

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

**Stanovení aktivity cytochromu P450 2E1 v primárních kulturách
hepatocytů**

Markéta Zelendová

Diplomová práce
2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Zelendová**
Osobní číslo: **C15633**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Stanovení aktivity cytochromu P450 2E1 v primárních kulturách hepatocytů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

- 1) Teoretická část:
 - a) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na vlastnosti a funkce cytochromů P450 s důrazem na cytochrom P450 2E1.
 - b) V teoretické části se dále zaměřte na možnosti stanovení enzymové aktivity, a to jednak obecně, a jednak konkrétně pro cytochrom P450 2E1.
 - c) Ke zpracování tohoto přehledu využijte elektronické databáze (ScienceDirect, NCBI Pubmed, HighWire, apod.).
- 2) Praktická část:
 - a) Naučte se pracovat s primárními kulturami hepatocytů potkana a myši. Jedná se zejména o hodnocení viability a density buněk, přípravu suspenzí hepatocytů a primárních kultur v monolayeru.
 - b) Naučte se připravovat a zpracovávat biologické vzorky získané z primárních kultur hepatocytů a následně u těchto vzorků stanovovat základní parametry poškození hepatocytů in vitro (LDH leakage, WST-1 test ev. mikroskopické hodnocení s pomocí fázového kontrastu).
 - c) Pokuste se zjistit optimální koncentraci paranitrofenolu pro stanovení aktivity cytochromu P450 2E1 v primárních kulturách hepatocytů.
 - d) Získaná experimentální data statisticky zpracujte a diskutujte. Své výsledky následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. MUDr. Otto Kučera, Ph.D.**
Lékařská fakulta UK Hradec Králové

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

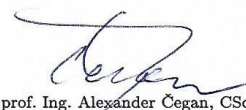
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

PROHLÁŠENÍ

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2017

Markéta Zelendová

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych mile ráda poděkovala svému školiteli MUDr. Ottu Kučerovi, Ph.D za odborné vedení, za poskytnuté praktické rady a připomínky a za věnovaný čas při tvorbě této diplomové práce. Děkuji doc. Tomáši Roušarovi za jeho odbornou pomoc při formálních zpracováních práce. Současně také děkuji paním laborantkám za jejich ochotu kdykoliv mi pomoci a za příjemné prostředí, které v laboratoři vytvářely.

Dále děkuji také i své rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

TITUL

Stanovení aktivity cytochromu P450 2E1 v primárních kulturách hepatocytů

ANOTACE

Tato práce byla zaměřena na zavedení metody stanovení aktivity enzymu cytochrom P450 2E1 v primárních kulturách hepatocytů potkana a myši pomocí enzymatické přeměny substrátu p-nitrofenolu na p-nitrokatechol. Ke zjištění optimální koncentrace p-nitrofenolu pro stanovení aktivity cytochromu P450 2E1 bylo nejprve nutno zjistit, zda p-nitrofenol nevykazuje toxické účinky na hepatocyty v primární kultuře. Míra poškození hepatocytů *in vitro* byla hodnocena pomocí aktivity laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu a aktivity celulárních dehydrogenáz (WST-1 test).

KLÍČOVÁ SLOVA

primární kultury hepatocytů, p-nitrofenol, p-nitrokatechol, cytochrom P450 2E1, aktivita cytochromu P450 2E1

TITLE

Evaluation of cytochrome P450 2E1 activity in primary cultures of hepatocytes

ANNOTATION

This work was focused on introduction of method for evaluation of cytochrome P450 2E1 activity in primary cultures of rat and mouse hepatocytes by enzymatic conversion of the substrate p-nitrophenol to p-nitrocatechol. To find the optimal concentration of p-nitrophenol for evaluation of cytochrome P450 2E1 activity was necessary to exclude the potential toxic effect of p-nitrophenol on hepatocytes in primary culture at first. Parameters of hepatocyte damage *in vitro* were determined by lactate dehydrogenase activity in the culture medium and activity of cellular dehydrogenases (WST-1 test).

KEYWORDS

primary cultures of hepatocytes, p-nitrophenol, p-nitrocatechol, cytochrome P450 2E1, activity of cytochrome P450 2E1

OBSAH

ÚVOD	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 CYTOCHROMY P450	13
1.1.1 Nomenklatura.....	14
1.1.2 Vlastnosti a funkce.....	15
1.1.3 Vstřebávání xenobiotik	18
1.1.4 Metabolismus xenobiotik.....	18
1.1.5 Polymorfismus	22
1.2 CYTOCHROM P450 2E1	24
1.2.1 Struktura.....	24
1.2.2 Exprese cytochromu P450 2E1	26
1.2.3 Substráty	27
1.2.4 Indukce aktivity cytochromu P450 2E1	28
1.2.5 Inhibice aktivity cytochromu P450 2E1	29
1.2.6 Nežádoucí doprovodné jevy cytochromu P450 2E1	29
1.3 STANOVENÍ AKTIVITY.....	31
1.3.1 Vyjadřování katalytické aktivity.....	31
1.3.2 Faktory ovlivňující aktivitu enzymu	31
1.3.3 Metody pro měření aktivity.....	33
1.3.4 Stanovení aktivity cytochromu P450 2E1	35
1.4 MODELOVÉ SYSTÉMY PRO TESTOVÁNÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY.....	38
1.4.1 Játra.....	38
1.4.2 Klasické modely <i>in vitro</i>	39
1.4.3 Alternativní modely	41
2 CÍL PRÁCE.....	44
3 METODICKÁ ČÁST.....	45
3.1 POUŽITÉ ROZTOKY	45
3.2 PŘÍPRAVA PRIMÁRNÍCH KULTUR HEPATOCYTŮ	47
3.2.1 Izolace hepatocytů	47
3.2.2 Stanovení viability hepatocytů.....	48
3.2.3 Určení denzity hepatocytů	48
3.2.4 Příprava monovrstvy hepatocytů.....	48
3.2.5 Příprava kalibrace p-nitrokatecholu	49
3.2.6 Příprava kalibrace p-nitrofenolu	49
3.3 SPEKTROFOTOMETRICKÁ MĚŘENÍ.....	50
3.3.1 Aktivita laktátdehydrogenázy	50
3.3.2 Test WST-1	50
3.3.3 Aktivita cytochromu P450 2E1	51
3.4 STANOVENÍ MNOŽSTVÍ PROTEINU.....	53
3.5 MIKROSKOPIE.....	54
3.5.1 Využití fázového kontrastu	54

3.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	54
4	VÝSLEDKOVÁ ČÁST	55
4.1	AKTIVITA LAKTÁTDEHYDROGENÁZY V KULTIVAČNÍM MÉDIU	55
4.1.1	Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů myši kultivovaných 2 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h.....	55
4.1.2	Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů myši kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h.....	56
4.1.3	Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů potkana kultivovaných 2 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 1 h.....	57
4.1.4	Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů potkana kultivovaných 2 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h.....	58
4.1.5	Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů potkana kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 1 h.....	59
4.1.6	Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů potkana kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h.....	60
4.2	STANOVENÍ VIABILITY HEPATOCYTŮ (WST-1 TEST)	61
4.2.1	Aktivita buněčných dehydrogenáz hepatocytů myši kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h.....	61
4.2.2	Aktivita buněčných dehydrogenáz hepatocytů potkana kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 1 h.....	62
4.2.3	Aktivita buněčných dehydrogenáz hepatocytů potkana kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h.....	63
4.3	MORFOLOGICKÉ ZMĚNY HEPATOCYTŮ	64
4.3.1	Vliv p-nitrofenolu na morfologii hepatocytů myši.....	64
4.3.2	Vliv p-nitrofenolu na morfologii hepatocytů potkana.....	65
4.4	STANOVENÍ AKTIVITY CYTOCHROMU P450 2E1	68
4.4.1	Stanovení vzniku produktu p-nitrokatecholu	68
4.4.2	Interference produktů p-nitrofenolu	70
4.4.3	Stanovení úbytku substrátu p-nitrofenolu v myších hepatocytech	71
4.4.4	Stanovení úbytku substrátu p-nitrofenolu v potkaních hepatocytech.....	73
5	DISKUZE.....	75
6	ZÁVĚR.....	80
	POUŽITÁ LITERATURA.....	81
	PŘÍLOHY.....	90

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázky

Obrázek 1: Hemová prosthetická skupina	13
Obrázek 2: Relativní podíl cytochromu P450 na metabolismu xenobiotik	15
Obrázek 3: Katalytický cyklus cytochromu P450	16
Obrázek 4: Typy reakcí katalyzovaných enzymy P450.....	17
Obrázek 5: Partneři elektronového přenosu.....	18
Obrázek 6: I. a II. fáze metabolismu acetaminofenu	21
Obrázek 7: Celková struktura CYP2E1	25
Obrázek 8: Aktivní místo CYP2E1	25
Obrázek 9: Schéma metody western blot	27
Obrázek 10: Tvorba ROS	30
Obrázek 11: Enzymová kinetika.....	32
Obrázek 12: Křivka optimální hodnoty pH	32
Obrázek 13: Schéma HPLC	35
Obrázek 14: Vzorec p-nitrofenolu	36
Obrázek 15: Aktivita CYP2E1	37
Obrázek 16: 2D kultivace	40
Obrázek 17: Morfologie kultivovaných hepatocytů	41
Obrázek 18: Porovnání kultivovaných buněk ve 2D a 3D	42
Obrázek 19: Jaterní perfúze	47
Obrázek 20: Reakce katalyzovaná LDH.....	50
Obrázek 21: Mechanismus redukce WST-1	51
Obrázek 22: Reakce katalyzovaná CYP2E1	52
Obrázek 23: Reakce vzniku nescifických produktů ze substrátu pNP.....	53
Obrázek 24: Kontrolní hepatocyty myši, kultivace 2 h	64
Obrázek 25: Vliv 2 h expozice 0,5 mM pNP – hepatocyty myši	64
Obrázek 26: Vliv 2 h expozice 1 mM pNP – hepatocyty myši	65
Obrázek 27: Kontrolní hepatocyty potkana, kultivace 2 h	65
Obrázek 28: Kontrolní hepatocyty potkana, kultivace 24 h	66
Obrázek 29: Vliv 2 h expozice 0,5 mM pNP – hepatocyty potkana	66
Obrázek 30: Vliv 2 h expozice 1 mM pNP – hepatocyty potkana	67
Obrázek 31: Vliv 2 h expozice 2 mM pNP – hepatocyty potkana	67

Schéma

Schéma 1: Fáze biotransformace xenobiotik	19
Schéma 2: Průběh enzymové reakce	27

Tabulky

Tabulka 1: Substráty metabolizovány/aktivovány CYP2E1	28
Tabulka 2: Rozdělení metod pro měření aktivity enzymů.....	33
Tabulka 3: Výhody a omezení jaterních modelů <i>in vitro</i>	39
Tabulka 4: Objemy pro příslušné destičky	48
Tabulka 5: Kalibrace p-nitrokatecholu a p-nitrofenolu	49
Tabulka 6: Kalibrace pro přípravu proteinů	54

Grafy

Graf 1: Aktivita LDH v myších hepatocytech, kultivace 2 h s pNP (2 h)	55
Graf 2: Aktivita LDH v myších hepatocytech, kultivace 2 h s pNP (24 h)	56
Graf 3: Aktivita LDH v potkaních hepatocytech, kultivace 1 h s pNP (2 h).....	57
Graf 4: Aktivita LDH v potkaních hepatocytech, kultivace 2 h s pNP (2 h).....	58
Graf 5: Aktivita LDH v potkaních hepatocytech, kultivace 1 h s pNP (24 h).....	59
Graf 6: Aktivita LDH v potkaních hepatocytech, kultivace 2 h s pNP (24 h).....	60
Graf 7: Test WST-1 v myších hepatocytech, kultivace 2 h s pNP (24 h).....	61
Graf 8: Test WST-1 v potkaních hepatocytech, kultivace 1 h s pNP (24 h)	62
Graf 9: Test WST-1 v potkaních hepatocytech, kultivace 2 h s pNP (24 h)	63
Graf 10: Kalibrační křivka pNC	68
Graf 11: Stanovení vzniku produktu pNC v potkaních hepatocytech	69
Graf 12: Měření absorpčního spektra pNP	70
Graf 13: Kalibrační křivka pNP	71
Graf 14: Stanovení úbytku substrátu pNP v myších hepatocytech.....	72
Graf 15: Kalibrační křivka pNP	73
Graf 16: Stanovení úbytku substrátu pNP v potkaních hepatocytech	74

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADH	alkoholdehydrogenáza
ASH	alkoholická steatohepatitida
CPR	NADPH-cytochrom P450 reduktáza
CYP	cytochrom P450
CYP2E1	cytochrom P450 2E1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
ES	komplex enzym-substrát
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
GSH	glutathion
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography)
K_m	Michaelisova konstanta
LDH	lakátdehydrogenáza
MEOS	mikrosomální ethanol oxidující systém (z angl. Microsomal Ethanol Oxidizing System)
mRNA	<i>messenger</i> ribonukleová kyselina
NADPH	redukováný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NASH	nealkoholická steatohepatitida
pNP	p-nitrofenol (z angl. p-nitrophenol)
pNC	p-nitrokatechol (z angl. p-nitrocatechol)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
UDP	uridindifosfát
UGT	uridindifosfát-glukuronosyltransferáza
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	ultrafialový-viditelný
V_{max}	maximální rychlost enzymatické reakce
WST	(4-(3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzendisulfonát) (substrát pro stanovení aktivity buněčných dehydrogenáz)

ÚVOD

Moderní život je spojený s používáním látek, které jsou cizorodé lidskému organismu. Tyto látky se nazývají xenobiotika. Mezi ně se řadí např. léky, pesticidy, potravinářské chemikálie nebo alkaloidy.

Cytochromy P450 jsou enzymy podílející se na biotransformaci xenobiotik oxidačními reakcemi. Cílem biotransformace, která se skládá ze dvou fází, je přeměnit cizorodé látky na více polární metabolity, které mohou být lépe vyloučeny z organismu.

Do nadrodiny cytochromů patří cytochrom P450 2E1, který se podílí na metabolismu léčiv. Nejvyšší aktivita cytochromu P450 2E1 se nachází v játrech, proto jsou jaterní buňky volbou pro stanovení aktivity a také pro toxikologické testování. Jelikož z etických důvodů nelze provádět testy na lidech, jako modelové organismy pro testování metabolismu xenobiotik se nejčastěji používají myši a potkani.

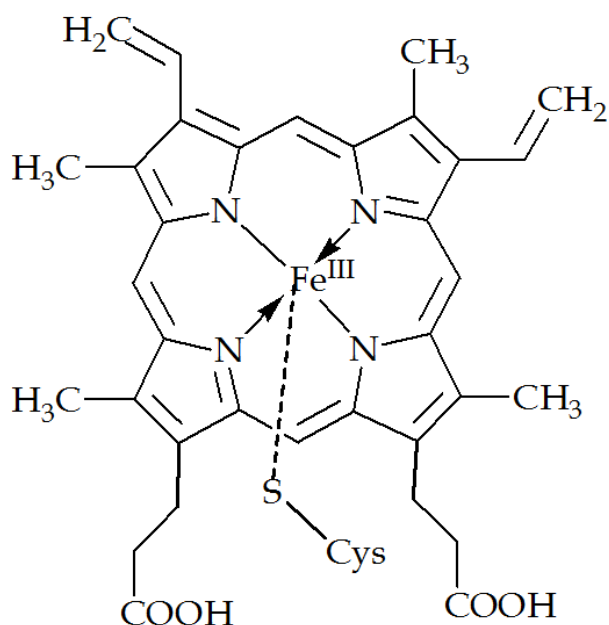
Cílem diplomové práce bylo zavést metodu stanovení aktivity cytochromu P450 2E1 v primárních kulturách hepatocytů potkana a myši pomocí hydroxylace p-nitrofenolu na p-nitrokatechol za použití spektrofotometrických metod. Tuto reakci zprostředkovává právě cytochrom P450 2E1. Jelikož byla u p-nitrofenolu prokázána toxicita, práce se také zabývá testováním toxicity p-nitrofenolu na jaterní buňky.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 se řadí mezi hemové proteiny, stejně jako peroxidáza, kataláza, NO syntáza nebo cytochrom c oxidáza. Označení cytochromu P450 vzniklo po objevu pigmentového proteinu (písmeno P) M. Klingenbergem v roce 1958 (Klingenberg, 1958). Tento pigment byl po redukci oxidem uhelnatým schopen absorbovat světlo s maximem při 450 nm (číslo 450), zatímco ostatní hemoproteiny absorbují v této oblasti při 420 nm (Groves, 2015).

Podobně jako u hemoglobinu nebo myoglobinu se hemová skupina cytochromu P450 vyskytuje v podobě protoporfirinu IX (hem b), avšak centrální atom obsahuje ve formě oxidovaného železa Fe^{3+} . Protoporfirin IX neboli cyklický tetrapyrrol obsahuje 4 cyklicky vázaná pyrrolová jádra, která jsou spojena methinovými můstky a obsahují centrálně zabudovaný atom Fe^{3+} . Toto hemové železo je vázáno k atomu síry blízkého cysteinu (Obrázek 1) (Montellano, 2010).

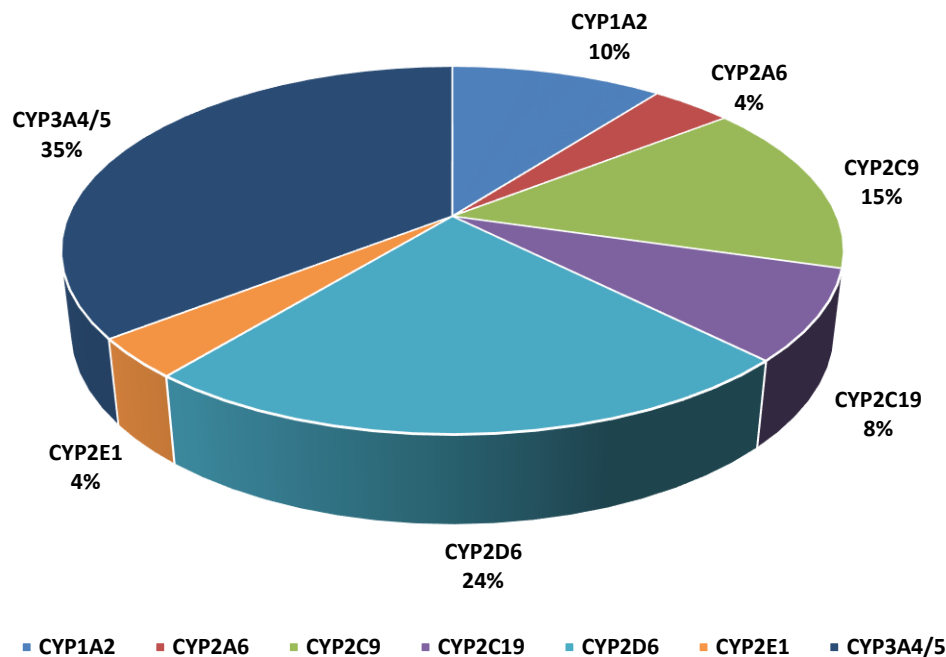


Obrázek 1: Hemová prosthetická skupina (Převzato z: Montellano de O., 2010)

1.1.1 Nomenklatura

S vývojem molekulární biologie v roce 1980 se ukázalo, že geny P450 existovaly téměř ve všech druzích od prokaryot po savce včetně lidí. Odvození aminokyselinové sekvence vedlo k prvnímu návrhu systému nomenklatury na základě evoluční odlišnosti. Tento evoluční pojem také naznačil, že všechny geny cytochromů jsou odvozeny od jediného předka, který vznikl před více než 3 miliardy let. Je známo 18687 pojmenovaných protein-kódujících genů P450 mající domnělé funkce, z nichž nalezneme 5442 u zvířat, více než 6800 u rostlin, více než 4800 u hub, 247 u prvoků, více než 1200 u eubakterií, 48 u archebakterií a 2 u virů (Nebert, 1987).

Cytochromy P450 (CYP) jsou seskupeny v rodinách, které jsou označeny arabským číslem (např. CYP3 rodina), kde musí CYP vykazovat homologii v sekvenci aminokyselin více než 40 %. Každá rodina P450 je dále rozdělena do podrodin označovaných velkým písmenem (např. CYP3A). Ve stejné podrodině musí cytochromy vykazovat homologii více než 55 %. Posledním znakem je další arabská číslice, která představuje jednotlivý enzym (např. CYP3A4) (Boussery, 2015). Cytochromy se nacházejí u archeí, bakterií, hub, rostlin a živočichů včetně člověka. Je známo 18 savčích CYP enzymů, které jsou kódovány 57 geny v lidském genomu. Největší zastoupení cytochromů nalezneme v játrech, kde zaujímají 2 % obsahu celkového mikrosomálního proteinu. V ostatních tkáních je jejich obsah nižší. Hlavními CYP enzymy podílející se na metabolismu léčiv jsou: CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4 (Nebert, 2013). Zastoupení těchto enzymů na metabolismu xenobiotik v játrech je znázorněno na obrázku 2.



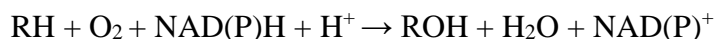
Obrázek 2: Relativní podíl cytochromu P450 na metabolismu xenobiotik (Převzato z: Zanger, 2013)

1.1.2 Vlastnosti a funkce

Cytochromy P450 jsou hlavními katalyzátory podílející se na metabolismu cizorodých látek neboli xenobiotik, jako jsou léky, toxiny, karcinogeny a na metabolismu endogenních substrátů jako např. mastných kyselin a steroidů. Většina CYP enzymů se nachází v buňkách v membránách endoplazmatického retikula (ER). Tato frakce je označována jako „mikrosomální CYP“ (viz níže).

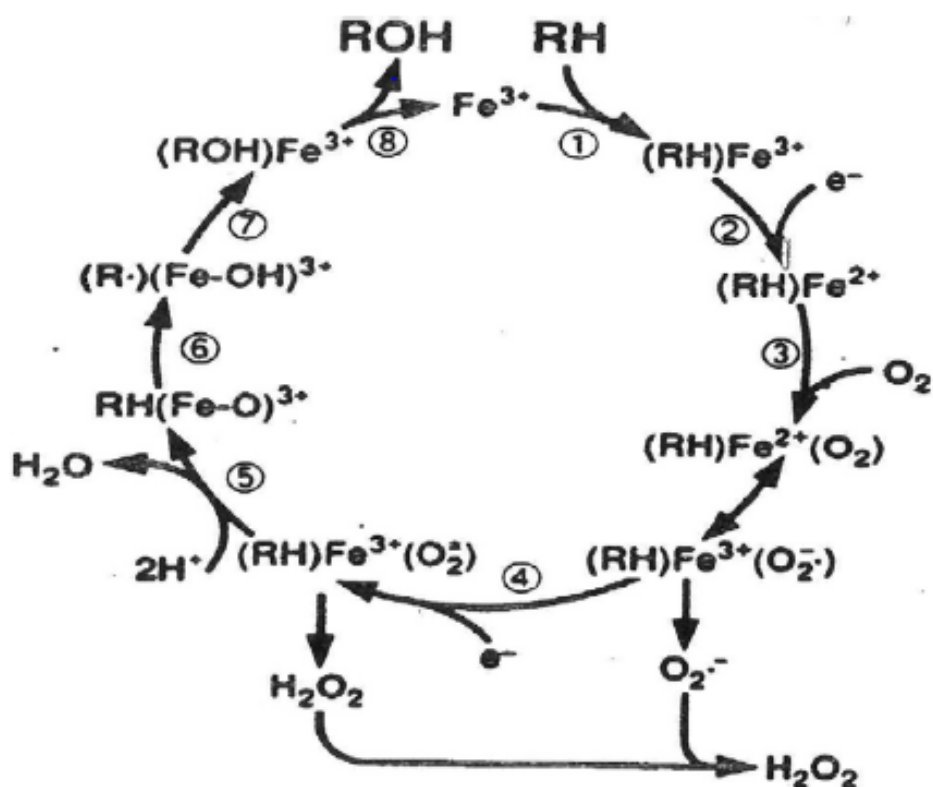
1.1.2.1 Mechanismus přenosu elektronů

Cytochromy P450 patří mezi tzv. monooxygenázy neboli oxidázy se smíšenou funkcí. Monooxygenázy jsou mikrosomální enzymy katalyzující vstup jednoho atomu kyslíku do substrátu. Aktivují molekulu kyslíku, přičemž jeden atom je vložen do substrátu a druhý atom je redukován na vodu. Mechanismus monooxygenace lze souhrnně vyjádřit rovnicí:



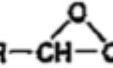
CYP nemohou přijímat elektrony přímo od NADH nebo NADPH, proto je k redukcí hemu mikrosomální P450 nezbytné, aby cytochrom P450 reduktáza obsahovala FMN (flavin mononukleotid) a FAD (flavin adenin dinukleotid) (Coon, 2005). Katalytický cyklus CYP je popsán na obrázku 3 (Cederbaum, 2015).

První krok zahrnuje navázání substrátu RH (1). Tato vazba vyvolává strukturální změny spinového stavu hemového železa z nízkospinového na vysokospinový. Tyto vyvolané strukturální změny vedou ke snadnějšímu transportu elektronů z NADPH a k redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} (2). Kyslík se dále váže na volné místo hemového železa za tvorby $(\text{RH})\text{Fe}^{2+}(\text{O}_2)$ komplexu superoxidu železitého (3). Následnou redukcí vzniká komplex, tzv. peroxid (4), který reaguje se dvěma protony za vzniku molekuly vody a komplexu $\text{RH}(\text{Fe}-\text{O})^{3+}$ (5). Touto reakcí dochází k rozpadu vazby O-O, čímž se získá molekula vody. Železo jako oxidační činidlo odebírá vodík ze substrátu RH za vzniku substrátového radikálu $\text{R}\cdot$ vázaného na hydroxyskupinu (6). Při tvorbě produktu dochází k vazbě atomu O na substrátový radikál, což vede ke vzniku hydroxylované formy substrátu ROH (7). Produkt reakce se uvolní a enzym se vrací do původního stavu s obsahem Fe^{3+} (8).



Obrázek 3: Katalytický cyklus cytochromu P450 (Převzato z: Cederbaum, 2015)

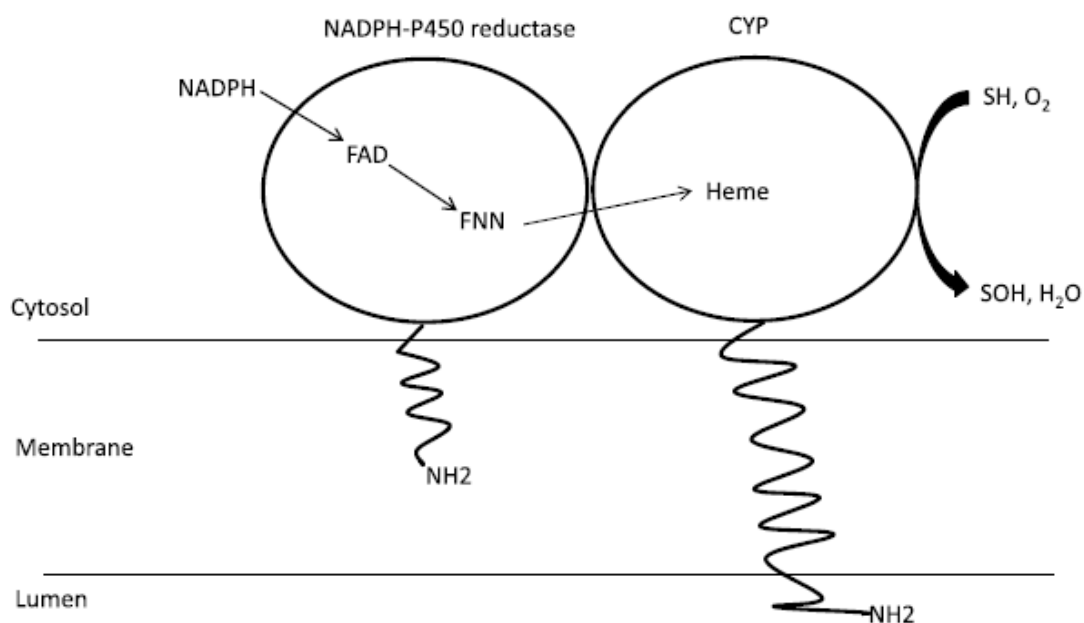
Uvedená reakce se nazývá hydroxylace. CYP také katalyzují řadu dalších chemických reakcí, jako např. peroxidace, epoxidace, dealkylace, redukce, dehalogenace apod. (Obrázek 4) (Aubert, 2011).

