Fluorescenční signál detekovaný po dobu 10 min byl vyhodnocen lineární regresí a lineární závislost byla zobrazena na malém grafu nahoře, ($n = 3$).

Tabulka 5: Změna R^2 v různých časových úsecích při měření koncentrace GSH u buněk HK-2 ($n = 4$).

	Časový interval (min)					
	0–10	0–20	0–30	0–40	0–50	0–60
R^2	0,9992	0,9979	0,9967	0,9948	0,993	0,9913

Nakonec jsme porovnali intracelulární koncentrace GSH kalkulované optimalizovaným výpočtem a koncentrace získané standardním přepočtem změny fluorescence po 60 min v porovnání ke kontrolním buňkám (= 100 %). Pro toto měření jsme použili buňky HK-2 inkubované s cisplatinou (30 a 50 μM) po dobu 24 hod. Zjištěné koncentrace GSH v buňkách ovlivněných cisplatinou byly v porovnání ke kontrolám vyšší při použití standardního výpočtu oproti koncentracím vypočteným optimalizovaným postupem (tabulka 6).

Tabulka 6: Porovnání intracelulární koncentrace glutathionu získané pomocí standardní a optimalizované metody výpočtu u buněk HK-2 exponovaných cisplatinou (30 a 50 μM) v časovém intervalu 24 hod s využitím sondy MCB; standardní metoda po 60 min měření, optimalizovaná metoda po 10 min měření; Intracelulární koncentrace GSH byla vyjádřena jako % kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %) průměr \pm SD ($n = 3$).

Typ kalkulace	Koncentrace GSH (% kontrol)		
	CisPt (0 μM)	CisPt (30 μM)	CisPt (50 μM)
Standardní	100 %	75 %	17 %
Optimalizovaná	100 %	64 %	15 %

5.1.3 Komparace stanovení glutathionu pomocí bimanů a o-ftalaldehydu

Na základě našich výsledků jsme se snažili potvrdit, zda intracelulární koncentrace GSH detekované pomocí MCB/MBB po 10/60 minutách měření byly srovnatelné s koncentracemi GSH získanými pomocí metody s o-ftalaldehydem (tabulka 7).

Za tímto účelem byla tedy použita optimalizovaná metoda kalkulace (tj. lineární fluorescenční signál byl vyhodnocen po 10 min měření jako změna fluorescence za 1 min) a standardní metoda (tj. fluorescenční signál byl vyhodnocen po 60 min měření jako rozdíl fluorescenčního signálu po 60 a 0 min). Dále jsme se zaměřili na srovnání výsledků obou metod, a proto jsme výsledky porovnali s referenční fluorescenční metodou založenou na reakci GSH s OPA.

Buňky HK-2 a A549 byly inkubovány s DEM (0,5 a 2 mM). Deplece GSH závislá na koncentraci DEM byla detekována za použití všech metod (MCB, MBB a OPA) u obou buněčných linií (HK-2 a A549). Jak je patrné z tabulky 7, intracelulární koncentrace GSH vypočtené standardní metodou byly vždy vyšší než koncentrace GSH vypočtené s využitím optimalizované metody u obou fluorescenčních sond MCB a MBB. Další srovnání ukázalo, že koncentrace GSH detekované s využitím MCB v buňkách byly nižší ve srovnání s koncentracemi GSH detekovanými s využitím MBB. Tabulka 7 ukazuje, že koncentrace GSH vyhodnocené jak standardní, tak optimalizovanou metodou v buňkách, u kterých byla pro detekci použita sonda MBB, byly vždy významně vyšší, než koncentrace GSH detekované s využitím referenčního testu OPA. Při použití MCB a optimalizované metody vyhodnocení byly výsledné koncentrace GSH v buňkách víceméně shodné

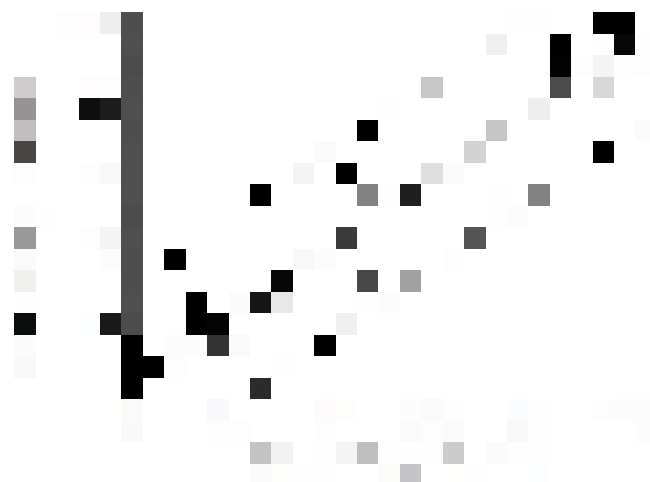
s koncentracemi získanými s využitím referenční metody s OPA u obou buněčných linií a obou koncentrací DEM.

Tabulka 7: Porovnání intracelulární koncentrace glutathionu měřené pomocí metod MCB, MBB a OPA; standardní metoda po 60 min měření, optimalizovaná metoda po 10 min měření; byly porovnávány koncentrace GSH získané s využitím metod MCB/MBB s referenční metodou OPA u obou buněčných linií (HK-2, A549) exponovaných diethylmalonátem (0,5 a 2 mM; 3 hod); Hodnoty intracelulární koncentrace GSH byly vyjádřeny jako % kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %); průměr ± SEM (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ (vs. referenční metoda OPA); $n = 6-8$).

Buněčná linie	Sonda	Koncentrace GSH (% kontrol)			Metoda pro detekci GSH (čas)
		Kontrolní buňky	DEM 0.5 mM	DEM 2 mM	
HK-2	MBB	100 ± 4%	59 ± 2% *	31 ± 2% ***	Optimalizovaná (10 min)
		100 ± 4%	73 ± 2% ***	38 ± 1% ***	Standardní (60 min)
	MCB	100 ± 7%	44 ± 4%	16 ± 3%	Optimalizovaná (10 min)
		100 ± 12%	67 ± 3% ***	18 ± 1%	Standardní (60 min)
	OPA	100 ± 5%	42 ± 2%	17 ± 1%	Referenční
A549	MBB	100 ± 4%	83 ± 2% ***	47 ± 4% ***	Optimalizovaná (10 min)
		100 ± 6%	100 ± 3% ***	76 ± 2% ***	Standardní (60 min)
	MCB	100 ± 5%	53 ± 2%	21 ± 1%	Optimalizovaná (10 min)
		100 ± 10%	66 ± 2%	27 ± 1%	Standardní (60 min)
	OPA	100 ± 3%	56 ± 6%	23 ± 3%	Referenční

5.1.4 Korelace stanovení glutathionu pomocí bimanů a o-ftalaldehydu

Byly korelovány výsledky intracelulární koncentrace GSH získané s využitím optimalizované metody MCB s referenční metodou využívající OPA. Pro tento experiment byly využity buňky HK-2 a A549 inkubované s řadou toxinů (cisplatina, diethylmalonát, *tert*-butylhydroperoxid, chlorid rtuťnatý a peroxid vodíku). Jak je znázorněno v grafu 6, korelace mezi výsledky získanými pomocí MCB/OPA metod byla velmi silná s korelačním koeficientem $r = 0,96$ ($y = 0,926x + 3,871$).

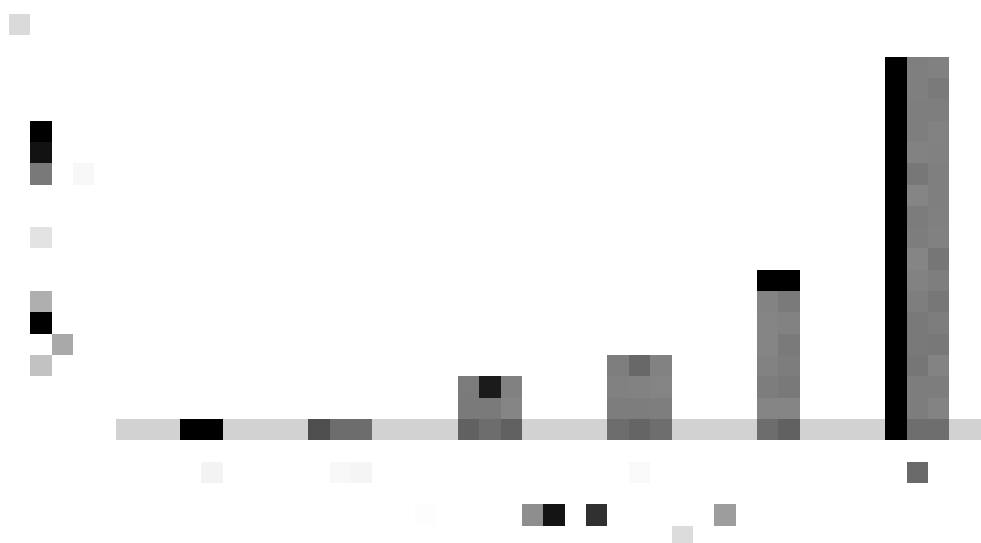


Graf 6: Korelace výsledků získaných metodou MCB a OPA ($r = 0,96$). Korelační křivka je zobrazena s intervalem spolehlivosti 95 % pomocí čerchované čáry ($n = 20$).

5.2 Detekce fragmentované DNA – Hoechst 33258

5.2.1 Optimalizace koncentrace sondy Hoechst 33258

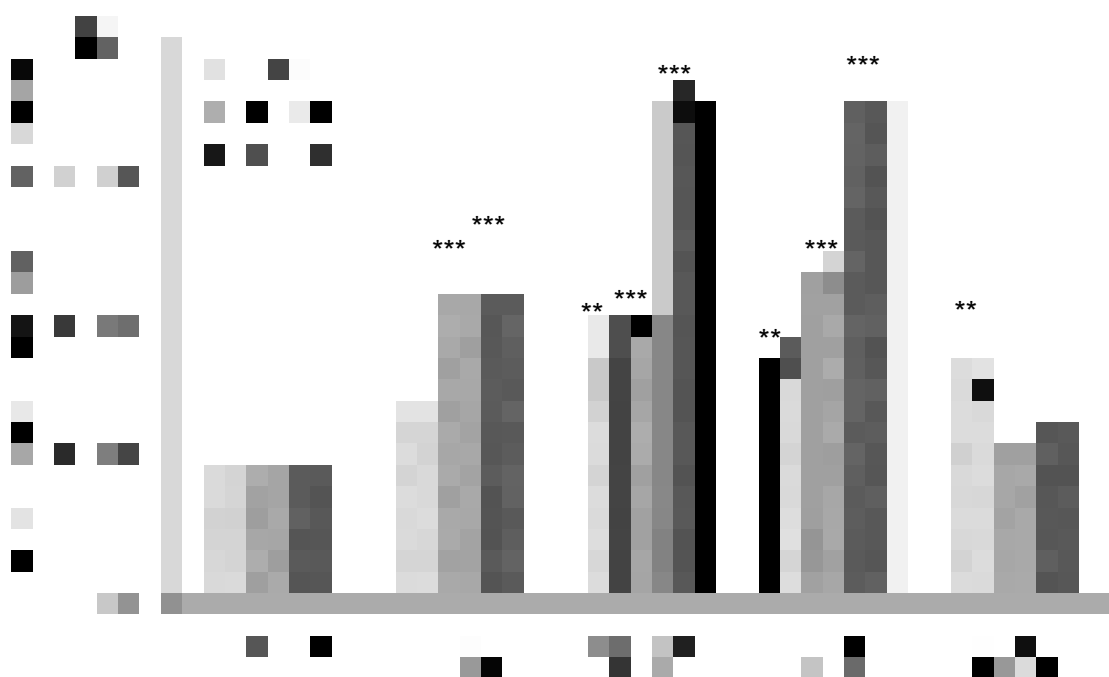
Buňky HepG2 exponované 100 μM CisPt byly využity pro zjištění optimální koncentrace sondy Hoechst 33258. Jak je patrné z grafu 7, nejvyšší hodnota fluorescenčního signálu byla u 5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258. U nejnižších koncentrací (0,01 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$) byl fluorescenční signál velice nízký. Ke zvýšení intenzity fluorescence došlo u 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Proto jsme pro další měření zvolili koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ s dostatečně vysokou intenzitou fluorescence.



Graf 7: Optimalizace koncentrace sondy Hoechst 33258 u buněk HepG2 inkubovaných s cisplatinou (100 μM ; 24 hod.). Fluorescence ($\lambda_{EX/EM} = 352/461 \text{ nm}$); 60 min ($n = 3$).

5.2.2 Vliv vybraných toxinů na fragmentaci DNA

Buňky HK-2 byly ovlivněny vybranými toxiny (40 μ M FCCP, 50 a 100 μ M CisPt a 50 μ M t-BHP) po dobu 2, 24 a 48 hod. Jak je patrné z grafu 8, v časovém intervalu 2 hod došlo ke zvýšení fluorescence sondy Hoechst 33258 po expozici všem toxinům vyjma 40 μ M FCCP. Největší intenzita fluorescence byla detekována po 48 hod expozice 50 a 100 μ M CisPt, a to vyšší o 257 % ve srovnání s kontrolními buňkami. Dále pak byl vysoký nárůst fluorescence nalezen u 40 μ M FCCP (o 124 %) oproti kontrolním buňkám. Po 24 hod inkubaci byla intenzita fluorescence sondy Hoechst 33258 svědčící pro fragmentovanou DNA v porovnání s intervalem 48 hod vždy nižší. Přesné hodnoty intenzit fluorescencí jsou uvedeny v příloze 2.