REAKCE	PŘÍKLAD
Alifatická hydroxylace	$R-CH_2-CH_2-CH_3 \longrightarrow R-CH_2-CHOH-CH_3$
Aromatická hydroxylace	$R-\text{C}_6\text{H}_5 \longrightarrow R-\text{C}_6\text{H}_4-OH$
Epoxidace	$R-CH=CH-R^I \longrightarrow R-\text{CH}-\text{CH}-R^I$ 
N-, O- nebo S-dealkylace	$R-(N, O, S)-CH_3 \longrightarrow R-(NH_2, OH, SH) + CH_2O$
Deaminace	$R-CH_2-NH_2 \longrightarrow R-\overset{O}{\parallel}C-H + NH_3$
N-hydroxylace	$R-NH-\overset{O}{\parallel}C-CH_3 \longrightarrow R-NOH-\overset{O}{\parallel}C-CH_3$
Sulfoxidace	$R-S-R \longrightarrow R-\overset{O}{\parallel}S-R^I$
Desulfurace	$R_1R_2\overset{S}{\parallel}P-X \longrightarrow R_1R_2\overset{O}{\parallel}P-X + S$
Oxidativní dehalogenace	$R-\overset{X}{\underset{H}{ }}C-H \longrightarrow R-\overset{X}{\underset{H}{ }}C-OH \longrightarrow R-\overset{O}{\parallel}C-H + HX$

Obrázek 4: Typy reakcí katalyzovaných enzymy cytochrom P450
(Převzato a upraveno z: Cederbaum, 2015)

1.1.2.2. Úloha partnerů elektronového přenosu

Cytochromy P450, které se nacházejí u bakterií a v mitochondriích eukaryot, jsou označovány jako 1. typu. Cytochromy v endoplazmatickém retikulu eukaryot neboli mikrosomální enzymy se pak označují jako 2. typu. V mitochondriích se nachází dvouelektronový přenosový systém, který se skládá z ferredoxinu, ferredoxin reduktázy a z hydrogenovaného nikotin amid adenindinukleotid fosfátu (NADPH). Mikrosomální enzymy v ER zprostředkovávají přenos elektronů. Hlavním partnerem elektronového přenosu je NADPH-cytochrom P450 reduktáza (CPR) obsahující kofaktory FAD a FMN (Obrázek 5). V některých případech může také cytochrom b_5 působit jako alternativní dárce elektronu, proto se řadí do cytochromů 2. typu (Xia, 2011).



Obrázek 5: Schéma membránového přenosu elektronů cytochromu P450 a NADPH cytochrom P450 reduktázy. Obě reduktázy jsou spojeny mikrosomální membránou, větší části těchto enzymů vyčnívají do cytosolu a jsou připojeny na membránu prostřednictvím amino konce (Převzato z: Cederbaum, 2015)

1.1.3 Vstřebávání xenobiotik

V organismu se xenobiotika dostávají do krve pokožkou, trávicím ústrojím a respiračním systémem. V krevním řečišti mohou xenobiotika interagovat s plazmatickými proteiny, jež slouží jako transportéry. Krevním řečištěm se pak látky mohou dostat k jednotlivým tělním buňkám. Mezi krví a tkáněmi existují bariéry, které jsou tvořeny buňkami epitelu obsahující velké množství fosfolipidů a lipidů, proto mají lipofilní látky usnadněný vstup do organismu. Transport xenobiotik do buněk může probíhat prostřednictvím volné difuze, aktivním transportem nebo endocytosou (Knejzlík, 2000).

1.1.4 Metabolismus xenobiotik

Metabolismus xenobiotik odstraňuje z organismu především potenciálně nebezpečné látky mechanismem, který se nazývá biotransformace. Tento děj probíhá především v játrech (hepatická biotransformace), ale může probíhat také ve střevní sliznici, plicích, ledvinách, kůži, placentě a v plazmě. V játrech se většina biotransformačních enzymů nachází v endoplazmatickém retikulu a v cytosolu. Pokud se jaterní tkáň homogenizují, endoplazmatické retikulum buněk se rozdělí na fragmenty retikula, které pak vytvoří mikrovezikuly zvané mikrosomy. Proto se biotransformační enzymy v ER označují jako

mikrosomální enzymy. Xenobiotika mají často nepolární charakter, proto je nutné převést tyto látky na jejich polární metabolity, aby docházelo ke snadnějšímu vylučování stolicí a močí (Boussery, 2015).

Biotransformaci můžeme rozdělit na dvě základní fáze. Cílem I. fáze je převést nepolární sloučeninu na polární přidáním polárních funkčních skupin. Fáze II. poté zajišťuje připojení endogenního substrátu k vytvořené polární sloučenině za vzniku více polárního konjugátu. Někdy se můžeme setkat s popisem III. biotransformační fáze, která zahrnuje vylučování konjugátu vzniklého ve druhé fázi (Schéma 1) (Hoffmann, 2014; Nies, 2007).

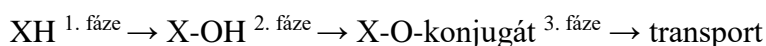


Schéma 1: Fáze biotransformace xenobiotik

1.1.4.1. I. biotransformační fáze

Při první fázi dochází k připojení funkční skupiny (např. -OH, -COOH, -NH₂ nebo -SH) uvnitř molekuly ke zvýšení hydrofilních vlastností. K tomuto ději může dojít prostřednictvím oxidace (např. oxidace alkoholů na kyseliny), redukce (např. redukce ketonů a aldehydů na alkoholy) nebo hydrolýzy. Nejvýznamnějšími substráty hydroláz jsou estery a amidy. Hydrolytické enzymy se nacházejí především v membráně hladkého ER. Jak bylo zmíněno výše, monooxygenázy vyžadují ke své aktivitě molekulární kyslík a redukující látku. Při reakci se poté jeden atom kyslíku objevuje v produktu a druhý v molekule vody. Mezi enzymy první fáze zahrnující oxidoreduktázy patří nejen monooxygenázy, ale také alkoholreduktázy, aldehydreduktázy nebo peroxidázy (Zhang, 2012).

Produkty první fáze se mohou stát již dostatečně polární a tak mohou být lépe vyloučeny ledvinami či žlučí. Pokud se polárními nestanou, nebo se stanou jen málo polárními, mohou se v některých případech stát chemicky reaktivními a více toxickými. Proto dále vstupují do druhé biotransformační fáze (Parkinson, 2008).

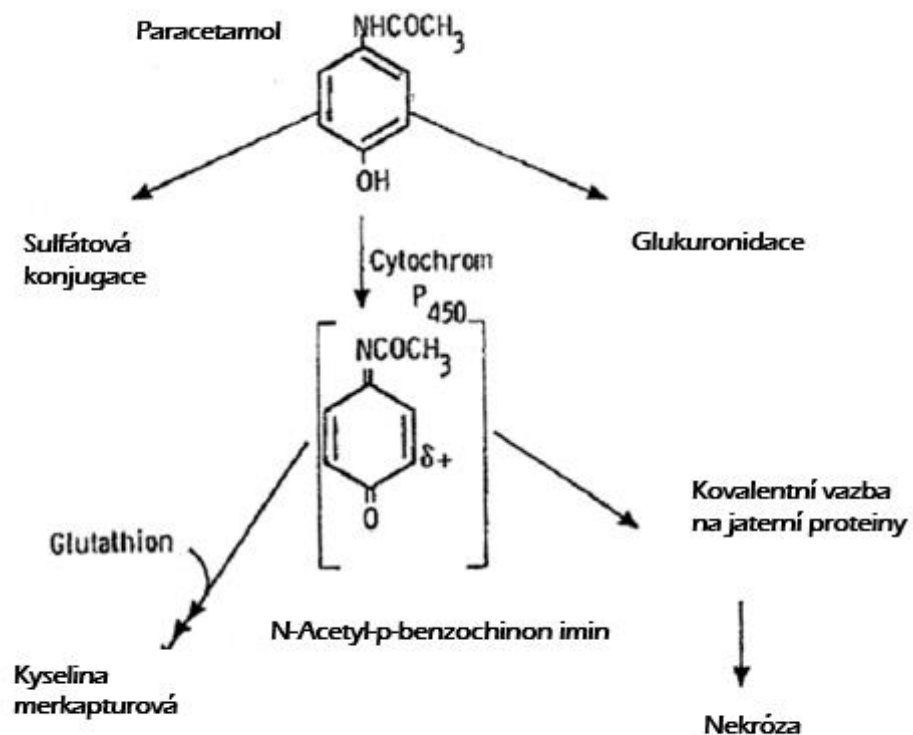
1.1.4.2. II. biotransformační fáze

Druhá fáze biotransformace se skládá z konjugace reaktivních skupin přítomných buď v původní molekule, nebo v produktu po transformaci v první fázi. K této konjugaci funkčních skupin dochází s polárním endogenním substrátem, kterým může být kyselina glukuronová, glutathion (GSH), glycin nebo kyselina octová. Enzymy druhé fáze zahrnují např. UDP-glukuronyltransferázy, glutathion S-transferázy, acyltransferázy nebo N-methyltransferázy.

Konjugáty druhé fáze jsou obvykle farmakologicky inaktivní. Dané metabolity jsou více polární než základní sloučeniny, proto jsou snadněji vylučovány ledvinami nebo žlučí (Williams, 2004).

Tyto konjugační reakce jsou důležité nejen pro vylučování léčiva, ale také snižují toxicitu léčiva. Například široce používaný lék acetaminofen (N-acetyl-p-aminofenol, známý také jako paracetamol obsažený např. v Paralenu) je při nízkých koncentracích odstraňován přímou konjugací enzymem sulfotransferázou nebo glukuronidací glukuronyl transferázou za vzniku netoxických konjugovaných produktů acetaminofenu (Xie, 2014).

Pokud se však acetaminofen vyskytuje ve vysokých koncentracích, dojde k překročení konjugační kapacity a acetaminofen může být oxidován několika CYP enzymy, zejména CYP2E1, za vzniku reaktivní látky N-acetyl-p-benzochinonimin. Tento reaktivní toxický metabolit může být odstraněn konjugací s GSH. Pokud však dojde k předávkování paracetamolem, hladiny GSH se vyčerpají a aktivní chinonimin vytváří kovalentní sloučeniny s proteiny, zejména s mitochondriálními proteiny. Narušení mitochondriální bioenergetiky vede k jaterní nekróze. Toxicita acetaminofenu jednou z hlavních příčin lékových poškození jater (Obrázek 6) (Saito, 2010).



Obrázek 6: I. a II. fáze metabolismu acetaminofenu (Převzato a upraveno z: Cederbaum, 2015)

Reakce fáze I. a fáze II. se často, ale ne vždy, vyskytují sekvenčně. (Například fenytoin je nejprve hydroxylován reakcí první fáze a následně konjugován s kyselinou glukoronovou). Enzymy podílející se na reakcích fáze I. se nachází primárně v endoplazmatickém retikulu, zatímco konjugační enzymatické systémy II. fáze jsou lokalizované především v cytosolu (Boussery, 2015).

1.1.4.3. Faktory ovlivňující metabolismus xenobiotik

Mezi faktory, které ovlivňují aktivitu cytochromu P450 a tím i metabolismus xenobiotik patří genetické faktory, věk, pohlaví, mezidruhové rozdíly, výživa, indukce a inhibice, chorobné stavy, faktory životního prostředí a denní změny (Ogu, 2000).

Genetické faktory – na molekulární úrovni je podstatou mutace genu zodpovídající za strukturu určitého cytochromu. Ve výsledku můžeme v populaci nalézt, mimo jedince s obvyklou rychlostí metabolismu, dva odlišné fenotypy: jedince mající pomalý a rychlý metabolismus.

Věk – u novorozenců není systém mikrosomálních enzymů plně rozvinutý, proto je rychlost metabolismu velmi nízká. S rostoucím věkem dochází k postupnému úbytku hladkého endoplasmatického retikula, čímž se snižuje aktivita enzymů první biotransformační fáze včetně cytochromů P450.

Pohlaví – rozdíly v metabolismu způsobují pohlavní hormony. Samci v porovnání se samicemi metabolizují xenobiotika mnohem efektivněji, avšak zvýšenou rychlost metabolismu mají samice během těhotenství.

Mezidruhové rozdíly – nejvíce jsou pozorovány u zvířat. Potkani a králíci metabolizují xenobiotika rychleji než lidé. Metabolismus xenobiotik se liší také mezi etnickými skupinami. Například Eskymáci metabolizují cizorodé látky mnohem rychleji než Asiaté (Sullivan, 2001).

Výživa – snížený přísun nenasycených mastných kyselin a proteinů při dietě má za následek pokles aktivity cytochromu P450, což se projevuje pomalým odbouráváním xenobiotik.

Enzymová indukce – jedná se o proces, ve kterém cizorodá látka vyvolá nebo zvýší expresi biotransformačních enzymů.

Enzymová inhibice – charakterizována poklesem schopnosti cytochromu metabolizovat xenobiotika. Mezi inhibitorem a cizorodou látkou probíhá soutěž o vazbu aktivního místa. Pokud se do aktivního místa naváže inhibitor, dojde k poklesu metabolismu.

Chorobné stavy – jaterní onemocnění (např. cirhóza jater, hepatitida, karcinom jater) snižuje schopnost jater metabolizovat xenobiotika. Kardiovaskulární onemocnění snižuje průtok krve játry, což brzdí proces biotransformace.

Faktory životního prostředí – aromatické uhlovodíky obsažené v cigaretách a chronický alkoholismus působí jako induktory enzymů. Ve vysoké nadmořské výšce se snižuje proces biotransformace v důsledku snížení hladiny kyslíku vedoucí ke snížení oxidace xenobiotik.

Denní změny – aktivita biotransformačních enzymů je maximální během časného rána a minimální v pozdních odpoledních hodinách (Martinez, 2002).

1.1.5 Polymorfismus

Aktivita cytochromu P450 může být ovlivněna 2 základními faktory – genetickým polymorfismem způsobující změnu genotypu a dále změnou exprese genu, která ovlivňuje změnu fenotypu.

Termín polymorfismus znamená mnohotvárnost, schopnost zaujímat více forem. Pokud dojde k polymorfní změně ve struktuře genu kódující enzym, výsledkem může být vznik enzymu s pozměněnou katalytickou aktivitou. Genetický polymorfismus představuje stav, kdy se v populaci vyskytuje více variant proteinů (enzymů) s frekvencí výskytu 1 %. Všechny cytochromy P450 podléhají genetickému polymorfismu. Mutace v genech cytochromů P450 mohou vést k expresi enzymů se sníženou, pozměněnou nebo zvýšenou aktivitou. Zvýšená metabolická aktivita enzymu způsobí rychlejší rozklad léčiv, což vede k nedostatečné koncentraci léčiva v organismu, čímž nemusí být dosaženo požadovaného farmakologického účinku. Naopak pokud je aktivita enzymu snížena, mohou se některá léčiva metabolizovat pomaleji a následně může dojít k předávkování organismu. Polymorfní forma enzymu je obvykle značená symbolem * a číslem pro alelickou variantu (Preissner, 2013; Slanař, 2002).

1.1.5.1. Polymorfismus cytochromu P450 2E1

Pro gen kódující CYP2E1 bylo popsáno málo polymorfních alel v porovnání s ostatními cytochromy. Některé varianty alel *CYP2E1* mohou zdvojnásobit riziko vzniku rakoviny jícnu a rakoviny nosohltanu. Například výskyt polymorfní alely *CYP2E1*6* může zvýšit riziko vzniku rakoviny plic. (Hu, 1997). Dalším příkladem polymorfismu může být například alela *CYP2E1*1D*. Výskyt alely *CYP2E1*1D* je úzce spjatý se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu jícnu a konečníku, což jsou onemocnění související s alkoholismem a kouřením. (Tang, 2010). Některé studie prokázaly, že polymorfismy CYP2E1 se výrazně liší mezi různými etnickými a rasovými skupinami (Garte, 2001).

1.2 Cytochrom P450 2E1

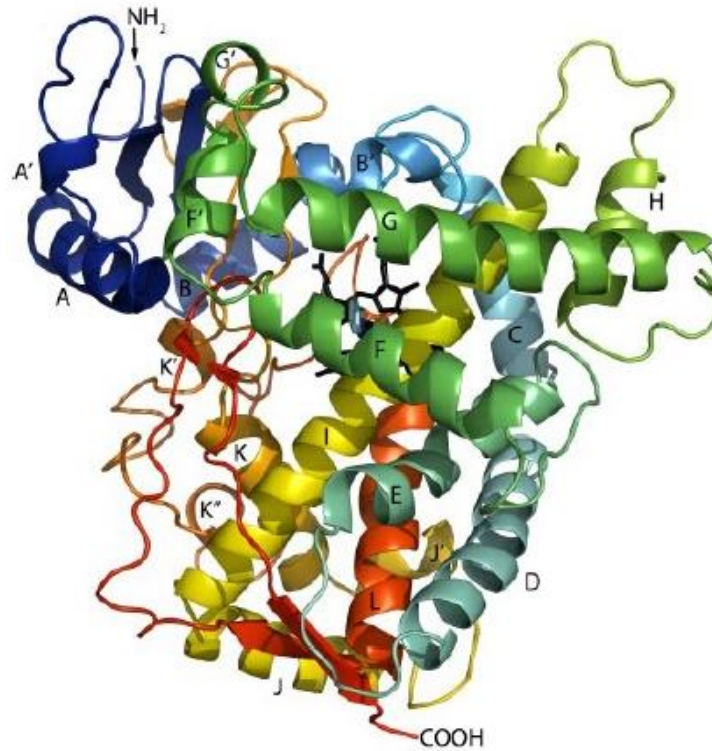
Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) je jedním z členů rodiny/nadrodiny P450, který oxiduje strukturálně různorodé skupiny endogenních a exogenních (cizorodých) látek. V roce 1968 bylo zjištěno, že jaterní mikrosomy obsahují ethanol oxidující enzymatický systém (MEOS) odlišný od alkoholdehydrogenázy (ADH). V systému byl později identifikován CYP2E1 oxidující ethanol na acetaldehyd (Lieber, 1968). Nejvyšší aktivita CYP2E1 se nachází v játrech, avšak CYP2E1 je také exprimován na nižších úrovních extrahepatálních tkáních, kde se především podílí na metabolismu endogenních sloučenin. CYP2E1 se výrazně podílí na metabolismu xenobiotik s cílem tyto cizorodé látky vyloučit z organismu, nicméně při tomto procesu však může dojít ke vzniku toxických nebo karcinogenních produktů. To znamená, že aktivita CYP2E1 může mít významný vliv na lidské zdraví a na metabolismu léčiv (Lieber, 2004).

CYP2E1 je spojený s jaterní toxicitou prostřednictvím dvou mechanismů: aktivací substrátů přeměňující se na reaktivní metabolity a potenciálně tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. Reactive Oxygen Species) viz kapitola 1.2.6. (Lu, 2008).

1.2.1 Struktura

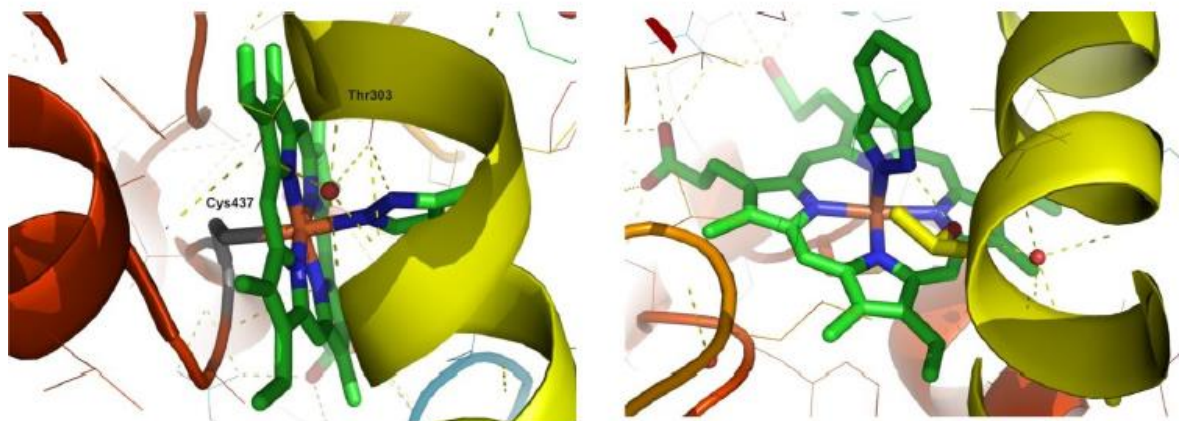
Cytochromy P450 mají podobné primární struktury, avšak podstatně se liší ve velikosti a tvaru jejich aktivního místa, přítomnosti kanálů, které umožňují vstup substrátů a vyloučení metabolitů, a dále faktory určující substrátovou specifitu. Pro lepší pochopení schopnosti CYP2E1 účinně vázat a metabolizovat jak sloučeniny o malé molekulové hmotnosti, tak mastné kyseliny, byla struktura tohoto enzymu stanovena rentgenovou krystalografií.

Základ struktury tvoří proteiny skládajících se z aminokyselinových zbytků. Celková struktura CYP2E1 se skládá z 12 hlavních α -šroubovic a ze 4 β -skládaných listů označených A-L a $\beta 1$ - $\beta 2$ v abecedním pořadí od N-konce po C-koncovou oblast (Obrázek 7). Tyto dvě molekuly α a β CYP2E1 přítomné v asymetrické jednotce každé struktury jsou téměř identické, jako je tomu u proteinových komplexů se dvěma různými inhibitory (Porubsky, 2008).



Obrázek 7: Celková struktura CYP2E1. Na obrázku je modře znázorněn N konec a červeně C konec. Šroubovice jsou označeny za použití typického P-450 názvosloví. (Převzato z: Krissinel, 2004)

Významným prvkem je tzv. aktivní místo, ve kterém se nachází hemový kofaktor obsahující centrální atom železa. Jedná se o prosthetickou skupinu, která se váže na atom síry v blízkosti aminokyseliny cystein nacházející se mezi helixy I a L. V aktivním místě se nachází dutina obsahující molekuly vody, které jsou provázány vodíkovými vazbami. Tato dutina umožňuje transport protonu během katalyzované reakce (Obrázek 8) (Mestres, 2005).



Obrázek 8: Aktivní místo CYP2E1. Cys437 (vyznačen šedě) vytváří vazbu Fe-S spojující zbytek enzymu s hemovým kofaktorem, Thr 303 je součástí I helixu a jeho OH skupina se vodíkovou vazbou spojuje s kyslíkovým atomem nejbližší aminokyseliny. (Převzato z: Porubsky, 2008)

Zanořené aktivní místo slouží k navázání molekuly substrátu prostřednictvím cest vstupu a výstupu, které jsou nejčastěji označovány jako útvary v enzymu spojující aktivní místo s povrchem proteinu. Tyto oblasti se označují jako tunely nebo kanály. Pomocí programu CAVER mohou být popsány polohy jednotlivých kanálů. Za nejlepší cestu kanálu je označována prostorově nejširší cesta, která má nejkratší vzdálenost aktivního místa od povrchu proteinu (Petřek, 2006).

1.2.2 Exprese cytochromu P450 2E1

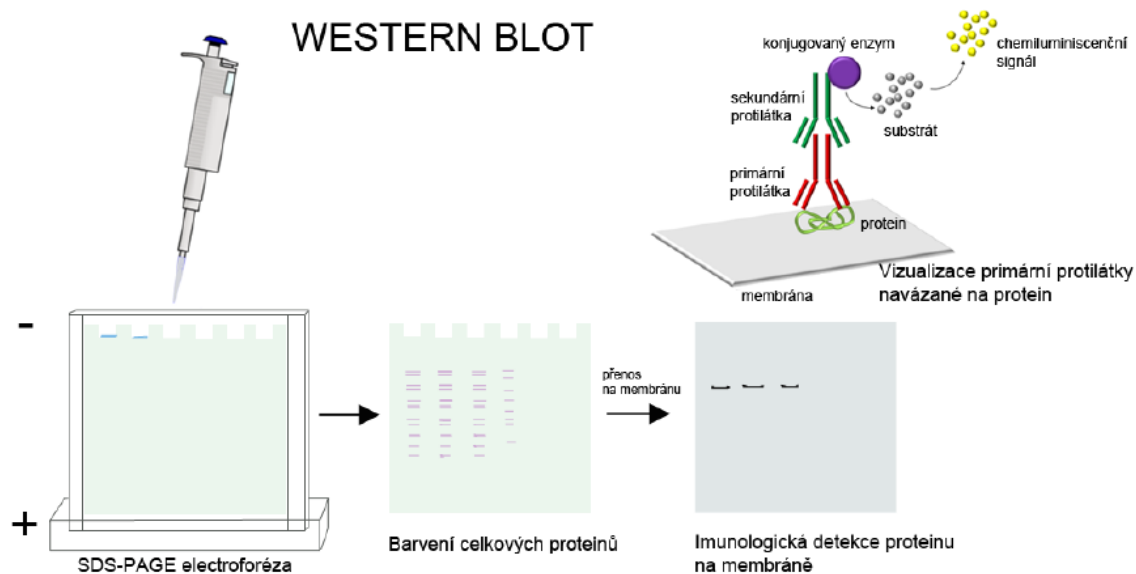
Proces, při kterém dochází k přepisu genetické informace DNA do struktury proteinů, se nazývá genová exprese a skládá se ze dvou fází – transkripce a translace. Transkripce zahrnuje přepis DNA do molekuly zvané mRNA (messenger RNA) pomocí enzymu RNA-polymerázy. Následuje translace, při které dochází k překlada genetické informace do sekvence proteinu (Kočárek, 2008).

Expresi enzymu CYP2E1 může ovlivňovat řada endogenních faktorů, mezi které patří například genetický polymorfismus, pohlaví, hladiny hormonů a věk a dále také vnější faktory například léčiva, životní prostředí nebo chemické látky. Exprese jaterního enzymu CYP2E1 v mRNA může být zvýšena jak při fyziologickém, tak při patologickém stavu, například při hladovění, diabetes, obezitě nebo při dlouhodobém nadužívání alkoholu (Robin, 2005).

Metody, které se používají ke stanovení exprese proteinů (tedy i cytochromu P450), jsou založeny na vazbě specifické protilátky se stanoveným proteinem. Mezi tyto metody patří imunoelektroforéza, western blot nebo imunoprecipitace.

1.2.2.1 Stanovení exprese proteinů metodou Western blot

Western blot analýza je běžně používaná metoda pro semikvantitativní detekci specifického proteinu ve vzorku. Základními kroky je elektroforetická separace proteinů, přenos separovaných proteinů a jejich detekce. Proteiny jsou denaturovány a separovány na SDS polyakrylamidovém gelu a následně jsou přeneseny na membránu. Zde je přítomnost proteinu detekována primární protilátkou namířenou proti danému proteinu. Protein s navázanou primární protilátkou je v dalším kroku rozpoznán sekundární protilátkou, která se váže na protilátku primární. Tento vzniklý komplex je dále detekován fluorescenčně nebo chemiluminiscenčně, v závislosti na značení sekundární protilátky (Obrázek 9) (Dittmer, 2006).



Obrázek 9: Schéma metody western blot (Převzato z: LabGuide, 2014)

1.2.3 Substráty

CYP2E1 metabolizuje mnoho exogenních toxikologicky důležitých substrátů zahrnující ethanol, glycerol, tetrachlormethan, paracetamol nebo N-nitrosodimethylamin na toxické metabolity, což způsobuje významné poškození buněk (viz kap. 1.1.4.). Tento nežádoucí efekt je provázán konzumací alkoholu a jeho metabolismem. CYP2E1 metabolizuje také endogenní sloučeniny zahrnující mastné kyseliny jako je např. kyselina arachidonová a laurová (Gonzalez, 2005).

Mnoho substrátů pro CYP2E1 splňuje platnost kinetické rovnice (Schéma 2). Jako první případ metabolismu substrátu byla uvedena oxidace p-nitrofenolu (pNP) (Koop, 1986). Obecně lze enzymovou reakci popsat vazbou strukturní jednotky substrátu na bílkovinnou část aktivního centra, čímž vytvoří komplex enzym-substrát. Následně dochází k oslabení chemických strukturních vazeb substrátu a vzniku vazeb nových, což způsobí rozpad vytvořeného komplexu na enzym a produkty (Collom, 2013).



Schéma 2: Průběh enzymové reakce: E = enzym, S = substrát, K_m = Michaelisova konstanta, k_{cat} = katalytická konstanta (Převzato z: Collom, 2013)

S ohledem na exogenní látky, CYP2E1 metabolizuje širokou škálu hydrofobních sloučenin, jako jsou rozpouštědla, aromatické uhlovodíky, alkoholy a nitrosaminy. Některé nitrosaminy jsou však považovány za karcinogenní látky. Mezi další karcinogenní látky patří např. benzen, styren, tetrachlormethan, vinyl chlorid a další. CYP2E1 se také podílí na metabolismu léků, jako chlorzoxanon a již zmíněný acetaminofen (Tabulka 1). 6-hydroxylace chloroxazonu se označuje za specifickou enzymovou reakci, která může být použita ke zjištění aktivity CYP2E1 u lidí včetně alkoholiků. Podobně jako chlorzoxanol je i p-nitrofenol běžně používán v modelových reakcích pro stanovení aktivity CYP2E1 (viz kapitola 1.3) (Girre, 1994).

Tabulka 1: Substráty metabolizovány/aktivovány CYP2E1

<i>Alkoholy, aldehydy, ketony</i>	acetaldehyd, ethanol, butanol, propanol, methanol, glycerol, pentanol, aceton, acetol, 2-butanon
<i>Aromatické sloučeniny</i>	acetaminofen, anilin, benzen, chlorzoxanon, fenol, pyridin, p-nitrofenol, toluen, pyrazol
<i>Mastné kyseliny</i>	kys. arachidonová ω -1 a ω -2 hydroxylace, kys. laurová ω -1 hydroxylace
<i>Alkany a alkeny</i>	acetoacetát, 1,3 butadien, chloroform, N,N-dimethylacetamid, N,N-dimethylformamid, ethan, ethylkarbamát, thioacetamid, trichloroethylen, vinyl chlorid
<i>Nitrosaminy</i>	azoxymethan, N,N-diethylnitrosamin, N,N-dimethylnitroamin, methylazoxymethanol, N-nitrosopyrrolidin
<i>Redukovatelné substráty</i>	kyslík, chrom VI, t-butylhydroperoxid, tetrachlormethan

(Převzato a upraveno z: Cederbaum, 2014)

1.2.4 Indukce aktivity cytochromu P450 2E1

Mechanismus indukce značí zvýšenou aktivitu enzymu. CYP2E1 může být indukován alkoholem a mastnými kyselinami. Alkohol je přednostně metabolizován alkoholdehydrogenázou. Nicméně CYP2E1 po indukci zvyšuje tvorbu toxických meziproductů, jako je acetaldehyd, acetát a volné radikály. Kromě toho CYP2E1 metabolizuje mastné kyseliny vytvářející ω -hydroxylované mastné kyseliny (Leung, 2013).

V důsledku vytváření toxických metabolitů aktivita CYP2E1 v játrech koreluje se stupněm poškození jater u pacientů s alkoholickou steatohepatitidou (ASH) a také s nealkoholickou steatohepatitidou (NASH) (Mahli, 2015).

ASH je relativně časté jaterní onemocnění charakterizované steatózou a zánětem u pacientů, kteří nadužívají alkohol. Tito pacienti mají špatnou prognózu: až u 50 % pacientů dojde k rozvoji jaterní cirhózy. NASH je jaterní onemocnění s histologickou podobností s ASH u pacientů, kteří neužívají alkohol. Vznik je často spojován s metabolickým syndromem a s obezitou. ASH a NASH se vyznačují indukcí aktivity CYP2E1 (Van der Wier, 2015).

1.2.5 Inhibice aktivity cytochromu P450 2E1

Inhibice enzymu vede ke snížení jeho aktivity a následně k omezení biotransformace substrátu. Tato inhibice metabolismu např. léčiva může vést k jeho nahromadění v organismu a následně se mohou projevit jeho toxické účinky na organismus. Obecně lze inhibici rozlišit na reverzibilní (vratnou) a ireverzibilní (nevratnou). Při reverzibilní inhibici dochází k rovnováze mezi enzymem a inhibitorem a komplexem enzym-inhibitor. Ireverzibilní inhibice je naopak charakterizována pevnou vazbou inhibitoru k enzymu, čímž dochází ke změně chemické struktury a ztrátě funkce enzymu. Reverzibilní inhibici lze rozdělit na kompetitivní, která brání vazbě substrátu na aktivní centrum enzymu, nekompetitivní, při níž se inhibitor váže na jiné místo, než je vazebné místo pro substrát, a dále akompetitivní, při které dochází k vazbě inhibitoru na komplex enzym-substrát, což zamezuje přeměně substrátu na produkt (Berg, 2002).

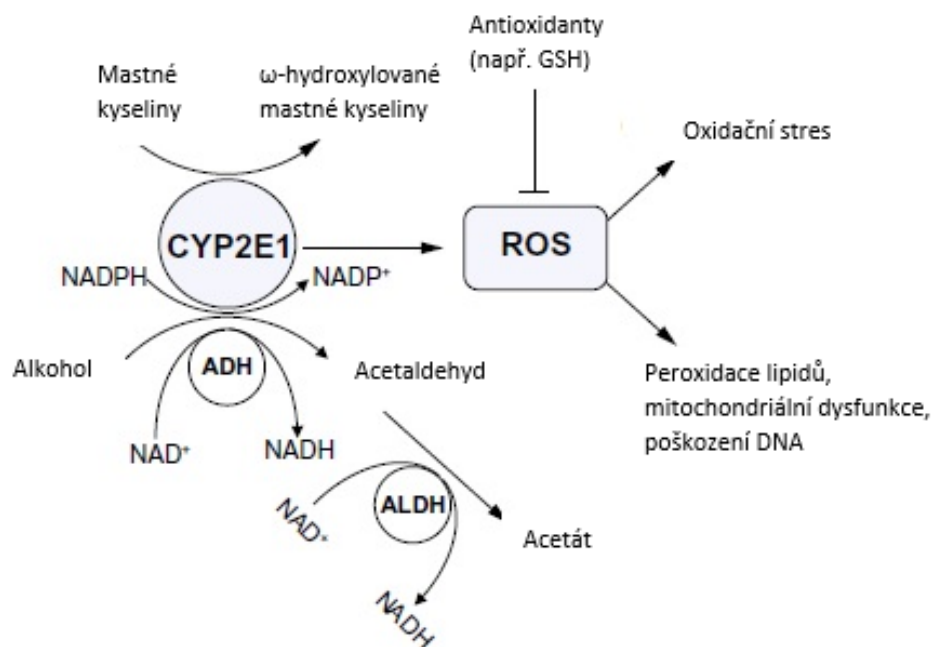
V roce 2015 bylo při testování homologů řady alifatických primárních alkoholů, sekundárních alkoholů, aldehydů, ketonů a karboxylových kyselin prokázáno, že inhibice aktivity CYP2E1 je primárně řízena lipofilicitou, neboli rozpustností v tucích. Mezi nejúčinnější inhibitory CYP2E1 se řadí např. 4-methylpyrazol, chlormethiazol, dialyldisulfid a disulfiram. Oxidovaná forma disulfiramu (zvaného Antabus) je aldehyd dehydrogenasový inhibitor, který se používá u pacientů v protialkoholní léčbě (Van der Wier, 2015).

1.2.6 Nežádoucí doprovodné jevy cytochromu P450 2E1

Jelikož katalytická aktivita enzymu CYP2E1 vyžaduje aktivaci kyslíku, dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku jako je superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($\cdot OH$). CYP2E1 je mnohem náchylnější k produkci ROS, než jiné cytochromy P450. ROS jsou toxické pro buňky, protože reagují s makromolekulami, denaturují bílkoviny, inaktivují enzymy a způsobují poškození DNA a RNA. ROS jsou také důležité v přenosu signálu a jsou zapojeny do důležitých metabolických drah. Avšak vysoká koncentrace ROS působí škodlivě (Lu, 2008).

Četné studie (Leung, 2013) ukázaly, že zvýšená aktivita CYP2E1 je provázána nadprodukcí ROS. Zvýšenou produkcí ROS je navozen oxidační stres (Obrázek 10), který vede k poškození buněk a následně může vést k apoptóze či nekróze. Tvorba ROS je klíčem k progresi ztukovatění jater ke steatohepatitidě (Mahli, 2015). Existují tři hlavní místa uvnitř hepatocytů pro tvorbu ROS, a to mitochondrie, peroxisomy a hladké endoplasmatické retikulum.

V těle se nachází antioxidační obranné mechanismy (enzymatické a neenzymatické), které udržují fyziologické hladiny ROS, čímž zabraňují buněčnému poškození. Tyto mechanismy zahrnují glutathion, glutathionperoxidázu, superoxiddismutázu, hemoxygenázu, ceruloplasmin, feritin, vitaminy A, E a C, kyselinu močovou a bilirubin (Aubert, 2011).



Obrázek 10: Tvorba ROS. (Převzato a upraveno z: Leung, 2013)

1.3 Stanovení aktivity

V biologickém materiálu se enzymy nacházejí ve velmi nízkých koncentracích, proto je lze přímo stanovit velmi obtížně. Ke stanovení se využívá katalytické účinnosti enzymu při nepřímém stanovení kinetickou metodou neboli na základě rychlosti, jakou enzym katalyzuje přeměnu substrátu na produkt.

1.3.1 Vyjadřování katalytické aktivity

Aktivita enzymu se vyjadřuje v kataltech. Tato jednotka enzymové aktivity se označuje katal (kat) a vyjadřuje množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za 1 sekundu. Jelikož je tato jednotka příliš velká, praktičtější je vyjádření v mikrokataltech (μkat) = 10^{-6} kat, nanokataltech (nkat) = 10^{-9} kat nebo pikokataltech = 10^{-12} kat. Specifická aktivita se obvykle vyjadřuje jako μmol substrátu přeměněného na produkt za 1 minutu na mg enzymu. Jedná se o množství produktu vytvořeného enzymem v daném čase za daných podmínek na miligram enzymu (El-Yassin, 2012).

1.3.2 Faktory ovlivňující aktivitu enzymu

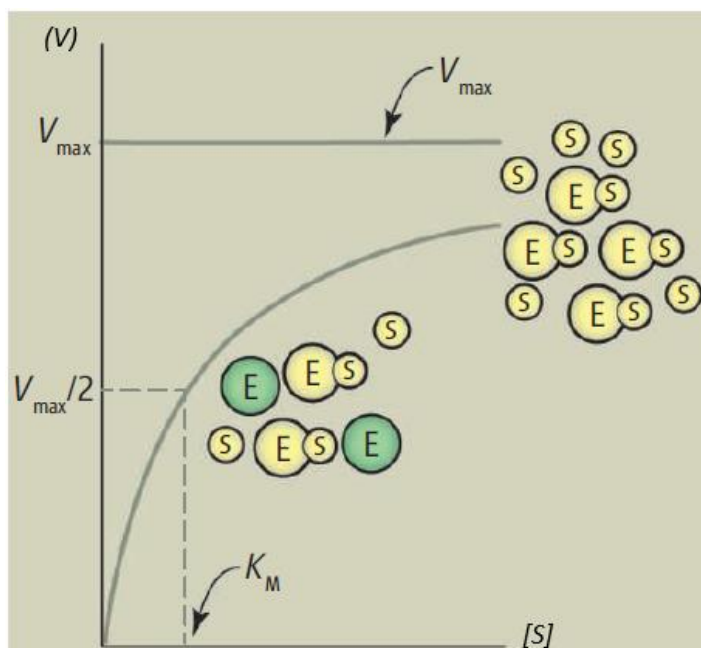
Mezi faktory ovlivňující aktivitu enzymu patří koncentrace substrátu, pH, iontová síla a přítomné soli a teplota.

1.3.2.1. Vliv koncentrace substrátu

Rychlost (v) tvorby produktu je závislá na koncentraci substrátu, což popisuje rovnice Michaelis-Mentelové:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

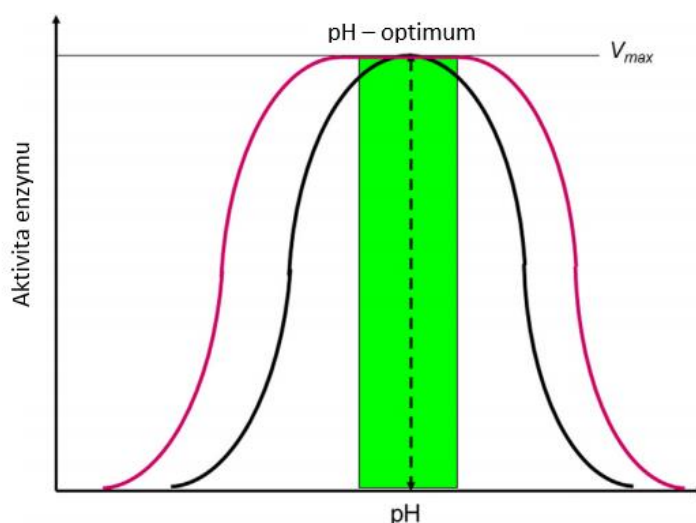
kde $[S]$ je koncentrace substrátu, v je měřená rychlost, V_{\max} je maximální teoretická rychlost při nekonečné koncentraci substrátu a K_m je Michaelisova konstanta. K_m charakterizuje koncentraci substrátu, při které je rychlost enzymové reakce rovna polovině maximální rychlosti (Obrázek 11) (Johnson, 2011).



Obrázek 11: Enzymová kinetika. Křivka závislosti rychlosti reakce (V) na koncentraci substrátu $[S]$ podle rovnice Michaelis-Mentenové. (Převzato z: Xie, 2013)

1.3.2.2. Vliv pH

Enzymy jsou aktivní pouze v určitém rozsahu pH. Rozsah může být široký např. hodnoty pH 5 až 10 nebo úzký např. hodnota pH kolem 1. V rozsahu je optimální hodnota taková, při které je dosaženo nejvyšší aktivity (nejvyšší hodnota pro V_{max}) (Obrázek 12). Účinek pH je obecně testován při vysoké koncentraci substrátu (Bisswanger, 2014).



Obrázek 12: Křivka optimální hodnoty pH
Černá křivka znázorňuje hodnotu pH v maximu, což je optimální pH, zelená oblast charakterizuje fyziologické rozmezí a červená linie popisuje širší křivku stability enzymu (Převzato a upraveno z: Bisswanger, 2014)

1.3.2.3. Vliv teploty

Teplota ovlivňuje aktivitu enzymu stejným způsobem jako další chemické reakce. Teplotní závislost se velmi podobá závislosti pH – s rostoucí teplotou roste rychlost přeměny substrátu na produkt. Trojrozměrná struktura enzymu je tepelně citlivá a po překročení určité teploty dochází k denaturaci enzymu, což má za následek snížení až zástavu tvorby produktu. Některé enzymy (např. alkohol dehydrogenáza) pomalu denaturují i při fyziologické teplotě (37°C) (Bisswanger, 2014).

1.3.2.4. Vliv iontové síly a soli

Každý enzym reaguje jedinečným způsobem na obsah soli. Většina z nich je inhibována při vysoké koncentraci soli (> 0,5 mol/l). Přirozená intracelulární iontová síla je obvykle v rozmezí od 0,15 do 0,2 mol/l (Scopes, 2002).

1.3.3 Metody pro měření aktivity

Metody stanovení katalytické aktivity enzymů lze podle principu detekce substrátu nebo produktu rozdělit do několika skupin (Tabulka 2). Princip stanovení je však totožný - stanovení změny koncentrace substrátu nebo produktu v čase. Nejběžnějšími metodami ke stanovení enzymů jsou spektrofotometrie a chromatografie (viz níže) (Grieshaber, 2008).

Tabulka 2: Rozdělení metod pro měření aktivity enzymů

<i>Optické</i>	<i>Elektrochemické</i>
Spektrofotometrie	Potenciometrie
Fluorimetrie	Amperometrie
Polarimetrie	Polarografie
Luminiscence	Konduktometrie

(Převzato z: Grieshaber, 2008)

1.3.3.1. Spektrofotometrie

Touto metodou lze stanovit aktivitu enzymu na základě absorbování světla roztokem při různé vlnové délce. Pokud se toto světlo nachází ve viditelné oblasti, lze vidět změnu barvy testu a tyto testy se už nazývají **kolorimetrické**. Velmi často se při spektrofotometrických testech používá světlo v UV oblasti. Společné koenzymy NADH a NADPH absorbují UV

světlo pouze v jejich redukované formě a nikoliv v oxidované formě. Cytochromy využívající NADH jako substrát by proto měly být testovány v UV oblasti při vlnové délce 340 nm. Při spektrofotometrii musí být změna koncentrace substrátu nebo produktu za jednotku času přímo úměrná změně absorbance. Toto je splněno, pokud platí Lambert-Beerův zákon, který definuje vztah absorbance a stanovované koncentrace:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

kde A je absorbance, ε molární absorpční koeficient (cm^2/mmol), c koncentrace (mol/l) a d tloušťka absorbující vrstvy (cm) (Vodrážka, 1991).

Spektrofotometrii lze použít ke stanovení aktivity CYP2E1 sledováním tvorby p-nitrokatecholu z p-nitrofenolu izolovanými jaterními mikrosomy. Produkt se testuje při vlnové délce 535 nm po okyselení reakční směsi kyselinou trichloroctovou a následnou alkalizací 2 M NaOH (Chang, 2006).

1.3.3.2. Fluorimetrie

Fluorescence je jev, kdy molekula vyzařuje světlo o specifické vlnové délce po absorbování světla jiné vlnové délky. Fluorimetrické testy používají pro měření enzymové reakce rozdíl fluorescencí substrátu a vzniklého produktu. Tyto testy jsou mnohem citlivější než spektrofotometrické, avšak mohou být rušeny působením nečistot a nestabilitou některých fluorescenčních sloučenin po vystavení světlu. Příkladem těchto reakcí je opět použití nukleotidových koenzymů NADH a NADPH. Zde mohou být oxidační reakce následovány poklesem fluorescence a redukční reakce naopak jejím zvýšením (Tothova, 2010).

1.3.3.3. Chemiluminiscence

Chemiluminiscence je emise světla vyvolané chemickou reakcí. Některé enzymové reakce produkují světlo, které může být měřené pro detekci tvorby produktu. Tyto typy testů bývají extrémně citlivé (Rossomando, 1990).

1.3.3.4. Radiometrie

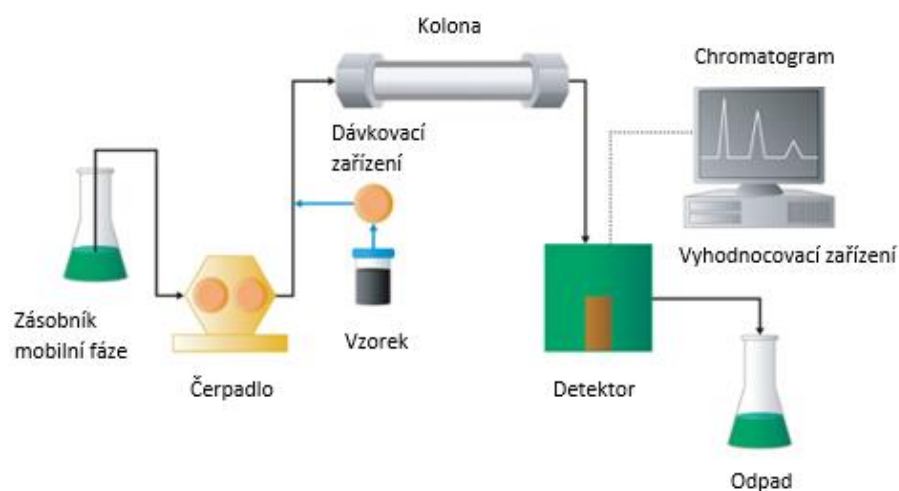
Radiometrické testy sledují začlenění radioaktivně značené látky do substrátů nebo její uvolnění ze substrátů. Nejčastěji používanými izotopy jsou ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S a ^{125}I . Jelikož radioaktivní izotopy umožňují specifické označení jednoho atomu substrátu, jsou tyto testy extrémně citlivé a specifické. Testy se používají v biochemii a jsou často jediným způsobem

měření specifické reakce v komplexu směsi enzymů produkovaných při lýze buněk. Radioaktivita se měří s použitím scintilačního počítače měřící ionizující záření (Pavelka, 2010).

1.3.3.5. *Chromatografické metody*

Chromatografické testy měří výsledný produkt rozdělením reakční směsi na jednotlivé složky pomocí chromatografie. Obvykle je k tomu používána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), avšak může být použita i jednodušší technika chromatografie na tenké vrstvě či jiné typy chromatografie. Citlivost chromatografických metod může být navýšena označením substrátů/produktů radioaktivní nebo fluorescenční značkou (Eisenthal, 2002).

Princip HPLC je uveden na obrázku 13. Jedná se o separační metodu, která je založena na separaci látky mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Mobilní fáze je vždy kapalná a stacionární fáze je ukotvena v koloně. Vzorek je dávkován dávkovacím ventilem a poté je unášen mobilní fází, která unáší složky vzorku na separační kolonu. Po průchodu kolonou jsou složky vzorku detekovány na detektoru (Kupiec, 2004).



Obrázek 13: Schéma HPLC (Převzato a upraveno z: www.waters.com)

1.3.4 Stanovení aktivity cytochromu P450 2E1

Bylo prokázáno, že oxidace p-nitrofenolu na p-nitrokatechol (pNC) je velmi rychlým, jednoduchým a relativně specifickým testem pro stanovení katalytické aktivity CYP2E1. Tato metoda byla poprvé uvedena v roce 1975 (Chrastil, 1975). Reinke a Moyer ukázali, že hydroxylace p-nitrofenolu je mikrosomální oxidací, která může být indukována ethanolem.

Došli k závěru, že p-nitrofenol může být užitečným substrátem pro studování změn metabolických reakcí léků způsobených ethanolem (Reinke a Moyer, 1985).

Následně Koop jasně prokázal, že u králíků to byl právě ethanol-indukovatelný P450 isoenzym 3a (starší terminologie pro CYP2E1), který byl zodpovědný za nárůst při oxidaci p-nitrofenolu po léčbě ethanolem. V dalších studiích Koop rozšířil tyto studie z králíků na potkany, myši a křečky (Koop, 1986).

1.3.4.1. P-nitrofenol

P-nitrofenol (nazývaný také 4-nitrofenol) patří mezi fenolové sloučeniny obsahující nitroskupinu na opačné straně od hydroxylové skupiny na benzenovém kruhu (Obrázek 14).



Obrázek 14: Vzorec p-nitrofenolu (Převzato z: Elbarbry, 2006)

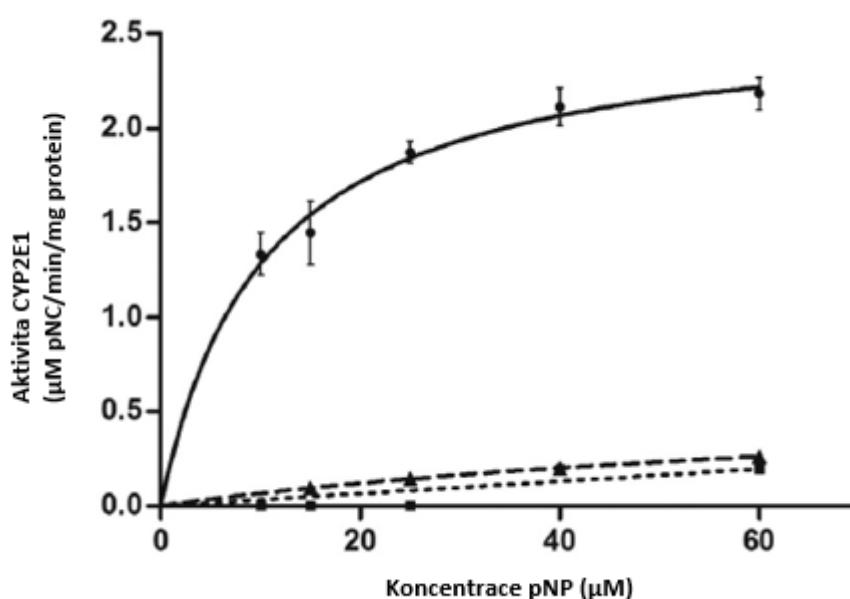
Jedná se o látku žluté barvy v krystalickém stavu, která se používá k výrobě léků (např. acetaminofenu), fungicidů a barviv. P-nitrofenol je toxický. Vdechnutí nebo jeho požití dráždí dýchací cesty, oči a kůži. Také může způsobit žluté zbarvení kůže, methemoglobinemii (modré rty, uši, nehty), bolest hlavy, nevolnost, závrať nebo dokonce bezvědomí, proto je důležité s touto látkou pracovat opatrně a s použitím ochranných pomůcek. U této látky však nebyly zjištěny karcinogenní účinky (U. S. Public Health Service, 1992).

1.3.4.2. P-nitrokatechol

P-nitrokatechol vzniká jako produkt při hydroxylaci p-nitrofenolu prostřednictvím enzymu CYP2E1. Tato reakce je užitečným metabolickým ukazatelem přítomnosti funkčního enzymu CYP2E1. Některé jaterní mikrosomální isoenzymy cytochromu P450 dále katalyzují redukci p-nitrokatecholu na p-aminofenol. Toxicita byla zjištěna také u p-nitrokatecholu. Kontakt s touto látkou může způsobit podráždění kůže, očí a dýchacích cest. Stejně jako u p-nitrofenolu zde nebyly zjištěny karcinogenní účinky (www.pubchem.cz).

1.3.4.3. Oxidace p-nitrofenolu

Reakce se obvykle provádí v 1,5 ml zkumavkách Eppendorf a probíhá při 37°C v třepací vodní lázni o objemu 0,1 ml obsahující 100 mM fosforečného pufru, 0,2 mM pNP a mikrosomy s definovaným množstvím proteinu (0,2-1 mg). Začátek reakce zahrnuje přidání 1 mM NADPH a konec reakce nastane po 10-20 min. (při práci s jaterními mikrosomy) přidáním 1 % kyseliny trichloroctové. Tato směs se následně centrifuguje při 5000 g po dobu 10 min., vysrážený protein se odstraní a vzniklý supernatant se převede do čisté zkumavky, ke které se přidá 0,1 ml roztoku NaOH. Absorbance vzniklého růžovo-žlutého p-nitrokatecholu se určuje při vlnové délce 510 nm ve spektrofotometru. Koncentrace p-nitrokatecholu se určuje buď z extinkčního koeficientu 9,53 mM⁻¹/cm, nebo ze standardní křivky p-nitrokatecholu obsahující nulové kontroly. Kontroly zahrnují vynechání mikrosomů, pNP nebo NADPH a nebo vynechání přídavku kyseliny trichloroctové před NADPH (Obrázek 15) (Cederbaum, 2014).



Obrázek 15: Aktivita CYP2E1. Horní křivka popisující závislost aktivity CYP2E1 získané na základě přeměny p-nitrofenolu (pNP) na p-nitrokatechol (pNC) v potkaních mikrosomech a dolní křivka popisující kontrolní mikrosomy. (Převzato z: Van de Wier, 2015)

1.4 Modelové systémy pro testování enzymové aktivity

Játra jsou hlavním místem metabolismu a biotransformace léků v těle. Klasické testování zahrnuje metody *in vivo*, což v překladu z latiny znamená „v živém těle“. Tyto testy probíhají v celých organismech, v nichž se sleduje interakce organismu s cizorodou látkou, která zahrnuje toxokinetické procesy, mezi něž patří např. vstup do těla nebo vylučování. Velikou nevýhodou těchto testů jsou mezidruhové rozdíly ve vstřebávání látek a metabolismu. Modelový organismus může být více nebo méně citlivý než organismus lidský. Jelikož z etických důvodů nelze testovat látky *in vivo* na lidech, byly vyvinuty metody testování *in vitro* a rovněž *in vivo* na laboratorních zvířatech (Page, 2012).

In vitro znamená v překladu „mimo tělo“ nebo „ve zkumavce“, přesný překlad znamená „ve skle“. Snahou modelů *in vitro* je napodobovat místa působení xenobiotik, jako jsou buňky a tkáně, které by se chovaly podobně jako v situaci *in vivo* (Bhanushali, 2010).

1.4.1 Játra

Játra patří mezi největší orgán lidského těla – u dospělého jedince váží cca 1500 g. Plní celou řadu důležitých funkcí, mezi něž patří především metabolické, vaskulární, biotransformační a imunitní funkce, ale také tvorba a vylučování žluči. Játra mají také funkci zásobní, např. skladování vitamínů A, B₁₂, D a K. Zásobním zdrojem energie je jaterní glykogen.

Základní morfologickou jednotkou jater je jaterní lalůček (lobulus) o velikosti přibližně 0,8-2 mm. Játra mohou obsahovat 50 000-100 000 lalůčků. Tyto jaterní lalůčky obsahují sinusoidy, do kterých přivádí živiny a okysličenou krev jaterní tepny a větve portální žíly nacházející se uvnitř laloků. Sinusoidy jsou obklopeny hepatocyty a prostor mezi endotelem krevních sinusoid a hepatocyty se nazývá Disseho prostor, v němž probíhá výměna látek mezi krví a hepatocyty. Funkční jednotkou jater je tzv. portální acinus, který nejlépe popisuje vztah mezi metabolickou aktivitou jater, krevní perfúzí a patologickými stavy (Ehrmann, 2014).

Hepatocyty jsou parenchymové buňky obsahující centrálně uložené jádro a tvoří 60 % jater. V játrech můžeme nalézt také neparenchymové buňky zaujímající přibližně 30 % jater, mezi které se řadí jaterní hvězdicovité buňky (Itovy buňky), Kupfferovy buňky (makrofágy), sinusoidální endoteliální buňky a epitelové buňky žlučových cest (Červinková, 2005).

1.4.2 Klasické modely *in vitro*

Hlavními modely pro testování toxicity *in vitro* jsou jaterní řezy, perfundovaná játra, izolované mikrosomy, stabilizované buněčné linie a primární kultury hepatocytů (Soldatow, 2013). Výhody a nevýhody těchto modelů udává tabulka 3.