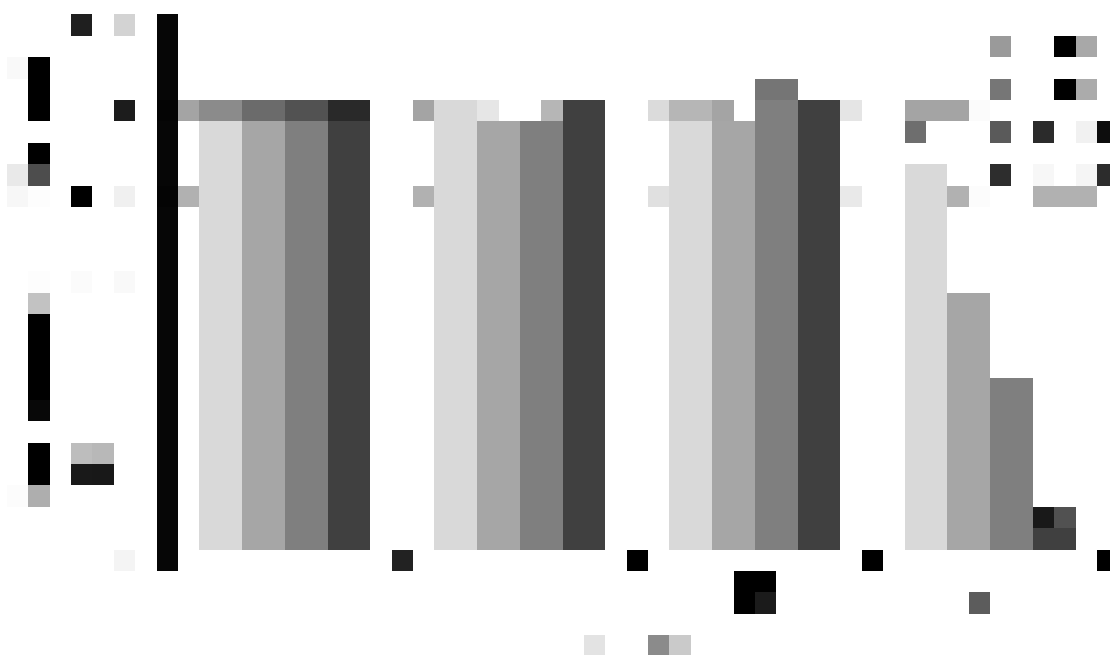
Graf 8: Vliv toxinů na fragmentaci DNA u buněk HK-2 exponovaných FCCP (40 μ M), cisplatině (50 a 100 μ M) a tert-butylhydroperoxidu (50 μ M) po 2, 24 a 48 hod s využitím sondy Hoechst 33258 ($\lambda_{EX/EM} = 352/461$ nm). Fragmentace DNA byla vyjádřena jako % IF kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %); průměr \pm SD; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (vs. kontrola daného časového intervalu); $n = 4$.

5.3 Využití fluorescenčních sond při studiu toxicity CdCl₂

Pro testování nefrotoxicity CdCl₂ byly použity renální HK-2 buňky, které byly inkubovány v buněčném médiu v 96jamkové destičce (100 μ l) a pro mikroskopickou detekci byly buňky kultivovány v cytopsinu. Buňky byly inkubovány s CdCl₂ (0, 5, 25 a 200 μ M) po dobu 2, 6, 10 a 24 hod.

5.3.1 Koncentrace glutathionu

Po uplynutí inkubace s CdCl_2 byla intracelulární koncentrace glutathionu detekována pomocí MCB. Jak je patrné z grafu 9, u koncentrací 5 a 25 μM CdCl_2 nebyl pozorován jakýkoliv vliv v žádném časovém intervalu. Signifikantní pokles koncentrace GSH byl naopak sledován u buněk exponovaných 200 μM CdCl_2 ve všech časových intervalech. Největší pokles koncentrace GSH byl sledován po 24 hod po expozici 200 μM CdCl_2 a to o 95 % ve srovnání s kontrolními buňkami. Přesné hodnoty koncentrací GSH jsou uvedeny v příloze 3.

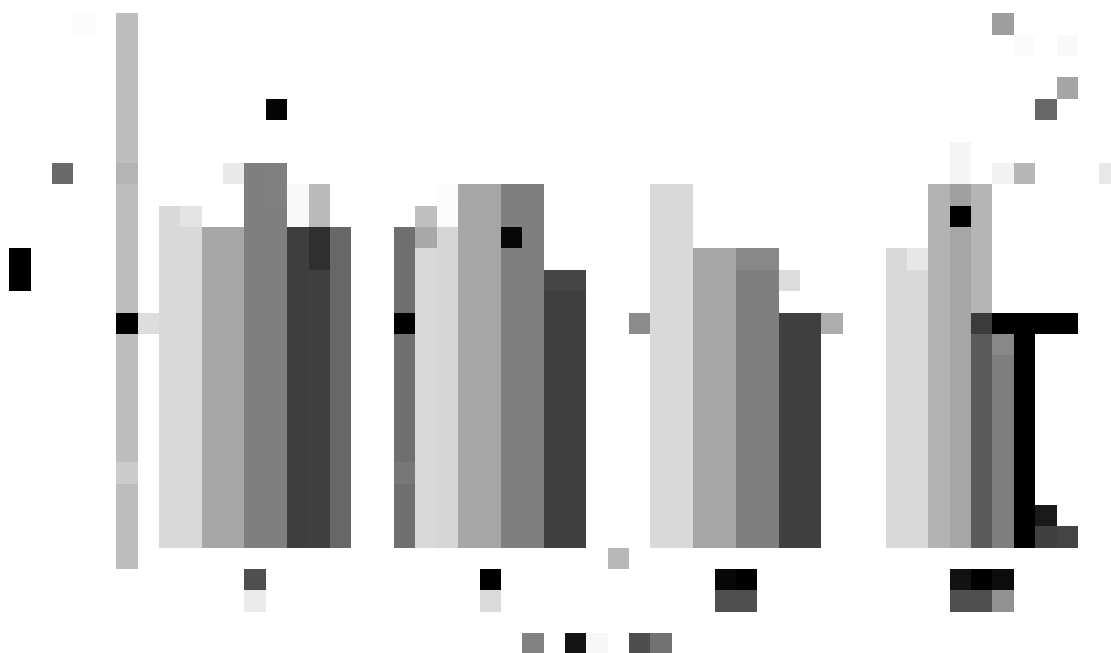


Graf 9: Vliv CdCl_2 na koncentraci glutathionu u buněk HK-2. Inkubace s CdCl_2 (5, 25 a 200 μM) v časových intervalech 2, 6, 10 a 24 hod; detekce s využitím sondy MCB ($\lambda_{\text{EX/EM}} = 394/490 \text{ nm}$). Intracelulární koncentrace GSH byla vyjádřena jako % kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %); průměr \pm SD; ***, $p < 0,001$ (vs. kontrola daného časového intervalu); $n = 6-10$.

5.3.2 Mitochondriální membránový potenciál

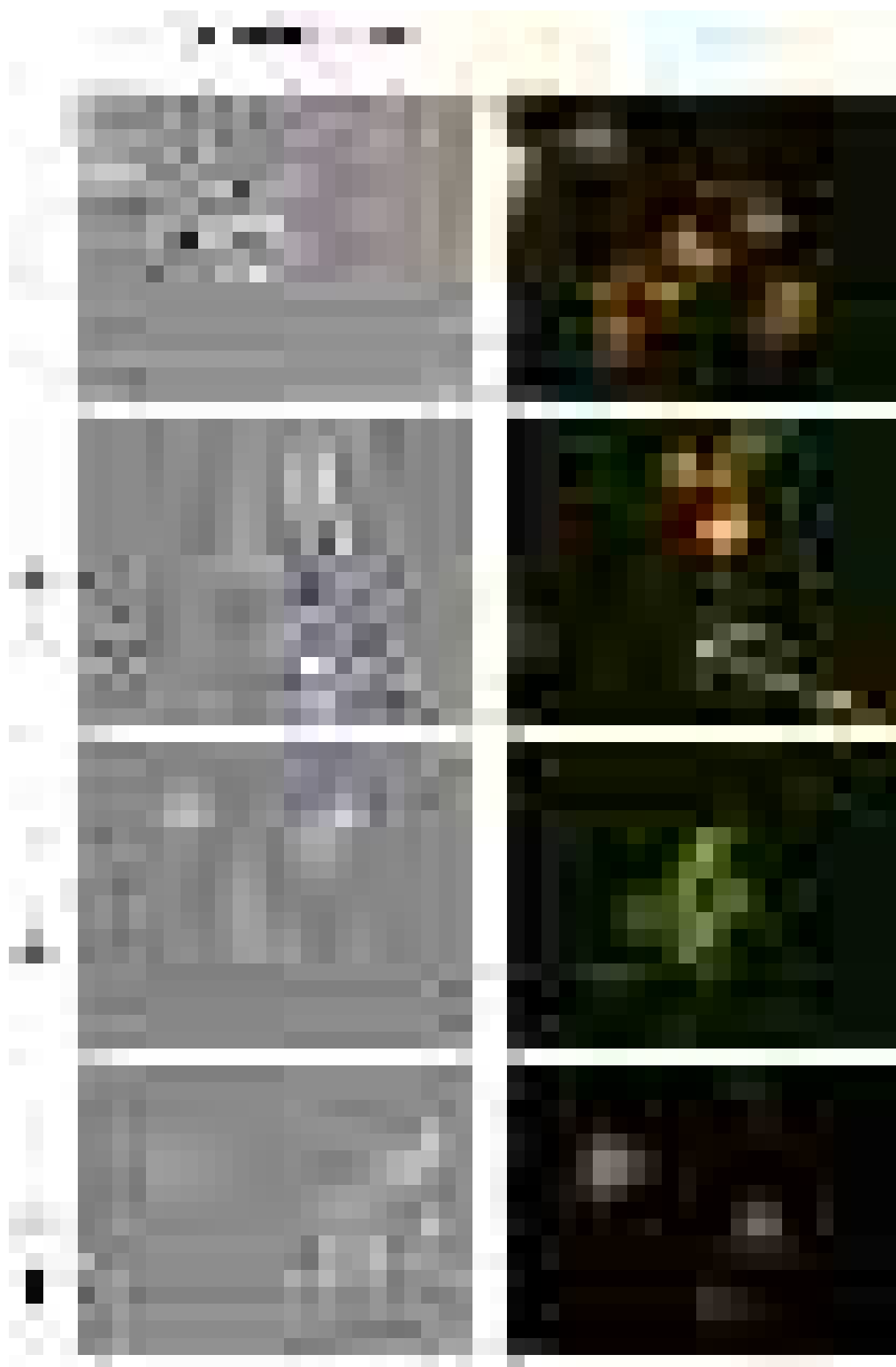
Detekce $\Delta\Psi$ byla provedena u HK-2 buněk inkubovaných s CdCl_2 s využitím sondy JC-1. Hodnoty $\Delta\Psi$ fluktovaly v závislosti na koncentraci CdCl_2 a časovém intervalu. Jak je patrné z grafu 10, signifikantní pokles $\Delta\Psi$ u časového intervalu 2 hod byl pozorován u 200 μM CdCl_2 , kde došlo k poklesu $\Delta\Psi$ o 14 % ve srovnání s kontrolními buňkami. K dalšímu pozorovanému poklesu $\Delta\Psi$ došlo u 25 μM CdCl_2 po 10 hod, a to o 25 %. Nejvýznamnější pokles $\Delta\Psi$ byl pozorován po expozici

200 μM CdCl_2 v časovém intervalu 24 hod a to téměř na nulovou hodnotu. Hodnoty poměru R/G jsou uvedeny v příloze 4.



Graf 10: Vliv kadmia na mitochondriální membránový potenciál u buněk HK-2. Inkubace s CdCl_2 (5, 25 a 200 μM) v časových intervalech 2, 6, 10 a 24 hod; detekce s využitím sondy JC-1 ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 485/535$ (595) nm). Mitochondriální membránový potenciál byl vyjádřen jako poměr R/G; průměr \pm SD; ***, $p < 0,001$ (vs. kontrola daného časového intervalu); $n = 6-10$.

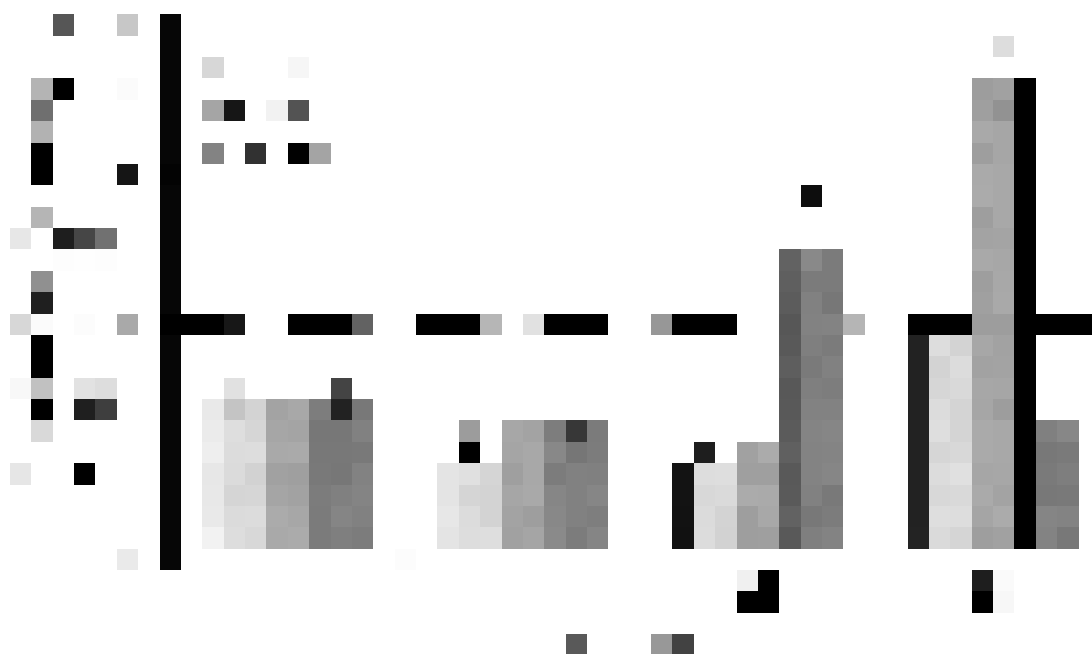
Jak je patrné z níže uvedeného obrázku 25, kontrolní buňky ve fázovém kontrastu jsou viabilní a normální morfologie. Toto potvrzuje i fluorescenční snímek sondy JC-1, kde je patrná červená fluorescence v důsledku vysokého $\Delta\Psi$ buněk. U buněk, které byly exponovány 5 μM CdCl_2 , je patrná taktéž červená fluorescence sondy JC-1 v mitochondriích, což svědčí pro vysoký $\Delta\Psi$. Lze tedy usuzovat, že tato koncentrace CdCl_2 nepůsobí na buňky toxicky a u mitochondrií nedochází k poklesu $\Delta\Psi$. Naopak u buněk inkubovaných s 25 a 200 μM CdCl_2 pozorujeme zelenou fluorescenci sondy JC-1, což svědčí pro nízký $\Delta\Psi$ a cytotoxické působení CdCl_2 . Pro tuto skutečnost svědčí i morfologie buněk pozorovaná ve fázovém kontrastu, kde je velikost buněk v porovnání s buňkami kontrolními menší. Dále pak u buněk sledujeme tzv. „blebbing membrány“.