Tabulka 3: Výhody a omezení jaterních modelů *in vitro*

Model	Výhody	Nevýhody
<i>Izolovaná perfundovaná játra</i>	Funkce blízká orgánu <i>in vivo</i> Zachovaná lobulární struktura Funkční žlučové kanálky Možný sběr žluči Krátkodobé kinetické studie	Krátkodobá životaschopnost (2-3 hod.) Vylučování žluči klesá po 1-3 hod. Bez studie lidských jater Vhodné jen pro játra malých zvířat Bez redukce počtu použitých zvířat
<i>Jaterní řezy</i>	Zachovaná lobulární struktura Detekovatelné intralobulární účinky Možné studie v lidských játrech	Životaschopnost: 6 hod. až 2 dny Není možný sběr žluči
<i>Izolované hepatocyty</i>	Získání z celých jater nebo z biopsie Funkce blízká metodě <i>in vivo</i> Kryoprezervace	Krátkodobá životaschopnost (2-4 hod.) Bez žlučových kanálků
<i>Primární kultury hepatocytů</i>	Funkce vyjádřené po dobu několik dnů za určitých podmínek Indukce/inhibice enzymů metabolizujících léčiva Mezidruhové studie	Předčasné fenotypové změny Změna žlučových kanálků
<i>Jaterní buněčné linie</i>	Neomezený počet buněk Zachované jen některé funkce	Genotypová nestabilita Různé aktivity enzymů

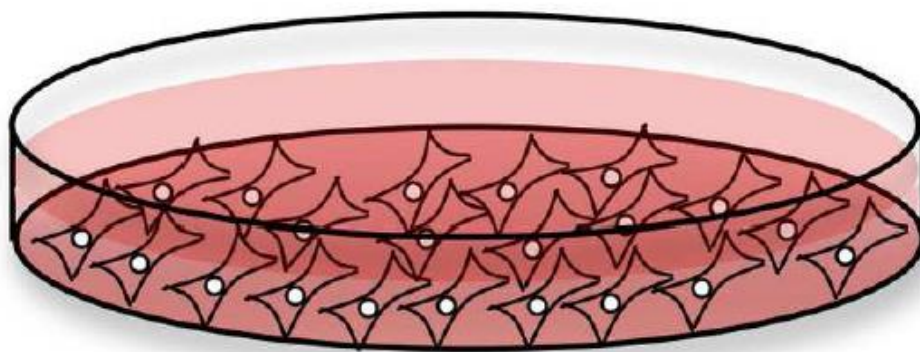
(Upraveno a převzato z: Guillouzo, 1998)

1.4.2.1. *Jaterní řezy*

Řezy jaterní tkáně mohou být příznivým modelem, jelikož udržují strukturu jater, obsahují všechny typy buněk nalezené *in vivo*, mají dobrou *in vitro/in vivo* korelaci metabolismu xenobiotik a udržují specifickou aktivitu cytochromu. Dalšími výhodami je snadná příprava vzorků a nízké náklady na technické vybavení. Připravené vzorky lze skladovat kryoprezervací, jelikož jaterní řezy mohou zůstat metabolicky aktivní po dobu 2 až 3 dnů. Pro zvýšení životaschopnosti buněk a snížení degenerativní změny ve tkáni v průběhu období kultivace je důležité využití kultivačních podmínek, které zahrnují tlak kyslíku a médium (Groneberg, 2002; Guillouzo, 1998).

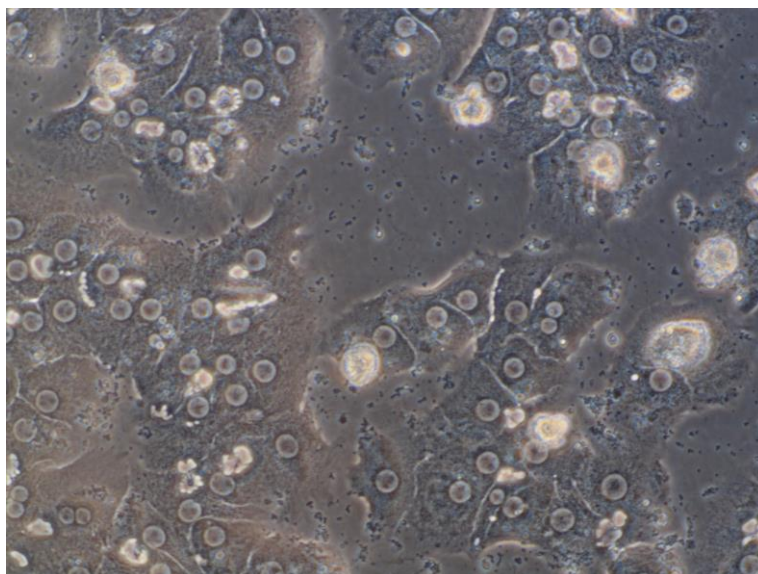
1.4.2.2. *Primární kultury hepatocytů*

Většina systémů pro kultivaci hepatocytů zahrnuje 2D jednovrstevné kultury založené na potahování povrchů extracelulární matricí, jako je např. kolagen (Obrázek 16). Za těchto podmínek si hepatocyty ponechají specifické funkce jako metabolismus cukrů nebo syntézu proteinů až několik dní (Chow, 2010).

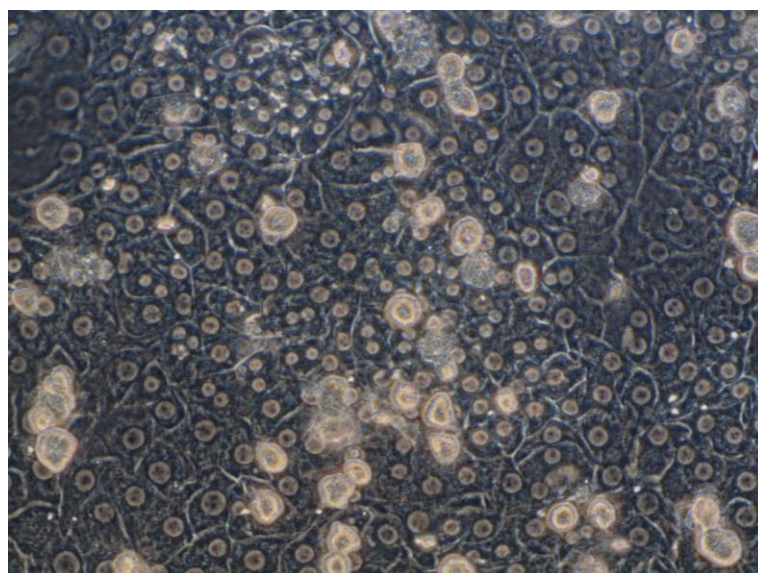


Obrázek 16: 2D kultivace na Petriho misce, buňky se nacházejí v jednovrstevném a plochém uspořádání. (Převzato z: Chow, 2010)

Pro testování toxicity *in vitro* jsou primární kultury hepatocytů velmi výhodným modelem. Jejich funkční aktivita přetrvává po dobu 24-72 hodin, mohou být použity k indukci enzymů i k inhibičním studiím. Primární kultura neboli primokultura se skládá z buněk odebraných přímo z organismu. Buňky se obvykle získávají z tkáně. Použití lidských hepatocytů je z řady důvodů velmi obtížné, proto se častěji využívají hepatocyty z potkaních či myších jater. Nevýhodou primárních kultur hepatocytů je vysoká ztráta aktivity jejich biotransformačních enzymů a také jejich dediferenciace k metabolismu fetálních hepatocytů. Dediferenciace hepatocytů je důležitým limitem tohoto *in vitro* systému. Funkční kapacita jaterních buněk rychle klesá v průběhu prvních 24-48 hodin kultivace. Ke zpomalení dediferenciace primokultury je dobré zvolit vhodné kultivační podmínky a přiblížit se *in vivo* stavu. Proto se nejčastěji hepatocyty kultivují metodou přichycení na plastové povrchy kultivačních nádob. Tento způsob kultivace se nazývá tzv. „monolayer“, neboli růst v jedné vrstvě (Obrázek 17) (Bachmann, 2015; Lecluyse, 2001).



a



b

Obrázek 17: Morfologie kultivovaných hepatocytů v průběhu času od 4 hodin (a) do 24 hodin (b).
Po 24 hodinách kultivace se buňky šíří v typickém růstu tzv. monolayeru a spoje mezi buňkami jsou lineární.

1.4.3 Alternativní modely

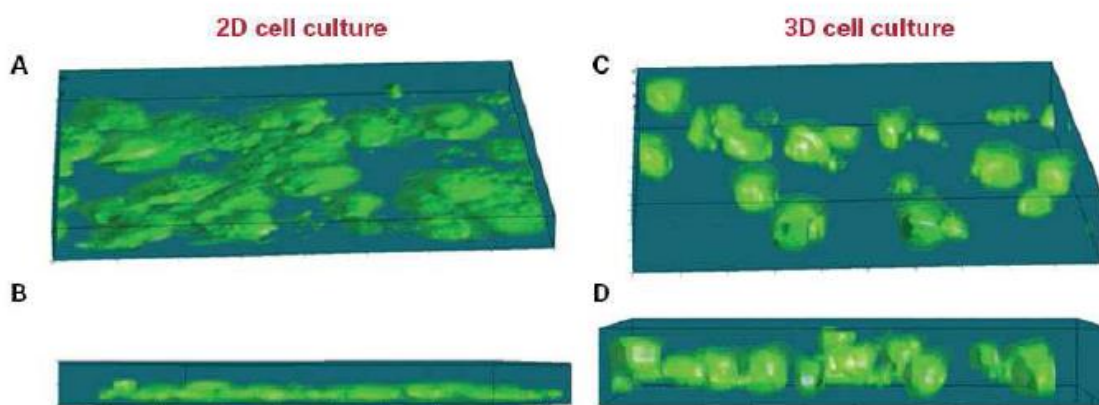
Nedávný vývoj v oblasti testování hepatotoxicity *in vitro* zahrnuje speciální 3D kultivační systémy, smíšené kultury různých typů buněk s hepatocyty (tzv. kokultivace) a diferenciaci kmenových buněk do linie jaterních buněk.

1.4.3.1. Mnohobuněčné sféroidy

Tyto mnohobuněčné sféroidy hepatocytů byly vyvinuty na základě předpokladu, že by tyto buněčné agregáty mohly lépe napodobovat vlastnosti jaterní tkáně. Jedná se o neúplné napodobeniny 3D modelů a vznikají při kultivaci v nádobách s nepřilnavým povrchem. Právě díky 3D struktuře je jejich výhodou vysoký počet mezibuněčných interakcí, což vede k udržení funkční polarity buněk. Nevýhodou sféroidů je jejich tendence shlukovat se dále až do vzniku velkých agregátů, ve kterých dochází ke smrti buněk. (Page, 2012; Lin, 2008).

1.4.3.2. 3D kultivační systémy

3D kultivační systémy se v posledních letech vyvíjely ve snaze prodloužit dobu kultivace a zachovat funkci hepatocytů. Buňky, které tvoří odlišné tkáně, mají různé fyziologické vlastnosti, jelikož jsou vystaveny jiným koncentracím kyslíku, signálním molekulám a faktorům jako je teplota, mechanický stres apod. Interakce hepatocytů s trojrozměrným prostředím zachovává jejich funkci a mezibuněčné komunikace prostřednictvím *tight* a *gap junctions* (Meng, 2010; Derda, 2011). Obrázek 18 porovnává buňky kultivované ve 3D a 2D.



Obrázek 18: Porovnání kultivovaných buněk ve 2D a 3D. Buňky kultivované 2D (A,B) – klasická plochá morfologie, růst buněk na povrchu kultivační nádoby do prostoru. Buňky kultivované 3D (C,D) – buňky si uchovávají kubickou morfologii a 3D strukturu. (Převzato z: www.reprocell-europe.com)

1.4.3.3. Kokultivace hepatocytů

Kokultury hepatocytů se obvykle skládají z hepatocytů jedné buněčné linie, která zahrnuje jaterní buňky, mimojaterní epiteliální a endoteliální buňky nebo fibroblasty. Kokultury mohou být také připraveny z neparenchymálních buněk zahrnující Kupfferovy buňky nebo hvězdčité buňky. Použitím kokultivace hepatocytů s neparenchymovými jaterními buňkami bylo prokázáno, že se jedná o jednu z nejúspěšnějších metod pro udržení funkce hepatocytů *in vitro* (Krause, 2009).

1.4.3.4. Kmenové buňky

Během posledních let se výzkum významně soustředil na využití kmenových buněk. Kmenové buňky představují obnovitelný zdroj buněk a mohou poskytnout velký počet funkčně ekvivalentních buněk. Dospělé kmenové buňky se získávají nejčastěji z kostní dřeně, avšak ve stárnoucí kostní dřeni se jich nachází čím dál méně a ztrácejí schopnost se dělit (proliferovat). Další skupinu představují pluripotentní kmenové buňky, které se mohou přeměnit (diferenciovat) v jakýkoliv buněčný typ přítomný v těle. Takovými buňkami jsou například embryonální buňky získané z embryí ve stádiu blastocysty nebo moruly, avšak kvůli zničení embryí vyvolává tento způsob získání kmenových buněk etické problémy. Kmenová buňka uměle vytvořená z obyčejné somatické (tělní) buňky dospělého jedince se nazývá indukovaná pluripotentní buňka. Výhodou je jejich schopnost neomezeného množení a také řeší etický problém týkající se experimentů s lidskými embryi (Bhanushali, 2010; Soldatow, 2013).

2 CÍL PRÁCE

1. Příprava a práce s primárními kulturami hepatocytů potkana a myši, stanovení denzity a viability izolovaných hepatocytů
2. Příprava a zpracování vzorků hepatocytů myši a potkana pro testování toxicity p-nitrofenolu a stanovení základních parametrů poškození hepatocytů *in vitro*
3. Zavedení spektrofotometrického stanovení aktivity cytochromu P450 2E1 v primárních kulturách hepatocytů s využitím p-nitrofenolu jako substrátu
4. Stanovení optimální koncentrace p-nitrofenolu pro stanovení aktivity cytochromu P450 2E1 v primárních kulturách hepatocytů

3 METODICKÁ ČÁST

3.1 Použité roztoky

- **Roztok A**

8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,0977 g MgSO₄.xH₂O; 0,1206 g Na₂HPO₄.12H₂O; 0,06 g KH₂PO₄; 2,188 g NaHCO₃; 0,19 g EGTA.

Vše bylo doplněno do 1000 ml destilovanou vodou.

- **Roztok B**

4,8 g NaCl; 0,24 g KCl; 0,05862 g MgSO₄.xH₂O; 0,07236 g Na₂HPO₄.12H₂O; 0,036 g KH₂PO₄; 0,3528 g CaCl₂.2H₂O, 1,314 g NaHCO₃.

Vše doplněno do 600 ml destilovanou vodou; obvykle se používá 0,2 g surové kolagenázy do 200 ml recirkulačního roztoku. Pozn.: množství surové kolagenázy může být upraveno podle aktivity používané šarže.

- **Roztok C (Krebs – Henseleitovo médium)**

6,9 g NaCl; 0,36 g KCl; 0,1441 g MgSO₄.xH₂O; 0,13 g KH₂PO₄; 0,374 g CaCl₂.2H₂O; 2g NaHCO₃; 0,9 g glukózy, doplněný do 1000 ml destilovanou vodou pro infúze. 1,333 g albuminu do 100 ml C roztoku pro práci s izolovanými buňkami.

- **Kolagen** (Collagen from Rat tail, Sigma-Aldrich)

- **Williamsovo E médium kompletní**

Fetální bovinní sérum (FBS – 6 %), glutamin (mmol/l), penicilin (100 IU/ml), streptomycin (10 mg/ml), inzulín (0,08 IU/ml), prednisolon (0,5 µg/ml) a glukagon (0,008 µg/ml).

- **Williamsovo E médium inkompletní**

Neobsahuje FBS.

- **p-nitrofenol (pNP)** (p-nitrophenol, Sigma-Aldrich)

Zásobní roztok o koncentraci 10 mmol/l a 20 mmol/l.

- **p-nitrokatechol (pNC)** (p-nitrocatechol, Sigma- Aldrich)

Zásobní roztok o koncentraci 10 mmol/l.

- **Trypanová modř** (Trypan blue solution, Sigma-Aldrich)

Kat. č. 93595 – 0,4 %, for microscopy.

- **Diagnostický kit LDH** (DiaSys)

Činidlo R1: LDH FS DGKC, 800 ml

Činidlo R2: LDH FS DGKC, 200 ml

Činidla byla naředěna v poměru 1:4.

- **Bradford činidlo** (Bradford Reagent, Sigma Aldrich)

50 mg Brilliant blue bylo smícháno s 25 ml etanolu (95 %) a 50 ml H₃PO₄. Vše bylo promícháno, doplněno do 500 ml destilovanou vodou a přefiltrováno.

- **Kyselina trichloroctová (TCA)** (Trichloroacetic acid, Sigma Aldrich)

Roztok o koncentraci 20 %.

- **Hydroxid sodný (NaOH)** (Sodium Hydroxide, Sigma Aldrich)

Roztok o koncentraci 2 mol/l.

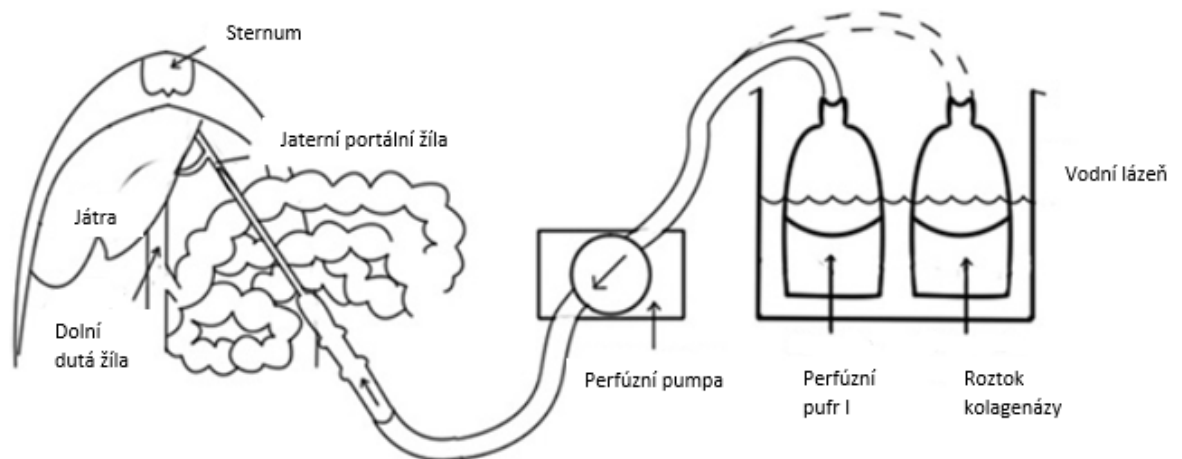
- **WST-1 činidlo** (Cell proliferation reagent, Roche)

Činidlo bylo naředěno inkompletním Williamsovým E médiem v poměru 1:10.

3.2 Příprava primárních kultur hepatocytů

3.2.1 Izolace hepatocytů

K daným pokusům byli používáni samci albino potkanů kmene Wistar a samci myši kmene C57Bl/6J. Otevření dutiny břišní bylo provedeno chirurgickým V stříhem a do *vena cava inferior* byl aplikován heparin ve fyziologickém roztoku. Přes portální žílu, která byla kovovou kanylou napojena na perfúzní aparaturu, bylo roztokem A (složení viz 3.1) provedeno promývání jater. Kvůli riziku poškození jater tlakem byla *vena cava inferior* po začátku perfúze rozstříhnuta. Poté byla játra perfundována roztokem B obsahující kolagenázu, která rozkládá kolagenová vlákna. Tato jaterní recirkulační perfúze u potkana trvala 14 minut (Obrázek 19).



Obrázek 19: Jaterní perfúze. (Upraveno a převzato z: Shen, 2012)

Následně byla játra vložena do kádinky s roztokem C (obsahující albumin), ve které došlo k rozvolnění jater. Jemným třením jater v kádince byla získána suspenze hepatocytů, která byla přes vrstvy gázy přefiltrována do centrifugační zkumavky.

Centrifugace probíhala 5 minut při 500 otáčkách (28 g) při 4°C a po odlití supernatantu byl znovu do zkumavky přidán roztok C a celý proces byl proveden znovu dvakrát. Zkumavka s výslednou suspenzí buněk byla vložena do nádoby s ledem a ihned bylo provedeno počítání viability a denzity hepatocytů. Izolace hepatocytů myši byla provedena obdobně s menšími modifikacemi jako izolace hepatocytů potkana.

3.2.2 Stanovení viability hepatocytů

Po izolaci bylo nutné zjistit počet mrtvých a živých buněk. Hepatocyty, které měly poškozenou plazmatickou membránu, v sobě hromadily barvivo Trypanovou modř, proto byly zbarveny do modrofialova, zatímco živé hepatocyty zůstaly bezbarvé. Na podložním sklíčku bylo smícháno 10 μ l 100 krát naředěné suspenze buněk (0,99 ml kompl. Williamsova E média + 0,01 ml resuspendovaných buněk) s 10 μ l Trypanové modři a následně přikryto krycím sklíčkem. V 10 zorných polích byly buňky spočítány a výsledné množství bylo udáváno v procentech. Za optimální viabilitu pro další zpracování byl považován výsledek nad 90 % u hepatocytů potkana a nad 85 % u myších hepatocytů.

3.2.3 Určení denzity hepatocytů

K počítání buněk byl použit automatický přístroj Cellometer™, auto T4 propojený s počítačem. Postup stanovení byl následovný: do c-chipu bylo napipetováno 20 μ l 100 krát naředěných buněk a výsledek byl uveden v milionech buněk/ml.

3.2.4 Příprava monovrstvy hepatocytů

Práce s buňkami a roztoky byla provedena v laminárním boxu a s použitím ochranných pomůcek. Do jamek mikrotitračních destiček tzv. well plate (WP) bylo pipetováno takového množství kolagenu, aby dno jamek bylo pokryté. Následně po 10 minutách byl kolagen odsán zpět do lahvičky. Dále bylo do jamek pipetováno stejné množství neutralizačního roztoku (inkompletní Williamsovo E médium) a po cca 5-10 minutách byla destička vyklepnuta. Poté byl do jamek pipetován příslušný objem naředěné buněčné suspenze hepatocytů (Tabulka 4). V 96 jamkové destičce sloužil první a poslední sloupec jako slepý vzorek, zde proto buněčná suspenze nebyla pipetována. Destičky byly vloženy do CO₂ inkubátoru (37°C, 5 % CO₂, 100 % relativní vlhkost vzduchu) na čas potřebný k přichycení hepatocytů ke kolagenu (minimálně 2 hod.).

Tabulka 4: Objemy pro příslušné destičky

<i>Počet jamek destiček</i>	<i>Pipetovaný objem [ml]</i>	<i>Denzita buněk [mil/ml]</i>	<i>Počet buněk [mil/ml]</i>
6	2	0,5	1
12	0,8	0,5	0,4
96	0,1	0,33	0,033

3.2.5 Příprava kalibrace p-nitrokatecholu

Kalibrační řada byla připravena podle Tabulky 5. Ze zásobního roztoku pNC o koncentraci 10 mmol/l byl podle vzorce: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ vypočten přídavek pro koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$. Pro objem 1 ml byl přídavek 10 μl pNC + 990 μl inkompletního Williamsova E média. Ostatní hodnoty koncentrací byly připraveny dvojkovým ředěním. Poslední slepý vzorek zahrnoval pouze přidání 500 μl inkompletního Williamsova E média.

3.2.6 Příprava kalibrace p-nitrofenolu

Zásobní roztok pNP o koncentraci 10 mmol/l byl podle vzorce: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ naředěn na koncentraci 1 mmol/l o objemu 40 ml, ze kterého byla poté připravena kalibrační řada o koncentraci 100; 200; 300; 400 a 500 $\mu\text{mol/l}$ o objemu 20 ml (Tabulka 5). Příslušné objemy pNP byly ředěny inkompletním Williamsovým médiem E. Slepý vzorek obsahoval inkompletní Williamsovo E médium.

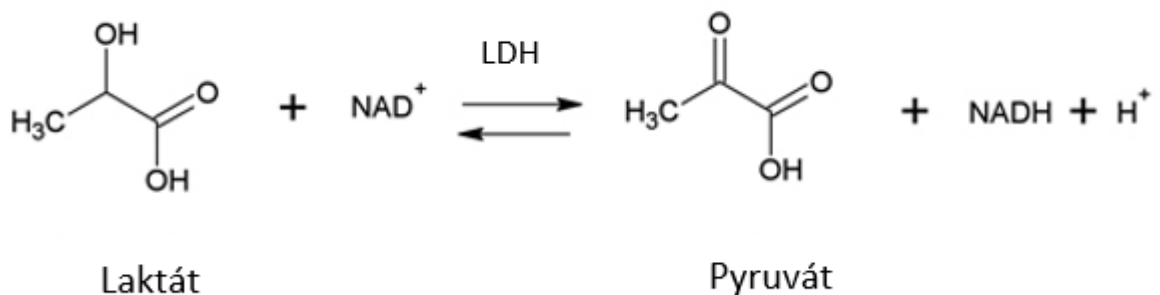
Tabulka 5: Kalibrace p-nitrokatecholu a p-nitrofenolu

Kalibrace pNC	Kalibrace pNP			
	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Objem [ml]	Přídavek pNP [ml]	Přídavek WE [ml]
100	100	20	2	18
50	200	20	4	16
25	300	20	6	14
12,5	400	20	8	12
6,25	500	20	10	10
3,125	0	20	-	20
1,5625				
0				

3.3 Spektrofotometrická měření

3.3.1 Aktivita laktátdehydrogenázy

Enzym laktátdehydrogenáza (LDH) se skládá ze dvou podjednotek M a H. Kombinací těchto podjednotek vzniká 5 isoenzymů – M₄, M₃H, M₂H₂, MH₃ a H₄. Měření aktivity laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu se využívá k určení stupně poškození buněk v kultuře, jelikož při poškození buněčné membrány buněk dochází k úniku LDH do kultivačního média. Laktátdehydrogenáza katalyzuje reakci, při které dochází k přeměně laktátu na pyruvát, což způsobuje nárůst koncentrace NADH+H⁺, který je následně spektrofotometricky změřen. (Obrázek 20).

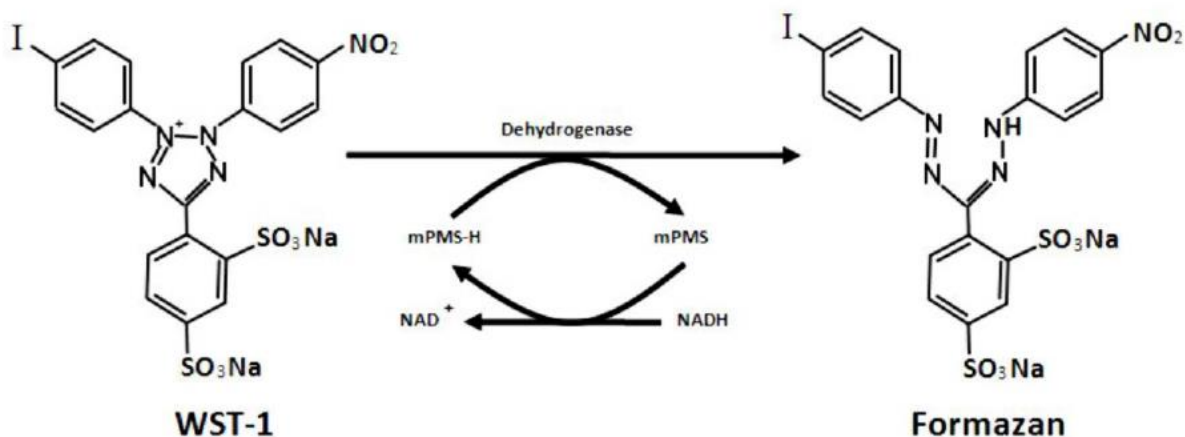


Obrázek 20: Reakce katalyzovaná LDH (Převzato z: www.aaltoscientific.com)

Pro testování aktivity LDH byly použity vzorky kultivačního média hepatocytů potkana a myši po 1 h a 2 h inkubaci s koncentracemi pNP 0,1; 0,2; 0,5; 1 a 2 mmol/l. Do 96 WP mikrotitrační destičky bylo pipetováno 10 μl vzorku. Vybrané jamky byly ponechány pro slepý vzorek, kalibraci pNC/pNP (pro zjištění možné interference) pro LDH kalibrátor. Po přidavku 250 μl činidla LDH byla destička kineticky změřena na přístroji Tecan Infinite M200 při vlnové délce 340 nm.

3.3.2 Test WST-1

Jako marker buněčné viability se používá měření aktivity buněčných dehydrogenáz pomocí testu WST-1 (4-(3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzendisulfonát). Jen aktivní živé buňky jsou schopné redukce tetrazoliové soli (WST-1) na barevný formazan a změna absorbance je detekována spektrofotometricky (Yin, 2013) (Obrázek 21).