Obr 25: Detekce mitochondriálního membránového potenciálu s využitím sondy JC-1 u buněk HK-2 exponovaných kadmii v časovém intervalu 24 hod; zvětšení 400x; fázový kontrast a fluorescence ($\lambda_{EX/EM} = 485/535 (595) \text{ nm}$); bílé šipky = „blebbing“ membrány.

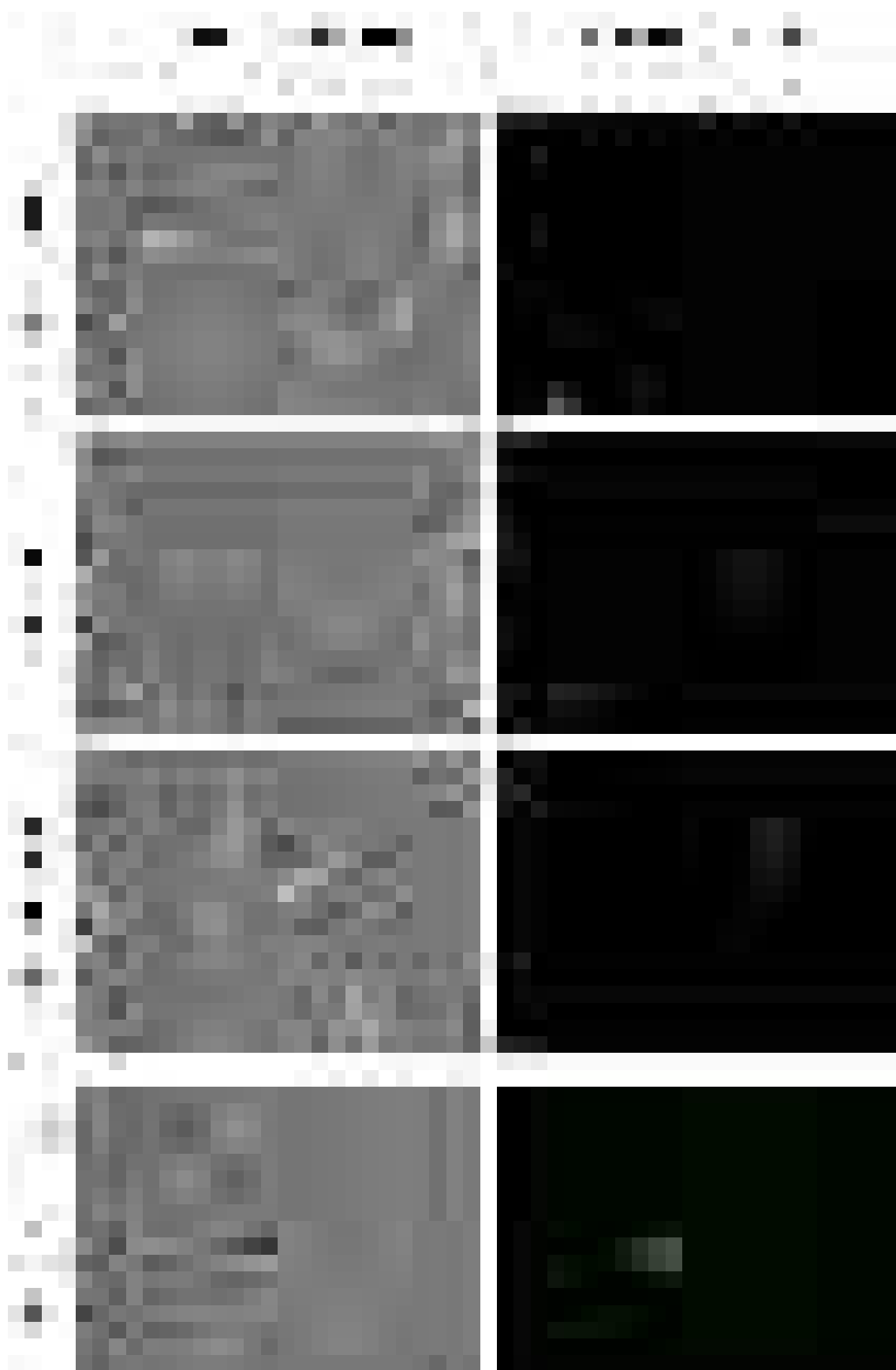
5.3.3 Reaktivní formy kyslíku

Produkce reaktivních forem kyslíku byla detekována s využitím sondy CM-H₂DCFDA. Jak je patrné z grafu 11, po dvouhodinové inkubaci buněk s CdCl₂ (5 a 25 μM) došlo k signifikantnímu snížení fluorescence sondy CM-H₂DCFDA (snížení o 40 %). Naopak u 200 μM CdCl₂ došlo ke zvýšení fluorescence o 48 %. Po šestihodinové inkubaci buněk s 200 μM CdCl₂ došlo k signifikantnímu zvýšení fluorescence sondy, a to o 211 % ve srovnání s kontrolními buňkami. Po dvacetičtyřhodinové inkubaci buněk s 25 μM CdCl₂ byl sledován nárůst fluorescence o 104 % ve srovnání s kontrolními buňkami. Přesné hodnoty produkce ROS jsou uvedeny v příloze 5.



Graf 11: Detekce ROS u buněk HK-2 exponovaných CdCl₂ (5, 25 a 200 μM) v časových intervalech 2, 6 a 24 hod s využitím sondy CM-H₂DCFDA ($\lambda_{EX/EM} = 485/535$ nm). Koncentrace ROS byla vyjádřena jako % kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %); průměr ± SD; ***, $p < 0,001$ (vs. kontrola daného časového intervalu); $n = 6-10$.

Pro mikroskopickou detekci tvorby ROS pomocí sondy CM-H₂DCFDA byly použity také buňky HK-2 inkubované s CdCl₂. Jak je patrné z obrázku 26, kontrolní buňky ve fázovém kontrastu jsou viabilní a normální morfologie. Pro toto svědčí i fluorescenční snímek buněk barvených pomocí CM-H₂DCFDA pro detekci ROS, kde nedošlo ke zvýšení fluorescence sondy.



Obr 26: Detekce produkce ROS pomocí sondy CM-H₂DCFDA u buněk HK-2 exponovaných kadmii (5, 25 a 200 μ M) v časovém intervalu 24 hod; zvětšení 400x; fázový kontrast a fluorescence ($\lambda_{EX/EM}$ = 485/535 nm).

U buněk exponovaných 5 μM CdCl_2 nebyla pozorovaná fluorescence. Naopak u buněk inkubovaných s 25 a 200 μM CdCl_2 lze pozorovat zvýšenou fluorescenci sondy CM- H_2DCFDA , což svědčí pro produkci ROS v těchto buňkách. Takto zvýšená fluorescence je přímo závislá na koncentraci CdCl_2 . Zejména pak u buněk ovlivněných 200 μM CdCl_2 lze pozorovat snížení denzity buněk a změny buněčných membrán.

5.3.4 Detekce fragmentované DNA

Pro detekci vlivu kadmia na fragmentaci DNA u buněk HK-2 byla použita sonda Hoechst 33258. Jak je patrné z tabulky 8, signifikantní nárůst fluorescence, který může značit přítomnost fragmentované DNA, sledujeme pouze u 200 μM CdCl_2 v časových intervalech 10 a 24 hod.

Tabulka 8: Vliv CdCl_2 na fragmentaci DNA u buněk HK-2. Inkubace s CdCl_2 (5, 25 a 200 μM) v časových intervalech 2, 6, 10 a 24 hod; detekce s využitím sondy Hoechst 33258 ($\lambda_{\text{EX/EM}} = 352/461$ nm). Míra fragmentace DNA byla vyjádřena jako % kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %); průměr \pm SD; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (vs. kontrola daného časového intervalu); $n = 6-10$.

Čas (hod)	CdCl_2 (μM)			
	0	5	25	200
2	100 \pm 11 %	94 \pm 15 %	65 \pm 13 %**	61 \pm 17 %***
6	100 \pm 50 %	107 \pm 28 %	98 \pm 5 %	87 \pm 44 %
10	100 \pm 30 %	69 \pm 26 %	70 \pm 21 %	563 \pm 26 %***
24	100 \pm 13%	74 \pm 16 %	86 \pm 8 %	561 \pm 36 %***

6. Diskuze

A. Optimalizace spektrofluorimetrické metody pro detekci glutathionu

Glutathion (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH) je nejhojnější neproteinová thiolová sloučenina, která je široce distribuovaná v živých organismech (Winyard *et al.*, 2005). Majoritně se GSH vyskytuje právě v redukované formě, ve které vstupuje do reakcí za vzniku oxidovaného GSSG. Tato oxidovaná forma se posléze redukuje pomocí glutathionreduktázy (Tosatto *et al.*, 2008). Svoji roli takto hraje glutathion v řadě fyziologických i patologických stavů (DeLeve *et al.*, 1991).

V dnešní době se pro detekci intracelulární koncentrace GSH využívá řada metod. Fluorimetrické metody jsou využívány zejména kvůli jejich vysoké citlivosti a specifitě. Mezi tyto metody řadíme např. metodu využívající fluorofor OPA (Hissin *et al.*, 1976; Rousar *et al.*, 2012) či naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (Lewicki *et al.*, 2006). Novou metodou je využití sondy RT-AM pro detekci GSH v buňkách s využitím HPLC v reálném čase (Cossetti *et al.*, 2018). Bimany jsou dalšími sondami používanými pro fluorescenční detekci GSH. Jejich výhodou je to, že pokud s GSH nezreagují, jsou nefluorescenční (Lu, 2013; Stevenson *et al.*, 2002). Fluorescenci po reakci bimanů s GSH a schopnost penetrovat buněčnými membránami lze využít pro detekci GSH v intaktních buňkách (Cadenas, 1989; Lewis *et al.*, 2009). Přestože oba typy bimanových sloučenin (tj. monochlorobimany, monobromobimany) mohou být použity pro detekci buněčných thiolů, bylo prokázáno, že MCB je pro detekci GSH specifitější. Je to způsobeno vyšší specifitou reakce mezi MCB a GSH za současné katalýzy glutathion-S-transferázami (Cook *et al.*, 1991; Nauen *et al.*, 2002; Stevenson *et al.*, 2002).

V řadě studií byly bimany použity pro detekci GSH v buňkách pomocí různých analytických technik. Produkt reakce mezi MCB a GSH byl detekován pomocí HPLC (Amarnath *et al.*, 2003; Cadenas, 1989; Kroemer *et al.*, 2007), průtokové cytometrie (Barhoumi *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1991) a fluorescenční mikroskopie (Bellomo *et al.*, 1992; Keelan *et al.*, 2001). Schopnost MCB pronikat přes buněčné membrány tedy mohla být použita s výhodou pro zavedení rychlého spektrofluorimetrického testu u intaktních buněk, aniž by bylo zapotřebí dalšího preanalytického postupu. Cílem této práce bylo tedy optimalizovat a charakterizovat test včetně následné kalkulace pro detekci GSH s využitím MCB u buněk kultivovaných v 96jamkové destičce pomocí destičkového spektrofluorimetru.

V naší práci jsme testovali vliv enzymu GST na průběh reakce mezi bimaný a GSH. Prokázali jsme, že přítomnost GST zvyšovala fluorescenci produktu reakce u MCB i MBB. Toto zjištění přímo koresponduje s pracemi jiných autorů (Barhoumi *et al.*, 1995; Hulbert *et al.*, 1983; Machado *et al.*, 2012; Ralat *et al.*, 2003). Aktivita GST je v každé buňce odlišná. Toto tvrzení potvrzuje práce autorů, ve které při práci s erytrocyty museli pro zajištění reakce mezi MCB a GSH k buňkám přidávat GST (Raththagala *et al.*, 2006). Práce dalších autorů popisovala přímou reakci MCB s GSH v buňkách za současné katalýzy této reakce pomocí intracelulárních GST (Briviba *et al.*, 1993). V naší práci jsme intracelulární koncentraci GSH detekovali přímo s využitím MCB bez dodatečného přidání GST do reakce, protože buňky obsahují intracelulární GST.

Dalším optimalizačním krokem této práce bylo stanovení optimální koncentrace bimanů. Optimální koncentrace v buňkách byla stanovena jako 40 μM MCB a 10 μM MBB. Optimální koncentrace MCB v rozmezí 30–50 μM je v souladu se studii jiných autorů, ve kterých pracovali s různými buněčnými liniemi, jako např. s buňkami lidského ovariálního karcinomu (Cook *et al.*, 1991), primárními myšími fibroblasty (Chan *et al.*, 2000), neuronálními a gliovými buňkami (Keelan *et al.*, 2001) a řadou dalších (Dickinson *et al.*, 2002; Flampouri *et al.*, 2016; Majumder *et al.*, 2015). V dalších pracích autoři pracovali i s vyššími koncentracemi MCB, a to se 60 μM (Chatterjee *et al.*, 1999) či 100 μM MCB (Cadenas, 1989).

Dále námi byla optimalizována i doba inkubace MCB v buňkách spolu s dobou trvání fluorimetrického měření. Měření bylo provedeno s využitím obou bimanů u buněk HK-2 exponovaným depletoru glutathionu DEM. Jako nejvhodnější byly pro další měření vybrány 0,5 a 2 mM DEM. Použití DEM jako modelového depletoru GSH bylo využito i v řadě jiných prací (Capek *et al.*, 2017; Mitchell *et al.*, 1983; Weber *et al.*, 1990). V naší práci jsme nejprve měřili fluorescenci sond MCB a MBB po dobu 90 min, aby poté jako nejvhodnější byla vybrána doba inkubace sondy s buňkami po dobu 60 min. Toto koresponduje s prací jiných autorů, ve které detekovali vliv různé doby inkubace (30 a 60 min) sondy MCB (50 μM). Výsledná doba inkubace a distribuce MCB v buňkách závisí především na zvolné buněčné linii (Keelan *et al.*, 2001). U lidských buněčných linií je optimální čas inkubace MCB mezi 40–50 min s ohledem na typ buněčné linie (Cook *et al.*, 1989). Studie jiných autorů využívající průtokovou cytometrii a fluorescenční mikroskopii inkubovaly MCB s buňkami po různě dlouhou dobu: 20 min (Cadenas, 1989), 30–60 min (Keelan *et*

al., 2001), 30 min (Chan *et al.*, 2000) a 40 min (Majumder *et al.*, 2015). U prací, jež využívaly k detekci destičkového spektrofluorimetru, autoři inkubovali MCB s buňkami nejčastěji po dobu 20–30 min (Dickinson *et al.*, 2002; Flampouri *et al.*, 2016; Nauen *et al.*, 2002).

Optimalizace výpočtu koncentrace GSH probíhala u buněk HK-2. Po přidání MCB k buňkám jsme detekovali fluorescenci vzniklého komplexu MCB-GSH kineticky po dobu 60 min a zjistili jsme, že fluorescenční signál byl téměř lineární pouze prvních 10 min měření. Byla vypočtena závislost R^2 na časovém intervalu, kde jsme zjistili, že hodnota R^2 klesá s postupujícím časem. Z tohoto vyplývá námi navržený a publikovaný optimalizovaný postup vyhodnocení koncentrace GSH (Capek *et al.*, 2017) získaný jako změna směrnice přímky po 10 min měření. Výsledky získané srovnáním fluorescenčního signálu MCB měřeného po dobu 10 a 60 min u buněk ovlivněných CisPt se dle předpokladu lišily. Proto jsme provedli další testy na dvou typech buněk (HK-2, A549) exponovaných DEM, kdy byla míra deplece GSH charakterizována s využitím MCB a MBB pomocí optimalizované a standardní metody kalkulace, a také pomocí OPA. Dokázali jsme, že způsob vyhodnocení fluorescenčního signálu po inkubaci buněk s MCB významně ovlivnilo detekované koncentrace GSH, přičemž koncentrace GSH detekované optimalizovanou metodou byly vždy výrazně nižší ve srovnání s hladinami GSH získanými po 60 min měření, resp. pomocí standardní metody. Toto bylo potvrzeno u obou testovaných buněčných linií (HK-2, A549) a monochlorobimanu i monobromobimanu. Kromě toho jsme potvrdili, že koncentrace GSH detekované s využitím MBB jsou ve srovnání s MCB značně nadhodnoceny. Vysvětlením je, že MBB je schopný reagovat mimo GSH také s jinými thioley (Hulbert *et al.*, 1983; Kosower *et al.*, 1987). V literatuře jsme bohužel našli žádné jiné srovnání naměřených koncentrací GSH pomocí MCB s jinou metodou nežli to námi uveřejněné (Capek *et al.*, 2017), kde jsme získané výsledky naměřené s využitím MCB a MBB komparovali s referenční metodou využívající OPA (Rousar *et al.*, 2012). Test využívající OPA je citlivý, specifický a v současné době často používaný pro detekci GSH (Ansari *et al.*, 2015; Dhanya *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Nehra *et al.*, 2015; Ramakrishnan *et al.*, 2016; Vrbova *et al.*, 2016). Naše výsledky ukázaly, že koncentrace GSH naměřené s využitím optimalizované MCB metody jsou srovnatelné s výsledky, kterých jsme dosáhli s využitím referenční metody OPA. Kromě toho jsme potvrdili, že koncentrace GSH detekované pomocí optimalizované metody využívající MCB jsou silně korelovány s koncentracemi GSH

detekovanými pomocí OPA v buňkách ovlivněných různými toxiny. Metoda založená na MCB s následným optimalizovaným vyhodnocením je velice rychlá, přesná a využitelná pro rutinní měření velkého množství vzorků. Limitací této metody je nutnost prezentovat získané výsledky koncentrací GSH pouze jako procenta kontrolních buněk.

B. Optimalizace spektrofluorimetrické metody pro detekci fragmentace DNA

Pro barvení jaderné DNA lze použít velké množství fluorescenčních látek jako jsou DAPI (Morikawa *et al.*, 1981), sondy Hoechst (Loken, 1980) či sondy SYTO (Wlodkowic *et al.*, 2008). Buněčné jádro je nositelem genetické informace buňky, a proto hraje významnou roli díky genové expresi i při proteosyntéze. Při cytotoxicitě může docházet i k jadernému poškození, kam můžeme řadit kondenzaci jaderného chromatinu či v konečné fázi fragmentaci DNA a jádra, což je průvodní jev buněčné smrti. Tyto děje lze pozorovat při apoptóze (Zhang *et al.*, 2000), nekróze (Grasl-Kraupp *et al.*, 1995) či autofagii (Uchiyama *et al.*, 2008). Fragmentace jaderné DNA se účastní řada faktorů, mezi které můžeme řadit např. kaspázami aktivovanou DNázu (Nagata, 2000), aktivaci c-Jun (Turner *et al.*, 1998) či mitochondriemi zprostředkované apoptotické dráhy (Takano *et al.*, 2005).

Charakterizace kondenzace a fragmentace buněčného jádra je velice důležitým parametrem při popisu poškození buněk. Pro vizualizaci buněčného jádra se využívá řada technik. Mnoho autorů využívá TUNEL assay, která je založena na vazbě fluorochromu na 3'OH konec fragmentované DNA za katalýzy terminální deoxynukleotidyltransferázy (Ribas-Maynou *et al.*, 2013). Mezi další metody patří detekce tzv. DNA žebříku či kometová analýza. Principem stanovení DNA žebříku je detekce fragmentované DNA pomocí gelové elektroforézy (Majtnerova *et al.*, 2018). Kometová analýza je založena na elektroforéze poškozených buněk, kde fragmentovaná DNA putuje odlišnou rychlostí než kompaktní DNA. Výsledkem je sledování tzv. komet, kde se posuzuje integrita DNA a intenzita případné fluorescence použité sondy (Majtnerova *et al.*, 2018).

Velice rozšířenou skupinou metod jsou metody fluorescenční, při kterých je jádro vizualizováno s využitím fluorescenční sondy pomocí následné mikroskopické detekce (Murphy, 2009; Saito *et al.*, 2004; Sikdar *et al.*, 2014). Jedna studie (Lukinavicius *et al.*, 2015) popisuje použití konjugátu SiR-Hoechst pro detekci

dynamiky buněčného jádra u živých buněk v reálném čase. Sondy typu Hoechst či DAPI lze využít v metodě založené na mapování jedné molekuly díky jejich možné fotokonverzi, kdy po použití laseru vznikají deriváty těchto sond, které mají emisi posunutou směrem k zelené barvě (Szcurek *et al.*, 2014). Velkou výhodou metody využívající Hoechst oproti DAPI je možnost barvit buněčné jádro nativních buněk. U metody s DAPI je nutno buňky před vlastní analýzou fixovat a permeabilizovat (Chazotte, 2011). Limitací metody využívající Hoechst je případná fototoxicita sondy. Díky časosběrné mikroskopii bylo prokázáno, že buňky exponované vysokým koncentracím sondy Hoechst po dlouhou dobu podstupovaly proces apoptózy (Purschke *et al.*, 2010).

Cílem naší práce bylo optimalizovat koncentraci sondy Hoechst 33258 pro následné využití při detekci fragmentované DNA u buněk pomocí destičkového spektrofluorimetru. Po 60 min inkubaci Hoechst 33258 byla měřena fluorescence sondy, buňky jsme nepromývali. Jako optimální jsme zvolili koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$, která poskytovala dostatečný fluorescenční signál.

Vyšší koncentrace (5 $\mu\text{g/ml}$) nebyla zvolena především z důvodu možné cytotoxicity samotné sondy při delší expozici buněk, která je popsána v práci jiných autorů (Purschke *et al.*, 2010; Siemann *et al.*, 1986). V jiných studiích pro mikroskopickou detekci autoři pracovali s koncentračním rozmezím 1–5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258 (Cao *et al.*, 2011; Hammond *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011). V jedné studii při mikroskopické detekci pracovali s 20 mg/ml Hoechst 33258 (Chen *et al.*, 2010). Autoři využívající ve svých studiích průtokovou cytometrii pracovali se sondou Hoechst 33258 v koncentračním rozmezí 0,5–5,8 $\mu\text{g/ml}$ (Carlson *et al.*, 1997; Rabinovitch, 1983). Pouze jediná práce autorů využila spektrofluorimetrickou metodu založenou na Hoechst 33258 (2 $\mu\text{g/ml}$) pro detekci fragmentované DNA v buňkách exponovaných toxinům. Výsledky byly v této práci prezentovány jako fluorescenční jednotky (Kim *et al.*, 2006). Ostatní autoři využívající ve svých studiích pro detekci fluorescence Hoechst 33258 spektrofluorimetr, vždy měřili závislost fluorescenčního signálu sondy na koncentraci DNA. Dále detekovali vliv pH prostředí na fluorescenci emitovanou komplexem DNA-Hoechst, kde ideální je pH 7,0–8,0, což přímo koresponduje s naší prací (Cesarone *et al.*, 1979; Green *et al.*, 2017; Labarca *et al.*, 1980). V jedné z těchto prací byla inkubace sondy Hoechst 33258 nastavena na 20 min (Cesarone *et al.*, 1979), což se liší od námi zvolené inkubační doby.

V další části práce jsme buňky HK-2 exponovali vybraným toxinům a sledovali zvýšení fluorescence sondy Hoechst 33258, které by mohlo indikovat možnou fragmentaci DNA v důsledku toxického poškození. Zvýšení fluorescence sondy jsme pozorovali u buněk exponovaných 40 μM FCCP, 50 a 100 μM CisPt ve všech časových intervalech. Cytotoxicita CisPt byla předmětem řady studií jiných autorů, kde pro detekci buněčného poškození používali např. detekci kaspázové aktivity, kde autoři prokázali signifikantní zvýšení aktivity kaspázy 3 po 24 hod inkubace s 50 μM CisPt, což koresponduje s námi nalezenou fragmentací DNA v daných časových intervalech (Lau, 1999). V další studii využili autoři kometovou analýzu, kde prokázali fragmentaci DNA po 24 hod u buněk PC12 inkubovaných s 0,1 $\mu\text{g/ml}$ CisPt (Mendonca *et al.*, 2010). Řada prací byla založena na detekci dráhy aktivované pomocí CisPt jejímž důsledkem bylo poškození jádra buněk s následnou DNA fragmentací (Baek *et al.*, 2003; Basnakian *et al.*, 2005; Mendonca *et al.*, 2010). Pozorované zvýšení fluorescence sondy Hoechst 33258 u buněk exponovaných 40 μM FCCP přímo koreluje s prací jiných autorů (Dispersyn *et al.*, 1999). V této práci pracovali s koncentrací 50 μM FCCP u buněk PC12, u kterých po 24 hod expozici detekovali apoptické buňky. Po 24 hod inkubaci s 10 μM FCCP s využitím sondy Hoechst 33342 detekovali alterace plazmatické membrány.

Jako poslední jsme testovali cytotoxický efekt 50 μM t-BHP. Tato koncentrace způsobila zvýšení intenzity fluorescence po 2 hod.

C. Detekce nefrotoxického působení CdCl_2 pomocí fluorescenčních sond

Kadmium je jeden z toxických těžkých kovů, jeho výskyt je podmíněn převážně průmyslovou výrobou. V lidském organismu se Cd hromadí v metalothioneinech. Nadměrná expozice kadmiumu způsobuje renální, kosterní, jaterní, cévní a respirační poruchy (Nordberg, 1992). Dle klasifikace Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny je Cd řazeno mezi karcinogeny 1. skupiny (Vainio *et al.*, 1993). Některé z cytotoxických účinků kadmia jsou způsobeny modifikací dráhy závislé na Ca^{2+} , a protože Ca^{2+} aktivuje na Ca^{2+} -závislou endonukleázu, proteinkinázu C a další enzymy, dochází po expozici Cd k buněčné smrti. Kadmium dále působí na řadu buněčných kompartmentů a intracelulárních drah, díky čemuž v konečném důsledku dochází k poškození exponovaných buněk. Účinek Cd vedle dalších těžkých kovů, jako např. rtuť, přímo aktivuje produkci ROS v buňkách (Nishimura *et*

al., 2006; Yang *et al.*, 1997). Jako důsledek cytotoxického působení Cd byla dříve považována nekrotická smrt buněk. Na základě řady studií byla u buněk exponovaných Cd detekována periferní kondenzace a fragmentace chromatinu svědčící spíše pro apoptotickou smrt buněk (Yang *et al.*, 1997).

Kadmium se hromadí v jádře buněk, kde působí fatální změny v DNA, mezi které můžeme v konečném důsledku řadit již výše zmíněnou fragmentaci DNA. Dále Cd inhibuje antioxidantní enzymy, čímž prohlubuje svůj cytotoxický účinek (Hamada *et al.*, 1997). Cytotoxicita Cd je velice složitá a v současné době je stále předmětem studií, ve kterých je využívána řada technik.