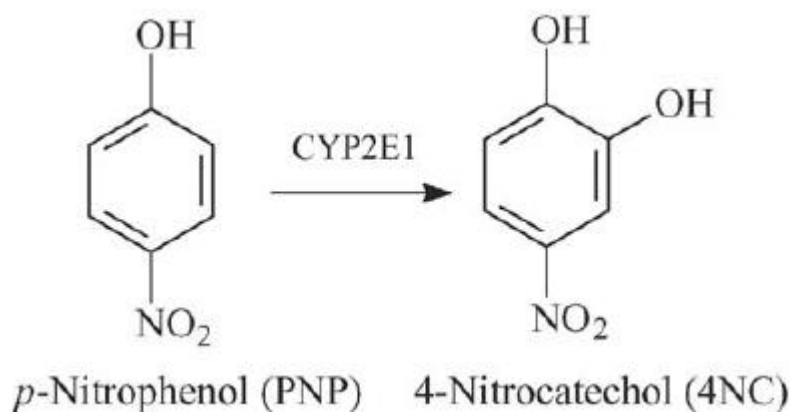
Obrázek 21: Mechanismus redukce WST-1. S tvorbou meziproduktů elektronů (mPMS) je WST-1 redukován buněčnými dehydrogenázami na barevný formazan. (Převzato z: Yin, 2013)

Ke stanovení aktivity WST byly použity destičky 96 WP se vzorky potkaních hepatocytů po 1 h a 2 h inkubaci s pNP o koncentracích 0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1 a 2 mmol/l a myších hepatocytů po 2 h inkubaci s pNP o koncentracích 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mmol/l.

1 ml WST-1 činidla bylo smícháno s 10 ml inkompletního Williamsova E média (ředěno 11x). 96 jamkové destičky byly po inkubaci vyklepnuty a do všech jamek bylo pipetováno 100 μ l připraveného WST-1 činidla. Pro slepý vzorek byly použity jamky bez hepatocytů. Ihned byla na přístroji Tecan změřena absorbance při vlnové délce 440 nm v čase 0 h a následně po 1 h a 2 h inkubaci (37°C, 5 % CO₂). Pro vyhodnocení grafu byl vypočítán nárůst absorbance v čase 1 h a 2 h, tzv. delta = absorbance 1 h resp. 2 h mínus absorbance v čase 0 h.

3.3.3 Aktivita cytochromu P450 2E1

Enzym CYP2E1 zprostředkovává hydroxylaci p-nitrofenolu na p-nitrokatechol (Obrázek 22). Tato reakce se využívá ke stanovení aktivity CYP2E1, jelikož je tato metoda jednoduchá a reakční složky jsou levné a komerčně dostupné (Elbarbry, 2006).

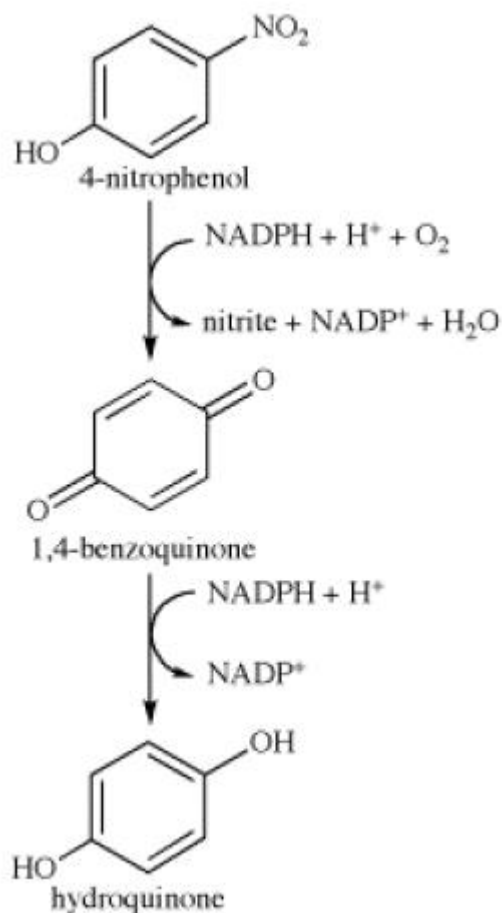


Obrázek 22: Reakce katalyzovaná CYP2E1. (Převzato z: Elbarbry 2006)

Ke stanovení aktivity CYP2E1 byly použity 6 WP destičky. Po 2 h kultivaci hepatocytů, potřebné k jejich přichycení, resp. po dalších 24 h kultivace hepatocytů bylo do 6 WP destiček pipetováno 1,2 ml pNP o koncentracích 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mmol/l. Jako slepý vzorek (0 mmol/l) bylo použito inkompletní Williamsovo E médium.

Destičky byly inkubovány po dobu 0 h 1 h, 2 h, 3 h, 4 h (37°C, 5 % CO₂). V každém časovém intervalu bylo z destiček přepipetováno 200 µl do zkumavky eppendorf o objemu 1,5 ml a ke každému vzorku bylo přidáno 40 µl kyseliny trichloroctové k deproteinaci vzorku. Všechny zkumavky byly následně promíchány na vortexu a stočeny při 20 000 g. Do nové 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno 200 µl supernatantu, následně bylo přidáno 100 µl činidla NaOH a vše bylo spektrofotometricky změřeno spektrometrem Tecan při vybraných vlnových délkách 348 nm, 405 nm, 420 nm, 510 nm a 535 nm (různé vlnové délky dle literárních údajů pro pNP a pNC) (Allis, 1994; Duescher, 1993).

Aktivitu CYP2E1 jsme nejprve zamýšleli stanovit měřením vzniku produktu pNC. Vzhledem k problémům při stanovení aktivity CYP2E1 touto metodou jsme se rozhodli pro další spektrofotometrickou metodu, a to měření úbytku substrátu pNP v čase. Při měření produktu pNC výsledky nejspíš ovlivňovaly jiné vzniklé produkty ze substrátu pNP (Obrázek 23), proto nám metoda měření úbytku substrátu pNP poskytla mnohem přesnější výsledky než při stanovení přírůstku produktu pNC.



Obrázek 23: Reakce vzniku nespecifických produktů ze substrátu pNP. (Převzato z: Moss, 2006)

3.4 Stanovení množství proteinu

Množství proteinu (mg/ml) bylo stanoveno ve vzorcích hepatocytů myši a potkana s pNP o koncentraci 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mmol/l. Vzorky (6 WP) byly naředěny s 1 ml destilované vody a promíchány. Poté byl obsah destiček seškrábnut a pipetován do zkumavky eppendorf o objemu 1,5 ml. Následně byly vzorky stočeny (10 000 g) po dobu 5 min. Ze zkumavek bylo pipetováno 10 μl do nové 96 WP destičky, přidáno 300 μl Bradfordova činidla, poté byla destička protřepána a po 10 min. inkubaci ve tmě změřena spektrometrem Tecan při 595 nm. Současně byla také proměřena kalibrace, která byla připravena podle Tabulky 6. K vytvoření kalibrační křivky byl použit bovinní sérový albumin.

Tabulka 6: Kalibrace pro přípravu proteinů

<i>Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]</i>	<i>Objem kalibračního roztoku [μl]</i>	<i>Objem destilované vody [μl]</i>
25	50	1950
50	100	1900
100	200	1800
200	400	1600
300	500	1250
400	800	1200
500	1000	1000

3.5 Mikroskopie

Pro nafocení buněk byl použit digitální fotoaparát Olympus NO E-600, který byl připojený k mikroskopu Olympus IX51. Buňky byly pozorovány ve fázovém kontrastu při zvětšení objektivu 40x.

3.5.1 Využití fázového kontrastu

Fázový kontrast umožňuje lepší rozlišení a kontrast oproti klasickému světelnému zobrazení. Výhoda fázového kontrastu spočívá v možnosti detailního zobrazování živých buněčných a tkáňových kultur bez nutnosti barvení. Princip je založen na posunu fáze světla od přímého odrazu světelného zdroje o $\frac{1}{4}$ vlnové délky. Výsledný obraz vnímáme jako tmavé objekty na světlém pozadí (Olympus Microscopy Resource Center, 2012).

3.6 Statistické vyhodnocení

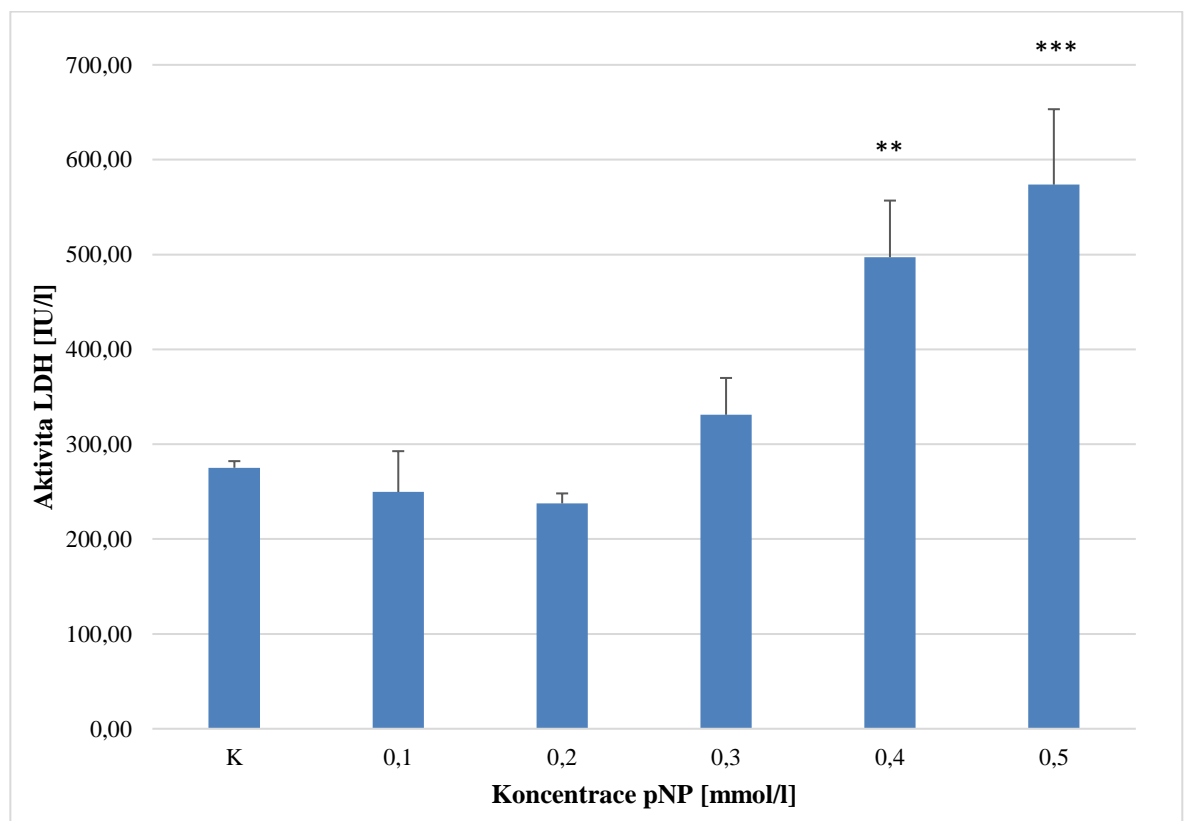
Pomocí uvedených testů byla naměřená data graficky zobrazena v programu Microsoft Excel 2013 a dále zpracována statistickými testy v programu GraphPad Prism 7. Nejprve byly výsledky vyhodnoceny testy normality (D'Agostinův a Pearsonův test). Všechna data vykazovala nenormální rozdělení, proto byly pro statické vyhodnocení použity neparametrické testy – Kruskal-Wallisův test následovaný Dunnetovým *post hoc* testem.

4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

4.1 Aktivita laktátdehydrogenázy v kulturačním médiu

4.1.1 Aktivita laktátdehydrogenázy v kulturačním médiu hepatocytů myši kultivovaných 2 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h

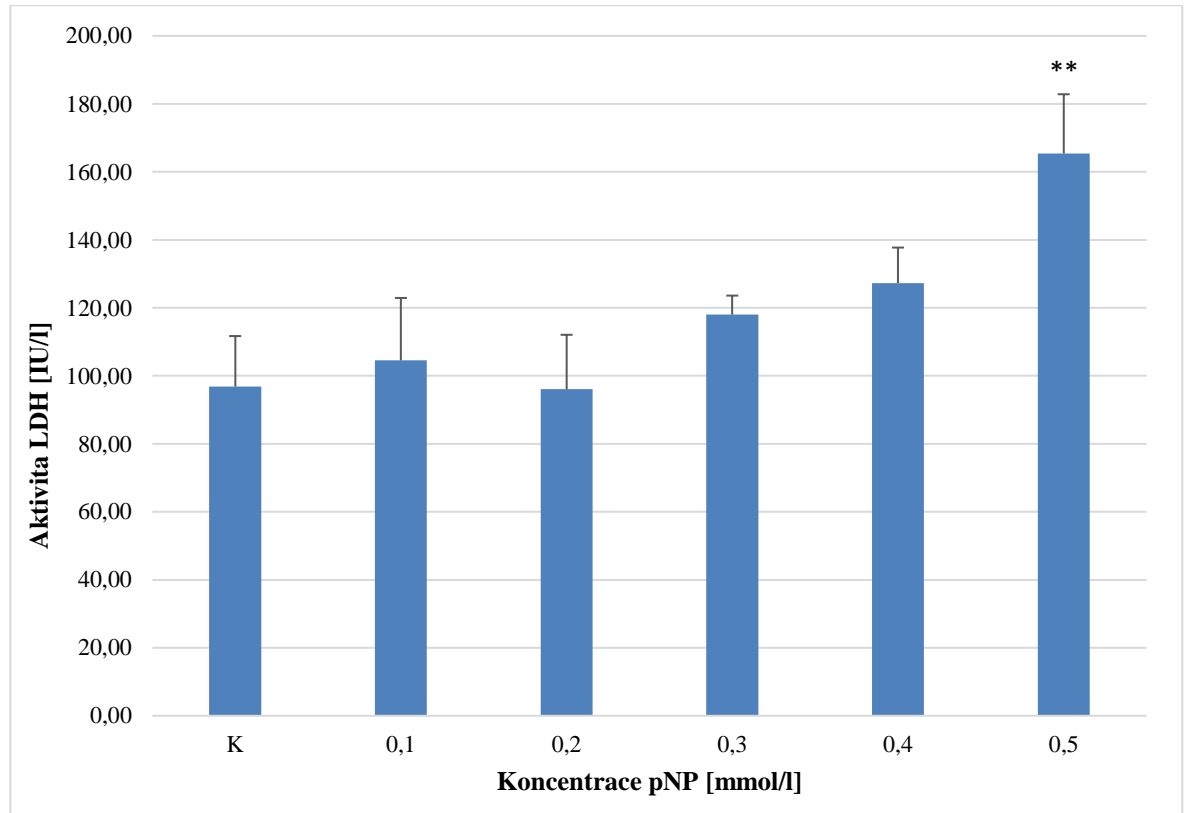
Aktivita LDH v kulturačním médiu hepatocytů myši kultivovaných 2 h a následně vystavených 2 h působení pNP byla signifikantně zvýšena od koncentrace pNP 0,4 mmol/l ($p < 0,01$). O něco vyšší nárůst aktivity byl zaznamenán při nejvyšší testované koncentraci pNP 0,5 mmol/l ($p < 0,001$).



Graf 1: Aktivita LDH – hepatocyty myši – kultivace 2 h – 2 h expozice pNP (nenormální rozdělení; neparametrický test; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. K; $n = 3$)

4.1.2 Aktivita laktátdehydrogenázy v kulturačním médiu hepatocytů myši kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h

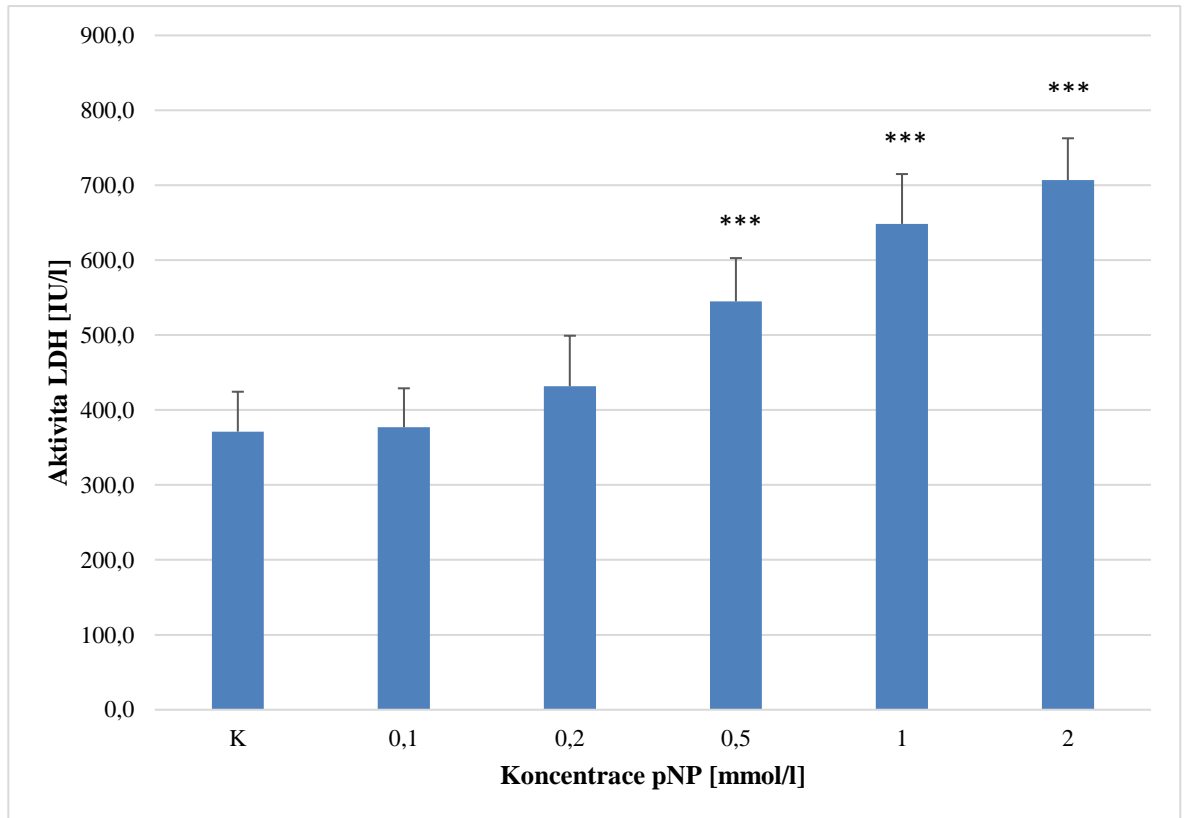
Hepatocyty, které byly nejprve kultivovány po dobu 24 h v CO₂ inkubátoru a teprve poté vystaveny účinku pNP po dobu 2 h, vykazovaly signifikantní nárůst aktivity LDH v kulturačním médiu až od koncentrace 0,5 mmol/l ($p < 0,01$).



Graf 2: Aktivita LDH – hepatocyty myši – kultivace 24 h – 2 h expozice pNP (nenormální rozdělení; neparametrický test; ** $p < 0,01$ vs. K; $n = 3$)

4.1.3 Aktivita laktátdehydrogenázy v kulturačním médiu hepatocytů potkana kultivovaných 2 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 1 h

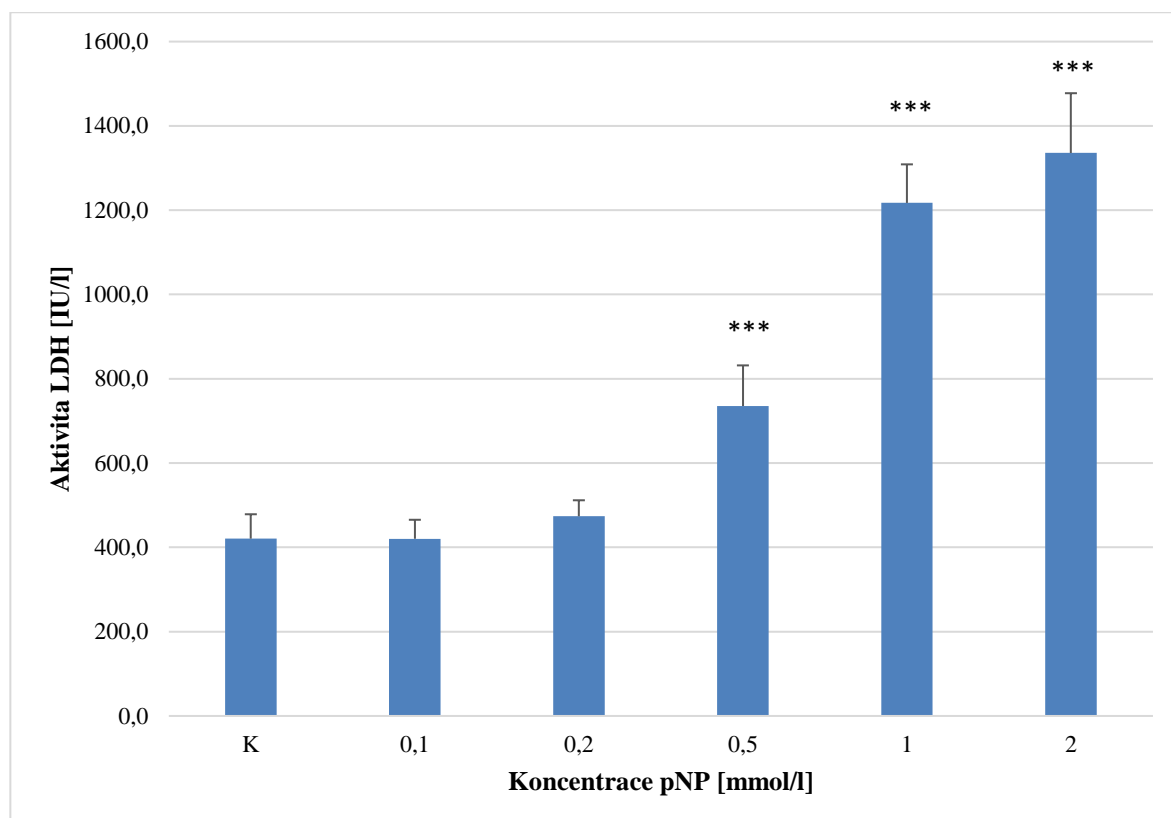
Aktivita LDH v kulturačním médiu hepatocytů potkana kultivovaných 2 h a následně vystavených pNP po dobu 1 h byla zvýšena od koncentrace pNP 0,5 mmol/l ($p < 0,001$).



Graf 3: Aktivita LDH – hepatocyty potkana – kultivace 2 h – 1 h expozice pNP (nenormální rozdělení; neparametrický test; *** $p < 0,001$ vs. K; $n = 6$)

4.1.4 Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů potkana kultivovaných 2 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h

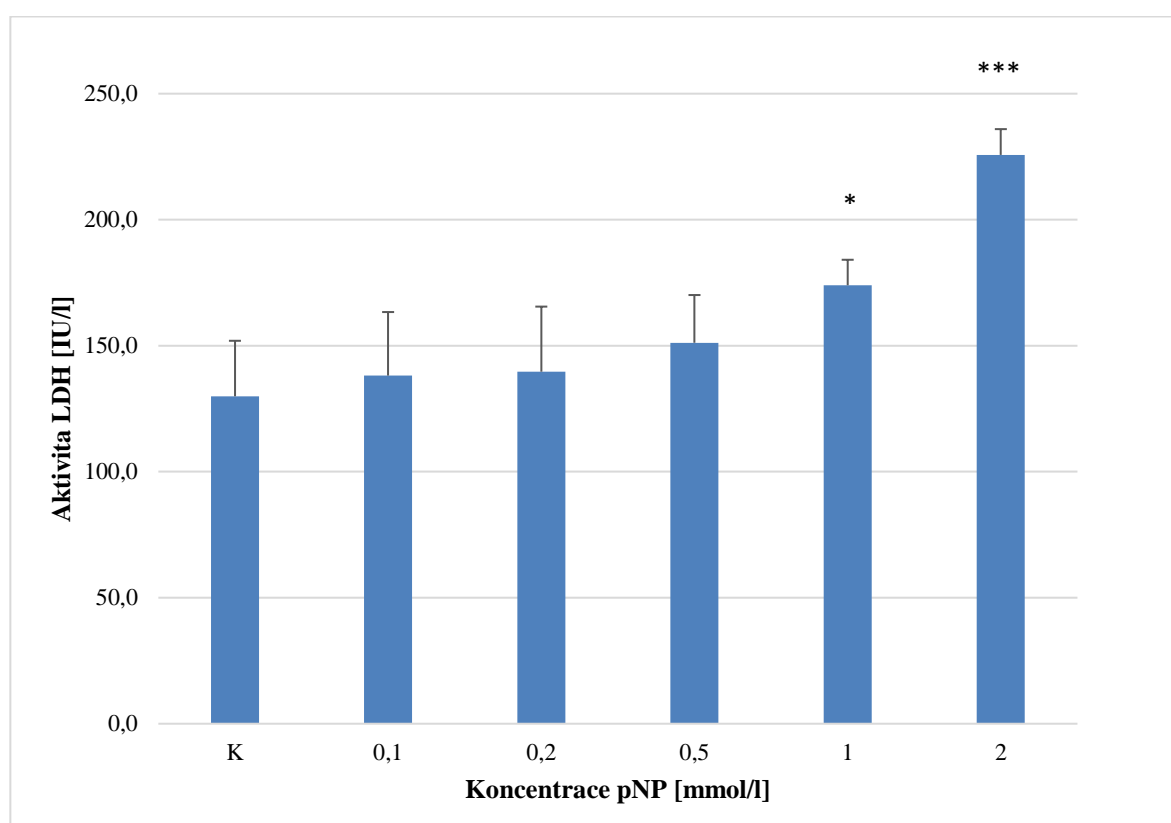
Po vystavení 2 h kultivovaných hepatocytů potkana účinku pNP po dobu 2 h došlo k signifikantnímu nárůstu aktivity LDH v kultivačním médiu od koncentrace 0,5 mmol/l ($p < 0,001$).



Graf 4: Aktivita LDH – hepatocyty potkana – kultivace 2 h – 2 h expozice pNP (nenormální rozdělení; neparametrický test; *** $p < 0,001$ vs. K; $n = 6$)

4.1.5 Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů potkana kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 1 h

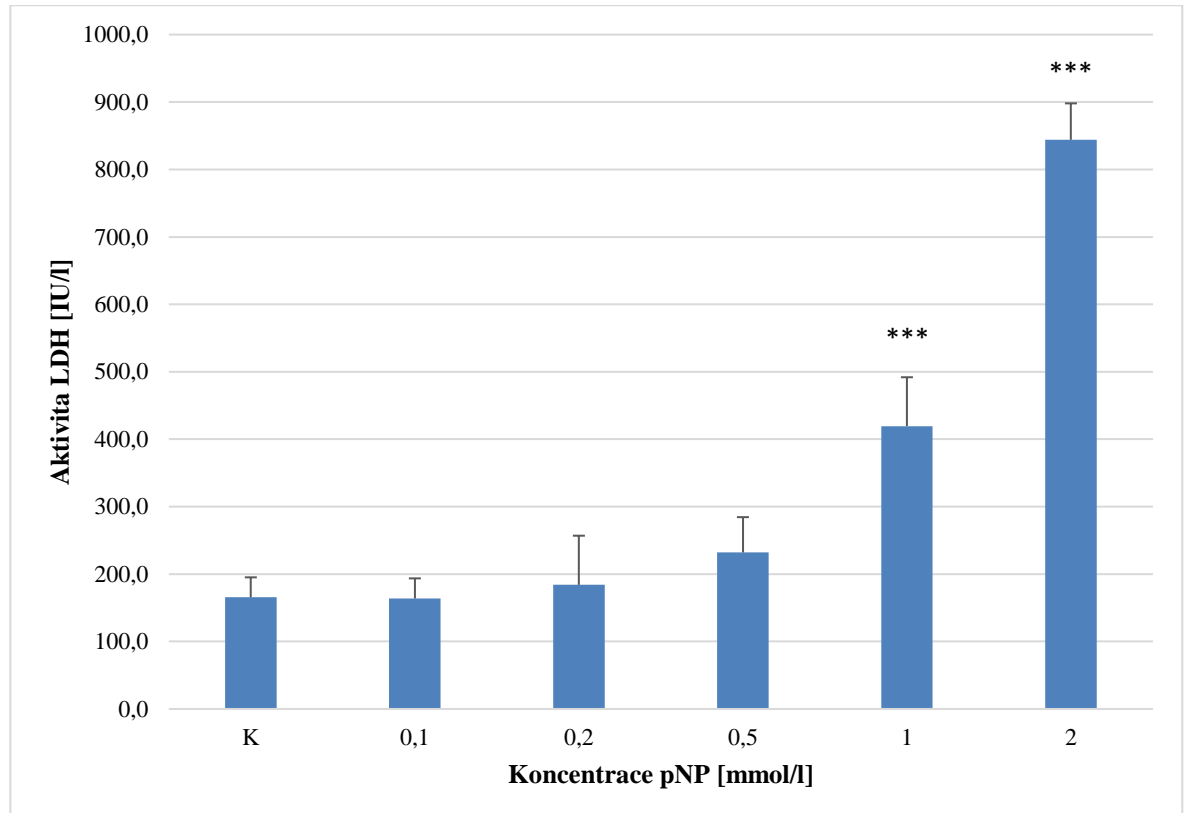
Potkaní hepatocyty po 24 h kultivaci, které byly vystaveny účinku pNP po dobu 1 h, vykazovaly signifikantní nárůst aktivity LDH v kultivačním médiu od koncentrace 1 mmol/l ($p < 0,05$). O něco výraznější nárůst aktivity LDH byl zaznamenán při koncentraci pNP 2 mmol/l ($p < 0,001$).