V části naší práce byla charakterizována cytotoxicita kadmia ve formě CdCl₂ s využitím fluorescenčních intracelulárních sond, tj. detekce koncentrace GSH, mitochondriálního membránového potenciálu, detekce produkce ROS a detekce fragmentované DNA.

Nejvyšší nárůst produkce ROS byl sledován u buněk ovlivněných 25 μM CdCl₂ po 24 hod a u buněk ovlivněných 200 μM CdCl₂ v časovém intervalu 6 hod. Spektrofluorimetrické výsledky byly potvrzeny i fluorescenční mikroskopií, kde jsme produkci ROS detekovali s využitím fluorescenční sondy CM-H₂DCFDA. Zvýšená produkce ROS detekovaná v naší práci u buněk exponovaných CdCl₂ se shoduje s řadou dalších studií (Shaikh *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2013; Wilmes *et al.*, 2011). Toxicita kadmia je spojena s řadou subcelulárních toxických mechanismů a nedávne studie prokázaly participaci tvorby ROS v těchto toxických mechanismech. Jedná se o mechanismus založený na produkci mitochondriálních ROS, jejichž vlivem dochází k depolarizaci mitochondriální membrány a translokaci apoptózu-indukujícího faktoru do jádra (Kim *et al.*, 2006; Tobwala *et al.*, 2014). Kadmium může indukci tvorby ROS také aktivovat mitogenem aktivované proteinkinázy (Liu *et al.*, 2009). Produkce ROS může být závislá na vlivu CdCl₂ na permeabilitu membrány mitochondrií (Gobe *et al.*, 2010).

V naší práci jsme dále detekovali signifikantní pokles koncentrace GSH u buněk HK-2 po expozici 200 μM CdCl₂ v delších časových intervalech 6, 10 a 24 hod. Sledovaný pokles koncentrace GSH v buňkách svědčí pro významnou roli antioxidantů při buněčném poškození způsobeném CdCl₂ (Lopez *et al.*, 2006). Ostatní autoři ve svých studiích potvrdili působení CdCl₂ na intracelulární koncentraci GSH. Pokles GSH autoři sledovali u buněk A549 exponovaných CdCl₂ (100 μM) po dobu 24 hod (Gaubin *et al.*, 2000) či u buněk proximálního tubulu, které byly

exponovány CdCl_2 (10 μM) po dobu 14 hod (Prozialeck *et al.*, 1995). Další autoři potvrdili toxicitu na myších modelech (Almazan *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2006).

Signifikantní pokles hodnoty $\Delta\Psi$ byl sledován zejména u buněk exponovaných 25 a 200 μM CdCl_2 v časovém intervalu 24 hod. Další významný pokles $\Delta\Psi$ byl pozorován u buněk exponovaných 200 μM CdCl_2 po dobu 10 hod.

Pokles hodnoty $\Delta\Psi$ sledovaný zejména u buněk inkubovaných s 25 a 200 μM CdCl_2 po 24 hod koresponduje se studii jiných autorů, kde autoři potvrdili cytotoxický účinek CdCl_2 (50 μM) po 6 hod inkubaci u ledvinných epiteliálních buněk s využitím sondy JC-1 (Zhang *et al.*, 2014). V další práci autoři pro testování vlivu CdCl_2 (100 μM ; inkubace 8 hod) na $\Delta\Psi$ využili plicní fibroblasty MRC-5. Detekci provedli s využitím sondy JC-1, jejíž fluorescenční signál byl detekovaný s využitím průtokové cytometrie a potvrdili cytotoxický efekt CdCl_2 (Shih *et al.*, 2003). Pokles $\Delta\Psi$ může být způsoben přímo účinkem CdCl_2 či zprostředkovaně pomocí ROS, které jsou tvořeny pod vlivem CdCl_2 (Cannino *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2013).

Nakonec jsme posuzovali vliv CdCl_2 na možnou fragmentaci DNA u buněk HK-2 s využitím sondy Hoechst 33258. Byl nalezen nárůst fluorescence sondy Hoechst 33258 u buněk exponovaných 200 μM CdCl_2 po 24 hod. Signifikantní nárůst fluorescence byl sledován už po 10 hod inkubaci buněk s 200 μM CdCl_2 . Kondenzace chromatinu a fragmentace DNA může svědčit např. pro probíhající proces apoptózy.

Apoptóza indukovaná CdCl_2 může být zprostředkována dvěma nezávislými cestami. První cestou je štěpení proteinu Bid, které je závislé na kaspáze 8 s následným uvolněním cytochromu c a aktivací kaspázy 9 a kaspázy 3. Druhá cesta je zprostředkována štěpením mitochondriálního proteinu Bax pomocí kalpainu. V této práci autoři zjistili nezávislost proteinů Bid a Bax na proteinu Bcl-2, z čehož vyplývá, že ROS přispívají k buněčné smrti indukované CdCl_2 (Oh *et al.*, 2004). V jedné studii autoři popisovali, že fragmentace DNA je nezávislá na koncentraci a době expozice, což nekorresponduje s našimi výsledky (Ye *et al.*, 2007). Stav buněčného jádra po expozici kadmii studovali ve svých studiích i jiní autoři, kteří pro detekci poškození jádra buněk využili výhradně fluorescenční mikroskopii (Yan *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013). Ve studii (Watjen *et al.*, 2002) pozorovali kondenzaci buněčného jádra s využitím Hoechst 33258 pomocí fluorescenční mikroskopie u gliomových buněk C6 po 48 hod expozici 2,5 μM CdCl_2 . Další autoři s využitím fluorescenční mikroskopie a sondy Hoechst detekovali změny v jaderné DNA. U buněk

exponovaných 5 μM CdCl_2 již po 3 hod detekovali kondenzaci DNA (Liu *et al.*, 2016). V další studii po expozici kardiomyocytů 100 μM CdCl_2 po dobu 12 hod autoři sledovali s využitím sondy Hoechst zvýšenou apoptózu buněk v porovnání ke kontrolním buňkám (Chen *et al.*, 2015). Dále studie ostatních autorů detekovali fragmentovanou DNA s využitím Hoechst 33258 např. u fibroblastů exponovaných 10 μM CdCl_2 po 36 hod (Kim *et al.*, 2000) či buněk lidského adenokarcinomu exponovaných 10 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 po dobu 24 hod (Ravindran *et al.*, 2017). Výše uvedené výsledky autorů potvrzují námi získané výsledky s využitím spektrofluorimetrické metody využívající Hoechst 33258 o nalezení fragmentované DNA po působení kadmia.

7. Závěr

Během naší práce byla optimalizována spektrofluorimetrická metoda pro rutinní detekci GSH v buňkách. Nejprve byly optimalizovány koncentrace MCB a MBB a následně byly tyto optimální použity pro další stanovení. U obou sond byl fluorescenční signál vyhodnocen v souladu se standardním postupem po 60 min měření a následně komparován s optimalizovaným postupem vyhodnocení. Všechny námi dosažené výsledky byly následně komparovány s referenční metodou využívající OPA. Následně byla metoda MCB korelována s OPA a bylo zjištěno, že obě metody vykazují velmi silnou korelaci ($r = 0,96$).

Dále jsme optimalizovali spektrofluorimetrické stanovení fragmentované DNA. Nejprve jsme optimalizovali pracovní koncentraci sondy Hoechst 33258 a poté metodu využili pro detekci fragmentované DNA u buněk exponovaných vybraným toxinům.

V poslední části práce jsme využili tyto dvě i další metody pro charakterizaci toxického působení CdCl_2 v několika časových intervalech v HK-2 buňkách. Detekovali jsme koncentraci GSH, fragmentaci DNA, produkci ROS a hodnotu $\Delta\Psi$. Byl nalezen vztah mezi koncentrací GSH a produkcí ROS, kde zvýšení produkce ROS předcházelo snížení koncentrace GSH. Dále bylo detekováno signifikantní snížení $\Delta\Psi$ a zvýšená fragmentace DNA. Nejvýznamnější vliv toxického působení CdCl_2 byl detekován u $200 \mu\text{M CdCl}_2$.

8. Seznam literatury

1. Al-Nasser IA (2000). Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *J Toxicol-Clin Toxic* 38(4): 407-413.
2. Albrich JM, Mccarthy CA, Hurst JK (1981). Biological Reactivity of Hypochlorous Acid - Implications for Microbicidal Mechanisms of Leukocyte Myeloperoxidase. *P Natl Acad Sci-Biol* 78(1): 210-214.
3. Almazan G, Liu HN, Khorchid A, Sundararajan S, Martinez-Bermudez AK, Chemtob S (2000). Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. *Free Radic Biol Med* 29(9): 858-869.
4. Amarnath K, Amarnath V, Amarnath K, Valentine HL, Valentine WM (2003). A specific HPLC-UV method for the determination of cysteine and related aminothiols in biological samples. *Talanta* 60(6): 1229-1238.
5. Andresen M, Regueira T, Bruhn A, Perez D, Strobel P, Dougnac A, *et al.* (2008). Lipoperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock. *Mediat Inflamm*.
6. Andrews DL (2009). Encyclopedia of Applied Spectroscopy. *Wiley VCH*: 1224.
7. Ansari FA, Ali SN, Mahmood R (2015). Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 29(7): 1878-1886.
8. Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
9. Araujo AR, Saraiva ML, Lima JL (2008). Determination of total and oxidized glutathione in human whole blood with a sequential injection analysis system. *Talanta* 74(5): 1511-1519.
10. Armstrong RN (1991). Glutathione S-Transferases - Reaction-Mechanism, Structure, and Function. *Chem Res Toxicol* 4(2): 131-140.
11. Aw TY (2003). Cellular redox: A modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol Sci* 18: 201-204.
12. Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK (2003). Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med* 142(3): 178-186.
13. Balendiran GK, Dabur R, Fraser D (2004). The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct* 22(6): 343-352.
14. Ball DW (2007). The electromagnetic spectrum: A history. *Spectroscopy* 22(3): 14-+.
15. Ballard JW, Youngson NA (2015). Review: can diet influence the selective advantage of mitochondrial DNA haplotypes? *Biosci Rep* 35(6).
16. Banerjee D, Pal SK (2008). Dynamics in the DNA recognition by DAPI: Exploration of the various binding modes. *J Phys Chem B* 112(3): 1016-1021.
17. Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G (2003). Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Bba-Bioenergetics* 1606(1-3): 137-146.
18. Barhoumi R, Bailey RH, Burghardt RC (1995). Kinetic analysis of glutathione in anchored cells with monochlorobimane. *Cytometry* 19(3): 226-234.
19. Barja G (2002). The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 34(3): 227-233.
20. Basnakian AG, Apostolov EO, Yin XY, Napirei M, Mannherz HG, Shah SV (2005). Cisplatin nephrotoxicity is mediated by deoxyribonuclease I. *Journal of the American Society of Nephrology* 16(3): 697-702.
21. Bayrhuber M, Meins T, Habeck M, Becker S, Giller K, Villinger S, *et al.* (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(40): 15370-15375.
22. Bellomo G, Vairetti M, Stivala L, Mirabelli F, Richelmi P, Orrenius S (1992). Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4412-4416.
23. Belyaeva EA, Sokolova TV, Emelyanova LV, Zakharova IO (2012). Mitochondrial Electron Transport Chain in Heavy Metal-Induced Neurotoxicity: Effects of Cadmium, Mercury, and Copper. *Sci World J*.

24. Benit P, Lebon S, Rustin P (2009). Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Bba-Mol Cell Res* 1793(1): 181-185.
25. Berkholz DS, Faber HR, Savvides SN, Karplus PA (2008). Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution. *J Mol Biol* 382(2): 371-384.
26. Bielski B. H. J., E. CD (1995). Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. *Active Oxygen in Chemistry 2*: 66-104.
27. Blackburn RV, Spitz DR, Liu X, Galoforo SS, Sim JE, Ridnour LA, *et al.* (1999). Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells. *Free Radical Biology and Medicine* 26(3-4): 419-430.
28. Bleier L, Drose S (2013). Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Bba-Bioenergetics* 1827(11-12): 1320-1331.
29. Briviba K, Fraser G, Sies H, Ketterer B (1993). Distribution of the monochlorobimane-glutathione conjugate between nucleus and cytosol in isolated hepatocytes. *Biochem J* 294 (Pt 3): 631-633.
30. Brownlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865): 813-820.
31. Cadenas E (1989). Biochemistry of Oxygen-Toxicity. *Annu Rev Biochem* 58: 79-110.
32. Candy JM, Perry RH, Perry EK, Irving D, Blessed G, Fairbairn AF, *et al.* (1983). Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Neurol Sci* 59(2): 277-289.
33. Canitrot Y, Lahmy S, Buquen JJ, Canitrot D, Lautier D (1996). Functional study of multidrug resistance with fluorescent dyes. Limits of the assay for low levels of resistance and application in clinical samples. *Cancer Lett* 106(1): 59-68.
34. Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi AM (2009). Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9(6): 377-384.
35. Cao MR, Li Q, Liu ZL, Liu HH, Wang W, Liao XL, *et al.* (2011). Harmine induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 10(6): 599-604.
36. Capek J, Hauschke M, Bruckova L, Rousar T (2017). Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 88(Pt 1): 40-45.
37. Carlson CR, Grallert B, Bernander R, Stokke T, Boye E (1997). Measurement of nuclear DNA content in fission yeast by flow cytometry. *Yeast* 13(14): 1329-1335.
38. Carocho M, Ferreira ICFR (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51: 15-25.
39. Cesarone CF, Bolognesi C, Santi L (1979). Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal Biochem* 100(1): 188-197.
40. Cook JA, Iype SN, Mitchell JB (1991). Differential specificity of monochlorobimane for isozymes of human and rodent glutathione S-transferases. *Cancer Res* 51(6): 1606-1612.
41. Cook JA, Pass HI, Russo A, Iype S, Mitchell JB (1989). Use of Monochlorobimane for Glutathione Measurements in Hamster and Human-Tumor Cell-Lines. *Int J Radiat Oncol* 16(5): 1321-1324.
42. Coolidge AS, James HM, Present RD (1936). A Study of the Franck-Condon Principle. *The Journal of Chemical Physics* 4(3): 193-211.
43. Corbett JT (1989). The Scopoletin Assay for Hydrogen-Peroxide - a Review and a Better Method. *J Biochem Bioph Meth* 18(4): 297-307.
44. Cossetti C, Di Giovamberardino G, Rota R, Pastore A (2018). Pitfalls in the quantitative imaging of glutathione in living cells. *Nat Commun* 9(1): 1588.
45. Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol JF (2011). Cytometric Assessment of Mitochondria Using Fluorescent Probes. *Cytom Part A* 79A(6): 405-425.
46. Crow JP (1997). Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide-Biol Ch* 1(2): 145-157.
47. Dann O., Bergen G., Demant E., G. V (1971). Trypanocide Diamidine des 2-Phenyl-benzofurans, 2-Phenyl-indens und 2-Phenyl-indols. *Liebigs Ann. Chem* 749(1): 68-89.
48. De Grey ADNJ (2002). HO₂ center dot: The forgotten radical. *DNA Cell Biol* 21(4): 251-257.
49. Dekaliuk M, Pyrshev K, Demchenko A (2015). Visualization and detection of live and apoptotic cells with fluorescent carbon nanoparticles. *J Nanobiotechnology* 13: 86.