Graf 5: Aktivita LDH – hepatocyty potkana – kultivace 24 h – 1 h expozice pNP (nenormální rozdělení; neparametrický test; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. K; $n = 6$)

4.1.6 Aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů potkana kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h

Hepatocyty potkana po 24 h kultivaci byly vystaveny účinku pNP po dobu 2 h. Zde došlo k výraznému nárůstu aktivity LDH v kultivačním médiu od koncentrace pNP 1 mmol/l ($p < 0,001$). Velmi výrazný nárůst aktivity byl pozorován při koncentraci 2 mmol/l ($p < 0,001$).

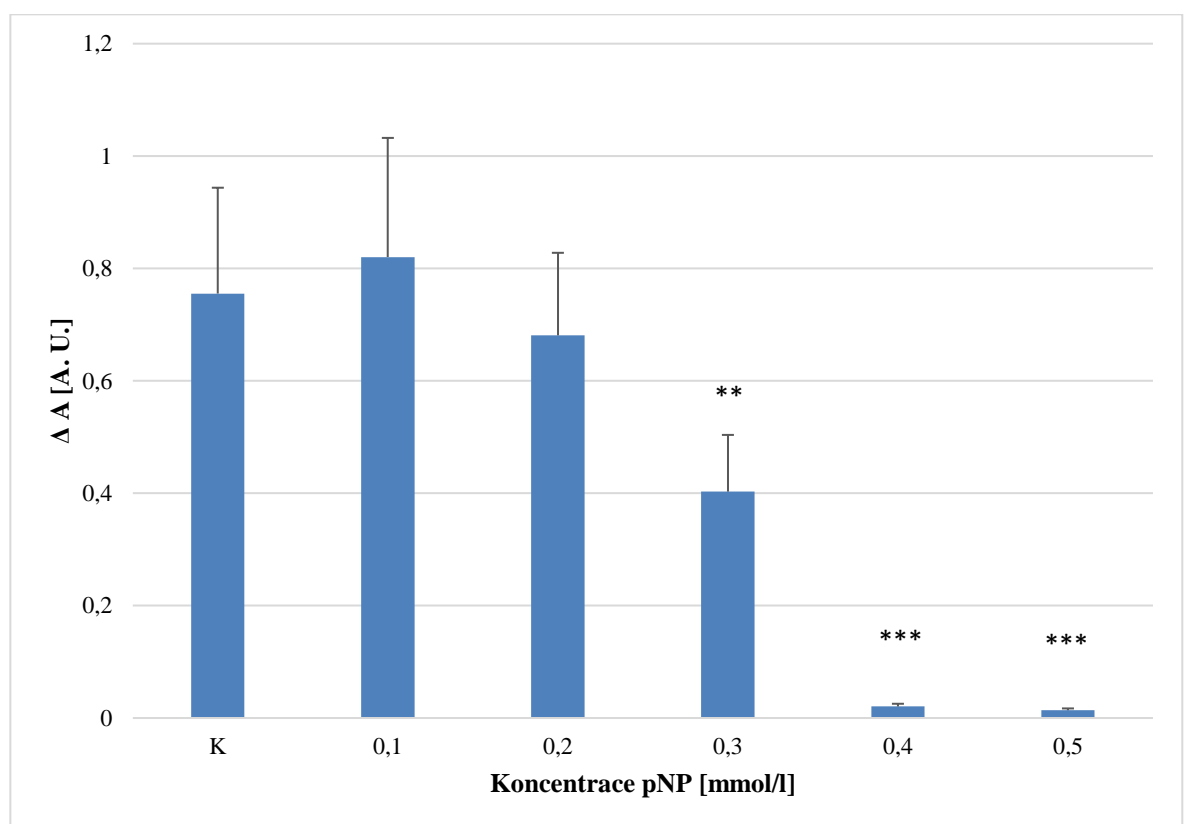


Graf 6: Aktivita LDH – hepatocyty potkana – kultivace 24 h – 2 h expozice pNP (nenormální rozdělení; neparametrický test; *** $p < 0,001$ vs. K; $n = 6$)

4.2 Stanovení viability hepatocytů (WST-1 test)

4.2.1 Aktivita buněčných dehydrogenáz hepatocytů myši kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h

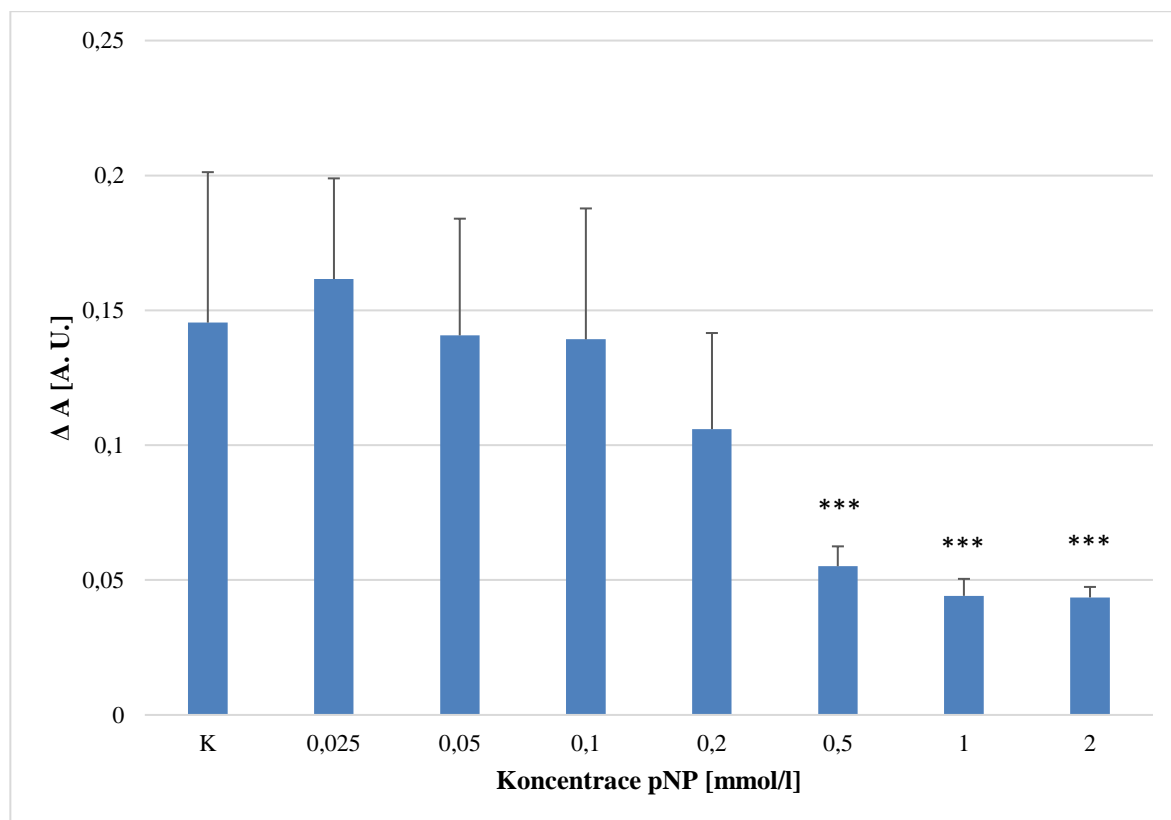
Pro provedení WST-1 testu byly použity hepatocyty myši po 24 h kultivaci v CO₂ inkubátoru, které byly vystaveny účinku pNP po dobu 2 h. Aktivita buněčných dehydrogenáz byla stanovena v čase 0 a 60 minut. K poklesu aktivity buněčných dehydrogenáz došlo od koncentrace pNP 0,3 mmol/l ($p < 0,01$). Výrazný pokles absorbance byl zaznamenán u koncentrace pNP 0,4 a 0,5 mmol/l ($p < 0,001$).



Graf 7: Test WST-1 – hepatocyty myši – kultivace 24 h – 2 h expozice pNP, rozdíl absorbancí v čase 60 a 0 min. (nenormální rozdělení; neparametrický test; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. K; $n = 8$)

4.2.2 Aktivita buněčných dehydrogenáz hepatocytů potkana kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 1 h

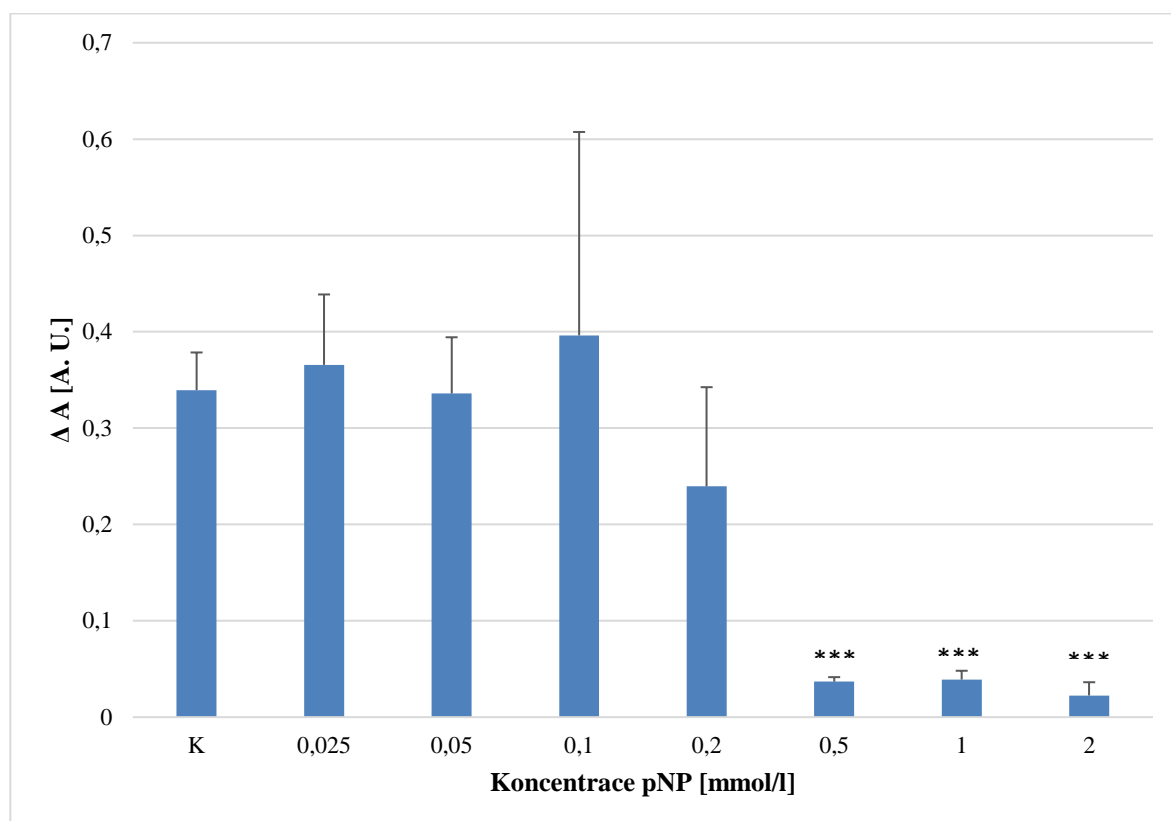
Po vystavení 24h kultivovaných hepatocytů potkana účinku pNP po dobu 1 h došlo k výraznému poklesu absorbance od koncentrace 0,5 mmol/l ($p < 0,001$).



Graf 8: Test WST-1 – hepatocyty potkana – kultivace 24 h – 1 h expozice pNP, rozdíl absorbancí v čase 60 a 0 min. (nenormální rozdělení; neparametrický test; *** $p < 0,001$ vs. K; $n = 8$)

4.2.3 Aktivita buněčných dehydrogenáz hepatocytů potkana kultivovaných 24 h a následně exponovaných p-nitrofenolu po dobu 2 h

Po 2 h expozici 24h kultivovaných hepatocytů potkana p-nitrofenolu byl zaznamenán o mnoho výraznější pokles absorbance od koncentrace 0,5 mmol/l ($p < 0,001$) v porovnání s 1 h expozicí.

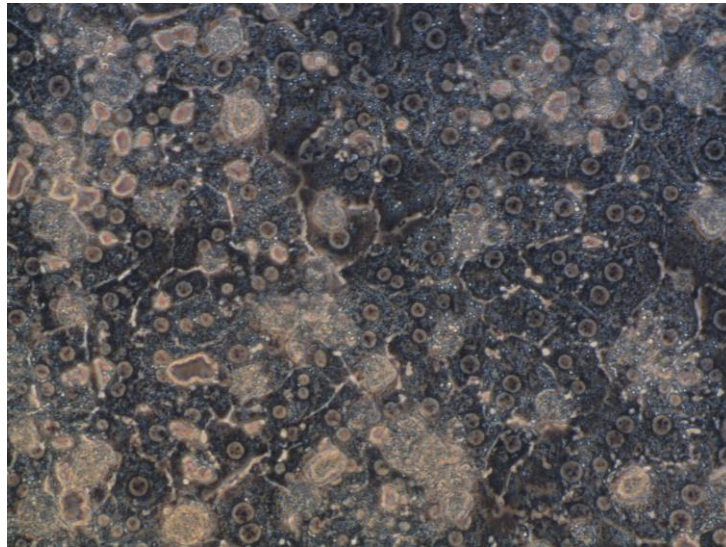


Graf 9: Test WST-1 – hepatocyty potkana – kultivace 24 h – 2 h expozice pNP, rozdíl absorbancí v čase 60 a 0 min. (nenormální rozdělení; neparametrický test; *** $p < 0,001$ vs. K; $n = 8$)

4.3 Morfologické změny hepatocytů

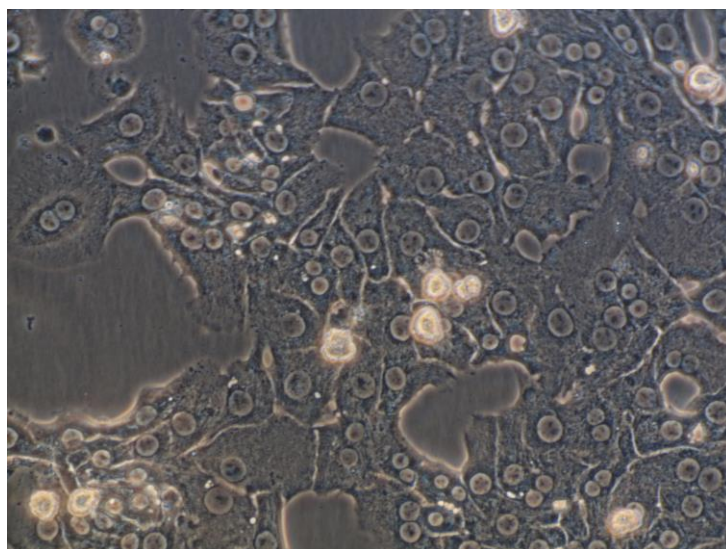
4.3.1 Vliv p-nitrofenolu na morfologii hepatocytů myši

Kontrolní hepatocyty byly inkubovány 24 h bez přídavku pNP. Po inkubaci byly buňky pozorovány pod mikroskopem ve fázovém kontrastu a byly zde viditelné nepoškozené buněčné membrány, jádra s jadrčky a mírně granulovaná cytoplazma (Obrázek 24).



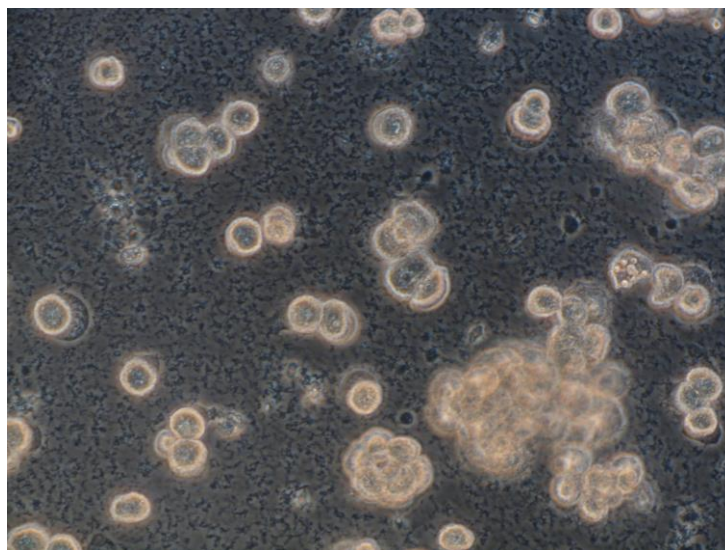
Obrázek 24: Kontrolní hepatocyty myši, kultivace 24 h
(Fázový kontrast, 40x zvětšení objektivu)

Po 2 h expozici hepatocytů 0,5 mM pNP nebyly pozorovány známky výrazného morfologického poškození buněk (Obrázek 25).



Obrázek 25: Vliv 2h expozice 0,5 mM pNP – hepatocyty myši
(Fázový kontrast, 40x zvětšení objektivu)

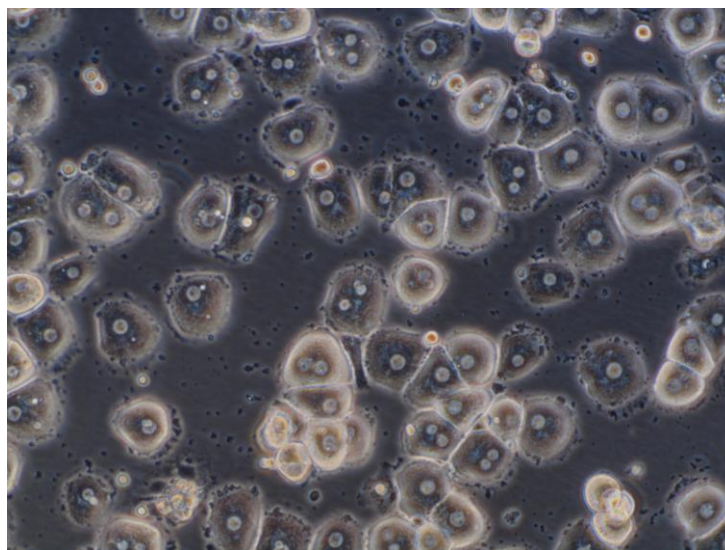
Vliv pNP na morfolonii buněk byl prokázán po 2 h expozici hepatocytů pNP o koncentraci 1 mmol/l. Pod mikroskopem byl pozorován vysoký stupeň granulace, poškozené buněčné membrány a viditelná kondenzovaná jádra bez jadérek (Obrázek 26).



Obrázek 26: Vliv 2 h expozice 1 mM pNP – hepatocyty myši
(Fázový kontrast, 40x zvětšení objektivu)

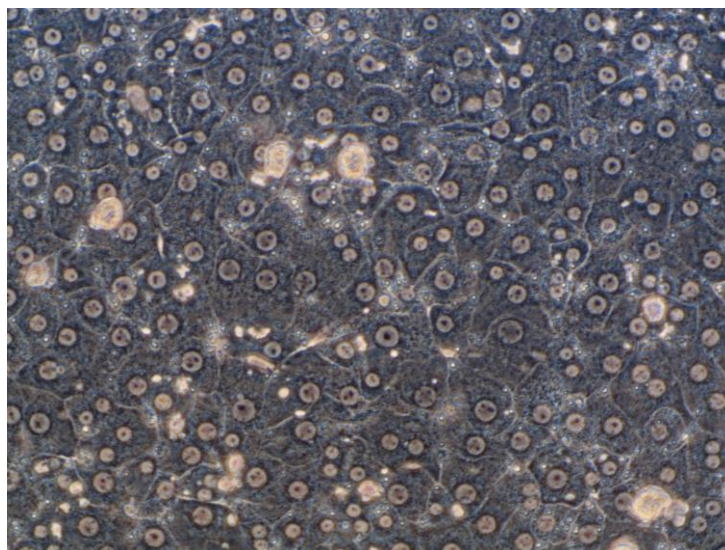
4.3.2 Vliv p-nitrofenolu na morfolonii hepatocytů potkana

Kontrolní hepatocyty byly inkubovány 2 h po přichycení buněk bez přídavku pNP. Pod mikroskopem ve fázovém kontrastu byly viditelné nepoškozené buněčné membrány, jádra s jadérky a mírně granulovaná cytoplazma (Obrázek 27).



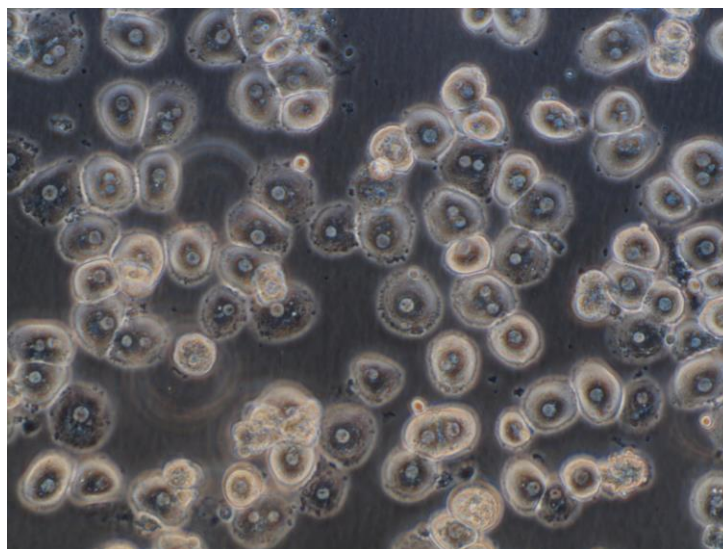
Obrázek 27: Kontrolní hepatocyty potkana, kultivace 2 h
(Fázový kontrast, 40x zvětšení objektivu)

Po 24 h kultivaci u kontrolních hepatocytů bylo pozorováno vytvoření souvislého *monolayeru*, hepatocyty byly dobře ohraničené od okolí s dobře viditelnými jádry a jadérky a s granulovanou cytoplazmou (Obrázek 28).



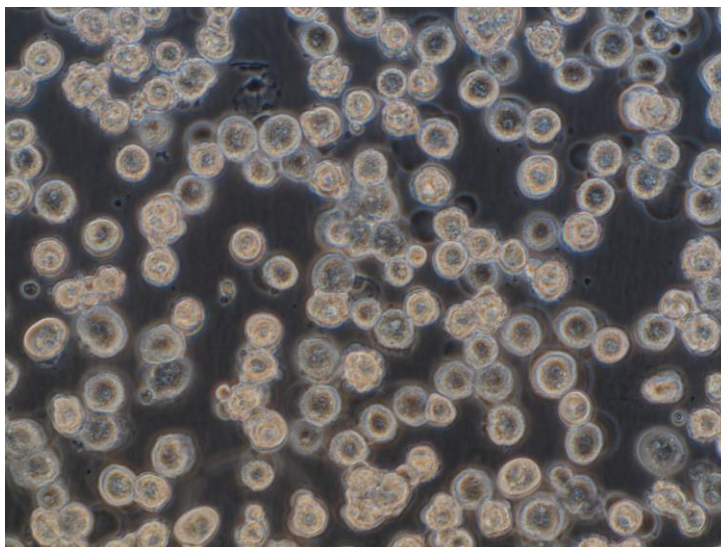
Obrázek 28: Kontrolní hepatocyty potkana, kultivace 24 h
(Fázový kontrast, 40x zvětšení objektivu)

Stejně jako u myších hepatocytů nebyly po 2 h expozici hepatocytů potkana 0,5 mM pNP pozorovány známky výrazného poškození buněk (Obrázek 29).



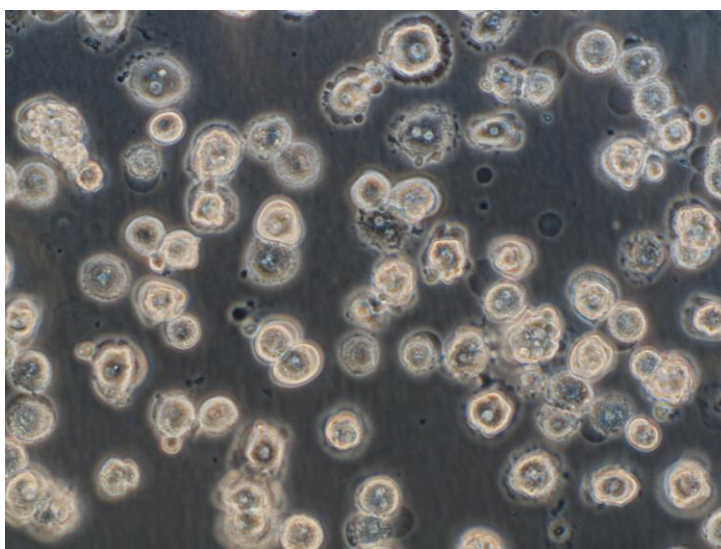
Obrázek 29: Vliv 2 h expozice 0,5 mM pNP – hepatocyty potkana
(Fázový kontrast, 40x zvětšení objektivu)

Morfologické změny hepatocytů byly pozorovány po 2 h expozici 1 mM pNP. Pod mikroskopem byla viditelná kondenzovaná jádra bez viditelných jadérek, vysoký stupeň granulace, zakulacování buněk a jejich odlučování od kolagenu a poškozené buněčné membrány (Obrázek 30).



Obrázek 30: Vliv 2 h expozice 1 mM pNP – hepatocyty potkana
(Fázový kontrast, 40x zvětšení objektivu)

Výrazné morfologické změny hepatocytů byly viditelné po 2 h expozici 2 mM pNP. Byl pozorovatelný vysoký stupeň kondenzace jader, vymizení jadérek a poškození buněčné membrány (Obrázek 31).

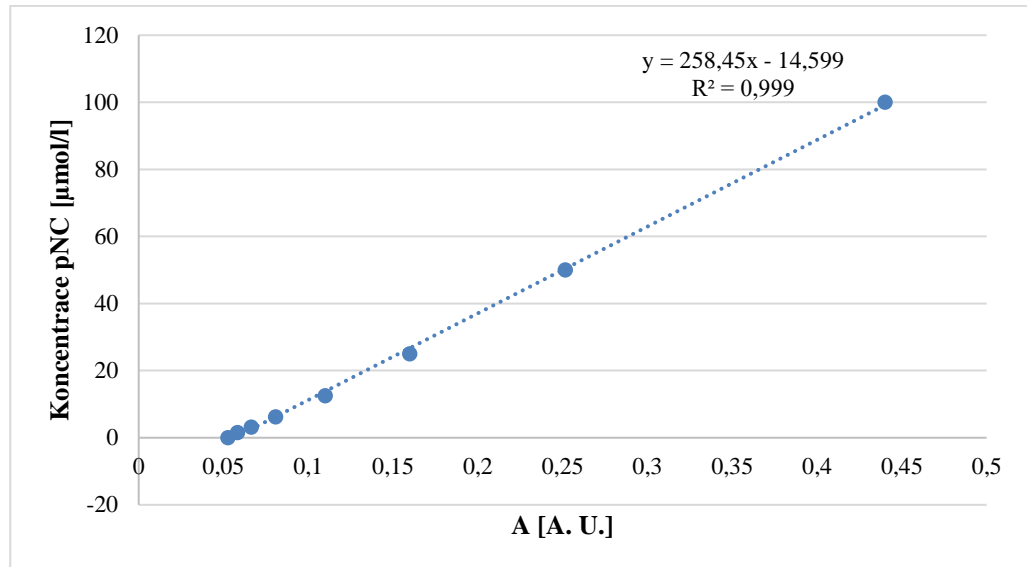


Obrázek 31: Vliv 2 h expozice 2 mM pNP – hepatocyty potkana
(Fázový kontrast, 40x zvětšení objektivu)

4.4 Stanovení aktivity cytochromu P450 2E1

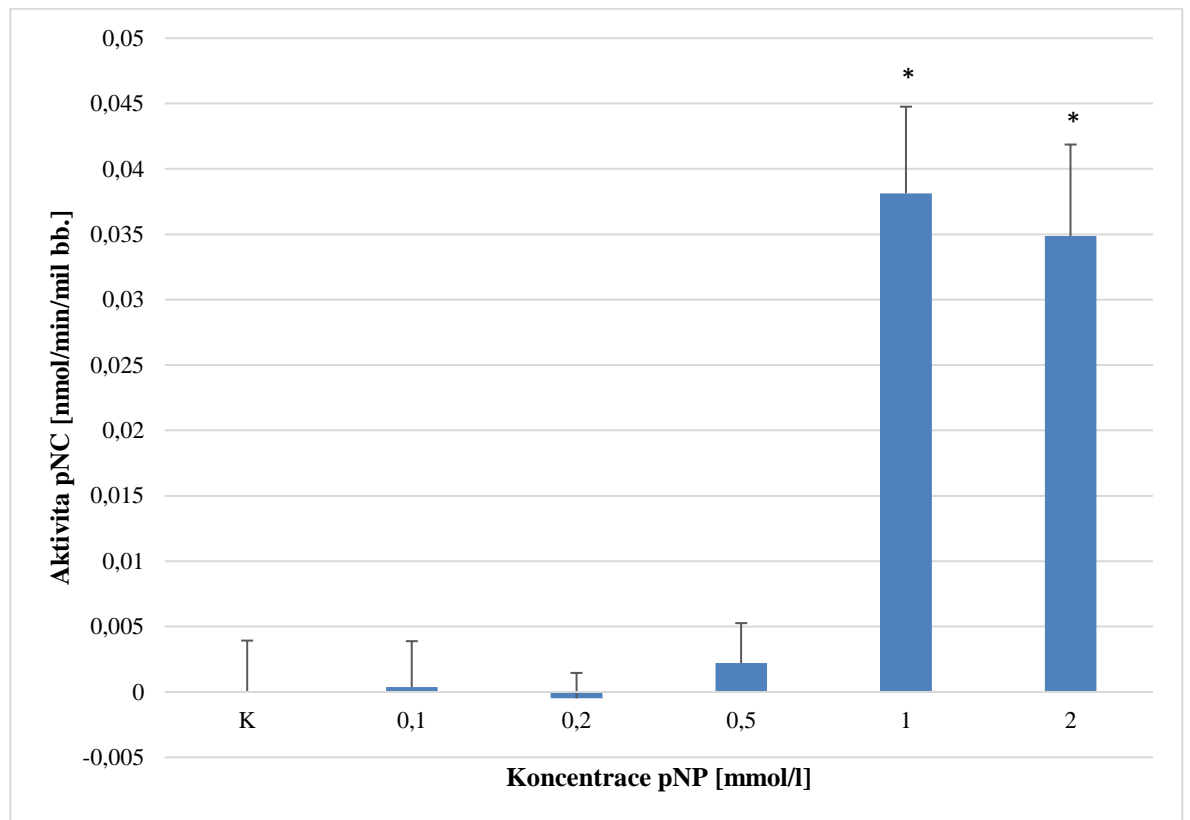
4.4.1 Stanovení vzniku produktu p-nitrokatecholu

Ke stanovení aktivity byla sestrojena kalibrační křivka pNC s koeficientem spolehlivosti $R^2 = 0,999$.