50. DeLeve LD, Kaplowitz N (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 52(3): 287-305.
51. Dhanya R, Arun KB, Nisha VM, Syama HP, Nisha P, Santhosh Kumar TR, *et al.* (2015). Preconditioning L6 Muscle Cells with Naringin Ameliorates Oxidative Stress and Increases Glucose Uptake. *PLoS One* 10(7): e0132429.
52. Dickinson DA, Forman HJ (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64(5-6): 1019-1026.
53. Dieckhaus CM, Fernandez-Metzler CL, King R, Krolikowski PH, Baillie TA (2005). Negative ion tandem mass spectrometry for the detection of glutathione conjugates. *Chem Res Toxicol* 18(4): 630-638.
54. Dispensyn G, Nuydens R, Connors R, Borgers M, Geerts H (1999). Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 1428(2-3): 357-371.
55. Dorta DJ, Leite S, DeMarco KC, Prado IM, Rodrigues T, Mingatto FE, *et al.* (2003). A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J Inorg Biochem* 97(3): 251-257.
56. Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1): 47-95.
57. Droge W, Breitkreutz R (2000). Glutathione and immune function. *P Nutr Soc* 59(4): 595-600.
58. Dundr M, Misteli T (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochemical Journal* 356: 297-310.
59. Elefantova K, Lakatos B, Kubickova J, Sulova Z, Breier A (2018). Detection of the Mitochondrial Membrane Potential by the Cationic Dye JC-1 in L1210 Cells with Massive Overexpression of the Plasma Membrane ABCB1 Drug Transporter. *Int J Mol Sci* 19(7).
60. Ellman GL (1959). Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch Biochem Biophys* 82(1): 70-77.
61. Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ (1986). Rhodamine-123 as a Probe of Transmembrane Potential in Isolated Rat-Liver Mitochondria - Spectral and Metabolic Properties. *Biochim Biophys Acta* 850(3): 436-448.
62. Eriksson S, Kim SK, Kubista M, Norden B (1993). Binding of 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (Dapi) to at Regions of DNA - Evidence for an Allosteric Conformational Change. *Biochemistry-Us* 32(12): 2987-2998.
63. Fernandezcheca JC, Kaplowitz N (1990). The Use of Monochlorobimane to Determine Hepatic Gsh Levels and Synthesis. *Anal Biochem* 190(2): 212-219.
64. Flampouri E, Mavrikou S, Mouzaki-Paxinou AC, Kintzios S (2016). Alterations of cellular redox homeostasis in cultured fibroblast-like renal cells upon exposure to low doses of cytochrome bc1 complex inhibitor kresoxim-methyl. *Biochem Pharmacol* 113: 97-109.
65. Forman HJ, Zhang HQ, Rinna A (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30(1-2): 1-12.
66. Franco R, Cidlowski JA (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16(10): 1303-1314.
67. Gaubin Y, Vaissade F, Croute F, Beau B, Soleilhavoup J, Murat J (2000). Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 human lung cell-line. *Biochim Biophys Acta* 1495(1): 4-13.
68. Giustarini D, Dalle-Donne I, Colombo R, Milzani A, Rossi R (2003). An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Radic Biol Med* 35(11): 1365-1372.
69. Gobe G, Crane D (2010). Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicology Letters* 198(1): 49-55.
70. Gomberg M (1990). An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *J. Am. Chem. Soc.* 22(1): 757-771.
71. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Bioph Meth* 65(2-3): 45-80.
72. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21(5): 1465-1468.
73. Green MR, Sambrook J (2017). Estimating the Concentration of DNA by Fluorometry Using Hoechst 33258. *Cold Spring Harb Protoc* 2017(5).
74. Griffith OW, Mulcahy RT (1999). The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Ramb* 73: 209-+.

75. Gross E, Sevier CS, Heldman N, Vitu E, Bentzur M, Kaiser CA, *et al.* (2006). Generating disulfides enzymatically: Reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(2): 299-304.
76. Gryn'ova G, Coote ML, Corminboeuf C (2015). Theory and practice of uncommon molecular electronic configurations. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci* 5(6): 440-459.
77. Halliwell B, Clement MV, Long LH (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 486(1): 10-13.
78. Hamada T, Tanimoto A, Sasaguri Y (1997). Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2(4): 359-367.
79. Hammond CL, Madejczyk MS, Ballatori N (2004). Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 195(1): 12-22.
80. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998). Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92(9): 3007-3017.
81. Herst PM, Rowe MR, Carson GM, Berridge MV (2017). Functional Mitochondria in Health and Disease. *Front Endocrinol* 8.
82. Hissin PJ, Hilf R (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74(1): 214-226.
83. Hulbert PB, Yakubu SI (1983). Monobromobimane: a substrate for the fluorimetric assay of glutathione transferase. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 35(6): 384-386.
84. Chan JY, Kwong M (2000). Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta* 1517(1): 19-26.
85. Chatterjee S, Noack H, Possel H, Keilhoff G, Wolf G (1999). Glutathione levels in primary glial cultures: Monochlorobimane provides evidence of cell type-specific distribution. *Glia* 27(2): 152-161.
86. Chazotte B (2011). Labeling mitochondria with JC-1. *Cold Spring Harb Protoc* 2011(9).
87. Chen CY, Zhang SL, Liu ZY, Tian Y, Sun Q (2015). Cadmium toxicity induces ER stress and apoptosis via impairing energy homeostasis in cardiomyocytes. *Biosci Rep* 35(3).
88. Chen QY, Wang YY, Xu KD, Lu GH, Ying Z, Wu LJ, *et al.* (2010). Curcumin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. *Oncol Rep* 23(2): 397-403.
89. Chignell CF, Sik RH (2003). A photochemical study of cells loaded with 2',7'-dichlorofluorescein: Implications for the detection of reactive oxygen species generated during UVA irradiation. *Free Radical Biology and Medicine* 34(8): 1029-1034.
90. Ithayaraja CM (2011). MINI-REVIEW: METABOLIC FUNCTIONS AND MOLECULAR STRUCTURE
91. OF GLUTATHIONE REDUCTASE. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 104-115.
92. Jinfang L., Qin Z., Chunmei W., Xing H., D. Z (2010). Monitoring of Mitochondrial Membrane Potential Changes in Live Cells Using JC-10. *ABD Bioquest*.
93. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 35(2): 211-225.
94. Kalyanaraman B, Chen G, Hardy M, Ouari O, Lopez M, Joseph J, *et al.* (2018). A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds (vol 14C, pg 316, 2017). *Redox Biol* 16: 426-427.
95. Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BHJ (2000). Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal Biochem* 286(1): 35-37.
96. Kand'ar R, Zakova P, Muzakova V (2006). Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 365(1-2): 249-256.
97. Kanofsky JR (1989). Singlet Oxygen Production by Biological-Systems. *Chemico-Biological Interactions* 70(1-2): 1-28.
98. Kataoka H, Takagi K, Makita M (1995). Determination of Total Plasma Homocysteine and Related Amino thiols by Gas-Chromatography with Flame Photometric Detection. *J Chromatogr B* 664(2): 421-425.
99. Keelan J, Allen NJ, Antcliffe D, Pal S, Duchon MR (2001). Quantitative imaging of glutathione in hippocampal neurons and glia in culture using monochlorobimane. *J Neurosci Res* 66(5): 873-884.

100. Kim J, Sharma RP (2006). Cadmium-induced apoptosis in murine macrophages is antagonized by antioxidants and caspase inhibitors. *J Toxicol Env Heal A* 69(12): 1181-1201.
101. Kim MS, Kim BJ, Woo HN, Kim KW, Kim KB, Kim IK, *et al.* (2000). Cadmium induces caspase-mediated cell death: suppression by Bcl-2. *Toxicology* 145(1): 27-37.
102. Kominkova M, Horky P, Cernei N, Tmejova K, Ruttkay-Nedecky B, Guran R, *et al.* (2015). Optimization of the Glutathione Detection by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection in the Brain and Liver of Rats Fed with Taurine. *Int J Electrochem Sc* 10(2): 1716-1727.
103. Kosower EM, Pazhenchevsky B, Hershkowitz E (1978). 1,5-Diazabicyclo[3.3.0]Octadienediones (9,10-Dioxabimanes) - Strongly Fluorescent Syn Isomers. *J Am Chem Soc* 100(20): 6516-6518.
104. Kosower NS, Kosower EM (1987). Thiol Labeling with Bromobimanes. *Methods Enzymol* 143: 76-84.
105. Kosower NS, Kosower EM, Newton GL, Ranney HM (1979). Bimane Fluorescent Labels - Labeling of Normal Human Red-Cells under Physiological Conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7): 3382-3386.
106. Kosower NS, Newton GL, Kosower EM, Ranney HM (1980). Bimane Fluorescent Labels - Characterization of the Bimane Labeling of Human-Hemoglobin. *Biochim Biophys Acta* 622(2): 201-209.
107. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87(1): 99-163.
108. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, *et al.* (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300(5624): 1439-1443.
109. Kuhlbrandt W (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *Bmc Biol* 13.
110. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)(+) oxidation-reduction state. *Biochemical Journal* 368: 545-553.
111. Labarca C, Paigen K (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102(2): 344-352.
112. Lakowicz JR (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer US* 3: 954.
113. Larsen TA, Goodsell DS, Cascio D, Grzeskowiak K, Dickerson RE (1989). The Structure of Dapi Bound to DNA. *J Biomol Struct Dyn* 7(3): 477-&.
114. Lau AH (1999). Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney Int* 56(4): 1295-1298.
115. Lavi A, Weitman H, Holmes RT, Smith KM, Ehrenberg B (2002). The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency. *Biophys J* 82(4): 2101-2110.
116. Lewicki K, Marchand S, Matoub L, Lulek J, Coulon J, Leroy P (2006). Development of a fluorescence-based microtiter plate method for the measurement of glutathione in yeast. *Talanta* 70(4): 876-882.
117. Lewis S, Lynch A, Bachas L, Hampson S, Ormsbee L, Bhattacharyya D (2009). Chelate-Modified Fenton Reaction for the Degradation of Trichloroethylene in Aqueous and Two-Phase Systems. *Environ Eng Sci* 26(4): 849-859.
118. Li D, Ellis EM (2014). Aldo-keto reductase 7A5 (AKR7A5) attenuates oxidative stress and reactive aldehyde toxicity in V79-4 cells. *Toxicol in Vitro* 28(4): 707-714.
119. Liu J, Qu W, Kadiiska MB (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3): 209-214.
120. Liu W, Dai N, Wang Y, Xu C, Zhao H, Xia P, *et al.* (2016). Role of autophagy in cadmium-induced apoptosis of primary rat osteoblasts. *Sci Rep* 6: 20404.
121. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2): 175-184.
122. Loew LM, Tuft RA, Carrington W, Fay FS (1993). Imaging in five dimensions: time-dependent membrane potentials in individual mitochondria. *Biophys J* 65(6): 2396-2407.
123. Loken MR (1980). Separation of viable T and B lymphocytes using a cytochemical stain, Hoechst 33342. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 28(1): 36-39.
124. Loontjens FG, Regenfuss P, Zechel A, Dumortier L, Clegg RM (1990). Binding Characteristics of Hoechst-33258 with Calf Thymus DNA, Poly[D(a-T)], and D(Ccggattccgg) - Multiple