Graf 10: Kalibrační křivka pNC, 0 – 100 μmol/l, $R^2 = 0,999$

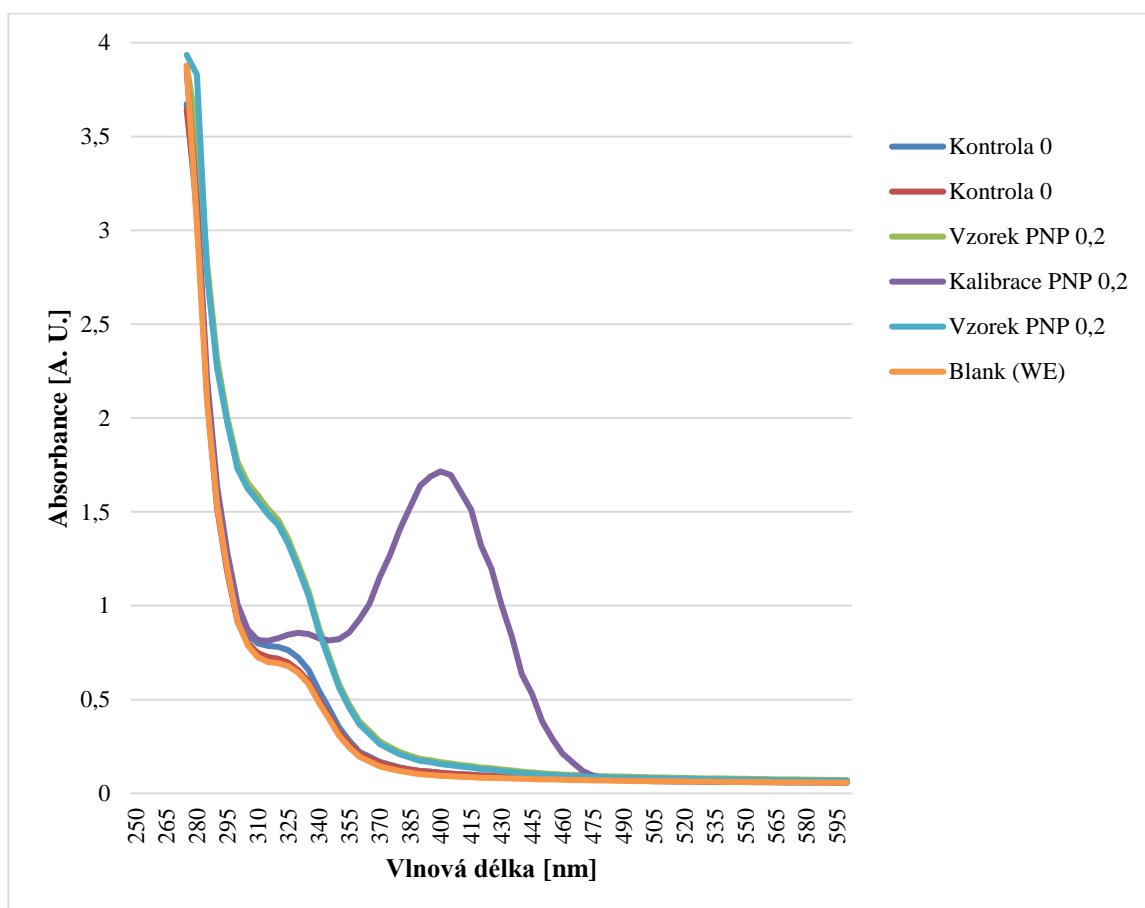
Po vystavení 24h kultivovaných potkaních hepatocytů účinku pNP po dobu 2 h byl pozorován nárůst vzniklého produktu pNC až při koncentraci 1 a 2 mmol/l ($p < 0,05$). Nicméně nárůst koncentrace pNC byl velmi nízký.



Graf 11: Stanovení vzniku produktu pNC – hepatocyty potkana – kultivace 24 h – 2 h expozice pNP (37°C, 5 % CO₂) (nenormální rozdělení; neparametrický test; * $p < 0,05$ vs. K; n = 6)

4.4.2 Interference produktů p-nitrofenolu

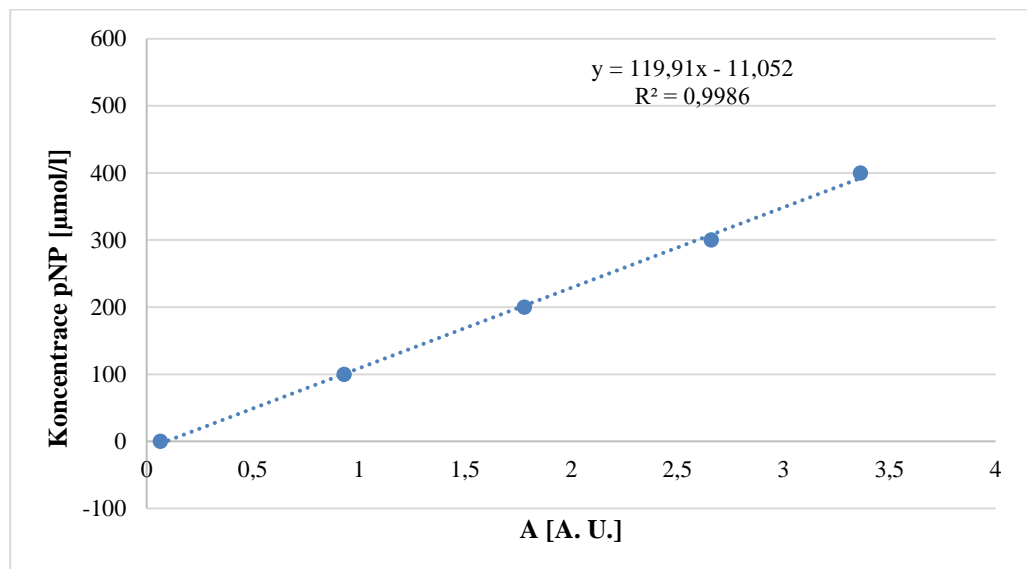
Po proměření absorpčního spektra (250 – 595 nm) na spektrometru Tecan Infinite M200 ve vzorku odebraném od hepatocytů potkana exponovaných 0,2 mM pNP po dobu 2 h (Vzorek 0,2 mM pNP) a jeho porovnání s čistým médiem (Blank) resp. s médiem s 0,2 mM pNP (Kalibrace pNP 0,2) je zřejmé, že pNP se nepřeměňuje pouze na pNC, ale je dále metabolizován na jiné produkty. Z grafu 12 je patrné, že samotný p-nitrofenol (Kalibrace PNP 0,2) maximálně absorbuje při vlnové délce 405 nm. Vzorek média odebraný z hepatocytů exponovaných 0,2 mM pNP vykazuje zvýšenou absorbanci v oblasti vlnové délky 300 – 320 nm, což je nejspíš specifické pro další produkty vznikající metabolismem p-nitrokatecholu. V této oblasti zvýšeně neabsorbují ani samotný pNP, ani samotné kultivační médium. Z grafu je též patrné, že ve vzorku z hepatocytů exponovaných pNP již byla většina pNP přeměněna na produkty, neboť absorbance při 405 nm je obdobná jako u samotného kultivačního média (Blank).



Graf 12: Měření absorpčního spektra kultivačních médií s a bez pNP, které byly, resp. nebyly předtím v kontaktu s hepatocyty; 250 – 595 nm; měření po 5 nm

4.4.3 Stanovení úbytku substrátu p-nitrofenolu v myších hepatocytech

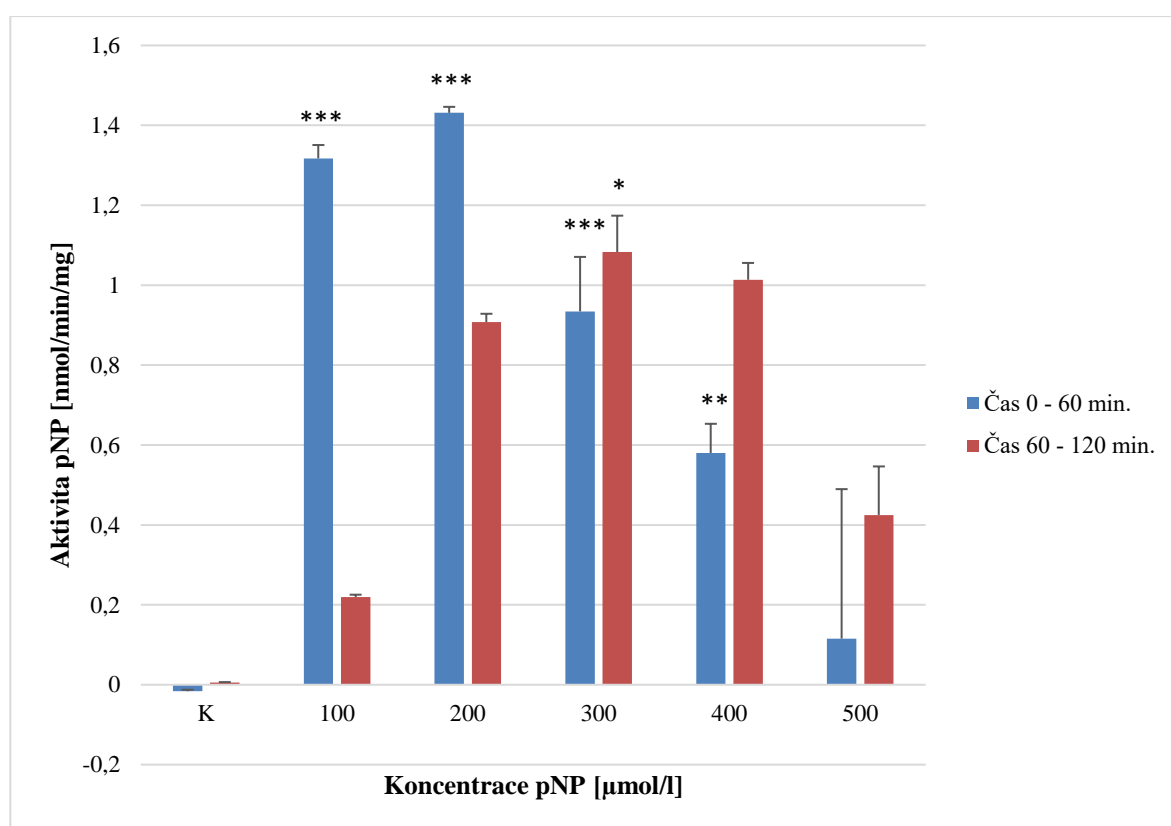
Pro výpočet aktivity byla sestrojena kalibrační křivka pNP s koeficientem spolehlivosti $R^2 = 0,9986$.



Graf 13: Kalibrační křivka pNP, 0 – 400 μmol/l pNP, $R^2 = 0,9986$

Graf 14 znázorňuje úbytek substrátu pNP v čase (min.) vztažený na množství buněčného proteinu (mg) v myších hepatocytech. Po 1 h expozici 2h kultivovaných hepatocytů p-nitrofenolu došlo k nejvyššímu poklesu absorbance při 405 nm při koncentraci pNP 100 a 200 $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0,001$). O něco menší úbytek absorbance byl pozorován při koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0,001$) a 400 $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0,01$). Nejmenší množství substrátu pNP bylo spotřebováno při koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$.

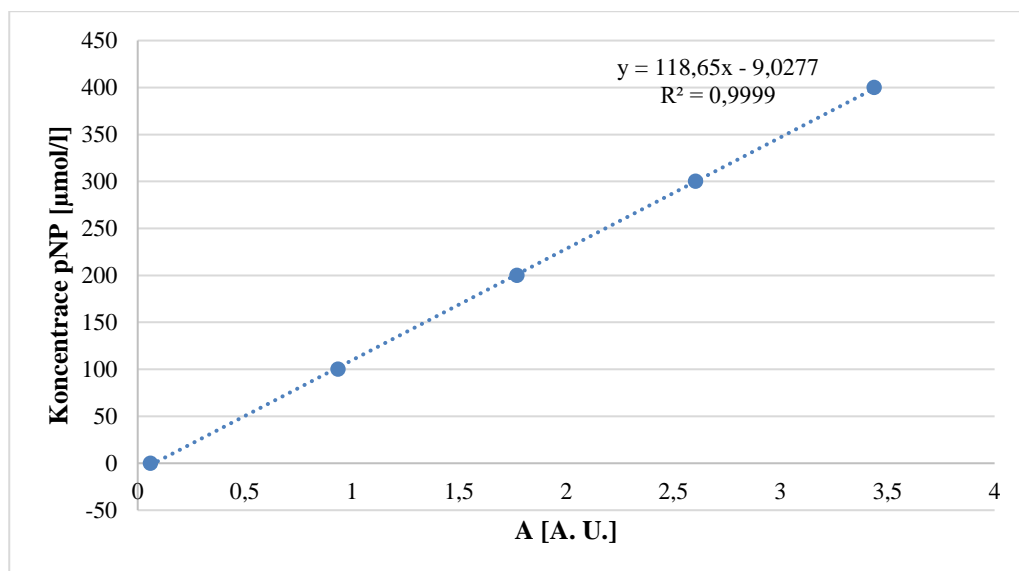
Největší úbytek pNP byl zaznamenán po 2. h expozice hepatocytů pNP při koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0,05$) a nejnižší aktivita byla pozorována již při koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$, což bylo dáno kompletním spotřebováním substrátu.



Graf 14: Stanovení úbytku substrátu pNP ve 2h kultivovaných myších hepatocytech exponovaných pNP po dobu 1 h a 2 h (37°C, 5 % CO₂) (nenormální rozdělení; neparametrický test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. K (resp. 0); $n = 3$)

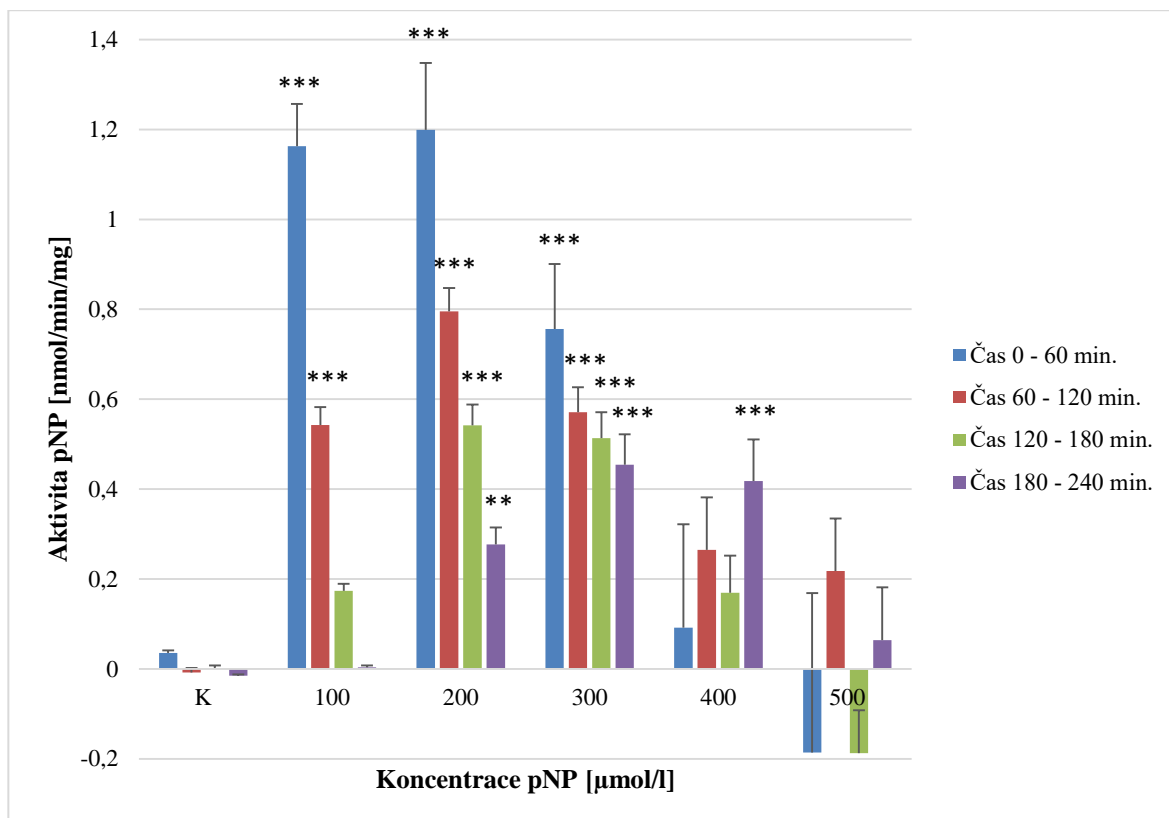
4.4.4 Stanovení úbytku substrátu p-nitrofenolu v potkaních hepatocytech

Stejně jako v kap. 4.3.2 byla pro výpočet aktivity sestrojena kalibrační křivka pNP, zde s koeficientem spolehlivosti $R^2 = 0,9999$.



Graf 15: Kalibrační křivka pNP, 0 – 400 μmol/l pNP, $R^2 = 0,9999$

Graf 16 popisuje úbytek substrátu pNP v čase. Největší aktivita byla zaznamenána po 1 h expozici hepatocytů potkana pNP o koncentraci 100 a 200 $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0,001$), jelikož se zde zmetabolizovalo největší množství substrátu. Naopak nejnižší aktivita byla viditelná u vzorků s pNP o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$, kde bylo metabolizováno velmi malé množství pNP. V dalších časových intervalech pak aktivita klesala.



Graf 16: Stanovení úbytku substrátu pNP v 24h kultivovaných potkaních hepatocytech exponovaných pNP po dobu 1-4 h (37°C , 5 % CO_2) (nenormální rozdělení; neparametrický test; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. K (resp. 0); $n = 12$)

5 DISKUZE

Cytochrom P450 2E1 je enzym patřící do nadrodiny cytochromů P450, který se podílí na metabolismu endogenních (steroidy, vitaminy, mastné kyseliny) a exogenních (léky, karcinogeny, toxiny) chemických látek. CYP2E1 je převážně exprimován v játrech a v menším rozsahu i v plicích. Jednou z metod stanovení aktivity CYP2E1 je měření hydroxylace p-nitrofenolu na p-nitrokatechol. Tato metoda, která byla poprvé uvedena v roce 1975, je velmi rychlá a reakční složky jsou komerčně dostupné v porovnání s jinými metodami. Avšak kvůli prokázané toxicitě p-nitrofenolu bylo důležité nejprve zjistit, od jaké koncentrace působí p-nitrofenol toxicky na primární kultury hepatocytů (Elbarbry, 2006).

Ke stanovení aktivity CYP2E1 v primárních kulturách byly použity hepatocyty potkana kmene Wistar a hepatocyty myši kmene C57B1/6J. K průkazu toxicity p-nitrofenolu byly měřeny aktivity LDH v kultivačním médiu, aktivity buněčných dehydrogenáz (WST-1 test) a sledovány morfologické změny pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem. Pro stanovení aktivity CYP2E1 byla použita metoda hydroxylace p-nitrofenolu na p-nitrokatechol s použitím spektrofotometrického měření vzniklého produktu, resp. úbytku substrátu.

Cílem této práce bylo stanovit aktivitu enzymu CYP2E1 v primárních kulturách hepatocytů potkana a myši, a také zjistit hodnotu koncentrace p-nitrofenolu, která vykazuje toxické účinky na hepatocyty po 1 h a 2 h expozici. Naměřená data byla zpracována v programu Microsoft Excel a dále byla tato data vyhodnocena ve statistickém programu GraphPad Prism 7.

Aktivita LDH po inkubaci hepatocytů potkana a myši s p-nitrofenolem stoupá v závislosti s rostoucí koncentrací p-nitrofenolu. Tento nárůst aktivity znamená únik LDH z hepatocytů a signalizuje tedy poškození buněčné membrány těchto buněk. Princip stanovení aktivity LDH spočívá v měření nárůstu koncentrace vzniklého $\text{NADH} + \text{H}^+$ v reakci, při které LDH katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát.

Po 1 h a 2 h expozici 2h kultivovaných hepatocytů potkana pNP, bylo pozorováno zvýšení aktivity LDH při koncentraci 0,5 mmol/l (Graf 3, Graf 4). K mírnému nárůstu aktivity LDH došlo u 24h kultivovaných hepatocytů potkana po 1 h a 2 h expozici pNP o koncentraci 1 mmol/l a výrazný nárůst byl pozorován při koncentraci pNP 2 mmol/l (Graf 4, Graf 5). V porovnání s myšími hepatocyty bylo tedy prokázáno, že myší hepatocyty vykazují vyšší citlivost k pNP, jelikož nárůst aktivity LDH byl u 2h kultivovaných hepatocytů myši pozorován po 2h expozici pNP o koncentraci 0,4 mmol/l (Graf 1) a u 24h kultivovaných hepatocytů myši byl nárůst aktivity LDH zaznamenán při koncentraci pNP 0,5 mmol/l (Graf 2).

Větší nárůst aktivity LDH byl zaznamenán ihned po přichycení buněk. Možný důvod je nedostatečné přichycení buněk ke kolagenu, ne zcela odeznělý izolační stres či vyšší metabolická aktivita „čerstvých“ hepatocytů. S dobou kultivace dochází k dediferenciaci a poklesu exprese některých biotransformačních enzymů.

Pro určení viability neboli životnosti buněk byl proveden WST-1 test. Pouze aktivní živé buňky jsou schopné redukovat WST-1 činidlo na barevný formazan. Na grafech 7-9 můžeme pozorovat, že s rostoucí koncentrací p-nitrofenolu se aktivity buněčných dehydrogenáz výrazně snižují v důsledku poškození hepatocytů. Výrazný pokles aktivity WST u 24h kultivovaných myších hepatocytů po 2 h expozici pNP byl zaznamenán při koncentraci 0,4 a 0,5 mmol/l, což dokazuje toxický účinek p-nitrofenolu na hepatocyty.

Po 1 h expozici pNP u 24h kultivovaných potkaních hepatocytů došlo k signifikantnímu poklesu aktivity při koncentraci 0,5 mmol/l ($p < 0,001$), ovšem zde nebyl testován vliv pNP o koncentraci 0,3 a 0,4 mmol/l. Nízké aktivity buněčných dehydrogenáz lze pozorovat po expozici pNP s vysokými koncentracemi (1 mmol/l a 2 mmol/l), což potvrzuje přítomnost malého množství živých buněk. Největší pokles aktivity buněčných dehydrogenáz byl zaznamenán po 2 h inkubaci s pNP, což signalizuje, že delší doba působení p-nitrofenolu na hepatocyty má za následek rychlejší odumírání buněk.

Morfologické změny hepatocytů potkana a myši po expozici vybraných koncentrací pNP také prokazují toxický účinek p-nitrofenolu. Pro pozorování buněk byla použita mikroskopie s fázovým kontrastem. V porovnání s kontrolními hepatocyty potkana a myši (Obrázek 24, Obrázek 27, Obrázek 28), které nebyly vystaveny účinku p-nitrofenolu, a tudíž nebyly poškozené (neporušená buněčná membrána, dobře viditelná jádra a polyedrický tvar buněk) je patrné, že čím větší koncentrace p-nitrofenolu na hepatocyty působí, tím větší je viditelné poškození buněk.

Po 2 h expozici hepatocytů myši a potkana 0,5 mM pNP nedošlo k viditelnému morfologickému poškození buněk (Obrázek 26, Obrázek 29). Myší hepatocyty po 2 h expozici 1 mM pNP vykazovaly vysoký stupeň granulace, viditelná kondenzovaná jádra bez viditelných jadérek a poškození buněčné membrány. Morfologické změny hepatocytů potkana také nastaly až po 2 h expozici hepatocytů potkana 1 mM pNP (Obrázek 30), kde bylo viditelné poškození buněčné membrány, vysoký stupeň granulace a přítomnost kondenzovaných jader bez jadérek. Vysoký stupeň poškození buněk byl znatelný po 2 h expozici hepatocytů potkana 2 mM pNP (Obrázek 28). Zde bylo pozorováno vymizení jadérek a výrazné poškození buněčné membrány.

Stanovení aktivity CYP2E1 v primárních kulturách hepatocytů potkana a myši bylo nejprve provedeno měřením vzniku produktu pNC. Vzhledem k problémům při stanovení aktivity CYP2E1, které zahrnovaly především přeměnu pNP na jiné nespecifické produkty, byla zvolena další spektrofotometrická metoda, a to měření úbytku substrátu pNP v čase.

Graf 11 popisuje vznik produktu pNC po 2 h expozici potkaních hepatocytů p-nitrofenolem, avšak je zde zaznamenán velmi nízký nárůst koncentrace vzniklého pNC. Zjištění tak nízké koncentrace p-nitrokatecholu by mohlo znamenat buď velmi nízkou (téměř nulovou) aktivitu CYP2E1 nebo vznikají další produkty s absorpčním maximem v jiné vlnové oblasti. Navíc aktivita enzymu CYP2E1 by byla dle výsledků pNC největší při koncentraci pNP 1 a 2 mmol/l, které jsou ovšem toxické a způsobují signifikantní poškození hepatocytů v primární kultuře. Nárůst absorbance pNC u těchto toxických koncentrací pNP by mohl být způsoben právě zmiňovanou toxicitou. Alespoň částečná aktivita mikrosomálních systémů (CYP2E1) by mohla přetrvávat i za těchto podmínek, ale další biotransformační systémy by již mohly být inaktivovány úplně (např. ty, které jsou zodpovědné za další metabolismus pNC).

Velmi nízký nárůst produktu pNC vysvětlujeme dalším metabolismem pNC. Na grafu 12 je zřejmé, že samotný p-nitrofenol vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 405 nm (Kalibrace pNP 0,2), avšak vzorky s pNP 0,2 mmol/l vykazují interferenci v rozmezí 300-320 nm. Pravděpodobně se jedná o stav, kdy zbylé živé buňky metabolizují p-nitrofenol na další produkty, které právě v tomto rozmezí vlnových délek interferují. Schéma metabolismu p-nitrofenolu, které zpracoval G. P. Moss (Moss, 2006) popisuje reakce přeměny p-nitrofenolu na 1,4-benzoquinone a dále na hydroquinone. Po dohledání maximální absorpce těchto sloučenin bylo zřejmé, že se pravděpodobně jedná právě o tyto látky, jelikož 1,4-benzoquinone absorbuje při vlnové délce 300 nm a hydroquinone při 290 až 300 nm.

Přesnější výsledky nám tedy poskytla spektrofotometrická metoda stanovení úbytku substrátu pNP v čase (min.) na množství buněčného proteinu (mg). Nejvyšší nárůst aktivity CYP2E1 byl pozorován po 1 h kultivaci myších hepatocytů při koncentraci pNP 100 a 200 $\mu\text{mol/l}$ (Graf 14). Z grafu je patrné, že většina 100 $\mu\text{mol/l}$ pNP se zmetabolizoval již za první hodinu, proto po 2. h expozice (60-120 min.) nebyl zaznamenán tak výrazný úbytek pNP jak za 1 h. Po 2 h kultivaci byla aktivita enzymu vyšší u koncentrací 300 a 400 $\mu\text{mol/l}$. Tím lze dokázat, že čím menší koncentrace substrátu, tím rychleji dochází k přeměně na produkt. Nejnižší aktivita byla zaznamenána při koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$, jelikož tato koncentrace vykazuje toxické působení na hepatocyty.