- Stoichiometries and Determination of Tight-Binding with a Wide Spectrum of Site Affinities. *Biochemistry-Us* 29(38): 9029-9039.
125. Lopez E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Canadas S, Gonzalez MP (2006). Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology and Medicine* 40(6): 940-951.
 126. Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L (1974). Superoxide Radicals as Precursors of Mitochondrial Hydrogen-Peroxide. *FEBS Lett* 42(1): 68-72.
 127. Loschen G, Flohe L, Chance B (1971). Respiratory Chain Linked H₂O₂ Production in Pigeon Heart Mitochondria. *FEBS Lett* 18(2): 261-&.
 128. Lu SC (2013). Glutathione synthesis. *Bba-Gen Subjects* 1830(5): 3143-3153.
 129. Lu SC (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30(1-2): 42-59.
 130. Lukinavicius G, Blaukopf C, Pershagen E, Schena A, Reymond L, Derivery E, et al. (2015). SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy. *Nat Commun* 6.
 131. Machado MD, Soares EV (2012). Assessment of cellular reduced glutathione content in *Pseudokirchneriella subcapitata* using monochlorobimane. *J Appl Phycol* 24(6): 1509-1516.
 132. Majtnerova P, Rousar T (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep* 45(5): 1469-1478.
 133. Majumder P, Duchon MR, Gale JE (2015). Cellular glutathione content in the organ of Corti and its role during ototoxicity. *Front Cell Neurosci* 9: 143.
 134. Manevich Y, Held KD, Biaglow JE (1997). Coumarin-3-carboxylic acid as a detector for hydroxyl radicals generated chemically and by gamma radiation. *Radiat Res* 148(6): 580-591.
 135. Martin P, Archier P, Vieillescazes C, Pistre MS (2001). HPLC coupled with fluorimetric detection for the identification of natural resins in archaeological materials. *Chromatographia* 53(7-8): 380-384.
 136. Martin RM, Leonhardt H, Cardoso MC (2005). DNA labeling in living cells. *Cytom Part A* 67A(1): 45-52.
 137. Martorana F, Gaglio D, Bianco MR, Aprea F, Virtuoso A, Bonanomi M, et al. (2018). Differentiation by nerve growth factor (NGF) involves mechanisms of crosstalk between energy homeostasis and mitochondrial remodeling. *Cell Death Dis* 9.
 138. Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32(8): 595-603.
 139. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF (1999). Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* 34(4 Pt 1): 539-545.
 140. Meister A, Anderson ME (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.
 141. Meistner A (1995). [1] Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 251: 3-7.
 142. Mendonca LM, dos Santos GC, dos Santos RA, Takahashi CS, Bianchi Mde L, Antunes LM (2010). Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. *Hum Exp Toxicol* 29(8): 635-643.
 143. Meredith MJ, Reed DJ (1982). Status of the Mitochondrial Pool of Glutathione in the Isolated Hepatocyte. *J Biol Chem* 257(7): 3747-3753.
 144. Michaelsen JT, Dehnert S, Giustarini D, Beckmann B, Tsikasa D (2009). HPLC analysis of human erythrocytic glutathione forms using OPA and N-acetyl-cysteine ethyl ester: Evidence for nitrite-induced GSH oxidation to GSSG. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877(28): 3405-3417.
 145. Mithofer K, Sandy MS, Smith MT, Di Monte D (1992). Mitochondrial poisons cause depletion of reduced glutathione in isolated hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 295(1): 132-136.
 146. Mitchell JB, Russo A, Biaglow JE, McPherson S (1983). Cellular glutathione depletion by diethyl maleate or buthionine sulfoximine: no effect of glutathione depletion on the oxygen enhancement ratio. *Radiat Res* 96(2): 422-428.
 147. Monostori P, Wittmann G, Karg E, Turi S (2009). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(28): 3331-3346.
 148. Morgan MJ, Liu ZG (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21(1): 103-115.
 149. Morikawa K, Yanagida M (1981). Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method. *J Biochem* 89(2): 693-696.
 150. Muller F, Crofts AR, Kramer DM (2002). Multiple Q-cycle bypass reactions at the Q(o) site of the cytochrome bc(1) complex. *Biochemistry-Us* 41(25): 7866-7874.
 151. Murphy MP (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417: 1-13.

152. Nagata S (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256(1): 12-18.
153. Nauen R, Stumpf N (2002). Fluorometric microplate assay to measure glutathione S-transferase activity in insects and mites using monochlorobimane. *Anal Biochem* 303(2): 194-198.
154. Nehra S, Bhardwaj V, Ganju L, Saraswat D (2015). Nanocurcumin Prevents Hypoxia Induced Stress in Primary Human Ventricular Cardiomyocytes by Maintaining Mitochondrial Homeostasis. *PLoS One* 10(9): e0139121.
155. Neupane P, Bhujju S, Thapa N, Bhattarai HK (2019). ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomol Concepts* 10(1): 1-10.
156. Neuschwandertetri BA, Roll FJ (1989). Glutathione Measurement by High-Performance Liquid-Chromatography Separation and Fluorometric Detection of the Glutathione Orthophthalaldehyde Adduct. *Anal Biochem* 179(2): 236-241.
157. Nishimura Y, Yamaguchi J, Kanada A, Horimoto K, Kanemaru K, Satoh M, *et al.* (2006). Increase in intracellular Cd²⁺ concentration of rat cerebellar granule neurons incubated with cadmium chloride: Cadmium cytotoxicity under external Ca²⁺-free condition. *Toxicol in Vitro* 20(2): 211-216.
158. Nordberg GF (1992). Application of the 'critical effect' and 'critical concentration' concept to human risk assessment for cadmium. *IARC Sci Publ*(118): 3-14.
159. Oh SH, Lee BH, Lim SC (2004). Cadmium induces apoptotic cell death in WI 38 cells via caspase-dependent Bid cleavage and calpain-mediated mitochondrial Bax cleavage by Bcl-2-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 68(9): 1845-1855.
160. Ohyashiki T, Nunomura M, Katoh T (1999). Detection of superoxide anion radical in phospholipid liposomal membrane by fluorescence quenching method using 1,3-diphenylisobenzofuran. *Bba-Biomembranes* 1421(1): 131-139.
161. Olive PL, Banath JP, Fjell CD (1994). DNA Strand Breakage and DNA-Structure Influence Staining with Propidium Iodide Using the Alkaline Comet Assay. *Cytometry* 16(4): 305-312.
162. Oparka M, Walczak J, Malinska D, van Oppen LMPE, Szczepanowska J, Koopman WJH, *et al.* (2016). Quantifying ROS levels using CM-H(2)DCFDA and HyPer. *Methods* 109: 3-11.
163. Otto F (1990). Chapter 11 DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA. 33: 105-110.
164. Paddenberg R, Ishaq B, Goldenberg A, Faulhammer P, Rose F, Weissmann N, *et al.* (2003). Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol-Lung C* 284(5): L710-L719.
165. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo HJ, Freeman BA, *et al.* (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Bba-Bioenergetics* 1411(2-3): 385-400.
166. Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Bba-Proteins Proteom* 1804(2): 245-262.
167. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50(2): 98-+.
168. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Bioche* 30(1): 11-26.
169. Picaud T, Desbois A (2002). Electrostatic control of the isoalloxazine environment in the two-electron reduced states of yeast glutathione reductase. *J Biol Chem* 277(35): 31715-31721.
170. Prokhorova EA, Zamaraev AV, Kopeina GS, Zhivotovsky B, Lavrik IN (2015). Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution. *Cell Mol Life Sci* 72(23): 4593-4612.
171. Prozialeck WC, Lamar PC (1995). Effects of Glutathione Depletion on the Cytotoxic Actions of Cadmium in L1c-Pk1 Cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 134(2): 285-295.
172. Prutz WA (1996). Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch Biochem Biophys* 332(1): 110-120.
173. Purschke M, Rubio N, Held KD, Redmond RW (2010). Phototoxicity of Hoechst 33342 in time-lapse fluorescence microscopy. *Photoch Photobio Sci* 9(12): 1634-1639.
174. Rabinovitch PS (1983). Regulation of Human Fibroblast Growth-Rate by Both Noncycling Cell Fraction and Transition-Probability Is Shown by Growth in 5-Bromodeoxyuridine Followed by Hoechst-33258 Flow-Cytometry. *P Natl Acad Sci-Biol* 80(10): 2951-2955.
175. Ralat LA, Colman RF (2003). Monobromobimane occupies a distinct xenobiotic substrate site in glutathione S-transferase pi. *Protein science : a publication of the Protein Society* 12(11): 2575-2587.
176. Ramakrishnan P, Maclean M, MacGregor SJ, Anderson JG, Grant MH (2016). Cytotoxic responses to 405 nm light exposure in mammalian and bacterial cells: Involvement of reactive oxygen species. *Toxicol in Vitro* 33: 54-62.

177. Raththagala M, Root PD, Spence DM (2006). Dynamic monitoring of glutathione in erythrocytes, without a separation step, in the presence of an oxidant insult. *Anal Chem* 78(24): 8556-8560.
178. Ravindran G, Chakrabarty D, Sarkar A (2017). Cell specific stress responses of cadmium-induced cytotoxicity. *Anim Cells Syst (Seoul)* 21(1): 23-30.
179. Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW (1980). High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem* 106(1): 55-62.
180. Rey V, Botana AM, Alvarez M, Antelo A, Botana LM (2016). Liquid Chromatography with a Fluorimetric Detection Method for Analysis of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxin Based on a Porous Graphitic Carbon Column. *Toxins* 8(7).
181. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, et al. (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 1(5): 715-722.
182. Rice GC, Bump EA, Shrieve DC, Lee W, Kovacs M (1986). Quantitative-Analysis of Cellular Glutathione by Flow-Cytometry Utilizing Monochlorobimane - Some Applications to Radiation and Drug-Resistance In vitro and In vivo. *Cancer Res* 46(12): 6105-6110.
183. Rich PR (2017). Mitochondrial cytochrome c oxidase: catalysis, coupling and controversies. *Biochem Soc T* 45: 813-829.
184. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Bio* 13(9): 566-578.
185. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, et al. (2006). Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(41): 15038-15043.
186. Roelofs BA, Ge SX, Studlack PE, Polster BM (2015). Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV. *Free Radic Biol Med* 86: 250-258.
187. Rousar T, Kucera O, Lotkova H, Cervinkova Z (2012). Assessment of reduced glutathione: comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Anal Biochem* 423(2): 236-240.
188. Royall JA, Ischiropoulos H (1993). Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as Fluorescent-Probes for Intracellular H₂O₂ in Cultured Endothelial-Cells. *Arch Biochem Biophys* 302(2): 348-355.
189. Ruchaud S, Korfali N, Villa P, Kottke TJ, Dingwall C, Kaufmann SH, et al. (2002). Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *The EMBO journal* 21(8): 1967-1977.
190. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD (2010). Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 10(4): 393-401.
191. Saito M, Kobayashi M, Iwabuchi S, Morita Y, Takamura Y, Tamiya E (2004). DNA condensation monitoring after interaction with hoechst 33258 by atomic force microscopy and fluorescence spectroscopy. *J Biochem* 136(6): 813-823.
192. Salman BI, Hussein SA, Ali MFB, Marzouq MA (2019). Innovative ultra-sensitive spectrofluorimetric method for nanogram detection of doripenem monohydrate in human plasma, urine and pharmaceutical formulation. *Microchemical Journal* 145: 959-965.
193. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A (1997). JC-1, but not DiOC(6)(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess Delta Psi changes in intact cells: Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* 411(1): 77-82.
194. Sazer S, Schiessel H (2018). The biology and polymer physics underlying large-scale chromosome organization. *Traffic* 19(2): 87-104.
195. Scaduto RC, Grotyohann LW (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 76(1): 469-477.
196. Scandalios JG (1993). Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol* 101(1): 7-12.
197. Sebastia J, Cristofol R, Martin M, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C (2003). Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y. *Cytom Part A* 51A(1): 16-25.
198. Sedmidubský D, Flemr V, Svoboda J, Cibulka R (2011). Základy chemie pro bakaláře. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*: 128.

199. Senft AP, Dalton TP, Shertzer HG (2000). Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 280(1): 80-86.
200. Shackman JG, Ross D (2007). Gradient elution isotachopheresis for enrichment and separation of biomolecules. *Anal Chem* 79(17): 6641-6649.
201. Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K (1999). Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 154(3): 256-263.
202. Shih CM, Wu JS, Ko WC, Wang LF, Wei YH, Liang HF, *et al.* (2003). Mitochondria-mediated caspase-independent apoptosis induced by cadmium in normal human lung cells. *J Cell Biochem* 89(2): 335-347.
203. Schagger H, Pfeiffer K (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 19(8): 1777-1783.
204. Siemann DW, Keng PC (1986). Cell cycle specific toxicity of the Hoechst 33342 stain in untreated or irradiated murine tumor cells. *Cancer Res* 46(7): 3556-3559.
205. Sies H, Menck CFM (1992). Singlet Oxygen Induced DNA Damage. *Mutat Res* 275(3-6): 367-375.
206. Sikdar S, Mukherjee A, Khuda-Bukhsh AR (2014). Ethanolic Extract of *Marsdenia condurango* Ameliorates Benzo[a]pyrene-induced Lung Cancer of Rats: *Condurango Ameliorates BaP-induced Lung Cancer in Rats. J Pharmacopuncture* 17(2): 7-17.
207. Smiley ST, Reers M, Mottolahartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, *et al.* (1991). Intracellular Heterogeneity in Mitochondrial-Membrane Potentials Revealed by a J-Aggregate-Forming Lipophilic Cation Jc-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(9): 3671-3675.
208. Son Y, Kim S, Chung HT, Pae HO (2013). Reactive Oxygen Species in the Activation of MAP Kinases. *Method Enzymol* 528: 27-48.
209. Stevenson D, Wokosin D, Girkin J, Grant MH (2002). Measurement of the intracellular distribution of reduced glutathione in cultured rat hepatocytes using monochlorobimane and confocal laser scanning microscopy. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 16(5): 609-619.
210. Stipanuk MH, Dominy JE, Lee JI, Coloso RM (2006). Mammalian cysteine metabolism: New insights into regulation of cysteine metabolism. *J Nutr* 136(6): 1652s-1659s.
211. Stokke T, Steen HB (1985). Multiple Binding Modes for Hoechst 33258 to DNA. *J Histochem Cytochem* 33(4): 333-338.
212. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res-Fund Mol M* 482(1-2): 21-26.
213. Sun F, Huo X, Zhai YJ, Wang AJ, Xu JX, Su D, *et al.* (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121(7): 1043-1057.
214. Surai PF, Kochish II, Fisinin VI (2018). Glutathione peroxidases in poultry biology: Part 1. Classification and mechanisms of action. *World's Poultry Science Journal* 74(2): 185-198.
215. Suttrop N, Toepfer W, Roka L (1986). Antioxidant Defense-Mechanisms of Endothelial-Cells - Glutathione Redox Cycle Versus Catalase. *Am J Physiol* 251(5): C671-C680.
216. Szczurek AT, Prakash K, Lee HK, Zurek-Biesiada DJ, Best G, Hagmann M, *et al.* (2014). Single molecule localization microscopy of the distribution of chromatin using Hoechst and DAPI fluorescent probes. *Nucleus-Phila* 5(4): 331-340.
217. Tai C, Gu XX, Zou H, Guo QH (2002). A new simple and sensitive fluorometric method for the determination of hydroxyl radical and its application. *Talanta* 58(4): 661-667.
218. Takano J, Tomioka M, Tsubuki S, Higuchi M, Iwata N, Itohara S, *et al.* (2005). Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. *The Journal of biological chemistry* 280(16): 16175-16184.
219. Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, *et al.* (2002). A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *The Journal of biological chemistry* 277(43): 41254-41258.
220. Tan J, Wang B, Zhu L (2009). Regulation of survivin and Bcl-2 in HepG2 cell apoptosis induced by quercetin. *Chem Biodivers* 6(7): 1101-1110.
221. Tang B, Zhang L, Geng Y (2005). Determination of the antioxidant capacity of different food natural products with a new developed flow injection spectrofluorimetry detecting hydroxyl radicals. *Talanta* 65(3): 769-775.
222. Tang B, Zhang L, Zhang LI (2004). Study and application of flow injection spectrofluorimetry with a fluorescent probe of 2-(2-pyridil)-benzothiazoline for superoxide anion radicals. *Anal Biochem* 326(2): 176-182.

223. Thai NQ, Tseng NH, Vu MT, Nguyen TT, Linh HQ, Hu CK, *et al.* (2016). Discovery of DNA dyes Hoechst 34580 and 33342 as good candidates for inhibiting amyloid beta formation: in silico and in vitro study. *J Comput Aid Mol Des* 30(8): 639-650.
224. Tietze F (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27(3): 502-522.
225. Tobwala S, Wang H-J, Carey J, Banks W, Ercal N (2014). Effects of Lead and Cadmium on Brain Endothelial Cell Survival, Monolayer Permeability, and Crucial Oxidative Stress Markers in an in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *Toxics* 2(2): 258-275.
226. Toppo S, Flohe L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M (2009). Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta* 1790(11): 1486-1500.
227. Toroser D, Yarian CS, Orr WC, Sohal RS (2006). Mechanisms of gamma-glutamylcysteine ligase regulation. *Biochim Biophys Acta* 1760(2): 233-244.
228. Tosatto SC, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, *et al.* (2008). The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxid Redox Signal* 10(9): 1515-1526.
229. Towne V, Will M, Oswald B, Zhao QJ (2004). Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: appropriate ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis. *Anal Biochem* 334(2): 290-296.
230. Townsend DM, Tew KD (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22(47): 7369-7375.
231. Tsikas D, Sandmann J, Holzberg D, Pantazis P, Raida M, Frolich JC (1999). Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 273(1): 32-40.
232. Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L, Wei JY (1998). Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 30(9): 1789-1801.
233. Uchiyama Y, Koike M, Shibata M (2008). Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia. *Autophagy* 4(4): 404-408.
234. Vainio H, Heseltine E, Partensky C, Wilbourn J (1993). Meeting of the IARC Working Group on Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing-Industry. *Scand J Work Env Hea* 19(5): 360-363.
235. Valeur B (2001). Molecular Fluorescence: Principles and Applications, 2nd Edition. *Wiley-VCH*: 592.
236. Vrbova M, Rousarova E, Bruckova L, Cesla P, Rousar T (2016). Characterization of acetaminophen toxicity in human kidney HK-2 cells. *Physiol Res* 65(4): 627-635.
237. Walker JE (1992). The NADH - Ubiquinone Oxidoreductase (Complex-I) of Respiratory Chains. *Q Rev Biophys* 25(3): 253-324.
238. Wang CX, Youle RJ (2009). The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Review of Genetics* 43: 95-118.
239. Wang JC (1974). The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium. I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients. *J Mol Biol* 89(4): 783-801.
240. Wang Y, Wu Y, Luo K, Liu Y, Zhou M, Yan S, *et al.* (2013). The protective effects of selenium on cadmium-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondria pathway in mice kidney. *Food Chem Toxicol* 58: 61-67.
241. Wasag P, Lenartowski R (2016). Nuclear matrix - structure, function and pathogenesis. *Postep Hig Med Dosw* 70: 1206-1219.
242. Watjen W, Cox M, Biagioli M, Beyersmann D (2002). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9-activation. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 15(1): 15-25.
243. Weber CA, Duncan CA, Lyons MJ, Jenkinson SG (1990). Depletion of tissue glutathione with diethyl maleate enhances hyperbaric oxygen toxicity. *The American journal of physiology* 258(6 Pt 1): L308-312.
244. Weinstein J, Bielski BHJ (1979). Kinetics of the Interaction of HO₂ and O₂-Radicals with Hydrogen-Peroxide - Haber-Weiss Reaction. *J Am Chem Soc* 101(1): 58-62.
245. Weisblum B, Haenssler E (1974). Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. *Chromosoma* 46(3): 255-260.

246. Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G, Preis D (1991). The Respiratory-Chain NADH Dehydrogenase (Complex-I) of Mitochondria. *Eur J Biochem* 197(3): 563-576.
247. Weng MS, Chang JH, Hung WY, Yang YC, Chien MH (2018). The interplay of reactive oxygen species and the epidermal growth factor receptor in tumor progression and drug resistance. *J Exp Clin Oncol* 37.
248. Wikstrom MK, Berden JA (1972). Oxidoreduction of cytochrome b in the presence of antimycin. *Biochim Biophys Acta* 283(3): 403-420.
249. Wilmes A, Crean D, Aydin S, Pfaller W, Jennings P, Leonard MO (2011). Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25(3): 613-622.
250. Wintner EA, Deckwerth TL, Langston W, Bengtsson A, Leviten D, Hill P, et al. (2010). A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood. *Br J Pharmacol* 160(4): 941-957.
251. Winyard PG, Moody CJ, Jacob C (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sci* 30(8): 453-461.
252. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z (2008). SYTO probes in the cytometry of tumor cell death. *Cytometry A* 73(6): 496-507.
253. Wu WS, Tsai RK, Chang CH, Wang S, Wu JR, Chang YX (2006). Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C alpha and extracellular signal-regulated kinase for migration of human hepatoma cell HepG2. *Mol Cancer Res* 4(10): 747-758.
254. Xu S, Pi H, Chen Y, Zhang N, Guo P, Lu Y, et al. (2013). Cadmium induced Drp1-dependent mitochondrial fragmentation by disturbing calcium homeostasis in its hepatotoxicity. *Cell Death Dis* 4: e540.
255. Yan Y, Bian JC, Zhong LX, Zhang Y, Sun Y, Liu ZP (2012). Oxidative stress and apoptotic changes of rat cerebral cortical neurons exposed to cadmium in vitro. *Biomedical and environmental sciences : BES* 25(2): 172-181.
256. Yang CF, Shen HM, Shen Y, Zhuang ZX, Ong CN (1997). Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). *Environ Health Perspect* 105(7): 712-716.
257. Ye JL, Mao WP, Wu AL, Zhang NN, Zhang C, Yu YJ, et al. (2007). Cadmium-induced apoptosis in human normal liver L-02 cells by acting on mitochondria and regulating Ca(2+) signals. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 24(1): 45-54.
258. Yoshikawa S, Shimada A (2015). Reaction Mechanism of Cytochrome c Oxidase. *Chem Rev* 115(4): 1936-1989.
259. Zhang D, Liu J, Gao J, Shahzad M, Han Z, Wang Z, et al. (2014). Zinc supplementation protects against cadmium accumulation and cytotoxicity in Madin-Darby bovine kidney cells. *PLoS One* 9(8): e103427.
260. Zhang JH, Xu M (2000). DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 10(3): 205-211.
261. Zhang Y, Li JH, Liu XR, Jiang FL, Tian FF, Liu Y (2011). Spectroscopic and microscopic studies on the mechanisms of mitochondrial toxicity induced by different concentrations of cadmium. *J Membr Biol* 241(1): 39-49.
262. Zhao YY, Shen X, Chao X, Ho CC, Cheng XL, Zhang Y, et al. (2011). Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1810(4): 384-390.
263. Zhou Z, Wang C, Liu H, Huang Q, Wang M, Lei Y (2013). Cadmium induced cell apoptosis, DNA damage, decreased DNA repair capacity, and genomic instability during malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Int J Med Sci* 10(11): 1485-1496.
264. Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakila S, Malamou-Mitsi V, Schoneveld O, et al. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions* 188(2): 334-339.
265. Zielonka J, Srinivasan S, Hardy M, Ouari O, Lopez M, Vasquez-Vivar J, et al. (2008). Cytochrome c-mediated oxidation of hydroethidine and mito-hydroethidine in mitochondria: Identification of homo- and heterodimers. *Free Radical Biology and Medicine* 44(5): 835-846.
266. Zoratti M, Szabo I (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241(2): 139-176.
267. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* 552: 50-59

9. Přílohy

9.1 Originální data k výsledkové části

Příloha 1: Vliv diethylmaleátu (DEM) na depleci glutathionu u buněk HK-2 (Graf 4; Intracelulární koncentrace GSH byla vyjádřena jako % kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %); průměr ± SD; n = 3.

Koncentrace DEM (mM)	Koncentrace GSH (% kontrol)	
	MCB	MBB
0	100 ± 7	100 ± 6
0,1	85 ± 1	98 ± 1
0,5	59 ± 2	70 ± 1
2	29 ± 1	50 ± 0

Příloha 2: Vliv toxinů na fragmentaci DNA u buněk HK-2 (Graf 8; Fragmentace DNA byla vyjádřena jako % IF kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %); průměr ± SD; **, p<0,01,*, p<0,001 (vs. kontrola daného časového intervalu); n = 4.**

	Fragmentace DNA (% kontrol)		
	2 hod	24 hod	48 hod
Kontrola	100 ± 38	100 ± 23	100 ± 22
40 μM FCCP	137 ± 10	218 ± 29 ***	224 ± 40 ***
50 μM CisPt	173 ± 27 **	200 ± 10 ***	358 ± 12 ***
100 μM CisPt	173 ± 11 **	232 ± 13 ***	357 ± 19 ***
50 μM t-BHP	177 ± 26 **	106 ± 7	124 ± 8

Příloha 3: Vliv $CdCl_2$ na koncentraci glutathionu u buněk HK-2 (Graf 9; Intracelulární koncentrace GSH byla vyjádřena jako % kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %); průměr \pm SD; *, $p < 0,001$ (vs. kontrola daného časového intervalu); $n = 6-10$.**

Koncentrace $CdCl_2$ (μM)	Koncentrace GSH (% kontrol)			
	2 hod	6 hod	10 hod	24 hod
0	100 \pm 5	100 \pm 4	100 \pm 4	100 \pm 3
5	102 \pm 4	97 \pm 4	99 \pm 3	102 \pm 4
25	99 \pm 3	97 \pm 3	105 \pm 2	102 \pm 4
200	87 \pm 4 ***	59 \pm 3 ***	39 \pm 2 ***	5 \pm 1 ***

Příloha 4: Vliv $CdCl_2$ na mitochondriální membránový potenciál u buněk HK-2 (Graf 10; Mitochondriální membránový potenciál byl vyjádřen jako poměr R/G; průměr \pm SD; *, $p < 0,001$ (vs. kontrola daného časového intervalu); $n = 6-10$.**

Koncentrace $CdCl_2$ (μM)	R/G			
	2 hod	6 hod	10 hod	24 hod
0	2,29 \pm 0,11	2,16 \pm 0,31	2,57 \pm 0,33	2,16 \pm 0,27
5	2,17 \pm 0,13	2,45 \pm 0,19	2,40 \pm 0,34	1,80 \pm 0,12
25	2,45 \pm 0,18	2,02 \pm 0,09	1,94 \pm 0,26 ***	1,62 \pm 0,13 ***
200	1,98 \pm 0,11 ***	2,45 \pm 0,25	1,49 \pm 0,11 ***	0,22 \pm 0,03 ***

Příloha 5: Detekce ROS u buněk HK-2 exponovaných $CdCl_2$ (Graf 11; Koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS) byla vyjádřena jako % kontrolních buněk (kontrolní buňky = 100 %); průměr \pm SD; *, $p < 0,001$ (vs. kontrola daného časového intervalu); $n = 6-10$.**

Koncentrace $CdCl_2$ (μM)	Produkce ROS (% kontrol)		
	2 hod	6 hod	24 hod
0	100 \pm 13	100 \pm 14	100 \pm 14
5	60 \pm 6 ***	90 \pm 9	86 \pm 5
25	57 \pm 9 ***	69 \pm 5 ***	204 \pm 23 ***
200	148 \pm 13 ***	311 \pm 21 ***	88 \pm 15

9.2 Původní práce autora

Jan Čapek, Martina Hauschke, Lenka Brůčková, Tomáš Roušar; Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells; *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; 88:40-45; 2017; doi:10.1016/j.vascn.2017.06.001. **(IF = 2,679)** (str. 111)

Martina Hauschke, Erika Roušarová, Pavel Flídr, **Jan Čapek**, Antonín Libra, Tomáš Roušar; Neutrophil gelatinase-associated lipocalin production negatively correlates with HK-2 cell impairment: Evaluation of NGAL as a marker of toxicity in HK-2 cells; *Toxicology in Vitro*; 39:52-57; 2017; doi:10.1016/j.tiv.2016.11.012. **(IF = 3,067)** (str. 117)

Jiří Handl, **Jan Čapek**, Pavlína Majtnerová, Filip Petira, Martina Hauschke, Erika Roušarová, Tomáš Roušar; Transient increase in cellular dehydrogenase activity after cadmium treatment precedes enhanced production of reactive oxygen species in human proximal tubular kidney cells; *Physiological Research*; 68:481-490; 2019; doi.org/10.33549/physiolres.934121. **(IF = 1,701)** (str. 123)

Práce vznikla za podpory projektu Posilování mezioborové spolupráce ve výzkumu nanomateriálů a při studiu jejich účinků na živé organismy (CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007421).