V porovnání s potkaními hepatocyty je aktivita CYP2E1 o trochu vyšší v myších hepatocytech. Celkově je aktivita cytochromů P450 vyšší u myši, ve studii (Martignoni, 2006) je zaznamenána také vyšší aktivita cytochromu P450 u myši v porovnání s potkanem, avšak zde byla stanovena aktivita enzymu CYP3A. Na grafu 16 popisujícím úbytek substrátu pNP v potkaních hepatocytech v průběhu 4 hodin lze pozorovat nejvyšší aktivitu při koncentraci pNP 100 a 200 $\mu\text{mol/l}$, stejně jako v myších hepatocytech, avšak hodnoty jsou o mnoho nižší. I na tomto grafu je zřejmé, že s délkou expozice stanovená aktivita enzymu klesá, neboť se všechny substrát zmetabolizuje již za první hodinu. Ovšem při koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$ je aktivita enzymu největší po 4 h expozici pNP. Opět nejnižší aktivita byla zaznamenána při koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$, a to kvůli toxickému účinku.

Studie (Elbarbry, 2006) uvádí, že ačkoliv mnoho laboratoří využívá metodu spektrofotometrického stanovení produktu p-nitrokatecholu, analytická citlivost a možná interference ostatních fenolových sloučenin omezuje účinnost této spektrofotometrické metody. Právě nízká analytická citlivost vyžaduje vyšší koncentrace mikrosomálních proteinů k zajištění měřitelné hladiny produktu p-nitrokatecholu. V důsledku toho nedoporučují tuto metodu k měření aktivity CYP2E1 v jaterních tkáních, jelikož je zde aktivita CYP2E1 nízká a zdroje tkání jsou limitující. Naproti tomu uvádí, že metoda HPLC s UV detekcí vykazuje oproti spektrofotometrické metodě vyšší citlivost (téměř 20krát), avšak je zdlouhavá a vyžaduje pracné a časově náročné extrakce reakční směsi a vypařování vzorku, což může vést ke vzniku chyb.

Metoda HPLC ke stanovení aktivity CYP2E1 v mikrosomech založená na použití chlorzoxanonu jako substrátu byla poprvé publikována v roce 1989 (Peter, 1989). Tato metoda byla cca 10krát více citlivá než metoda hydroxylace pNP. Přesnější výsledky pro stanovení aktivity CYP2E1 by bylo možné získat právě metodou HPLC, nicméně naše laboratoř k tomuto stanovení bohužel nemá k dispozici vybavení.

Ke stanovení aktivity CYP2E1 lze také místo p-nitrofenolu použít jiné substráty. Například kinetické měření anilinu, který se metabolizuje na 4-aminofenol a dále na indofenol, jehož konečnou koncentraci lze stanovit pomocí HPLC s detekcí absorbance při 630 nm (Hartman, 2015) nebo hydroxylaci chlorzoxanonu na méně toxický 6-hydroxychlorzoxanon, který lze také detekovat pomocí HPLC (Duescher, 1993).

Pro stanovení aktivity CYP2E1 lze také kromě primárních kultur hepatocytů využít lidské buněčné linie HEP-G2 (human hepatocellular carcinoma neboli lidské jaterní nádorové buňky).

Tyto buňky jsou často používány jako model hepatocytů pro širokou škálu metabolických studií. Nicméně buňky HEP-G2 nejsou považovány za vhodný model pro studie týkající se funkce hepatocytů, které jsou spojeny s metabolickými procesy souvisejícími s oxidací etanolu, jelikož *in vitro* bylo u buněk HEP-G2 prokázáno, že ztrácejí většinu své schopnosti exprimovat enzymaticky aktivní molekuly CYP2E1 (Balusikova, 2013).

6 ZÁVĚR

Toxicita pNP byla stanovena na základě aktivity LDH, WST-1 testu a stanovením morfologických změn hepatocytů potkana a myši. Toxický vliv pNP na hepatocyty myši byl prokázán od koncentrace pNP 0,4 mmol/l (LDH, WST-1) a na hepatocyty potkana byl prokázán od koncentrace 0,5 mmol/l (LDH, WST-1). Změny v morfologii hepatocytů potkana a myši nám poskytly informace, že na buňky působí toxicky pNP od koncentrace 1 mmol/l.

Aktivitu CYP2E1 jsme se nejprve pokusili stanovit spektrofotometricky měřením vzniku produktu pNC v hepatocytech myši a potkana. Při měření tohoto produktu byly výsledky pravděpodobně ovlivněny dalším metabolismem pNC na blíže nespecifikované produkty. Proto jsme přešli k spektrofotometrickému stanovení úbytku substrátu pNP, které nám poskytlo přesnější výsledky. Hepatocyty myši i potkana vykazovaly největší aktivitu při koncentraci pNP 100 a 200 $\mu\text{mol/l}$. Tyto koncentrace lze tedy považovat za optimální pro stanovení aktivity CYP2E1. Je třeba však zdůraznit, že je nutné měřit v čase 30 min. nebo 1 h, jelikož při delším měření (po 2 h) je již pro stanovení nedostatek substrátu. Nejnižší aktivita byla zaznamenána při koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$, což vysvětluje již zmíněný toxický účinek pNP. Porovnáním výsledných grafů bylo patrné, že aktivita CYP2E1 je vyšší u myši než u potkanů.

Závěrem lze říci, že metoda hydroxylace p-nitrofenolu na p-nitrokatechol se zdá být velmi rychlou metodou ke stanovení aktivity CYP2E1, nicméně pro spektrofotometrickém stanovení je třeba mít k dispozici větší množství buněk. Pro přesnější stanovení aktivity by bylo lepší využít například metodu HPLC.

POUŽITÁ LITERATURA

AALTO SCIENTIFIC, LTD. Lactate Dehydrogenase (Lactic Dehydrogenase/LDH/LD) [online]. [cit. 2017-1-10]. Dostupné z: <https://www.aaltoscientific.com/product/lactate-dehydrogenase/>

ALLIS J. W., ROBINSON B. L. A kinetic assay for p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes. *Analytical biochemistry*, 1994, **219** (1): 49-52.

AUBERT J., BEGRICHE K., KNOCKAERT L., ROBIN M. A., FROMENTY B. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanism and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2011, **35**: 630-637.

BACHMANN A., MOLL M., BURKHARDT B., GOTTWALD E. 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays*, 2015, **4** (1): 64-83.

BALUSIKOVA K. KOVAR J. Alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 can be induced by long-term exposure to ethanol in cultured liver HEP-G2 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2013, **49** (8): 619-625.

BERG J. M., TYMOCZKO J. L., STRYER L. Enzymes Can. Be Inhibited by Specific Molecules. *Biochemistry, 5th edition, New York*, 2002.

BHANUSHALI M., BAGALE V., SHIRODE A., JOSHI Y., KADAM V. An in-vitro toxicity testing - a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals, *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 2010, **1** (1): 15-31.

BISSWANGER H. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 2014, **1** (1): 41-55.

BOUSSERY K., BELPAIRE F. M., VAN DE VOORDE J. Physiological Aspects Determining the Pharmacokinetics Properties of drugs. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 2015, **23**: 539-559.

CEDERBAUM I. A. Methodology to assay CYP2E1 mixed function oxidase catalytic activity and its induction. *Redox Biology*, 2014, **2**: 1048-1054.

CEDERBAUM I. A. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biology*, 2015, **4**: 60-73.

COLLOM S. L., et al. CYP2E1 substrate inhibition. Mechanistic interpretation through an effector site for monocyclic compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288** (45): 32640-32640.

COON M. J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2005, **45**: 1-25.

ČERVINKOVÁ Z. Metabolismus a játra. *Sanquis: odborný a společenský časopis pro lékaře*, 2005, (40): 14-16.

DE BRUYN T., CHATTERJEE S., FATTAH S., KEEMINK J. Sandwich-cultured hepatocytes: utility for in vitro exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2013, **9** (5): 589-616.

DERDA R. TANG S. K., LAROMAINE A., MOSADEGH B. Multizone paper platform for 3D cell cultures. 2011.

DITTMER A., DITTMER J. β -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis*, 2006, **27** (14): 2844-2845.

DUESCHER R. J., ELFARRA A. A. Determination of p-nitrophenol hydroxylase activity of rat liver microsomes by high-pressure liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 1993, **212** (2): 311-314.

EHRMANN J., HŮLEK P. Hepatologie, 2. vydání. *Praha: Grada Publishing, a.s.*, 2014, 658 s. ISBN 978-80-247-5510-6.

EISENTHAL R., DANSON M. J. Enzyme assays: a practical approach. *Oxford university press*, 2002.

ELBARBRY F., WILBY K., ALCORN J. Validation of a HPLC method for the determination of p-nitrophenol hydroxylase activity in rat hepatic microsomes. *Journal of Chromatography B*, 2006, **834** (1): 199-203.

EL-YASSIN D. H. Enzymes assay. [online]. [cit. 2015-11-15] Dostupné z: [http://www.comed.uobaghdad.edu.iq/uploads/Lectures/Biochemistry/biochemistry%202012-2013/dr.%20hadaf/6Enzyme%20Assay2012%20\(%D8%A7%D9%84%D9%85%D8%AD%D8%A7%D8%B6%D8%B1%D9%87%20%D8%A7%D9%84%D8%B3%D8%A7%D8%AF%D8%B3%D9%87\).pdf](http://www.comed.uobaghdad.edu.iq/uploads/Lectures/Biochemistry/biochemistry%202012-2013/dr.%20hadaf/6Enzyme%20Assay2012%20(%D8%A7%D9%84%D9%85%D8%AD%D8%A7%D8%B6%D8%B1%D9%87%20%D8%A7%D9%84%D8%B3%D8%A7%D8%AF%D8%B3%D9%87).pdf)

- GARTE S., GASPARI L., ALEXANDRIE A. K., AMBROSONE C., AUTRUP H.** Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2001, **10** (12): 1239-1248.
- GIRRE C., LUCAS D., HISPARD E.** Assessment of cytochrome P4502E1 induction in alcoholic patients by chlorzoxazone pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, 1994, **47** (9): 1503-1508.
- GONZALEZ F. J.** Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2005, **569** (1): 101-110.
- GRIESHABER D., MACKENZIE R., VOEROES J., REIMHULT E.** Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 2008, **8** (3): 1400-1458.
- GRONEBERG D. A., GROSSE-SIESTRUP CH., FISCHER A.** In vitro models to study hepatotoxicity. *Toxicologic pathology*, 2002, **30** (3): 394-399.
- GROVES J. T.** Cytochrome P450 enzymes: understanding the biochemical hieroglyphs. *F1000 Research*, 2015, 4.
- GUILLOUZO A.** Liver cell models in in vitro toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 1998, **106** (2): 511.
- HARTMAN J. H., MARTIN H. C., CARO A. A., PEARCE A. R., MILLER G. P.** Subcellular localization of rat CYP2E1 impacts metabolic efficiency toward common substrates. *Toxicology*, 2015, **338**: 47-58.
- HOFFMANN M. F., PREISSNER S. C., NICKEL J., DUNKEL M., PREISSNER R., PREISSNER S.** The Transformer database: biotransformation of xenobiotics. *Nucleic acids research*, 2014, **42** (D1): D1113-D1117.
- HU Y., OSCARSON M., JOHANSSON I., YUE Q. Y., DAHL M. L.** Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles. *Molecular Pharmacology*, 1997, **51** (3): 370-376.
- CHANG T. K., CRESPI C. L., WAXMAN D. J.** Spectrophotometric analysis of human CYP2E1-catalyzed p-nitrophenol hydroxylation. *Cytochrome P450 Protocols*. Humana Press, 2006, 127-131.

- CHOW A. Y.** Cell cycle control by oncogenes and tumor suppressors: driving the transformation of normal cells into cancerous cells. *Nature Education*, 2010, **3** (7).
- CHRASIL J., WILSON J. T.** 4-Nitrocatechol production from rho-nitrophenol by rat liver. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1975, **193** (2): 631-638.
- JOHNSON K. A., GOODY R. S.** The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. *Biochemistry*, 2011, **50** (39): 8264-8269.
- KLINGENBERG M.** Pigments of rat liver microsomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1958, **75** (2): 376-386.
- KNEJZLÍK Z., KÁŠ J., RUML T.** Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické listy*, 2000, **94**: 913-918.
- KOČÁREK E.** Genetika, 2. vydání. *Praha: Scientia*, 2008. 212 s. ISBN 978-80-86960-36-4
- KOOP D. R.** Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P450 isozyme 3a. *Molecular Pharmacology*, 1986, **29** (4): 399-404.
- KRAUSE P., SAGHATOLISLAM F., KOENIG S.** Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2009, **45** (5-6): 205-212.
- KRISSINEL E., HENRICK K.** Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2004, **60** (12): 2256-2268.
- KUPIEC T.** Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography. *International journal of pharmaceutical compounding*, 2004, **8**: 223-227.
- LABGUIDE.** Western blot. [online]. [cit. 2017-02-24] Dostupné z: <http://labguide.cz/protokoly/western-blot/>
- LECLUYSE E. L.** Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, **13** (4): 343-368.
- LEUNG T. M., NIETO N.** CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 2013, **58** (2): 395-398.
- LIEBER C. S., DECARLI L. M.** Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptive increase after ethanol feeding. *Science*, 1968, **162**(3856): 917-918.

- LIEBER C. S.** Microsomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS): The First 30 Years (1968-1998) - A Review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1999, **23**(6): 991-1007.
- LIEBER C. S.** CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatology research*, 2004, **28**(1): 1-11.
- LIN R., CHANG H.** Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology journal*, 2008, **3** (9-10): 1172-1184.
- LU Y., CEDERBAUM A. I.** CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008, **44** (5): 723-738.
- MAHLI A., THASLER W. E., PATSENKER E., MÜLLER, S.** Identification of cytochrome CYP2E1 as critical mediator of synergistic effects of alcohol and cellular lipid accumulation in hepatocytes in vitro. *Oncotarget*, 2015, **6** (39): 41464.
- MARTIGNONI M., GROOTHUIS G., DE KANTER R.** Comparison of mouse and rat cytochrome P450-mediated metabolism in liver and intestine. *Drug metabolism and disposition*, 2006, **34** (6): 1047-1054.
- MARTINEZ M. N., AMIDON G. L.** A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2002, **42** (6): 620-643.
- MENG Q.** Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2010, **6** (6): 733-746.
- MESTRES J.** Structure conservation in cytochromes P450. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2005, **58** (3): 596-609.
- MIN W.** When does the Michaelis-Menten equation hold for fluctuating enzymes? *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110** (41): 20093-20097.
- MONTELLANO DE O.** Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.*, 2010, **110** (2): 932-948.
- MOSS G. P.** Enzyme nomenclature – recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyse. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)*. Department of Chemistry, Queen Mary University of London. [online]. [cit. 2017-04-03] Dostupné z: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html> (2006).

NEBERT D. W., ADESNIK M., COON M. J., ESTABROOK R. W., GONZALEZ F.J., GUENGERICH F. P. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *Dna*, 1987, **6** (1): 1-11.

NEBERT W. D., WIKVALL K., MILLER L. W. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013, **368** (1612): 20120431

NIES A. T., KEPPLER D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2007, **453** (5): 643-659.

OGU C. C., MAXA J. L. Drug interactions due to cytochrome P450. *Baylor University Medical Center. Proceedings*. Baylor University Medical Center, 2000, **421**.

OLYMPUS MICROSCOPY RESOURCE CENTER. Phase Contrast Microscopy. *Olympus America Inc.*, 2012, [online]. [cit. 2017-02-16] Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/phasecontrast/phaseindex.html>

PAGE H., FLOOD P., REYNAUD E. G. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell and tissue research*, 2013, **352** (1): 123-131.

PARKINSON A., OGILVIE B. Biotransformation of xenobiotics. Casarett and Doull's Toxicology: *The Basic Science of Poisons*, 2008, **7**: 161-304.

PAVELKA S. Development of radiometric methods for the determination of enzyme activities of iodothyronine deiodinases. Effect of the antidepressant fluoxetine on type 1, 2 and 3 deiodinase activities in the rat brain. *Ústav biochemie, přírodovědecká fakulta MU, Brno*, 2010.

PETER R., BOECKER R., BEAUNE P. H., IWASAKI M., GUENGERICH F. P., YANG C. S. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450III_{E1}. *Chemical research in toxicology*, 1989, **3** (6): 566-573.

PETŘEK, M., OTYEPKA M., BANÁŠ P., KOŠINOVÁ P., KOČA J., DAMBORSKÝ J. CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC bioinformatics*, 2006, **7** (1): 316.

PORUBSKY P. R., MENEELY K. M., SCOTT E. E. Structures of human cytochrome P450 2E1 insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283** (48): 33698-33707.

- PREISSNER S. C. HOFFMANN M. F., PREISSNER R., DUNKEL M., GEWIESS A.** Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PloS one*, 2013, **8** (12): e82562.
- PUBCHEM COMPOUND DATABASE.** 4-Nitrocatechol. *National Center for Biotechnology Information*, [online]. [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3505109#section=Top>
- REINKE L. A., MOYER M. J.** P-Nitrophenol Hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metabolism and Disposition: The biological Fate of Chemicals*, 1985, **13** (5): 548-552
- REPROCELL EUROPE LDT.** Comparison of primary rat hepatocytes structure between conventional 2D cell culture and 3D cell culture using alvetex scaffold. [online]. [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <http://reinnervate.com/alvetex/about-alvetex/what-is-alvetex/>
- ROBIN M. A., SAUVAGE I., GRANDPERRET T., DESCATOIRE V., PESSAYRE D.** Ethanol increases mitochondrial cytochrome P450 2E1 in mouse liver and rat hepatocytes. *FEBS letters*, 2005, **579** (30): 6895-6902.
- ROSSOMANDO E. F.** Measurement of enzyme activity. *Methods in Enzymology*, 1990, **182**: 38-49.
- SAITO C., ZWINGMANN C., JAESCHKE H.** Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology*, 2010, **51** (1): 246-254.
- SCOPES R. K.** Enzyme activity and assays. *Encyclopedia of life sciences*, 2002.
- SHEN L., HILLEBRAND A., WANG D. Q-H. LIU M.** Isolation and primary culture of rat hepatic cells. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2012, **64**.
- SLANAŘ O.** Genetický polymorfismus metabolismu léčiv. *Postgraduální medicína*, 2002, **4** (3), 324-330.
- SOLDATOW, V. Y., LeCLUYSE L. E., GRIFFITH G. L., RUSYN I.** In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicology research*, 2013, **2** (1): 23-39.
- SULLIVAN J. B., KRIEGER G. R.** Clinical environmental health and toxic exposures. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2001, 54-62

- TANG K., LI X., XING Q., LI W., FENG G., HE L., QIN S.** Genetic polymorphism analysis of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in Chinese Han populations from four different geographic areas of Mainland China. *Genomics*, 2010, **95** (4): 224-229.
- TOTHOVA J., SADECKA J.** Principles and Applications of Synchronous Fluorescence in Multicomponent Analysis. *CHEMICKE LISTY*, 2010, **104** (8): 778-783.
- U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE.** Toxicological Profile for Nitrophenols, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 1992.
- VAN DE WIER B., BALK M. J., BAST A., KOEK H. G., HAENEN M. M. R. G.** Chemical characteristics for optimizing CYP2E1 inhibition. *Chemico-biological interactions*, 2015, **242**: 139-144.
- VODRÁŽKA Z., RAUCH P., KÁŠ J.** Enzymologie. 2. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991, 245 s. ISBN 80-7080-124-7
- WATERS: THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.** HPLC (High Performance Liquid Chromatography) [online]. [cit. 2016-12-17]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ
- WILLIAMS J. A., HYLAND R., JONES B. C.** Drug-drug interaction for UDP-glucuronosyltransferase substrates: A pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCI/AUC) ratios. *Drug metabolism and Disposition*, 2004, **32** (11): 1201-1208.
- XIA C., PANDA S. P., MAROHNIC C. C.** Structural basic for human NADPH.cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, **108** (33): 13486-13491.
- XIE X. S.** Enzyme kinetics, past and present. *Science*, 2013, **342** (6165): 1457-1459.
- XIE Y., MCGILL M. R., DORKO K.** Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 2014, **279** (3): 266-274.
- YIN L. M., WEI Y., WANG Y., XU Y. D., YANG Y. Q.** Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *Int J Med Sci*, 2013, **10** (1): 68-72.
- ZANGER U. M.** Cytochrome P450 in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 2013, **138**: 103-141.

ZHANG D., SURAPANENI S. *ADME-enabling technologies in drug design and development.* John Wiley & Sons, 2012.

PŘÍLOHY

PŘÍLOHA A

Souhrn údajů pro testy LDH (měřena aktivita LDH), WST-1 (měřena delta absorbance) v myších hepatocytech (n – počet měření, AVG – aritmetický průměr, STD – směrodatná odchylka)

LDH t = 2h, 2h	n	AVG	STD	LDH t = 2h, 24h	n	AVG	STD
Kontrola	3	275,16	7,01	Kontrola	3	96,82	14,88
pNP 0,1 mmol/l	3	249,64	43,05	pNP 0,1 mmol/l	3	104,56	18,36
pNP 0,2 mmol/l	3	237,57	10,57	pNP 0,2 mmol/l	3	96,05	16,03
pNP 0,3 mmol/l	3	331,07	38,80	pNP 0,3 mmol/l	3	118,01	5,59
pNP 0,4 mmol/l	3	497,19	59,71	pNP 0,4 mmol/l	3	127,29	10,44
pNP 0,5 mmol/l	3	573,67	79,57	pNP 0,5 mmol/l	3	165,42	17,42

WST t = 60min, 2h, 24h	n	AVG	STD
Kontrola	8	0,755275	0,188363
pNP 0,1 mmol/l	8	0,82025	0,212029
pNP 0,2 mmol/l	8	0,680875	0,146945
pNP 0,3 mmol/l	8	0,4028	0,100982
pNP 0,4 mmol/l	8	0,020538	0,004844
pNP 0,5 mmol/l	8	0,0137	0,003357

Údaje pro stanovení aktivity CYP2E1 (měřen úbytek substrátu pNP v čase) v myších hepatocytech (n – počet měření, AVG – aritmetický průměr, STD – směrodatná odchylka)

pNP čas 1h	n	AVG	STD	pNP čas 2h	n	AVG	STD
Kontrola	3	-0,01614	0,003602	Kontrola	3	0,005421	0,001162
pNP 100 μ mol/l	3	1,317365	0,033455	pNP 100 μ mol/l	3	0,219657	0,005703
pNP 200 μ mol/l	3	1,431296	0,015064	pNP 200 μ mol/l	3	0,907625	0,020794
pNP 300 μ mol/l	3	0,934315	0,13646	pNP 300 μ mol/l	3	1,082977	0,091029
pNP 400 μ mol/l	3	0,580073	0,073047	pNP 400 μ mol/l	3	1,013588	0,04207
pNP 500 μ mol/l	3	0,115541	0,374028	pNP 500 μ mol/l	3	0,424924	0,121474

PŘÍLOHA B

Souhrn údajů pro testy LDH (měřena aktivita LDH), WST-1 (měřena delta absorbance) v potkaních hepatocytech (n – počet měření, AVG – aritmetický průměr, STD – směrodatná odchylka)

LDH t = 1h, 2h	n	AVG	STD	LDH t = 2h, 2h	n	AVG	STD
Kontrola	6	371,2	53,19418	Kontrola	6	420,6	57,90156
pNP 0,1 mmol/l	6	377,0	51,9574	pNP 0,1 mmol/l	6	420,4	45,10341
pNP 0,2 mmol/l	6	431,8	67,41007	pNP 0,2 mmol/l	6	473,8	38,00871
pNP 0,5 mmol/l	6	545,0	57,75573	pNP 0,5 mmol/l	6	735,4	96,36379
pNP 1 mmol/l	6	648,4	66,49744	pNP 1 mmol/l	6	1217,2	91,50608
pNP 2 mmol/l	6	706,8	55,88711	pNP 2 mmol/l	6	1335,7	141,8192

LDH t = 1h, 24h	n	AVG	STD	LDH t = 2h, 24h	n	AVG	STD
Kontrola	6	129,9	22,03431	Kontrola	6	165,5	29,67555
pNP 0,1 mmol/l	6	138,1	25,21678	pNP 0,1 mmol/l	6	163,8	29,83602
pNP 0,2 mmol/l	6	139,7	25,81961	pNP 0,2 mmol/l	6	184,1	72,89161
pNP 0,5 mmol/l	6	151,2	18,94206	pNP 0,5 mmol/l	6	232,1	52,35568
pNP 1 mmol/l	6	174,0	10,12257	pNP 1 mmol/l	6	419,4	72,47131
pNP 2 mmol/l	6	225,7	10,23495	pNP 2 mmol/l	6	843,9	54,06654

WST t = 60min, 1h, 24h	n	AVG	STD	WST t = 120min, 1h, 24h	n	AVG	STD
Kontrola	8	0,145439	0,055775	Kontrola	8	0,423837	0,155343
pNP 0,025 mmol/l	8	0,161602	0,03731	pNP 0,025 mmol/l	8	0,4939	0,111254
pNP 0,05 mmol/l	8	0,140701	0,043267	pNP 0,05 mmol/l	8	0,444587	0,095088
pNP 0,1 mmol/l	8	0,139239	0,048531	pNP 0,1 mmol/l	8	0,431262	0,113708
pNP 0,2 mmol/l	8	0,105939	0,035639	pNP 0,2 mmol/l	8	0,346025	0,117929
pNP 0,5 mmol/l	8	0,055126	0,007363	pNP 0,5 mmol/l	8	0,145187	0,043315
pNP 1 mmol/l	8	0,044152	0,006291	pNP 1 mmol/l	8	0,071087	0,011024
pNP 2 mmol/l	8	0,043552	0,003904	pNP 2 mmol/l	8	0,06465	0,006304

WST t = 60min, 2h, 24h	n	AVG	STD	WST t = 120min, 2h, 24h	n	AVG	STD
Kontrola	8	0,339394	0,039135	Kontrola	8	0,948162	0,091064
pNP 0,025 mmol/l	8	0,365657	0,073103	pNP 0,025 mmol/l	8	1,118637	0,163044
pNP 0,05 mmol/l	8	0,336019	0,058297	pNP 0,05 mmol/l	8	1,11225	0,251459
pNP 0,1 mmol/l	8	0,396257	0,211174	pNP 0,1 mmol/l	8	1,148687	0,38568
pNP 0,2 mmol/l	8	0,239544	0,102965	pNP 0,2 mmol/l	8	0,746287	0,271543
pNP 0,5 mmol/l	8	0,036832	0,004705	pNP 0,5 mmol/l	8	0,073737	0,010241
pNP 1 mmol/l	8	0,038995	0,009165	pNP 1 mmol/l	8	0,08755	0,015186
pNP 2 mmol/l	8	0,022469	0,013769	pNP 2 mmol/l	8	0,063062	0,013626

Údaje pro stanovení aktivity CYP2E1 (měřen úbytek substrátu pNP v čase) v potkaních hepatocytech (n – počet měření, AVG – aritmetický průměr, STD – směrodatná odchylka)

pNP čas 1h	n	AVG	STD	pNP čas 2h	n	AVG	STD
Kontrola	12	0,03578	0,00531	Kontrola	12	-0,00796	0,01013
pNP 100 μ mol/l	12	1,16254	0,094157	pNP 100 μ mol/l	12	0,542674	0,03965
pNP 200 μ mol/l	12	1,199393	0,148588	pNP 200 μ mol/l	12	0,795214	0,052283
pNP 300 μ mol/l	12	0,756347	0,144434	pNP 300 μ mol/l	12	0,571125	0,055205
pNP 400 μ mol/l	12	0,09167	0,229708	pNP 400 μ mol/l	12	0,264721	0,116514
pNP 500 μ mol/l	12	-0,1863	0,354794	pNP 500 μ mol/l	12	0,217523	0,117011

pNP čas 3h	n	AVG	STD	pNP čas 4h	n	AVG	STD
Kontrola	12	0,000876	0,006775	Kontrola	12	-0,01491	0,002334
pNP 100 μ mol/l	12	0,173907	0,015492	pNP 100 μ mol/l	12	0,003335	0,004405
pNP 200 μ mol/l	12	0,541557	0,046519	pNP 200 μ mol/l	12	0,276937	0,037662
pNP 300 μ mol/l	12	0,51322	0,057505	pNP 300 μ mol/l	12	0,454016	0,067602
pNP 400 μ mol/l	12	0,169173	0,082748	pNP 400 μ mol/l	12	0,418184	0,092007
pNP 500 μ mol/l	12	-0,18761	0,095882	pNP 500 μ mol/l	12	0,06408	0,117079

Údaje pro stanovení aktivity CYP2E1 (měřen vznik produktu pNC v čase) v potkaních hepatocytech (n – počet měření, AVG – aritmetický průměr, STD – směrodatná odchylka)

pNC čas 2h	n	AVG	STD
Kontrola	6	-0,0000235	0,0039542
pNP 0,1 mmol/l	6	0,000371	0,003514
pNP 0,2 mmol/l	6	-0,00049	0,001948
pNP 0,5 mmol/l	6	0,002202	0,003063
pNP 1 mmol/l	6	0,038134	0,006624
pNP 2 mmol/l	6	0,034867	0,006996